

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

**Produção e Composição dos Polissacarídeos Extracelulares de *Planktothrix*  
*agardhii* (Cyanobacteria) e suas Relações com bactérias no reservatório de Barra**

**Bonita**

FABRÍCIO SEBASTIANI MECCHERI

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  
2010

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

M486pc

Meccheri, Fabricio Sebastiani.

Produção e composição dos polissacarídeos extracelulares de *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) e suas relações com bactérias no reservatório de Barra Bonita / Fabricio Sebastiani Meccheri. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

48 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Recursos naturais. 2. Polissacarídeos extracelulares dissolvidos. 3. Matéria orgânica. 4. Bactérias - transformação. I. Título.

CDD: 333.7 (20<sup>a</sup>)

Fabício Sebastiani Meccheri

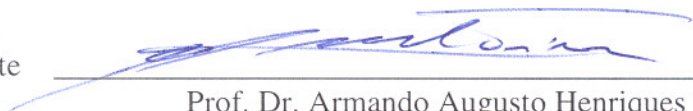
**Produção e Composição dos Polissacarídeos Extracelulares de *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) e suas Relações com bactérias no reservatório de Barra Bonita**

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 12 de julho de 2010

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira  
(Orientador)

1º Examinador



Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profa. Dra. Vanessa Colombo Corbi  
UNIARA/Araraquara-SP

*“If you're trying to achieve, there will be roadblocks.  
I've had them; everybody has had them.  
But obstacles don't have to stop you.  
If you run into a wall, don't turn around and give up.  
Figure out how to climb it, go through it, or work around It”*  
Michael Jordan

## *Agradecimentos*

A UFSCar e ao PPG-ERN pela infra-estrutura e pela formação acadêmica que permitiram a realização deste trabalho.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira pelos ensinamentos, dedicação, paciência, confiança, e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Danilo Giroldo que mesmo distante apoiou as idéias e contribuiu com grande conhecimento.

À Prof. Dr. Vanessa Colombo Corbi pela ajuda nos momentos mais complicados, mesmo sem saber o quanto contribuiu.

Ao Luiz pelos seus conselhos construtivos e ajuda indispensável

Ao Luis pelas ajudas e conversas nas coletas de campo

Aos amigos do Laboratório de Ficologia: Alessandra, Rodrigo, Ingritt, Thais Bittar, Thais Garcia, Moira, Helena, Guilherme, Cilene e especialmente a Inessa pelos conselhos e Letícia pelos anos de amizade trabalhando junto e aguentando minhas reclamações

Aos amigos da minha ex-republica André e Eduardo pela amizade no início do mestrado

Aos amigos da minha republica Guilherme e Bona pela amizade no fim do mestrado

Aos amigos de São Carlos que me ajudaram nessa caminhada

E meu agradecimento especial vai a minha mãe, porque sem ela com certeza meu caminho teria sido muito mais difícil, principalmente com palavras de auxílio e apoio, além de infinitas broncas e discussões sobre meu português.

## RESUMO

O organismo *Planktothrix agardhii* é uma das espécies pertencentes a um dos dois gêneros mais abundantes no mundo inteiro entre o fitoplâncton (o outro é *Microcystis* sp.). Não obstante, o gênero *Planktothrix* é potencialmente tóxico, produtor de microcistinas e anotoxinas, o que torna relevante o conhecimento da biologia de espécies produtoras de grande biomassa, como é o caso de *P. agardhii*, e as relações que possa ter com as comunidades que coabitam com elas. O conhecimento da composição dos EPS (polissacarídeo extracelular) foi fundamental para o entendimento das possíveis relações com bactérias baseadas na utilização dos EPS como substrato. EPS excretado por *Planktothrix agardhii* cultivada em cultura axênica é um heteropolímero rico em glicose (17%), cuja composição também apresenta os seguintes monossacarídeos: 14% de ácido glicurônico, 13% de fucose, 11% de ácido siálico, 11% de N-acetil galactosamina, 10% de N-acetil glicosamina, 8% de ramnose, 7% de galactose, 5% de arabinose e 4% de outros tipos de monossacarídeos não identificados. O EPS é composto por apenas uma única fração ligeiramente ácida. A degradação do EPS pelas bactérias da população natural do reservatório de Barra Bonita iniciou-se a partir das 12 horas sendo no 31º dia de exposição totalmente consumido. A degradação do polissacarídeo acompanhada por cromatografia gasosa mostrou rápida diminuição na quantidade de glicose seguida de um aumento da mesma, após o 12º dia. Já para ácido glicurônico primeiramente ocorre um aumento na concentração, seguido de uma diminuição acentuada após o 12º dia. Os demais monossacarídeos apresentam degradação até uma concentração mínima ou foram completamente exauridos.

## ABSTRACT

The organism *Planktothrix agardhii* belongs to one of the two most abundant genera in the world among the phytoplankton (the other is *Microcystis sp.*). Nevertheless, the genus *Planktothrix* is potentially toxic, producing microcystins and anotoxins, which makes relevant knowledge of the biology of species that produce large biomass, as the case of *P. agardhii*, and the relationships with the communities that coexist with them. Knowledge of the composition of EPS was fundamental to the understanding of possible correlation with bacteria based on the use of EPS as a substrate. The EPS excreted by *P. agardhii* grown in axenic culture is a heteropolymer rich in glucose (17.04%), whose composition also have the monosaccharides: glucuronic acid 13.78%, 12.65% of fucose, from 10.95 n-acetyl galactosamine, 10.48% n-acetyl glucosamine, 7.78% of rhamnose, galactose 7.04%, 4.89% arabinose and 15.39% from other types of sugars. EPS is composed of only one fraction slightly acidic. The degradation of EPS by the bacteria in natural population of Barra Bonita reservoir started at 12 hours and was totally consumed on the 31st day of exposure. The degradation of the polysaccharide followed by gas chromatography showed a quick decrease in the amount of glucose followed by an increase in the same after the 12th day. As for glucuronic acid occurs primarily an increase in concentration, followed by a sharp decline after the 12th day. The other monosaccharides present degradation to a minimum concentration or were completely exhausted.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma apresentando os processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo **8**
- Figura 2.** Fluxograma representando os processos envolvidos na montagem do experimento II **13**
- Figura 3.** Concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* **15**
- Figura 4.** Concentração de carbono total ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* **16**
- Figura 5.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no primeiro dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **16**
- Figura 6.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **17**
- Figura 7.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no décimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **17**
- Figura 8.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no décimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **18**
- Figura 9.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no vigésimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **18**
- Figura 10.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no vigésimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **19**
- Figura 11.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* trigésimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo. É possível observar, além dos tubos, a presença de polissacarídeos excretados pela algas **19**



**Figura 12.** Microfotografia de *Planktothrix agardhii* trigésimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo **20**

**Figura 13.** Cromatograma do excretado extracelular de *Planktothrix agardhii* em Sepharose CL-6B ( $10^4 - 10^6$ ). “A” representa  $V_e/V_T = 0.27$ . “B” representa a fração de massa menor do composto ainda não identificado, com  $V_e/V_T = 0.68$ . **22**

**Figura 14.** Cromatograma do excretado extracelular de *Planktothrix agardhii* em DEAE-Sepharose “Fast Flow”, eluídos com gradientes salino variando de 0 até 2M **23**

**Figura 15.** Cromatograma para identificação do padrão de ácido siálico. As letras representam: A - manitol; B – ácido siálico **24**

**Figura 16.** Cromatograma da fração A do polissacarídeo excretado por *P. agardhii* obtido através de cromatografia gasosa em função do tempo. As letras representam: a – arabinose; b – ramnose; c – fucose; d – ácido glicurônico; e – galactose; f – glicose; g – ácido siálico; h – N-acetil glicosamina; i – N-acetil galactosamina **24**

**Figura 17.** Cromatograma da fração A do polissacarídeo excretado por *P. agardhii* obtido através de cromatografia gasosa em função do tempo com a adição de ácido siálico. As letras representam: a – arabinose; b – ramnose; c – fucose; d – ácido glicurônico; e – galactose; f – glicose; g - ácido siálico h – N-acetil glicosamina; i – N-acetil galactosamina **25**

**Figura 18.** Degradação da fração A pela população bacteriana analisada através de cromatografia de separação por massa em gel Sepharose CL-4B. Os gráficos (dias 0-31) mostram a degradação do polissacarídeo durante o período de tempo de exposição à população bacteriana. **27-28**

**Figura 19.** Controles preparados pela mistura de meio de cultura ASM-1 e adição de polissacarídeo de *P. agardhii* **29**

**Figura 20.** Composição dos monossacarídeos em comparação com o tempo de degradação nas culturas bacterianas enriquecidas com polissacarídeo excretado por *P. agardhii* **31**

**Figura 21.** . Concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada **32**

**Figura 22.** Concentração de carboidrato dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada **32**

**Figura 23.** Concentração de carbono intracelular ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada **33**

**Figura 24.** Variação da densidade bacteriana em relação a degradação do polissacarídeo excretado por *P.agardhii*, em função do tempo de cultivo **35**

**Figura 25.** Proporção de morfotipos bacterianos presentes nos diferentes dias de cultivo da população de bactérias enriquecido com polissacarídeo proveniente de *P. agardhi* **36**

**Figura 26.** Frequência relativa (%) das bactérias nas culturas enriquecidas com polissacarídeo, separadas por classes de tamanho celular durante os 20 dias de cultivo **37**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição monomérica relativa dos fragmentos da fração A durante sua degradação em função do tempo de exposição à população bacteriana **30**

**Tabela 2.** Variação da densidade bacteriana em cultura de *P. agardhii*, em relação ao tempo de cultivo **34**

## SUMÁRIO

1.) Introdução.....	1
2.) Objetivos.....	5
3.) Materiais e Métodos .....	6
3.1) Organismo.....	6
3.2) Condições de Cultivo e Curva de Crescimento de <i>Planktothrix agardhii</i> .....	6
3.3) Experimento I: Obtenção e Caracterização do EPS.. .....	7
3.3.1) Obtenção do EPS.....	7
3.3.2) Caracterização dos EPS.....	9
3.3.2.1) Cromatografia de massa em coluna de gel CL6B Sephrose.....	9
3.3.2.2) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sephrose. ....	10
3.3.2.3) Composição Monomérica.....	10
3.4) Experimento II: Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacterianas.....	11
3.4.1) Cultivos cianobactéria/bactéria.....	11
3.4.2) Obtenção do polissacarídeo.....	11
3.4.3) Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacteriana.....	12
3.4.4) Densidade, morfologia e biovolume bacteriano. ....	13
4.) Resultados.....	15
4.1) Crescimento de <i>Planktothrix agardhii</i> .....	15

4.2) Caracterização do polissacarídeo.....	21
4.2.1) Cromatografia de massa em coluna de gel CL6B Sepharose .....	21
4.2.2) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose.....	22
4.3) Composição monomérica do EPS.....	23
4.4) Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacterianas.....	25
4.5) Cultivo conjunto cianobactéria/bactéria.....	31
4.6) Crescimento da população de bactérias.....	33
4.6.1) Diversidade de Morfotipos Bacterianos.....	35
4.6.2) Frequências relativas das bactérias separadas por classes de tamanho.....	37
5.) Discussão.....	38
6.) Conclusão.....	43
7.) Referências Bibliográficas.....	44

## 1.) Introdução

Os organismos fitoplanctônicos podem liberar para o meio, sob a forma de matéria orgânica dissolvida (MOD), importantes quantidades de carbono orgânico derivado diretamente da fotossíntese sem passar pela morte celular (Myklestad 1995; Giroldo et al. 2007). Compõe essa MOD uma variedade enorme de compostos, mas os mais importantes sob o aspecto quantitativo são os carboidratos poliméricos (Hellebust, 1974; Vieira & Myklestad 1986; Giroldo & Vieira 2005).

Populações bacterianas podem ser subsidiadas metabolicamente tendo como substrato o exopolissacarídeo, ou polissacarídeo excretado (EPS) fitoplanctônico como única fonte de carbono (Freire-Nordi & Vieira 1996, 1998), uma vez que quase todo o EPS de origem fitoplanctônica apresenta uma porcentagem de proteína associada covalentemente; sendo essa porcentagem maior no EPS de cianobactérias. A relevância do EPS na alça microbiana, assim como na formação de agregados gelatinosos (Vieira *et al.* 2008) e na formação de partículas exopoliméricas transparentes (TEP) (Passow *et al.*, 1994), faz com que o conhecimento desses compostos tenham um papel primordial no entendimento desses processos nos sistemas aquáticos. Embora existam outras fontes de carbono orgânico, as bactérias podem ser dependentes do fitoplâncton em lugares onde a entrada de matéria orgânica alóctone é baixa, como ocorre em regiões pelágicas e em alto mar (Bell *et al.*, 1983). Dessa forma a interação algas e bactéria representam um caminho pelos quais o carbono orgânico retorna à cadeia alimentar, insere-se na alça microbiana e, dessa forma, é eficientemente transferido dos menores níveis tróficos para os níveis tróficos superiores (Pomeroy & Wiebe, 1988).

A diversidade na composição da MOD liberada pelas algas implica, teoricamente, na seleção de bactérias que poderiam associar-se especificamente aos produtos de determinadas

espécies algais. Índícios de especificidade foram obtidos no fitoplâncton marinho para diatomáceas (Bell & Sakshaug, 1980) e no fitoplâncton de água doce para cianobactérias (Fallowfield & Daft, 1988)

A estrutura e composição dos EPS têm reconhecida importância nas suas propriedades físicas e químicas (Decho 1990; Mopper *et al.*, 1992; Vieira *et al.* no prelo) definindo muitas das suas funções, por exemplo, na formação dos agregados e TEP, na fixação de organismos a substratos, na complexação de metais tóxicos, na seleção do transporte através de cápsulas gelatinosas (Freire-Nordi *et al.* 2005) ou como suporte mecânico para populações bacterianas. Essas funções evidenciam a relevância de estudos da composição e estrutura do EPS fitoplanctônico.

Existe pouca informação na literatura a respeito das alterações da composição em um específico EPS fitoplanctônico uma vez liberado no meio. Além do controle genético, algumas variações podem ocorrer na biossíntese desses polissacarídeos como, desvios da especificidade das glicosiltransferases ou erros na polimerização (Leppard, 1995). Entretanto, fatores ambientais, como a degradação seletiva microbiana podem também alterar significativamente a composição e estrutura conformacional do EPS com conseqüentes alterações nas suas propriedades físicas e químicas, como sua hidrofobicidade por exemplo, tornando o EPS mais ou menos reativo como acontece com o EPS da diatomácea *Thalassiosira duostra* (Girollo *et al.* 2003).

Apesar dos polissacarídeos serem considerados mais refratários à degradação bacteriana do que os compostos de baixa massa molecular, a utilização desses compostos por bactérias tem sido demonstrada pela literatura, embora com uma reduzida quantidade de trabalhos (Chróst & Faust 1983; Freire-Nordi & Vieira 1996, 1998), principalmente para cianobactérias (Colombo *et*

al. 2004).

A cianobactéria *Planktothrix agardhii*, é uma espécie formadora de “blooms” extremamente abundante em ambientes de água doce, muitas vezes encontrando-se em coexistência ou alternância de dominância com outras cianobactérias, tais como *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis panniformis* e *Anabaena spiroides*. De fato, no reservatório de Barra Bonita, essas espécies de cianobactérias produzem extensas populações e dividem a dominância, inclusive dos “blooms” que se repetem ao longo do ano, excretando grande quantidade de EPS para o meio (Dellamano-Oliveira, 2006). Tal biomassa deve, portanto, produzir quantidades razoáveis de EPS mesmo que a quantidade EPS/célula não se compare com aquela referente à de *A. spiroides* que apresenta enormes cápsulas recobrando os filamentos. A possibilidade de que esse EPS seja utilizado como fonte de carbono por microrganismos heterotróficos apresenta uma implicação ecológica de alta importância, não só para o reservatórios de Barra Bonita, mas, também, para o ambiente a jusante devido à exportação desses compostos excretados.

. Tais quantidades de EPS uma vez liberadas no meio obrigatoriamente têm um destino que invariavelmente termina por ser a degradação. Contudo, até que isso aconteça, o EPS pode desempenhar outras funções ecológicas diretamente ou indiretamente relacionadas com as espécies fitoplanctônicas e/ou bacterioplanctônicas. Entretanto, a descoberta de tais funções passa obrigatoriamente pelo conhecimento da cinética de degradação, dos organismos envolvidos no processo, e conhecimento de sua composição e estrutura iniciais. Também de suma importância é o conhecimento das alterações na sua composição durante as etapas intermediárias de sua degradação, assim como saber a sua contribuição para a alça microbiana. Por exemplo, mudanças na composição ou estrutura de um polissacarídeo causadas por ataques seletivos bacterianos podem acarretar mudanças drásticas nas propriedades dessas moléculas,



alterando sua hidrofobicidade, tornando o EPS mais adesivo o que aumenta o potencial de formação de TEP e agregados gelatinosos, como ocorre com o EPS da diatomácea *Thalassiosira* sp (Girollo *et al.* 2003)

A hipótese apresentada neste projeto considera que o EPS produzido por *Planktothrix agardhii*, de presença constante no reservatório de Barra Bonita (Dellamano-Oliveira *et al.* 2006), e a quantidade de polissacarídeo extracelular liberados por essa cianobactéria representa de fato uma importante fonte de carbono que irá interagir com o ambiente biótico e abiótico e apresenta elevada importância como substrato para bactérias, inclusive mantendo uma população adaptada para esse substrato. Em decorrência dessa interação bactéria/EPS uma grande variedade de fragmentos dos polissacarídeos de composição variada devido a ação enzimática e assimilação diferenciada deve ser produzida e disponibiliza plausíveis interações ecológicas antes da sua completa degradação. Para uma primeira abordagem do estudo desses fragmentos, devem ser obtidas informações básicas sobre o polissacarídeo extracelular liberado por *P. agardhii*, como quais são os monossacarídeos que entram em sua composição, quantas frações é composto, sal acidez e outros detalhes.

A produção de EPS é influenciada por fatores intrínsecos à sua biologia, mas pode, também, ser influenciada pela presença de bactérias com caráter benéfico e/ou deletério. A turbulência característica do reservatório de Barra Bonita faz com que frequentemente a cianobactéria especializada a crescer em baixas intensidades de luz, fique exposta a altas intensidades na superfície.

## 2.) Objetivos

A abordagem deste estudo iniciou-se pela caracterização do polissacarídeo excretado pela espécie em questão. Em seguida foram realizados experimentos de cultivo em conjunto de *P. agardhii* em culturas axênicas e em culturas inoculadas com populações bacterianas coletadas no mesmo lugar da alga. O objetivo destes cultivos foi observar os padrões de crescimento da alga em função do crescimento simultâneo das populações microbianas. O passo seguinte foi enriquecer culturas bacterianas com o EPS isolado da alga e observar os padrões de degradação de cada um dos monossacarídeos presentes e observar como ocorre a sucessão bacteriana.

Dessa forma os objetivos secundários desse trabalho podem ser descritos da seguinte forma:

- Caracterização do EPS e parâmetros de crescimento da alga em questão crescendo em condições axênicas.
- Cultivo da cianobactéria com as bactérias do reservatório, comparando-se os padrões de crescimento em ambas situações.
- Observar os padrões de degradação do polissacarídeo em culturas bacterianas enriquecidas e a sucessão bacteriana que ocorre conforme este composto é degradado

### **3.) Material e Métodos**

#### **3.1) Organismos**

A cianobactéria *Planktothrix agardhii* (clone BB0013) foi isolada do reservatório de Barra Bonita (22° 32' S, 48° 29' W), um reservatório eutrofizado localizado na porção média do rio Tietê (Estado de São Paulo, Brasil), a cultura é mantida em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WCD 835).

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir da água do reservatório de Barra Bonita proveniente de diferentes profundidades: superfície, 3, 5 10, 15 m e fundo (~ 20m). A água foi filtrada em membranas de fibra de vidro GF/C com poros de 1.2 µm calcinados, para retirar algas, zooplâncton e protozoários.

#### **3.2) Condições de Cultivo e Curva de Crescimento de *Planktothrix agardhii***

As culturas de *P. agardhii* (volume de 16,5 l) foram mantidas em garrações de 20 litros com agitação constante através de um agitador magnético. O meio utilizado foi ASM-1 (Gorham *et al* 1968) com um pH de 7.8 e adição de tampão tris(hidroximetil)aminometano. As culturas foram mantidas em temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12:12 horas sob  $80 \pm 5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luz proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

A concentração de clorofila-a, de carboidrato (intracelular e extracelular) e a quantidade de carbono (total, orgânico e inorgânico), foram as variáveis utilizadas para determinar o crescimento da espécie.

Para determinação da clorofila-a esta foi extraída com etanol 90% a quente (Nusch, 1980), segundo recomendações de Marker *et al.* (1980) e quantificada segundo Lorenzen (1967) procedimentos brevemente expostos a seguir. Foram filtradas entre 20 e 30 mL das amostras em filtros de fibra de vidro com poro 1,2  $\mu\text{m}$ : os filtros foram armazenados em tubos plásticos por 12 horas e mantidos a  $-5^{\circ}\text{C}$  no escuro. Para a extração foram acrescidos aproximadamente 5 mL de etanol 90% a  $80^{\circ}\text{C}$  e macerados. O macerado foi mantido no *freezer* ( $-5^{\circ}$ ) durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas para a separação da fibra de vidro e o sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro (Hewlett Packard, Diode Array Spectrophotometer 8452A) nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm. Em seguida as amostras foram acidificadas com HCl 1 M (100  $\mu\text{L}$  para cada 5 mL) mantidas em descanso por 15 minutos e lidas novamente nos mesmo comprimentos de onda para se obter os valores de feofitina.

Uma alíquota da amostra (15mL) foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ , para a determinação das concentrações de carboidrato total extracelular e o filtro foi macerado para a determinação de carboidrato intracelular, obtidos pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). As análises de carbono total, foram obtidos utilizando-se um analisador de carbono TOC-Vcph (Shimadzu).

### **3.3) Experimento I: Obtenção e Caracterização do EPS**

### 3.3.1) Obtenção do EPS

Diversas culturas axênicas de *Planktothrix tropicalis* foram montadas e ao fim de 2 meses de crescimento foram filtradas tangencialmente em cartucho de fibra oca com poros de 0,65  $\mu\text{m}$  acoplado ao aparelho de filtração tangencial Mid Gee (A/G Technology Corporation, Needham, MA, USA), essa porosidade retém de forma eficiente as células. Esta filtração teve como objetivo separar a fração particulada da dissolvida. Uma segunda filtração utilizando poros de 30 kDa foi utilizado para reter o polissacarídeo e, em seguida, a parte retida e concentrada no filtrador tangencial contendo as frações maiores que 30kDa foram congeladas com a utilização de nitrogênio líquido e liofilizadas. O procedimento experimental está resumido na Figura 1.

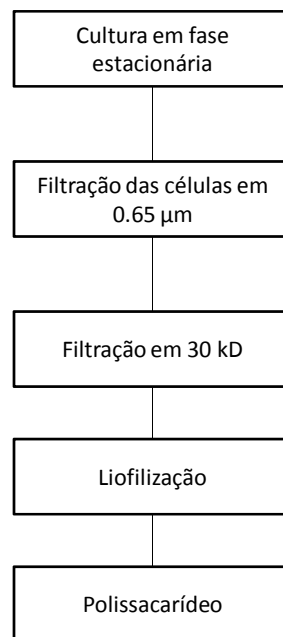


Figura 1. Fluxograma apresentando os processos envolvidos na obtenção do polissacarídeo

### 3.3.2) Caracterização dos EPS

A caracterização ocorreu em duas fases:

1) identificação das frações por cromatografia de massa. A cromatografia líquida de massa consiste na separação de moléculas de diferentes tamanhos, de forma que as moléculas maiores passam diretamente entre as partículas individuais do gel e desta forma excluídas primeiramente durante o processo de eluição com o volume da fase aquosa que está na parte externa dos poros. As moléculas que penetram nos poros do gel são eluídas de forma diferenciada em ordem decrescente de tamanho molecular (Fisher, 1980).

2) identificação por cromatografia de troca iônica. para cromatografia líquida de troca iônica, não é necessário respeitar o limite de 5% do volume total da coluna, uma vez que a separação não é feita em função da massa molecular, mas sim em função da afinidade da amostra com o gel.

#### 3.3.2.1) Cromatografia de massa em coluna de gel CL6B Sepharose

Para essa cromatografia foi montada uma coluna com 370 mL de volume, preenchida com gel CL6B Sepharose (Pharmacia®) com faixa de exclusão entre  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^6$  Da, acoplado ao aparelho Äkta Prime Pharmacia/GE ajustado a um fluxo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . As amostras foram diluídas em água deionizada (1mg/mL) e injetou-se um volume de 5mL, e coletadas em frações de 5,0 mL no coletor do aparelhor Äkta Prime Pharmacia/GE. Os carboidratos nas diversas frações coletadas foram detectados pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956).

### 3.3.2.2) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose

Montou-se uma coluna com 175 mL de volume, preenchida com o gel DEAE Sepharose “Fast Flow” (Pharmacia<sup>®</sup>), acoplado ao aparelho Äkta Prime Pharmacia/GE ajustado a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em água deionizada (1 mg mL<sup>-1</sup>) e injetou-se um volume de 5 mL. Nessa cromatografia a água deionizada foi gradualmente sendo substituída pela solução de NaCl 2.0M formando um gradiente salino. O gradiente salino foi utilizado para evidenciar se o polissacarídeo apresentaria frações neutras e ácidas. O gradiente salino neste caso é a mistura fracionada de NaCl durante a passagem desse eluente pela coluna de cromatografia, dessa maneira, o NaCl no início da corrida não está presente e vai substituindo a água deionizada até restar somente a solução salina (2.0M)

### 3.3.2.3) Composição Monomérica

A caracterização da composição monomérica do EPS foi feita por cromatografia gasosa (CG), após a amostra ter sido metanolizada, derivatizada a O-trimetilsilil derivados e analisados em cromatógrafo de gás segundo metodologia descrita por Paulsen & Vieira (1994) e será apresentada em resumo: aproximadamente 1 mg de amostra de polissacarídeos em pó (colocados em tubos selados com revestimento de Teflon<sup>®</sup>) foram metanolizados e colocados em estufa a 80°C por 24 h para a quebra das ligações glicosídicas e concomitante geração de metil glicosídeos, que em seguida são tratados com TMS (tri-metil-silil) para a formação de O-trimetilsilil derivados (Reinhold 1972). Os O-trimetilsilil derivados foram identificados e

quantificados por cromatografia de gás (HP 5980 série II) equipado com colunas DB-5 (J & W Scientific) de sílica com 30 m e 0,32 mm de diâmetro interno.

Este tipo de cromatografia pode separar gases ou substâncias volatilizáveis através da coluna de sílica em temperaturas adequadas que possibilitam a volatilização da amostra. Estas substâncias são excluídas em tempos diferentes dependendo das propriedades físicas da molécula. O uso de um detector adequado (FID) na saída da coluna possibilita a detecção e quantificação destas substâncias.

A presença de proteínas ligadas ao EPS foi testada de acordo com o método Lowry *et al.* (1951).

### **3.4) Experimento II: Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacterianas**

#### *3.4.1) Cultivos alga/bactéria*

O cultivo alga/bactéria foi feito em frascos de 2L contendo 1L de meio ASM-1 (Gorham *et al.* 1968) com um pH de 7.8 e adição de Tris. As culturas foram mantidas em condições de laboratório temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12:12 horas sob  $80 \pm 5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luz proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

As concentrações de clorofila-a, carboidrato intracelular e extracelular e carbono total foram estimados segundo metodologia citada no item 3.2.

#### *3.4.2) Obtenção do polissacarídeo*



A obtenção do polissacarídeo seguiu a mesma metodologia descrita no item 3.3.1 e resumida na Figura 1.

#### *3.4.3) Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacteriana*

Frascos de 1 litro em triplicata contendo 500 mL de meio ASM-1 (Gorham *et al.* 1964) foram enriquecidos com 0,95 g L<sup>-1</sup> da fração A do polissacarídeo produzido por *P. agardhii*. A população bacteriana natural utilizada no inóculo foi coletada no reservatório de Barra Bonita através de amostrador que evita contaminação por bactérias aéreas, previamente autoclavado, de modo a obter-se uma amostra integrada da coluna d'água (0, 5, 10 e 15 metros de profundidade). Uma quantidade relativa a 5% da água integral do reservatório foi filtrada, sob condições estéreis, em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatman) com poros de 1,2 µm, calcinada, para a remoção de algas, protozoários e detritos, e em seguida inoculada em frascos experimentais. Os frascos experimentais foram incubados em condições aeróbicas no escuro à 25° C e agitados manualmente duas vezes por dia, para controle um frasco recebeu apenas a adição do polissacarídeo sem adição da água proveniente do reservatório. A degradação do polissacarídeo e sua transformação em carboidratos de menor massa molecular foi analisada a cada quatro dias por meio de cromatografia de exclusão por permeação em gel através do gel CL-4B. A composição das frações provenientes da degradação bacteriana foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita na Figura 2.

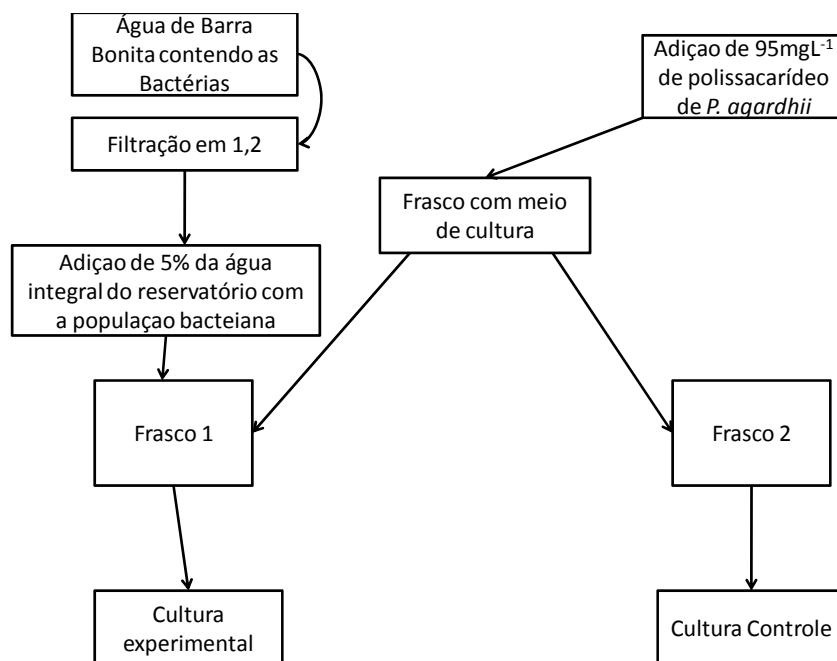


Figura 2. Fluxograma representando os processos envolvidos na montagem do experimento II

#### 3.4.4) Densidade, morfologia e biovolume bacteriano

Alíquotas de 1 mL de amostras previamente fixadas foram coradas com DAPI segundo Porter & Feig (1980), com concentração final de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e filtradas em membranas de policarbonato (Nucleopore®) com poros de  $0,22 \mu\text{m}$ , coradas com Sudan Black. Após as filtrações, as membranas de policarbonato foram montadas sobre lâminas para a análise em microscopia de epifluorescência.

As microfotografias capturadas com câmera Zeiss AxioCam HRc acoplada a um microscópio Zeiss Axioplan (Jena, Germany) foram tratadas com ajuda do software Axivision release 4.5 (Zeiss).

Os morfotipos bacterianos foram identificados segundo a razão comprimento/largura proposta por Racy *et al.*(2005), através deste valor foram classificados em: coco – de 1,0 a 1,25; cocobacilos – de 1,26 a 1,75; bacilos – de 1,76 a 5. Organismos com razão (comprimento /largura)R superior a 5 foram classificados como filamentos; vibrios foram identificados pela sua forma (bacilos em forma de C); e espirilos identificados pela sua forma em S ou espiraladas. O biovolume foi calculado segundo Sun & Liu (2003) assumindo as fórmulas de esferóide para o coco e cocobacilo e de cilindro com duas hemiesferas para os demais tipos: bacilo, espirilo, vibrio e filamento.

## 4.) Resultados

### 4.1) Crescimento de *Planktothrix agardhii*

O crescimento da cianobactéria foi monitorado durante 30 dias através da concentração de clorofila-a (figura 3), carbono total (figura 4). A curva de crescimento obtida com a concentração de clorofila-a é similar à obtida com carbono total fotoassimilado (particulado e excretado). O 25º dia de cultivo correspondeu ao início da fase estacionária que se estendeu até o 35º dia. Os dados de carboidrato dissolvido e carbono total também indicam que a cultura atingiu a fase estacionária no 25º dia de cultura.

Durante esse período microfotografias foram tiradas para observar os tubos de polissacarídeos formados por *Planktothrix agardhii* que envolvem suas células e são liberados para o meio. (Figuras 6-13)

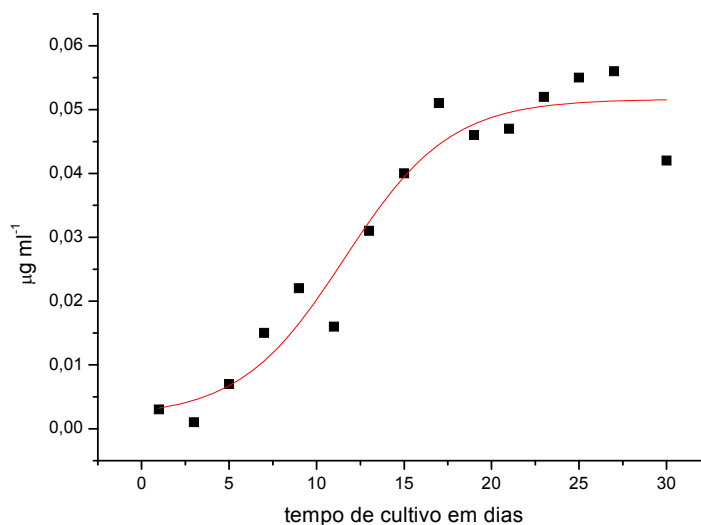


Figura 3. Concentração de clorofila a ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii*

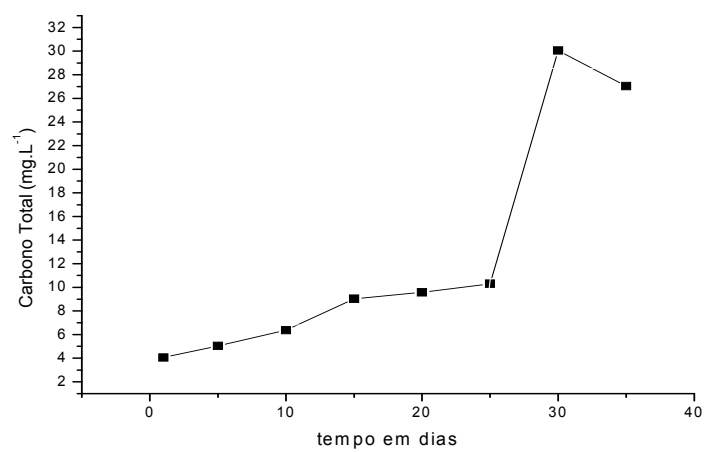


Figura 4. Concentração de carbono total (mg.L<sup>-1</sup>) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii*

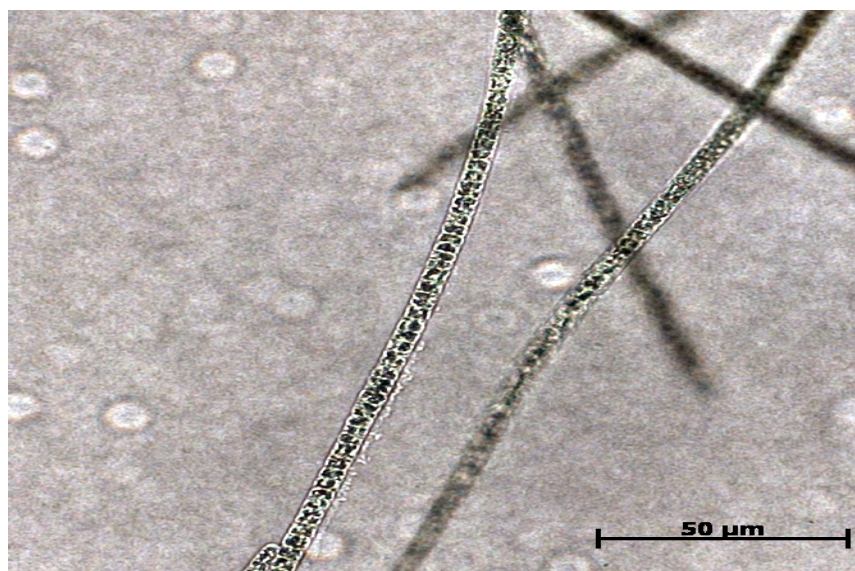


Figura 5. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no primeiro dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo



Figura 6. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo



Figura 7. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no décimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo



Figura 8. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no décimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo

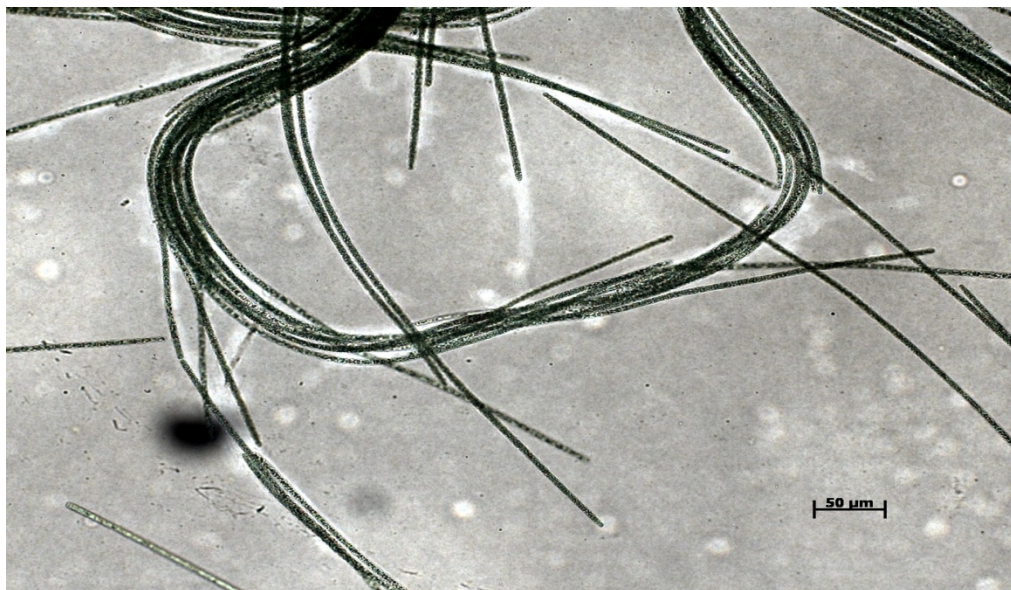


Figura 9. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no vigésimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo

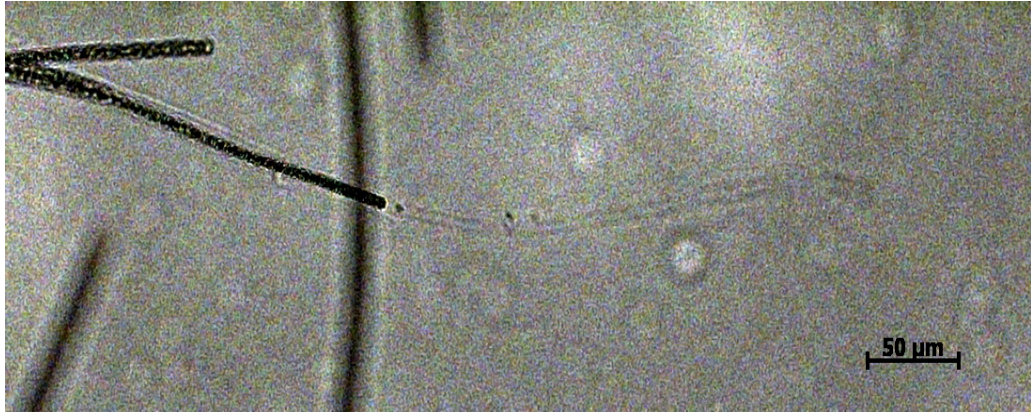


Figura 10. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* no vigésimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo

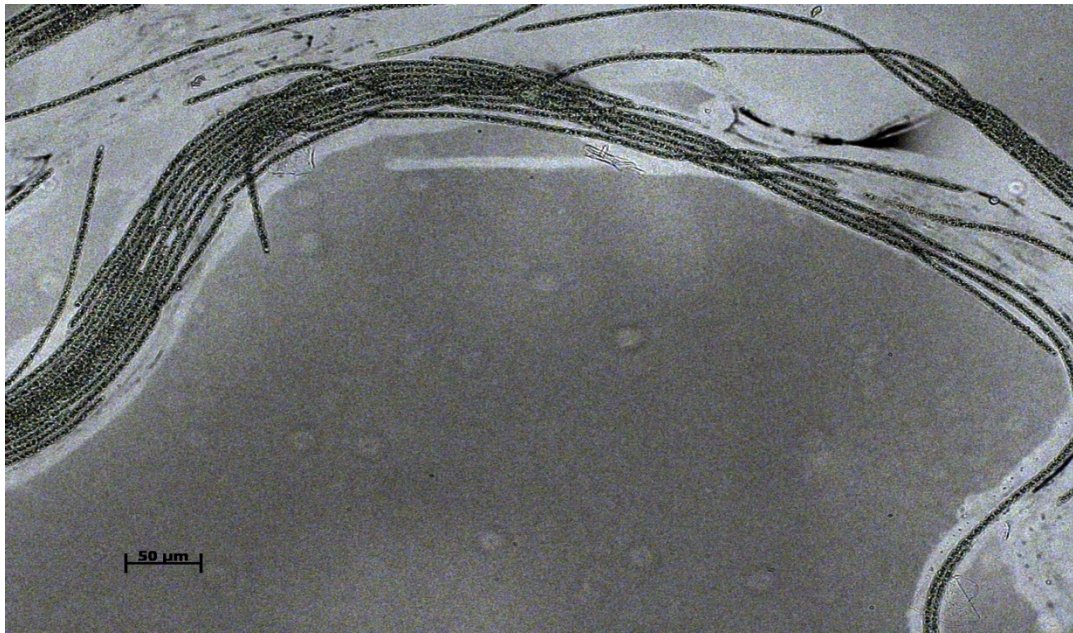


Figura 11. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* trigésimo dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo. É possível observar, além dos tubos, a presença de polissacarídeos coloidais livres excretados pela alga.



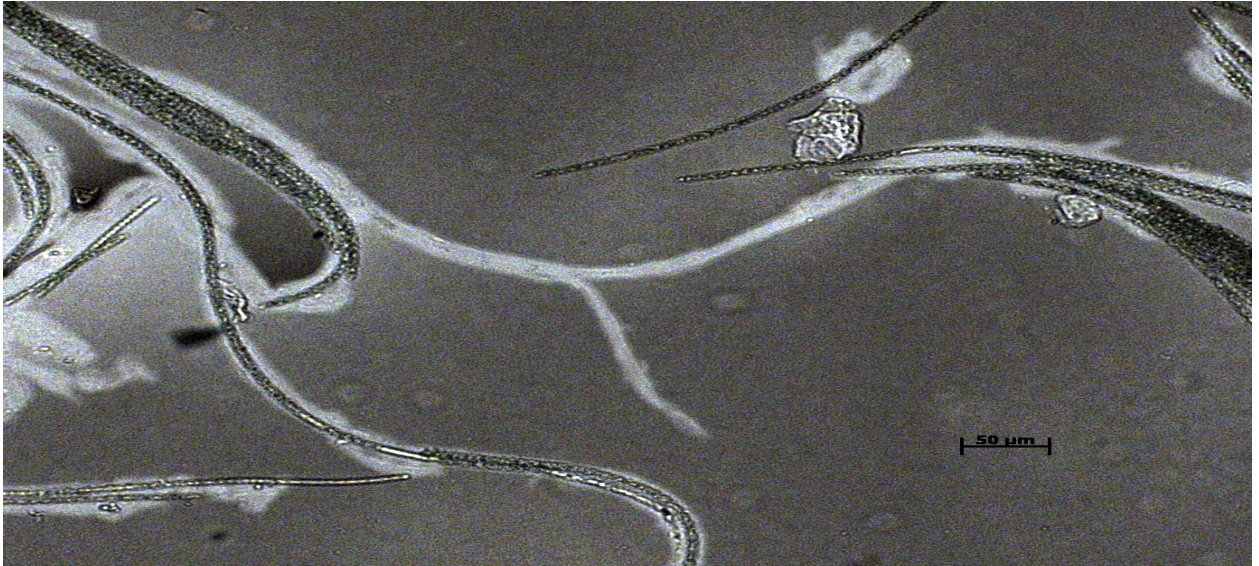


Figura 12. Microfotografia de *Planktothrix agardhii* trigésimo quinto dia de cultura para observação de formação dos tubos de polissacarídeo.

As fotografias (Fig. 6 do dia 5) mostram que a liberação de tubos envoltórios mucilaginosos inicia-se a partir do 5º dia e se estende até o 35º dia, final dos cultivos. Observa-se (Figs. 11 e 12 do dias 30 e 35), também, que os tubos liberados coalescem para formar uma aparente massa única mucilaginosa com características de TEP (transparent exopolymer particles). Entretanto, aparentemente, esses tubos desagregam-se formando colóides que permanecem nas culturas, dando seu aspecto “gelatinoso”. Porém, não se comprovou ainda se a “dissolução” dos tubos são realmente os únicos responsáveis pela gelatinização dos meios de cultura já que pode-se observar que, EPS é liberado, pelo menos em pouca quantidade, antes das liberação dos tubos (Figs. 8, 9 e 12 dos dias 15, 20 e 35).

## 4.2 Caracterização do polissacarídeo

### 4.2.1) Cromatografia de massa em coluna de gel CL6B Sepharose

A cromatografia por eluição em de gel Sepharose CL-6B evidenciou dois picos distintos; o primeiro pico (A) relacionado a carboidratos de alta massa molecular (polissacarídeo) e um segundo pico (B) de um composto de massa molecular menor. Quando analisado pela metodologia de Dubois *et al.* (1956), o material separado no pico B desenvolveu a cor roxa profunda sendo o usual para carboidratos tons de amarelo. Aparentemente esse composto é um polímero, já que foi eluído em  $V_e/V_t = 0.68$ , antes do limite inferior de exclusão do gel ( $1 \times 10^4 \text{Da}$ ) do gel CL-6B ( $10^4 - 10^6$ ). Muito provavelmente esse componente seja um polissacarídeo com componentes não identificados. Análise envolvendo LC-MS (espectrofotometria de massa) está sendo providenciada já que esse composto representa uma fração razoável da matéria orgânica excretada. A Figura 13 mostra o cromatograma obtido na coluna de gel Sepharose CL-6B

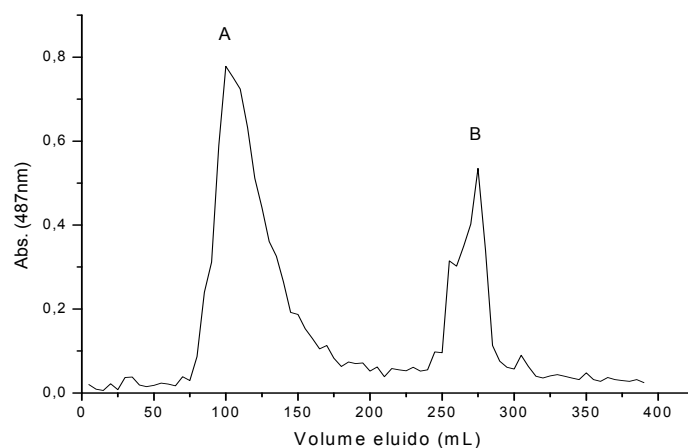


Figura 13. Cromatograma do excretado extracelular de *Planktothrix agardhii* em Sepharose CL-6B ( $10^4 - 10^6$ ). “A” representa  $V_e/V_T = 0.27$ . “B” representa a fração de massa menor do composto ainda não identificado, com  $V_e/V_T = 0.68$ .

#### 4.2.2) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel Sepharose DEAE

A Figura 14 mostra a fração obtida em gel de troca iônica Sepharose DEAE da amostra de polissacarídeo denominada pico A isolada em gel CL-6B. Pode-se observar que o polissacarídeo excretado por *Planktothrix agardhii* teve a maior parte eluída logo no início da cromatografia, evidenciando que o polissacarídeo apresenta uma composição muito pouco ácida.

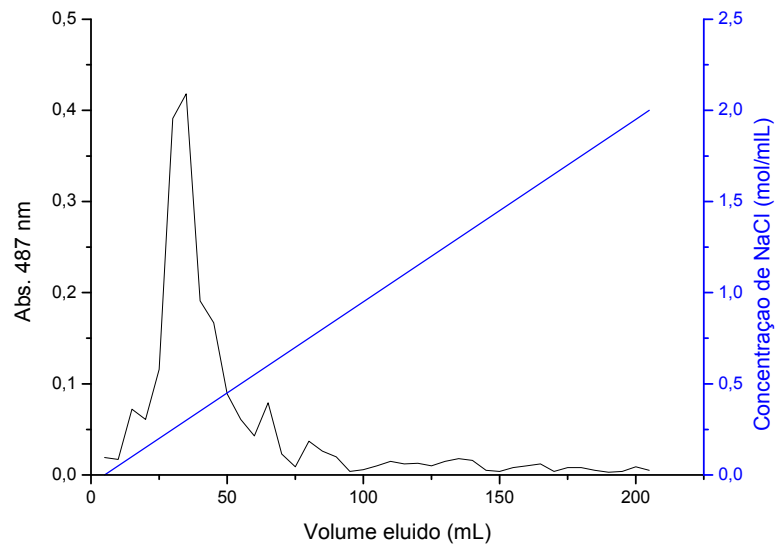


Figura 14. Cromatograma do excretado extracelular de *Planktothrix agardhii* em DEAE-Sepharose “Fast Flow”, eluídos com um gradiente salino variando de 0 até 2M.

### 4.3) Composição monomérica do EPS

A composição monomérica do EPS de *P. agardhii* obtida através de cromatografia gasosa foi: 17% de glicose, 14% de ácido glicurônico, 13% de fucose, 11% de ácido siálico, 11% de N-acetil galactosamina, 10% de N-acetil glicosamina, 8% de ramnose, 7% de galactose, 5% de arabinose e 4% de outros tipos de monossacarídeos não identificados. O EPS também apresentou uma quantidade de 16% de proteína.

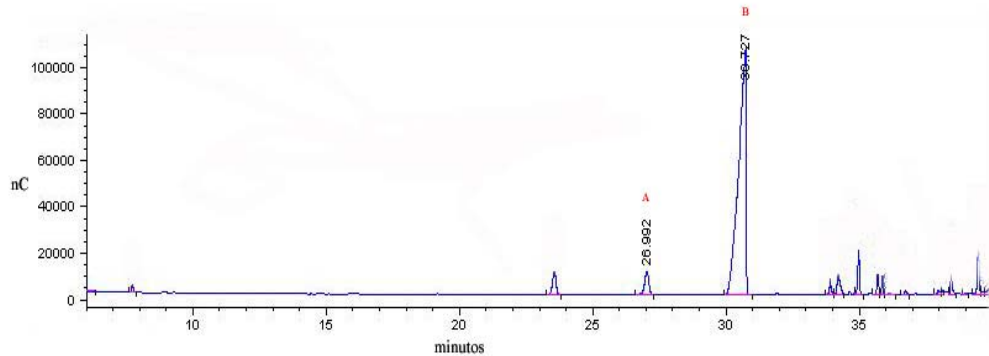


Figura 15. Cromatograma para identificação do padrão de ácido siálico. As letras representam: A - manitol; B – ácido siálico

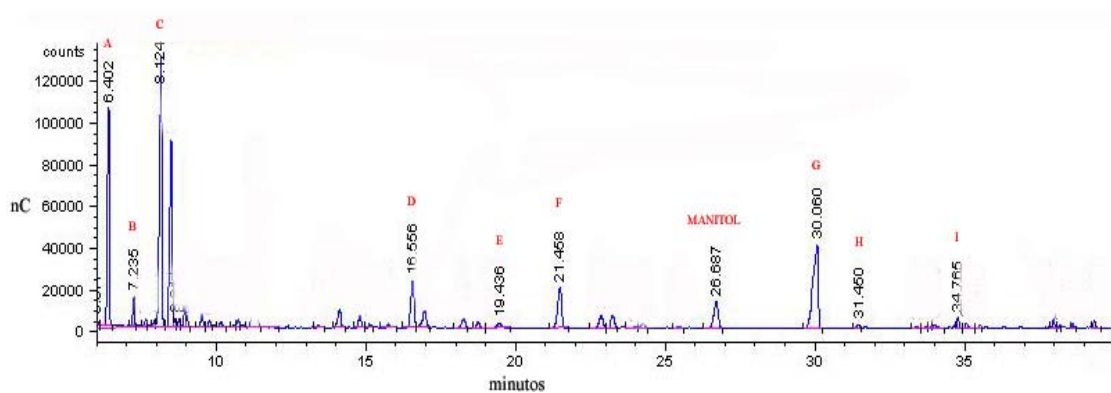


Figura 16. Cromatograma da fração A do polissacarídeo excretado por *P. agardhii* obtido através de cromatografia gasosa em função do tempo. As letras representam: a – arabinose; b – ramnose; c – fucose; d – ácido glicurônico; e – galactose; f – glicose; g - ácido siálico; h – N-acetil glicosamina; i – N-acetil galactosamina

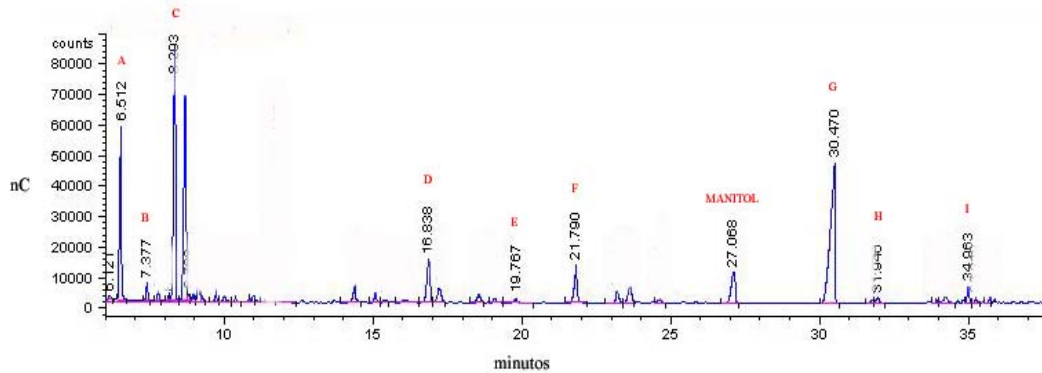


Figura 17. Cromatograma da fração A do polissacarídeo excretado por *P. agardhii* obtido através de cromatografia gasosa em função do tempo com a adição de ácido siálico. As letras representam: a – arabinose; b – ramnose; c – fucose; d – ácido glicurônico; e – galactose; f – glicose; g - ácido siálico h – N-acetil glicosamina; i – N-acetil galactosamina

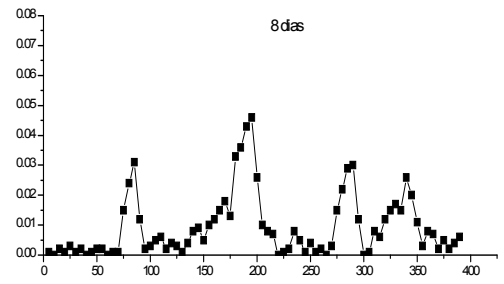
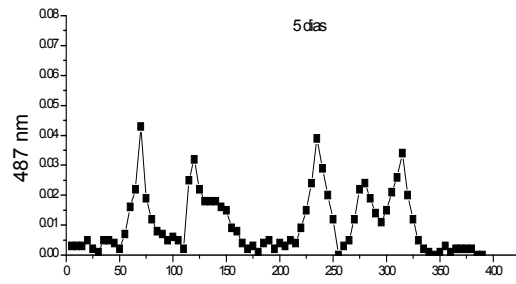
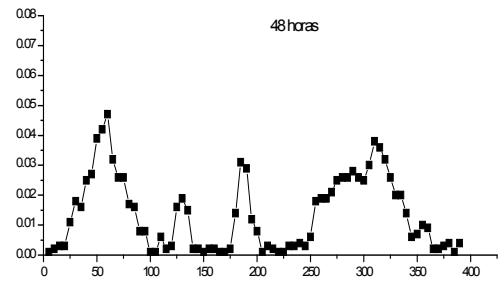
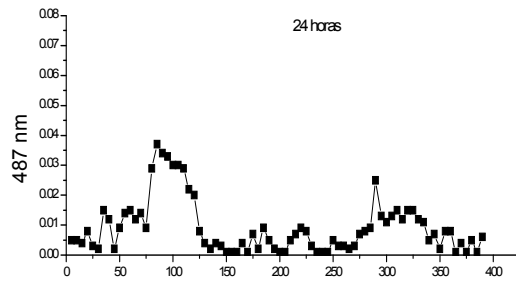
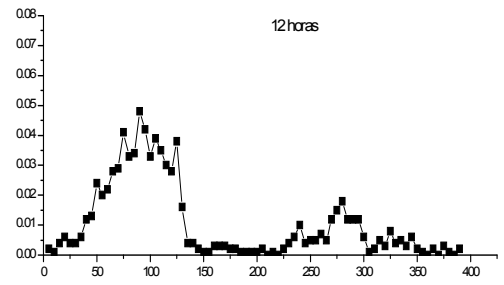
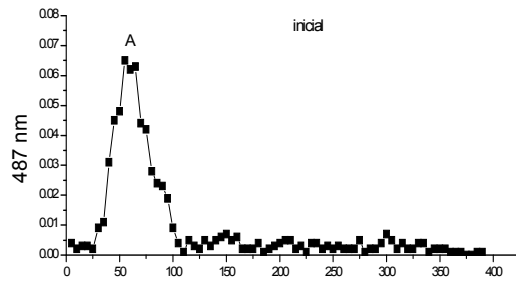
O ácido siálico encontrado no polissacarídeo de *P. agardhii* é um fato inédito, tal monossacarídeo ainda não havia sido encontrado em cianobactérias. Entretanto para se ter certeza de que o pico G registrado pelo cromatograma era de ácido siálico procedeu-se a adição de ácido siálico, como mostrado na figura 17, e mostrou um aumento da área do mesmo no polissacarídeo em comparação com a área encontrada no polissacarídeo (figura 18), a porcentagem da área final desse monossacarídeo passou de 11,54% para 16,45%, mostrando que o ácido siálico está presente na composição do polissacarídeo excretado.

#### 4.4) Degradação e utilização do polissacarídeo por populações bacterianas

A degradação do polissacarídeo em função do tempo de exposição à população bacteriana é mostrada na Figura 18, é possível observar que o conteúdo da fração A foi sendo realocada

com o aparecimento de outros fragmentos, até o completo desaparecimento tanto da fração A quanto de seus fragmentos.

Para atestar que a degradação do polissacarídeo não foi causada por fatores químicos ou físicos, foi analisado o controle que não revelou degradação alguma durante o experimento (Figura 19).



Volume eluido mL

Volume eluido mL



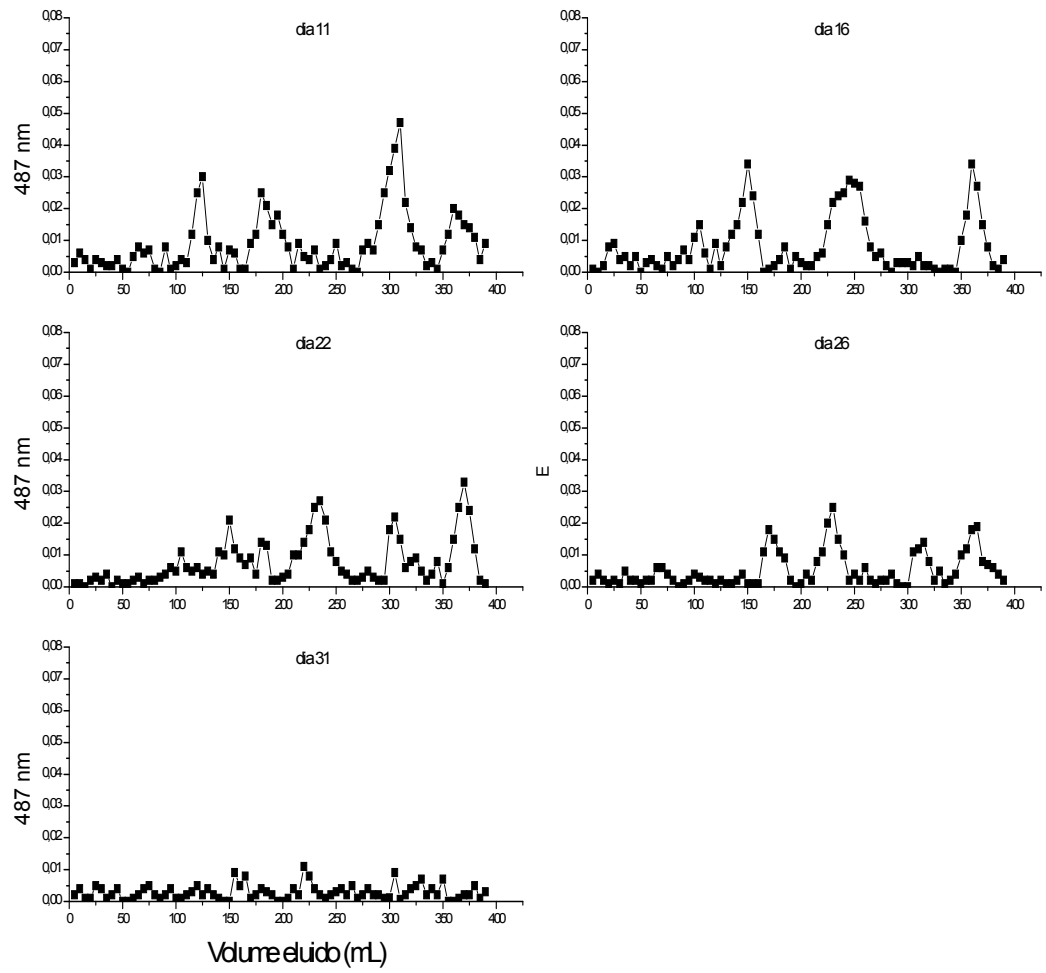


Figura 18. Degradação da fração A pela população bacteriana analisada através de cromatografia de separação por massa em gel Sepharose CL-4B. Os gráficos (dias 0-31) mostram a degradação do polissacarídeo durante o período de tempo de exposição à população bacteriana

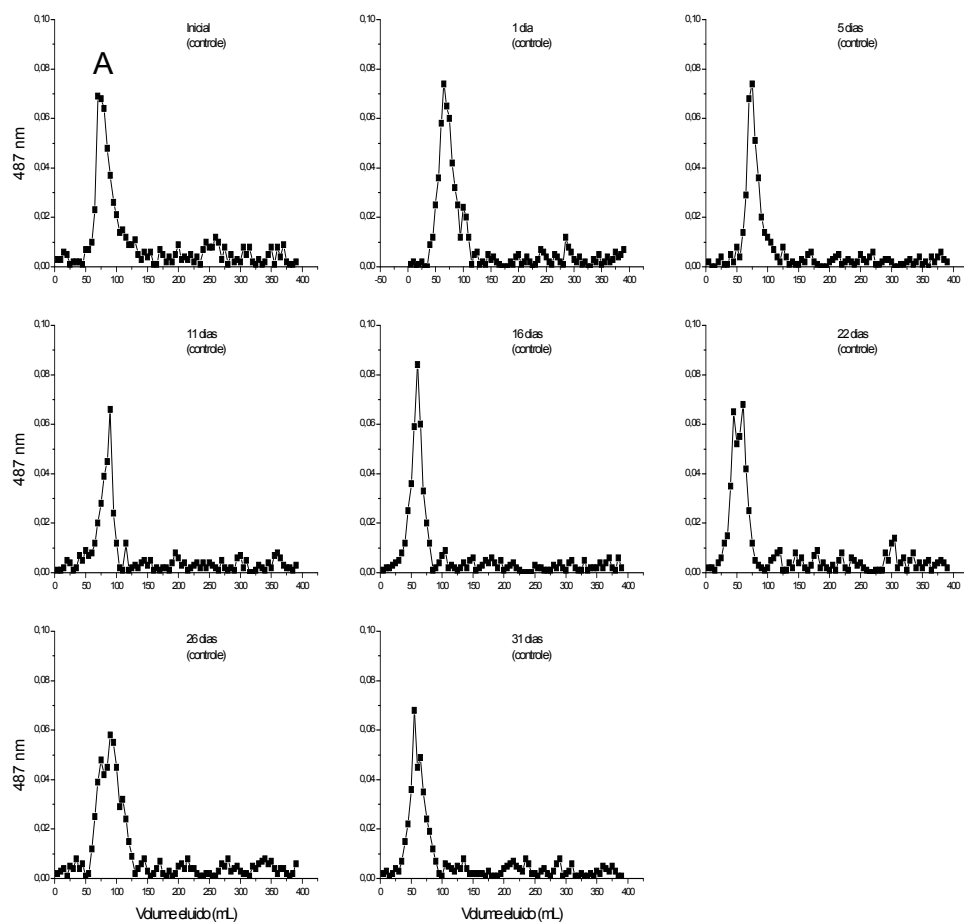


Figura 19. Controles preparados pela mistura de meio de cultura ASM-1 e adição de polissacarídeo de *P. agardhii*

A tabela 1 e a figura 20 mostram em porcentagem a degradação da fração A pela população bacteriana. Observa-se que a glicose é rapidamente degradada nos primeiros dias de exposição, até o dia 12 quando ocorre um aumento na concentração. O ácido glicurônico apresenta aumento na sua porcentagem, em relação à composição original, logo no início da exposição, sofrendo uma grande diminuição na sua concentração relativa partir do 12º dia. A glicose também apresentou ligeiro aumento na sua concentração relativa, devido à degradação

seletiva do polissacarídeo pelas bactérias, no início diminuindo em seguida, mas não chegou a ser exaurida até o 20º dia de exposição às bactérias. Os monossacarídeos arabinose, N-acetilgalactosamina e galactose foram completamente assimilados pelas bactérias no 20º dia. A partir do 20º dia de exposição às bactérias ainda ocorria a presença de monossacarídeos, entretanto por limitação metodológica, em virtude do limite de detecção do método, não foi possível analisar a degradação do polissacarídeo até o 31º dia.

Tabela 1. Composição monomérica relativa dos fragmentos da fração A durante sua degradação em função do tempo de exposição à população bacteriana

	dia 1	dia 4	dia 8	dia 12	dia 16	dia 20
arabinose	6,88%	4,62%	3,01%	0,00	0,00	0,00
n-acetil glicosamina	11,99%	13,49%	15,42%	15,26%	13,59%	9,74%
glicose	21,39%	19,19%	11,41%	24,28%	23,87%	27,80%
n-acetil galactosamina	12,57%	11,77%	10,81%	5,25%	0,00	0,00
ramnose	9,05%	8,94%	8,07%	7,73%	13,78%	5,04%
fucose	14,08%	11,81%	16,67%	22,05%	21,27%	24,91%
acido glicurônico	16,01%	22,80%	26,95%	20,02%	27,50%	32,50%
galactose	8,04%	7,38%	7,68%	5,42%	0,00	0,00
total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

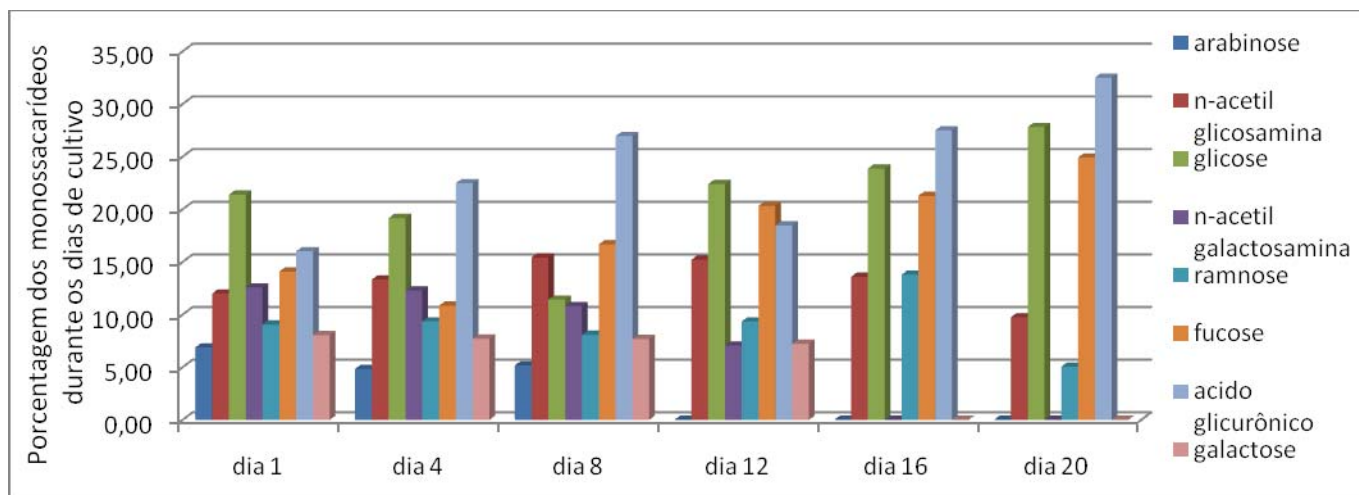


Figura 20. Composição dos monossacarídeos em comparação com o tempo de degradação nas culturas bacterianas enriquecidas com polissacarídeo excretado por *P. agardhii*

#### 4.5) Cultivo conjunto alga/bactéria

A adição de bactérias nas culturas de *P. agardhii* do reservatório de Barra Bonita não apresentou diferenças significativas no crescimento da alga, quando comparado com o teste estatístico ANOVA. Isso leva a crer que a presença de bactérias não estimulou o crescimento de *P. agardhii* (Figura 21). Porém o crescimento exponencial da cultura contaminada foi mais lento e apresentou um prolongamento dessa fase em dois dias, além de entrar em senescência mais rapidamente.

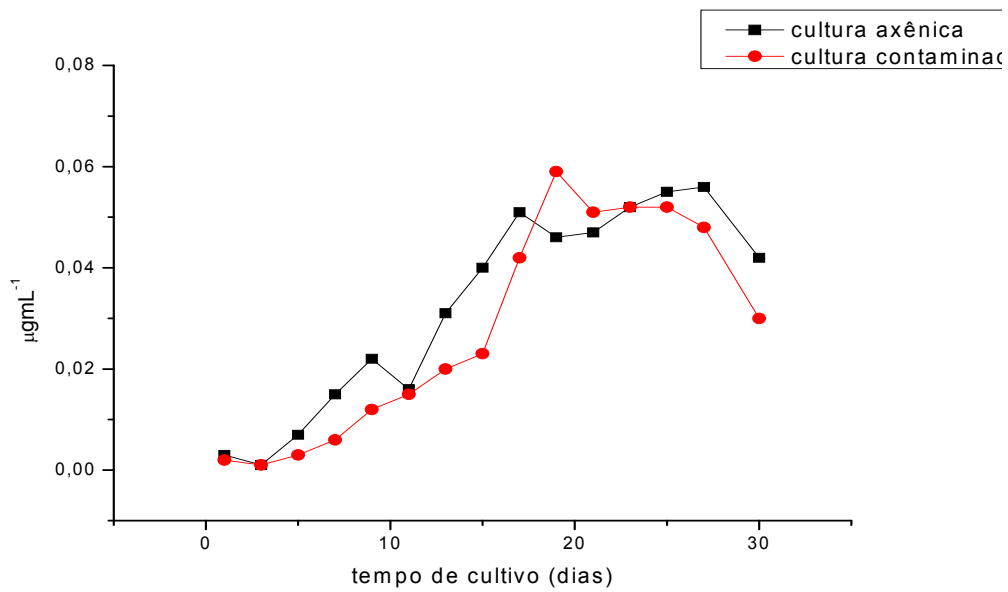


Figura 21. Concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada

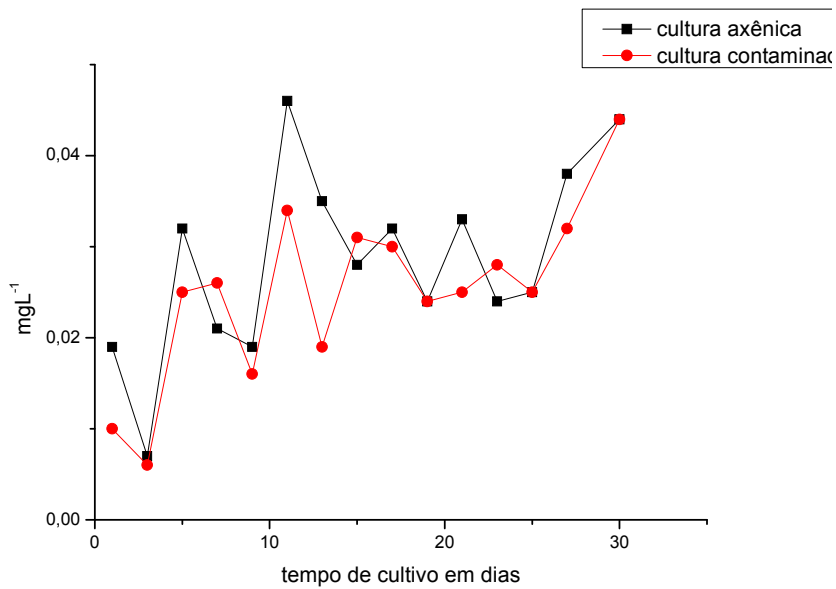


Figura 22. Concentração de carboidrato dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada

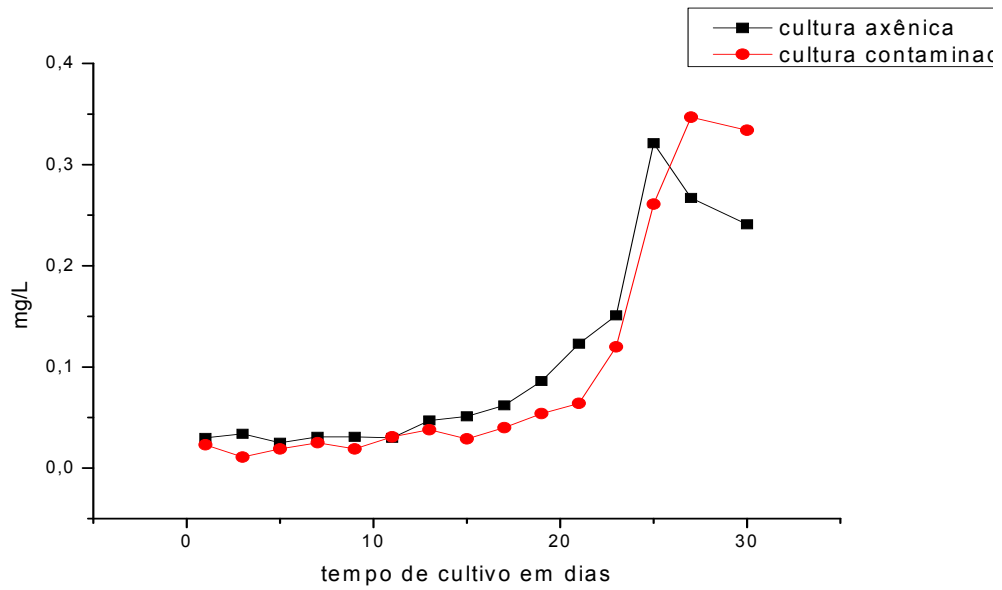


Figura 23. Concentração de carbono intracelular ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função do tempo (dias) da cultura de *Planktothrix agardhii* axênica e contaminada

#### 4.6) Crescimento da população de bactérias

O crescimento bacteriano foi observado na cultura enriquecida com EPS excretado pela cianobactéria *P. agardhii*. Observa-se uma diminuição na densidade bacteriana após o oitavo dia (Tabela 2), no mesmo tempo em que a concentração de glicose apresentou-se em declínio. Entretanto durante todo o período de exposição não houve alterações significativas no decaimento do polissacarídeo, que manteve-se constante durante todo o período.

Tabela 2. Variação da densidade bacteriana em cultura de *P. agardhii*, em relação ao tempo de cultivo

Tempo de cultivo em dias	Densidade bacteriana média (bact/mL)
Início	$4,7 \times 10^5$
4	$5,2 \times 10^5$
8	$5,6 \times 10^6$
12	$3,8 \times 10^6$
16	$4,1 \times 10^6$
20	$5 \times 10^6$

A variação da densidade bacteriana observada na figura 24 pode refletir sucessão de diferentes populações bacterianas em função do tempo de degradação do polissacarídeo. O aumento da densidade bacteriana nos 8 primeiros dias de cultivo pode ter sido devido a presença de bactérias que rapidamente degradam o polissacarídeo, liberando monossacarídeos livres para o meio. Conforme esses monossacarídeos vão sendo degradados e somente os mais refratários estão presentes no meio, o crescimento bacteriano dessa população específica decresceu até o 12º dia, onde a população inicial passou a utilizar os monossacarídeos mais refratários, ou, foi substituída por uma outra mais especializada neste tipo de composto o que mostra a contínua queda de polissacarídeo durante todo o período de cultivo.

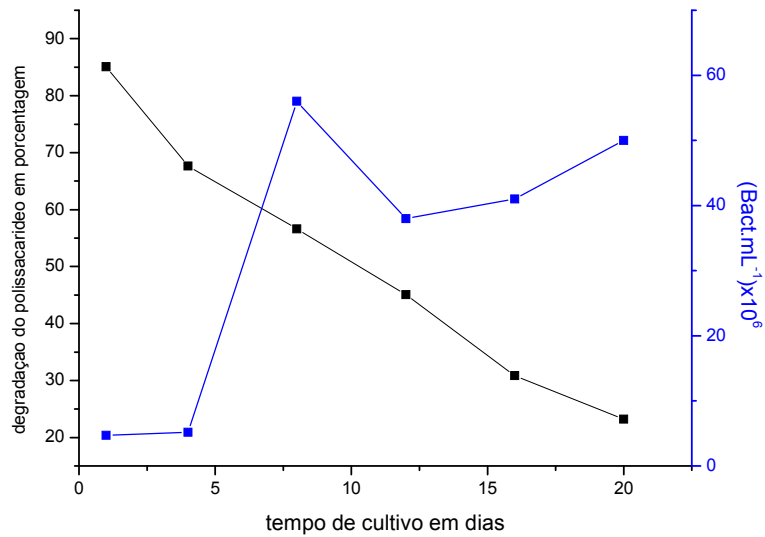


Figura 24. Variação da densidade bacteriana em relação à degradação do polissacarídeo excretado por *P.agardhii*, em função do tempo de cultivo

#### 4.6.1) Diversidade de Morfotipos Bacterianos

Todos os morfotipos bacterianos foram encontrados durante o período de cultivo. Os morfotipos com maior frequência em todos os dias de cultivo foram os cocobacilos e bacilos. Nos primeiros dias de cultura a predominância era de bacilos sendo substituída gradativamente pelos cocobacilos, os quais no 20º dia se tornaram o morfotipo mais comum. Cocos apareceram em todos os dias de cultura, filamentos não apareceram no primeiro dia, vibrios aparecem no 8º dia e espirilos apareceram somente no 16º dia.

A figura 25 mostra a presença dos diferentes morfotipos nos diferentes dias de cultivo bacteriano



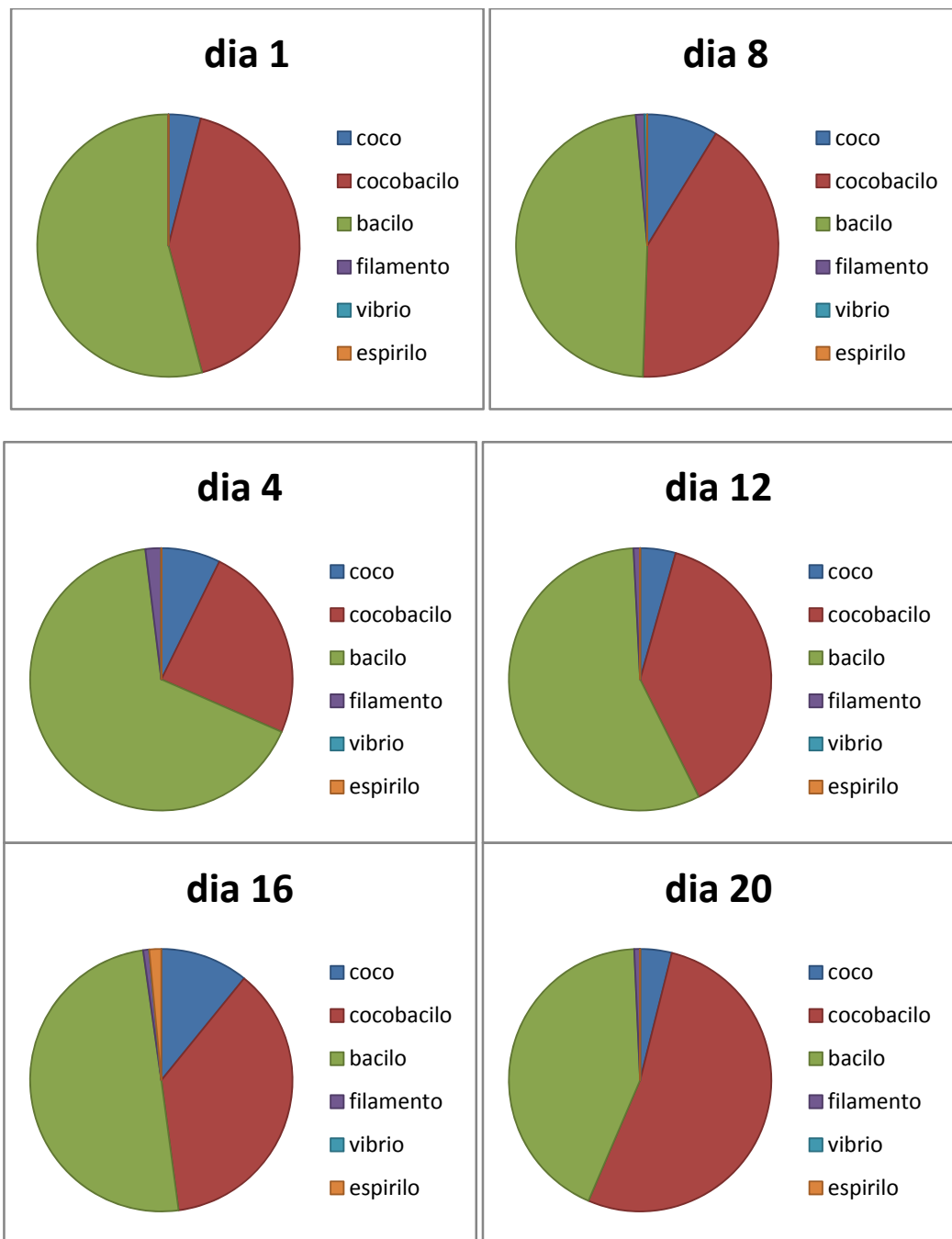


Figura 25. Proporção de morfotipos bacterianos presentes nos diferentes dias de cultivo da população de bactérias enriquecido com o polissacarídeo proveniente de *P. agardhii*

#### 4.6.2) *Frequências relativas das bactérias separadas por classes de tamanho*

A principal diferença entre bacilos e flagelos é a razão comprimento/largura é possível observar o aumento dos filamentos e dos cocos durante o cultivo por meio da separação por classes de tamanho. Com essa separação é possível observar um aumento na quantidade de filamentos e uma grande diminuição das bactérias de menor tamanho, e uma maior homogeneização das diferentes classes de tamanho no 4º dia. Após esse dia os maiores filamentos começam a sofrer uma diminuição na sua frequência e as bactérias de menor tamanho começam a se tornar mais abundantes, devido a um maior chance de encontro entre elas e o nutriente (razão superfície/volume).

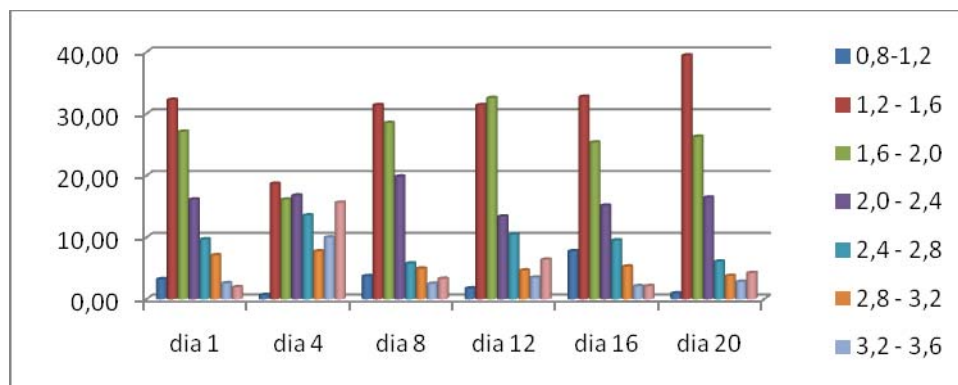


Figura 26. Frequência relativa (%) das bactérias nas culturas enriquecidas com o polissacarídeo, separadas por classes de tamanho celular durante os 20 dias de cultivo

## 5. Discussão

A excreção de carboidratos e/ou formação de tubos de polissacarídeos envolvendo os filamentos de *P. agardhii* ocorreu durante todo o crescimento, iniciando-se no quinto dia e mantendo-se até a fase de senescência.

No fim do cultivo (correspondente ao 35º dia – figura 12) os tubos coalescem formando uma aparente massa única gelatinosa com característica de TEP. Entretanto, aparentemente, esses tubos desagregam-se, tornando-se coloidais, dando o aspecto “gelatinoso” às culturas. Não se comprovou ainda se a “dissolução” dos tubos é realmente o único responsável pela gelatinização dos meios de cultura já que pode-se observar que o EPS é liberado, pelo menos em pouca quantidade, antes da liberação dos tubos.

De acordo com as fotos, verificou-se que os tubos de polissacarídeo estiveram presentes por todo o período (correspondente aos 35 dias de cultivo). Nos primeiros dias de cultura eles formam tubos mais compactos (Figuras 4, 5, 6, 7), devido a uma maior replicação das células. Conforme a cultura atingiu a fase estacionária e os filamentos formam agregados maiores, os tubos de polissacarídeo começam a se fundir (figura 12).

Hoiczky (2000) mostrou que a parede celular das *Oscillatoriales* apresenta um arranjo de peptidoglicano muito maior do que do que outras bactérias gram-negativas e suas células são cobertas por um complexo externo de camadas. Esse complexo externo de camadas é arranjado paralelamente através de fibras, que são correlacionadas com o senso de ciclo dos filamentos durante a locomoção. Outra característica presente na parede celular desses organismos é a

presença de organelas complexas chamadas JPC (“junctional pore complex”), onde foi registrado a dezena de tipos de moléculas de peptidoglicano em diferentes cianobactérias.

A fração do polissacarídeo de *P. agardhii* analisada no cromatograma de separação por troca iônica (Figura 14), evidenciou que o polissacarídeo é eluído em baixa molaridade do gradiente salino logo no início do cromatograma, sendo dessa forma um polissacarídeo pouco ácido. A baixa acidez deve-se à baixa concentração de ácidos glucurônicos na composição do EPS: somente 13,78% e não foi constatada a presença de ácido galacturônico. A alta proporção de glicose no EPS de *P. agardhii* e os monossacarídeos que foram encontrados no cultivo dessa cianobactéria são uma característica do EPS deste grupo, já descrita em vários trabalhos (De Philips *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 2004).

A realocação observada na figura 18, ou seja, a realocação do polissacarídeo de alta massa molecular para o de massa molecular mais baixa por degradação bacteriana, já havia sido observada por Freire-Nordi & Vieira (1996) para o polissacarídeo produzido pela clorofícea *Ankistrodesmus densus* e por Colombo *et al.* (2004) para o polissacarídeo produzido pela cianobactéria *Anabaena spiroides*. A completa degradação do EPS de *P. agardhii* e de outros polissacarídeos extracelulares de outros fitoplanctontes mostra que as altas massas moleculares desse composto não são empecilho para que sejam metabolizados completamente e relativamente rápido por bactérias e/ou outros microorganismos heterótrofos.

Estudos têm mostrado que, de modo geral, composto de baixa massa molecular (açúcares simples e pequenos peptídeos) são mais importantes para as populações bacterianas que compostos de maior massa molecular, pelo fato desses compostos serem mais facilmente assimilados pelas bactérias (Iturriaga & Zsolnay, 1983). Por outro lado essa teoria pode ser

contestada por estudos que mostram que compostos poliméricos podem facilitar a nutrição bacteriana (Münster, 1991).

Passow *et al.* (1994) mostraram que os polissacarídeos excretados por diatomáceas marinhas são importante formadores de agregados e constituíram-se em recursos para a fixação de bactérias, além de fonte de carbono de alta qualidade. Pode-se deduzir que os tubos liberados para o meio podem funcionar, antes de se “dissolverem” ou ficarem na forma de colóides, pelo menos durante algum tempo como TEP (Berman-Frank *et al.*, 2007) ou partículas gelatinosas que têm um desenvolvimento diferenciado no meio ambiente; podem se agregar a células fitoplanctônicas e a outras TEP, formando agregados gelatinosos (Vieira *et al.*, 2008). Estes TEP seriam de origem “biótica” e não formados por coagulação físico-química de colóides de origens variadas (Mopper *et al.* 1992), que é reconhecido como o processo mais freqüente na formação dessas partículas. O TEP de origem biótica, ou seja, a partir da cápsula e/ou tubos da célula são descritas para outras cianobactérias, como *Trichodesmium* sp. ((Berman-Frank *et al.*, 2007) e *Anabaena spiroides* (Bittar & Vieira, 2010). As TEP podem se agregar a células fitoplanctônicas e outras TEP, formando agregados gelatinosos (Vieira *et al.*, 2008) e dessa forma podem servir de substrato para a colonização de bactérias.

Como as mudanças na população bacterioplanctônica estão relacionadas com a mudança no ambiente os quais elas habitam (Christensen & Characklis, 1990) mudanças na concentração dos monossacarídeos disponíveis podem ser devido à variação metabólica dos organismos heterotróficos. Dessa maneira os polissacarídeos excretados, ao longo do tempo, podem ter selecionado certas populações específicas para a degradação dos mesmos. A capacidade de mineralização de macromoléculas envolve um consórcio de bactérias, cada qual com funções diferenciadas e realizando transformações específicas.

A degradação do polissacarídeo iniciou-se já após 12 horas de exposição às bactérias e no 31º dia de exposição foi praticamente consumido quando quantificado por fragmentos em cromatografia por eluição em gel CL-6B (figura 15). Também, os monossacarídeos quantificados por cromatografia gasosa durante a degradação foram quase todos exauridos (Tabela 1). Estes resultados podem dar indícios que no reservatório de Barra Bonita existe uma população bacteriana perfeitamente adaptada a utilizar o EPS de *P. agardhii*.

Durante a degradação bacteriana pequenas flutuações na massa dos EPS e variações encontradas na concentração relativa dos monossacarídeos, podem ser, devidos à liberação de EPS pelas próprias bactérias (Panhota et al. 2007), uma vez que a produção e excreção de polissacarídeos não se restringe exclusivamente a cianobactérias. Entretanto, é bem plausível que tenha ocorrido aumento da concentração relativa, no caso de ácido glicurônico e glicose, devido à degradação seletiva de monossacarídeos. É interessante notar que a fucose até o 20º dia de cultivo, foi o açúcar mais refratário, o que daria um caráter hidrofóbico aos fragmentos com esse monossacarídeo.

A análise do polissacarídeo de *P. agardhii* evidenciou a presença do monossacarídeo ácido siálico. Este monossacarídeo pertence a um grupo de compostos glicoconjugados muito comum em organismos superiores (Schauer, 2003), porém ainda não havia sido observado para cianobactérias. Para outros procariotos eles são excelentes fontes de carbono, nitrogênio, energia e são precursores da biossíntese da parede celular. As estratégias catabólicas para utilizar as fontes nutricionais de ácido siálico derivam de mecanismos biossintéticos, incluindo transferência horizontal de genes e sistemas de transportes múltiplos. Para cianobactérias, no caso específico da alga utilizada nesse trabalho, a presença de ácido siálico pode fornecer

informação orientacional, como posição na coluna d'água, do ambiente e pode funcionar como regulador global, uma das funções observadas por Vimr (2004) para *E. choli*.

Os morfotipos bacterianos (figura 24) e as diferentes classes de tamanho (figura 25) podem apresentar-se em situações benéficas mútuas para a cianobactéria, como discutido por Giroldo *et al.* (2003), uma vez que o crescimento do organismo não sofreu alteração pela presença da população bacteriana a qual estava previamente adaptada. Dessa forma é pouco provável que a produção de EPS se não traz benefícios por meio das associações alga bactéria, pode trazer benefícios de outras formas, para suprir o prejuízo causado pela colonização das bactérias. Neste trabalho a associação alga/bactéria não apresentou prejuízo para a alga, seu crescimento não foi alterado devido à colonização pelas bactérias.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o EPS originado de *P. agardhii* pode ser totalmente consumido por uma população bacteriana durante um período de tempo de 30 dias. Esse período de tempo pode ser considerado curto em comparação com o tempo de retenção médio para o reservatório (100 dias). Isto mostra que o EPS é produzido e degradado no próprio reservatório, não sendo exportado a jusante. Os resultados obtidos mostram também que, considerando a enorme biomassa produzida por *P. agardhii* o EPS produzido por essa cianobactéria é uma fonte de carbono importantíssima para a população de microorganismos heterotróficos e, considerando-se que ocorrem variações na composição dos fragmentos durante a degradação, potenciais importantes funções ecológicas podem estar vinculadas à degradação do EPS de *P. agardhii*.

## 6. Conclusão

- A degradação do polissacarídeo excretado por *P.agardhii* evidencia que existe uma população bacteriana adaptada a ele.
- A composição monomérica apresentou semelhanças com de outras cianobactérias, porém com a presença de um monômero inédito, o ácido siálico.
- A degradação do polissacarídeo pelas bactérias demonstra que há indícios de degradação seletiva desses compostos.
- A alteração dos morfotipos e classes de tamanho das bactérias, pode-se ter indícios de sucessão da população.



## 7. Bibliografia

- Berman-Frank, I., Rosenberg, G., Levitan, O., Haramaty, L. & Mari, X. 2007. Coupling between autocatalytic cell death and transparent exopolymeric particle production in the marine *Trichodesmium*. **Environ. Microbiol.** **9** (6): 1415-1422
- Bratbak, G. & Thingstad, T. F., 1985. Phytoplankton-bacteria interaction: an apparent paradox? Analysis of model system with both competition and commensalisms. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, **25**: 23-30
- Chrost, R. J. & Faust, M. A. 1983. Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. **J. Plankton. Res.**, **5**: 477-493
- Colombo, V., Vieira A. A. H. & Moraes, G., 2004. Microbial degradation of the extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). **Rev. Microbiol.**, **35**: 110-116
- Decho, A. W., 1990. Microbial exopolymer secretion in ocean environments: Their role(s) in food web and marine process. **Oceanogr. Mar. Biol. Annual Review**, **28**: 73-153
- De Philips, R., Sili, C., Paperi, R. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. **J. Appl. Phycol**, **13**: 293-299
- Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, D. A., Rebers, P. & Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350-356.
- Fisher, L. 1980. Gel filtration chromatography. Elsevier North-Holland Biomedical Press, 269p
- Fogg, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Bot. Mar.**, **26**: 3-14

- Freire-Nordi, C. S., Vieira, A. A. H, & Nascimento, O. R. 2005. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: na EPR study. **Process Biochemistry**, **40**: 2215-2224.
- Freire-Nordi, C. S. & Vieira, A. A. H. 1998. Degradability of polysaccharides compounds excreted by *Ankistrodesmus densus* Kors (Chlorophyceae) in cultures of natural bacterial communities. **Verh. Internat. Verein. Limnol.** **26**: 1685-1688.
- Freire-Nordi, C. S. & Vieira, A. A. H. 1996. Utilization of extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae) by heterotrophic bacteria. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **27(1)**: 27-32
- Giroldo, D., Ortolano, P. I. C. & Vieira, A. A. H. 2007. Bactéria-algae association in batch culture of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrate. **Freshwater Biology** **52**: 1281-1289
- Giroldo, D. & Vieira, A. A. H. 2005. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. **J. Plankton Res.**, **27(7)**: 695-705.
- Giroldo, D., Vieira, A. A. H. & Paulsen, B.S. 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). **J. Phycol.** **39**: 1109-1115.
- Giroldo, D., Vieira A. A. H. 2002. An extracellular sulphated fucose-rich polysaccharides produced by a tropical strain of *C. obovata* (Cryptophyceae). **J. Applied Phycology**, **14**: 185-191

- Gorham, P. R., McLachlan, J., Hammer, U. T. & Kim, W. K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. **Verh. Int. Verei Theor. Angew. Limnol.**, **15: 796-804.**
- Hellebust, J. A. 1974. Extracellular products. In: W.D.P. Stewart (ed). *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs, v 10 pp 838-863. Blackwell Scientific, Oxford
- Hoiczky, E. 2000. Gliding motility in cyanobacteria: observation and possible explanations. **Arch Microbiol.** **174:11-17**
- Iturriaga, R. & Zsolnay, A. 1983. Heterotrophic uptake and transformation of phytoplankton extracellular products. **Bot. Mar.** **26:375-381**
- Leppard, G. G., 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment** **165: 103-131**
- Lorezen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.** **12:343-346**
- Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F., 1978. *Water analysis: Some revised methods for limnologist*. Freshwater Biological Association. Scientific Association. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd. 117p
- Marker A.F.H., Nusch, E.A., Rai, H. & Riemann, B. 1980. The measurement of photosynthetic pigment in freshwaters and standardization of methods: conclusion and recommendation. **Arch Hydrobiol Beih.** **14:91-106**
- Mayzaud, P., Chanut, J. P. & Ackmann, R. G. 1998. Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate matter with special reference to fatty acids and sterols. **Mar. Ecol. Progr. Ser.** **56: 189-204**

- Mopper, K., Schultz, C. A., Chevolot, L., Germain, C., Revuelta, R. Dawson, R. 1992. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. **Environ. Sci. Technol.** **26: 133-138**
- Münster U. 1991. Extracellular enzymes in eutrophic and polyhumic lakes. In: Microbial Enzymes in Aquatic Enviroments. Chróst, R.J. New York: Springer-Verlag. p. 96-117
- Myklestad, S. 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. **Science of Total Environment 165: 155-164**
- Myklestad, S, 1977. Production of carbohydrates by marine plankton diatoms. II. Influence of the N/P ratio in growth medium on the assimilation ratio, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrate by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** **29: 161-179**
- Nusch, E.S. 1980. Comparision of diferente methods for chlorophyll and pheopigments determination. **Arch. Hydrobiol. Beih.** **14:14-36**
- Panhota, R. S., Bianchini Jr., I. & Vieira A.A.H. 2007. Glucose uptake and extracellular polysaccharides (EPS) produced by bacterioplankton from na eutrophic tropical reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). **Hydrobiologia 583: 223-230**
- Passow, U., Alldredge, A. L. & Logan, B. E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatoms blooms. **Deep-Sea Res. J.** **41: 335-357**
- Vieira, A. A. H., Ortolano, P. I. C., Giroldo, G., Dellamano-Oliveira, M. J., Bittar, T. B., Lombardi, A. T., Sartori, A. L., Paulsen, B. S., 2008. Role of hydrophobic extracellular polyssacharide of *Aulacoseira granulata* (Bacillriphyceae) on agregate formation in a turbulent and hypertrophic reservoir. **Limnol. Oceanogr.** **53: 1877-1899**

Vieira, A. A. H. & Myklestad, S. 1986. Production of extracellular carbohydrates from *Nitzschia densus*. **J. Plankton Res. 8: 985-994**

Wood, A. M. & Van Vallen, L. M. 1990. Paradox lost? On the releases of energy-rich compounds by phytoplankton. **Marine microbial food web 4: 103-116**