

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

**POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DAS GLICOSIDASES NO RESERVATÓRIO
DE BARRA BONITA, SP, BRASIL**

VANESSA COLOMBO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos-SP
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

C718pe

Colombo, Vanessa.

Polissacarídeos extracelulares e atividade enzimática das glicosidases no reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil / Vanessa Colombo. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Meio ambiente de água doce. 2. Atividade enzimática.
3. Fitoplancto. 4. Barra Bonita (SP). 5. Polissacarídeos extracelulares I. Título.

CDD: 574.52632 (20^a)

Orientador

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

*Dedico este trabalho
a minha família e ao meu
marido Juliano pelo
incentivo e colaboração
em tudo o que alcancei
até hoje ...*

"Não julgues nada pela pequenez dos começos. Uma vez fizeram-me notar que não se distinguem pelo tamanho as sementes que darão ervas anuais das que vão produzir árvores centenárias."

AGRADECIMENTOS

- ☺ Ao Prof. Dr. Armando A.H. Vieira pela orientação, oportunidade, incentivo (e correções...) que fizeram minha vida acadêmica crescer durante todos estes anos.
- ☺ Ao PPG-ERN e UFSCar pela infra-estrutura oferecida.
- ☺ À FAPESP pelo apoio financeiro durante estes dois anos, que possibilitou a realização deste trabalho.
- ☺ Ao Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr. pela grande ajuda com as análises de DNA e por me proporcionar oportunidades para o futuro.
- ☺ À banca examinadora da defesa de doutorado, Prof. Dra. Cristina Freire-Nordi, Prof. Dra. Sandra Protter Gouvêa, Prof. Dr. Gilberto Moraes, Prof. Dra. Odete Rocha e Prof. Dr. Armando A.H. Vieira pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho.
- ☺ Ao pessoal da AES Tietê (UHE Barra Bonita) na pessoa do Sr. Faustino Levorato pelos dados de vazão e pluviosidade.
- ☺ Ao Antônio Luiz Sartori por solucionar todos os meus problemas dentro do laboratório. É verdade... se você ganhasse R\$ 0,10 por cada muito obrigado, já estaria rico.
- ☺ Ao Luizinho, técnico de campo, pela disposição a toda prova e pelas boas risadas durante as coletas.
- ☺ Ao Marcelo Cervini, super colega, com uma paciência que é difícil de ver... Obrigado !
- ☺ Aos amigos do laboratório: Sandra, Danilo, Ana, Cristina, Mic, Zeza, Thaís, Pedro, Danilo II, Roseli, Sebastião, Inessa, Aline, Fabrício e Letícia.
- ☺ Em especial pela Zeza, minha amiga do dia-a-dia e companheira de suplícios em campo.
- ☺ Agradeço também em especial à Ana Lombardi por ser sempre tão solícita.
- ☺ Ao Prof. Flávio pelo empréstimo de muitos kits caríssimos e aos colegas de seu laboratório: Cássia (super providencial), Marcinha, Andréia, Rossele e Marina que muito me ajudaram.
- ☺ À Prof. Dra. Mirna H.R. Selegim e ao pessoal de seu laboratório (Roberta F. e Darci) pela ajuda nas contagens de bactérias.
- ☺ Às amigas da graduação Suze, Rê, Ká e Dri pela troca de e-mails revigorantes, almocinhos cheios de história e simplesmente por passarem pelas mesmas situações e preocupações que eu.
- ☺ A toda a família Corbi pelos momentos de descontração e pela força nos momentos de fraqueza.
- ☺ Aos meus avós falecidos Sebastião, Osvaldo e Elvira pelas lições de vida que deixaram e por toda a alegria que compartilhamos (para os que eu conheci) quando estavam aqui entre nós.
- ☺ À minha avó Hortência, para que ela agora queira ver os meus próximos pós-docs e pelo incentivo e orgulho pelos netos que sempre faz a gente se sentir tão bem.
- ☺ Aos primos, primas, tios, tias e toda a família por tudo de bom. Em especial pelos meus tios César e Magaly e primos Kelyn e Kelton por acompanharem de perto minhas alegrias e tristezas acadêmicas.

- ☺ Ao Irysh que bem que tentou mas não conseguiu me seguir até o fim...pelo Tommy e pela (futura) Theodora promessas de companhia e de novas alegrias.
- ☺ À minha irmã Marta, meu cunhado Márcio (Bicho!!!), minhas sobrinhas Mylena e Luíza que continuam me apoiando no estudo “dos lodinhos”.
- ☺ Aos meus pais Milton e Vera que foram toda a minha base e continuam me acompanhando (agora um pouco mais de longe) agradeço pelo incentivo e preocupações em todos os sentidos.
- ☺ Agradeço com muito carinho ao meu marido Juliano que foi quem mais me deu forças durante este doutorado, pelo apoio e paciência nos momentos de choradeira, pelo amor, pela felicidade e por todas as outras coisas que só minha cara metade poderia me oferecer.
- ☺ A Deus pela saúde e força dadas durante todos estes anos de estudo peço que abençoe todas estas pessoas maravilhosas.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram
mas sim na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis
pessoas incomparáveis”*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

A)	LISTA DE TABELAS	
B)	LISTA DE FIGURAS	
C)	RESUMO	
D)	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	OBJETIVOS	11
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1.	Local de Estudo	13
2.2.	Coleta de Amostras	15
2.3.	Distribuição das Glicosidases Extracelulares nos Diferentes Tamanhos de Partículas Presentes na Coluna D'Água do Reservatório	16
2.4.	Análise Mensal dos Polissacarídeos e da Atividade Enzimática Presentes no Reservatório	17
2.5.	Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório	18
2.6.	Degradação dos Polissacarídeos Produzidos pelas Espécies Predominantes do Fitoplâncton em Culturas Axênicas no Laboratório	21
A)	<i>Cromatografia de Exclusão por Permeação em Gel</i>	22
B)	<i>Cromatografia de Gás</i>	23
C)	<i>Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Pulso Amperométrico (HPLC-PAD)</i>	25
D)	<i>Coloração com DAPI</i>	26
E)	<i>Análise da Atividade Enzimática</i>	27
F)	<i>Diversidade Bacteriana por Regiões Espaçadoras Intergênicas</i>	29
	Análises estatísticas	35
3.	RESULTADOS	36
3.1.	Dados Limnológicos	36
3.1.1.	Pluviosidade	36
3.1.2.	Parâmetros Físicos e Químicos	37
3.2.	Atividade Enzimática das Glicosidases	37
3.2.1.	Análise Mensal da Atividade Enzimática de Glicosidases Presentes no	37

Reservatório	
3.2.2. Distribuição das Glicosidases Extracelulares nos Diferentes Tamanhos de Partículas Presentes na Coluna D'Água do Reservatório	42
3.3. Análise Mensal dos Polissacarídeos Presentes no Reservatório	49
3.4. Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório	59
3.5. Degradação dos Polissacarídeos Produzidos pelas Espécies Predominantes do Fitoplâncton em Culturas Axênicas no Laboratório	69
3.5.1. <i>Aulacoseira granulata</i>	69
3.5.2. <i>Microcystis aeruginosa</i>	75
4. DISCUSSÃO	80
5. CONCLUSÃO	91
6. BIBLIOGRAFIA	92

A) LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Concentração final dos reagentes para execução do PCR do Domínio <i>Bacteria</i> .	31
Tabela 2:	Parâmetros de qualidade da água do Reservatório de Barra Bonita (SP) verificados durante o período de amostragem de agosto de 2002 a janeiro de 2004.	37
Tabela 3:	Valores médios de atividade enzimática (n moles L ⁻¹ h ⁻¹) de diferentes enzimas na coluna d'água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004. * = não detectado.	40
Tabela 4:	Porcentagem de atividade enzimática (n moles L ⁻¹ h ⁻¹) encontrada na fração livre em relação ao total para cada enzima nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente durante o período de maio 2003 a janeiro de 2004.	48
Tabela 5:	Composição total de carboidratos (mg L ⁻¹) nas amostras de água do reservatório para as coletas de junho 2002 a janeiro de 2004.	52
Tabela 6:	Valores médios em porcentagem para composição monossacarídica total de carboidratos nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. * = não detectado.	52
Tabela 7:	Composição de carboidratos dissolvidos em porcentagem nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.	54
Tabela 8:	Atividades das enzimas α e β -glicosidase, α e β -galactosidase e α e β -manosidase determinada em vários ambientes aquáticos.	81
Tabela 9:	Composição do polissacarídeo extracelular produzido pelas principais microalgas no Reservatório de Barra Bonita (SP). Fuc= Fucose, Ram= Ramnose, Ara= Arabinose, Gal= Galactose, Gli= Glicose, Man= Manose, Xil= Xilose, Acgal= Ácido Galacturônico, Acgli= Ácido Glicurônico.	85

B) LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Localização do Reservatório de Barra Bonita no Estado de São Paulo e da estação de coleta.	15
Figura 2:	Sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do Reservatório de Barra Bonita (SP) para compor o inóculo da comunidade microbiana. O sistema é lavado com HCl 10% e autoclavado. A entrada de água permanece tampada e é manuseada apenas dentro da represa para evitar contaminação por bactérias aéreas. A água entra na garrafa quando se abre a saída de ar em cada uma das profundidades-alvo. Um filtro feito com algodão na mangueira de ar evita a queda de partículas aéreas no interior da garrafa.	19
Figura 3:	Fluxograma apresentando os processos envolvidos na análise da atividade enzimática das amostras (modificado de Chróst & Velimirov, 1991).	28
Figura 4:	Pluviosidade mensal (mm) registrada no reservatório de Barra Bonita (SP) de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.	36
Figura 5:	Atividade enzimática (n moles $L^{-1} h^{-1}$) total nas amostras de água em diferentes profundidades (m) do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Média das medidas ($n=18$).	39
Figura 6:	Variação dos valores médios da atividade enzimática total (n moles $L^{-1} h^{-1}$) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004.	40
Figura 7:	Média da atividade enzimática (n moles $L^{-1} h^{-1}$) para cada enzima nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004.	41
Figura 8:	Atividade enzimática (n moles $L^{-1} h^{-1}$) nos diferentes frações de tamanho de partículas e fração livre quantificada de novembro de 2002 a janeiro de 2004 na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita (SP).	43
Figura 9:	Atividade enzimática total (n moles $L^{-1} h^{-1}$) nas diferentes frações, quantificada nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de novembro de 2002 a janeiro de 2004.	45
Figura 10:	Atividade enzimática total (n moles $L^{-1} h^{-1}$) separada entre as frações 70-0,2 μm e menor que 0,2 μm nas amostras de água do Reservatório de Barra	45

	Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2003 a janeiro de 2004.	
Figura 11:	Atividade enzimática ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) separada entre as frações 70-0,2 μm e menor que 0,2 μm nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2002 a janeiro de 2004.	47
Figura 12:	Atividade enzimática ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na fração livre comparada com a densidade bacteriana (células mL^{-1}) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2003 a janeiro de 2004.	48
Figura 13:	Análise da composição monossacarídica total (mg L^{-1}) nas amostras de água em diferentes profundidades do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Média das medidas ($n=18$).	50
Figura 14:	Concentração de carboidratos totais dissolvidos (mg L^{-1}) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.	51
Figura 15:	Concentração dos monossacarídeos dissolvidos (mg L^{-1}) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.	53
Figura 16:	Densidades fitoplantônicas (células mL^{-1}) das populações predominantes nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.	56
Figura 17:	Distribuição conjunta das densidades fitoplantônica e bacteriana (células mL^{-1}), dos carboidratos totais dissolvidos (mg L^{-1}) e da atividade enzimática extracelular ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.	58
Figura 18:	Frações provenientes do substrato em decomposição que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).	59
Figura 19:	Composição monossacarídica total (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por	60

Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004.

- Figura 20:** Atividade enzimática ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004. 61
- Figura 21:** Concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004. 62
- Figura 22:** Densidade bacteriana (células mL^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004. 63
- Figura 23:** Frações provenientes do substrato em decomposição que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa ($V_e/V_t 0,3$) e 10 kDa ($V_e/V_t 0,9$). 64
- Figura 24:** Composição monossacarídica total (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. 65
- Figura 25:** Atividade enzimática ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. 66
- Figura 26:** Concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. 67
- Figura 27:** Comparação entre crescimento bacteriano (células mL^{-1}) e concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. 68

Figura 28:	Frações do substrato em decomposição (polissacarídeo da diatomácea <i>Aulacoseira granulata</i>) que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).	70
Figura 29:	Composição monossacarídica (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos Produzidos por <i>Aulacoseira granulata</i> em Culturas Axênicas no Laboratório.	71
Figura 30:	Atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea <i>Aulacoseira granulata</i> .	72
Figura 31:	Concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea <i>Aulacoseira granulata</i> .	73
Figura 32:	Densidade bacteriana (células mL^{-1}) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea <i>Aulacoseira granulata</i> .	73
Figura 33:	Imagem do gel de agarose 1% após a purificação do DNA mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana presente durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea <i>Aulacoseira granulata</i> . As três amostras dia 0 (t_0), dia 14 (t_{14}) e dia 32 (t_{32}) estão entre os dois “ladders”. HM (High DNA Mass Ladder) em ng e 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder) com o tamanho aproximado dos fragmentos de DNA obtidos.	74
Figura 34:	Frações do substrato em decomposição (polissacarídeo da cianofícea <i>Microcystis aeruginosa</i>) que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).	76
Figura 35:	Composição monossacarídica (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos Produzidos por <i>Microcystis aeruginosa</i> em Culturas Axênicas no Laboratório.	77
Figura 36:	Atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofícea <i>Microcystis aeruginosa</i> .	78
Figura 37:	Concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofícea <i>Microcystis aeruginosa</i> .	79
Figura 38:	Densidade bacteriana (células mL^{-1}) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofícea <i>Microcystis aeruginosa</i> .	79

C) RESUMO

A liberação de polissacarídeos extracelulares pode ocorrer a partir de células saudáveis e ativas e tem sido demonstrado ser uma importante fonte de carbono para as bactérias. Em ambientes eutróficos onde grandes florações são formadas por eficientes produtores de polissacarídeos extracelulares como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides* estes substratos orgânicos podem, por exemplo, suportar o crescimento bacteriano planctônico. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade glicolítica extracelular durante o ciclo sazonal e os possíveis ajustes das enzimas correspondentes em resposta a variações dos polissacarídeos do Reservatório de Barra Bonita. A maioria das enzimas exibiu uma diminuição significativa durante a estação seca (abril a setembro). O conteúdo de carboidratos totais dissolvidos variou de 0,5 a 6,83 mg L⁻¹ e foi composto principalmente de polissacarídeos (92%). A comunidade fitoplanctônica mostrou uma sucessão evidente com cianobactérias dominando durante a estação chuvosa (principalmente *Microcystis* sp, *M. aeruginosa* e *Anabaena spiroides*) enquanto que as diatomáceas (principalmente *Aulacoseira granulata*) e criptofíceas (*Cryptomonas* sp) estiveram presentes em maiores densidades durante a estação seca. Quatro florações foram verificadas durante o período experimental e, após cada floração a liberação de carboidratos combinados foi seguida por elevadas atividades enzimáticas, dessa forma a produção de enzimas extracelulares pelos microorganismos microheterotróficos esteve relacionada ao influxo de matéria orgânica polimérica. Mesmo a composição dos monossacarídeos das amostras do reservatório após cada floração aproxima-se da composição do polissacarídeo extracelular da população fitoplanctônica dominante. Também foram realizados experimentos de degradação do polissacarídeo proveniente de Barra Bonita e do polissacarídeo extracelular produzido por organismos dominantes do fitoplâncton (*A. granulata* e *M. aeruginosa*) em laboratório que confirmaram a interpretação dos dados obtidos em campo.

D) ABSTRACT

Release of extracellular polysaccharides can occur from healthy and active cells and has been demonstrated to be an important carbon source for bacteria. In eutrophic environments where large blooms are formed by efficient extracellular polysaccharide producers such as *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena spiroides*, these organic materials (high molecular weight extracellular polysaccharides) may support planktonic bacterial growth. The aim of this study was to evaluate the extracellular glycolytic enzyme activity during a seasonal cycle and a possible regulation of the corresponding enzymes in response to variation of polysaccharides in Barra Bonita Reservoir. The majority of enzymes exhibited a significant decrease during the dry season (April to September). The content of total dissolved carbohydrates varied from 0.5 to 6.83 mg L⁻¹ and was mainly (92%) constituted by polysaccharides. Phytoplanktonic community showed a marked succession with cyanobacteria typically dominating during the rainy season (*Microcystis* sp, *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena spiroides*), whereas diatoms (mostly *Aulacoseira granulata*) and cryptophytes (*Cryptomonas* sp) were dominant through the dry season. Four algal blooms were observed during the experimental period, and after each bloom the release of combined carbohydrates was followed by high enzymatic activities, thus the production of extracellular enzymes for microheterotrophic microorganisms was related to the influx of polymeric organic substances. Even the monosaccharides composition of reservoir samples after each bloom roughly revealed the extracellular polysaccharide composition of dominant phytoplanktonic population. Experiments of polysaccharide degradation from Barra Bonita Reservoir and produced by dominant phytoplanktonic organisms (*A. granulata* e *M. aeruginosa*) assayed in laboratory conditions had confirmed the interpretation of data measured in field.

1. INTRODUÇÃO

A existência de enzimas livres em ambientes aquáticos já havia sido percebida desde 1906 quando Fermi observou, pela primeira vez, a atividade de enzimas proteolíticas em águas de piscinas estagnadas. Um pouco mais tarde, Harvey (1925) chamou atenção para a possível presença de catalases e oxidases na água do mar e Vallentyne (1957) apontou para algumas “evidências controvertidas” a respeito da importância de enzimas livres na transformação química da matéria orgânica existente em lagos e oceanos.

Em 1959, durante o 14º Congresso da Sociedade Internacional de Limnologia Teórica e Aplicada (SIL) em Viena, Overbeck apresentou pela primeira vez dados a respeito de enzimas livres dissolvidas na água de um lago, um trabalho tratando sobre fosfatases e suas relações com a população fitoplanctônica (Overbeck, 1991).

No entanto, apenas na década de 80, quando do surgimento de um trabalho pioneiro utilizando substratos fluorescentes, o estudo das hidrolases presentes em ambientes naturais tomou grande impulso. Publicado por Hoppe (1983), para ser utilizado na análise de atividade exoenzimática, o método foi adaptado a partir de várias técnicas bioquímicas. Desde então este método tem sido bastante útil no estudo de hidrolases presentes nos mais variados ambientes.

As enzimas extracelulares possuem um papel muito importante na ecologia dos ambientes aquáticos pois, juntamente com o “grazing”, são responsáveis pela passagem de detritos para a cadeia alimentar via atividade bacteriana heterotrófica

(Hoppe *et al.*, 1988).

A principal função destas enzimas é catalisar reações que tornem possível aos microorganismos a obtenção de substâncias mais simples que necessitam para crescer. Macronutrientes por exemplo, a partir da degradação de macromoléculas de difícil utilização e também elementos-traço originados de “espécies” indisponíveis ou complexas (Price & Morel, 1990). Isto porque apenas a menor parte da matéria orgânica dissolvida (MOD, menos de 5%) presente em ambientes aquáticos é composta por substâncias de baixa massa molecular (Chróst, 1992) passíveis de absorção, enquanto grande parte dos constituintes orgânicos são compostos poliméricos de alta massa molecular (Allen, 1976; Jørsensen & Jensen, 1994).

Portanto, os microorganismos devem hidrolisar inicialmente estes polímeros e macromoléculas fora da célula, naturalmente sintetizados, transformando-os em substratos menores (como monômeros e pequenos oligômeros) para que estes possam atravessar a membrana celular entrando, dessa forma, em seu metabolismo (Hoppe, 1983; Hoppe *et al.*, 1988; Chróst, 1989, 1992; Arnosti & Repeta, 1994). Sabe-se que moléculas maiores que 600 Da são muito grandes para ultrapassarem com facilidade as membranas de bactérias (Weiss *et al.*, 1991) e por isso devem ser enzimaticamente hidrolisadas fora da célula.

É, por conseguinte, duplo o impacto dos microorganismos em águas naturais: por um lado eles retiram nutrientes do sistema transportando-os para níveis tróficos superiores, e por outro lado são responsáveis pela disponibilidade de parte desses nutrientes.

Dentre as enzimas o sub-grupo 3.2., ou seja, as glicosidases (3 é número indicador do grupo das hidrolases, 2 é o número indicador do grupo das glicosidases), englobam não somente as enzimas que agem sobre glicosídeos simples, mas também enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas em polissacarídeos (Dixon & Webb, 1979). São enzimas que removem grupos glicosídicos por hidrólise de uma terminação não-reduzida, ou seja, transferindo uma unidade glicosídica para a água (ou para outra unidade glicosídica, embora haja uma preferência pela primeira opção), sendo os produtos das reações de transferência suscetíveis a hidrólises posteriores (Matheson & MacCleary, 1985).

As glicosidases que agem sobre polissacarídeos removem monossacarídeos e representam, juntamente com as liases, o conjunto de enzimas que degrada essas macromoléculas (Matheson & McCleary, 1985; Gorton *et al.*, 1994), sendo por isso também chamadas de polissacarases ou polissacaridases. Desta maneira, há enzimas capazes de degradar o polissacarídeo em oligossacarídeos, outras capazes de agir sobre estes fragmentos menores reduzindo-os a oligossacarídeos ainda menores ou a monossacarídeos e estes podem, então, ser absorvidos e utilizados pelos microorganismos.

De acordo com a classificação utilizada por Chróst (1991) o termo “ectoenzima” refere-se a uma enzima que é produzida internamente cruzando ativamente a membrana citoplasmática e permanecendo associada com seu produtor. Estas enzimas, ligadas à superfície da célula, são as chamadas periplasmáticas e podem reagir com substratos poliméricos fora da célula. Outro termo utilizado é “enzima extracelular”, para enzimas que atuam na forma livre, ou seja, dissolvidas na água e/ou adsorvidas a

outras superfícies que não as de seu produtor (como partículas de detritos, células, materiais lodosos, etc).

Os maiores produtores de glicosidases extracelulares dentro dos ambientes aquáticos (água e sedimentos em ambientes de água doce e marinho) são os microorganismos heterotróficos, predominantemente bactérias e fungos (Somville, 1984; Meyer-Reil, 1987; Chróst, 1989). Esta classe de enzimas pode também ter sua origem indireta na liberação por células danificadas, através da predação de células algais por zooplâncton (Bochdandsky *et al.*, 1995), através da predação de bactérias por protozoários ou por lise viral (Karner & Rassoulzadegan, 1995).

Através da literatura sabe-se que entre todas as glicosidases estudadas dentro dos ambientes naturais destacam-se as α e β glicosidases que já foram encontradas em águas eutróficas, ácidas, alcalinas, e húmicas, entre outras (Somville, 1984; Chróst & Krambeck, 1986; Chróst, 1989,1992; Münster *et al.*, 1989; Sabater & Romani, 1996). Mas outras glicosidases também têm sido pesquisadas, principalmente aquelas relacionadas com a agricultura e os processos industriais das indústrias de alimento, química e farmacêutica.

Por exemplo, as galactosidases são produzidas por bactérias (Tryland & Fiksdal, 1998; Rabiou *et al.*, 2001), por fungos como *Aspergillus niger* (Ademark *et al.*, 2001) e também são encontradas em ambientes aquáticos (Münster *et al.*, 1992 a,b; MacCammon *et al.*, 1998). As fucosidases já foram verificadas em bactérias (Kurimura *et al.*, 1995) e em fungos (Farkas *et al.*, 2000). As manosidases são produzidas por fungos (Ademark *et al.*, 2001; Kurakake & Komaki, 2001), tendo sido também

encontradas em ambientes aquáticos (Chróst & Krambeck, 1986; Kasnowski & Włodarczak, 1991; Münster *et al.*, 1992 a,b). As arabinosidases são produzidas principalmente por fungos (Luonteri *et al.*, 1995; Burke & Cairney, 1997). As ramnosidases são produzidas por fungos (Manzanares *et al.*, 2000; Gallego *et al.*, 2001) e também por bactérias (Hashimoto *et al.*, 1999).

De qualquer maneira os dados sobre os produtores dessas enzimas são muito escassos, e outros microorganismos, inclusive outros microheterótrofos aquáticos, poderão ser descobertos no futuro. A ocorrência destas glicosidases em ambientes aquáticos é extremamente relevante considerando-se que a grande maioria dos polissacarídeos extracelulares de origem algal é composta por heteropolissacarídeos nos quais os monossacarídeos arabinose, manose, fucose, ramnose e xilose são componentes freqüentes, entre outros.

Os polissacarídeos representam a maior parcela de carbono fotossinteticamente fixado presente na biosfera. Os polissacarídeos solúveis representam a maior fração do carbono orgânico dissolvido (COD) em ambientes de água doce, sendo estimado em cerca de 1 a 30% do pool da MOD (Chróst *et al.*, 1989; Jørgensen & Jensen, 1994). Também representam a principal fração excretada pelo fitoplâncton (Lancelot, 1984; Myklestad, 1995; Biddanda & Benner, 1997) e por isso o fitoplâncton é considerado a maior fonte autóctone destas macromoléculas em ambientes aquáticos. Contudo pouco se sabe sobre os fatores que distinguem as frações da MOD produzidas pelo fitoplâncton que são rapidamente remineralizadas pelas bactérias daquelas que não o são (Keith & Arnosti, 2001).

Dentro dos ambientes aquáticos, os polissacarídeos podem ter origem terrestre (alóctone) ou serem excretados por microorganismos como bactérias e algas (autóctone). As funções bioquímicas dos polissacarídeos extracelulares bacterianos e algais têm atraído grande atenção nos últimos anos devido aos papéis assumidos dentro dos sistemas ecológicos ao tornarem os microorganismos adaptados a pressões seletivas particulares em diferentes ambientes. Em relação aos excretados algais, apesar de sua importância em termos de biomassa, pouco se sabe sobre seu papel ecológico e fisiológico, mas baseando-se em estudos teóricos, algumas funções ecológicas têm sido propostas.

Entre estas funções, a utilização como fonte de energia por microorganismos heterotróficos teria importante papel sobre a coevolução de comunidades microbianas complexas (Fogg, 1983; Wood & Van Valen, 1990); outras funções putativas seriam a interferência na troca de substâncias com o meio (Myklestad *et al.*, 1972; Wangersky, 1978; Freire-Nordi *et al.*, 1998), a redução das taxas de afundamento graças às bainhas extracelulares (Hutchinson, 1967; Ignatiades & Fogg, 1973; Reynolds & Walsby, 1980), a inibição da predação por organismos zooplanctônicos (Porter, 1973; Reynolds, 1986) e a promoção de condições propícias para a manutenção da atividade de determinadas enzimas (Spijkerman & Coesel, 1998).

Podemos ainda citar a participação dos excretados algais na formação de agregados gelatinosos (Grossart & Simon, 1993; 1997; Leppard, 1995; Vieira *et al.*, 2006 no prelo) e partículas gelatinosas transparentes (“transparent exopolymer particles”, TEP, Passow *et al.*, 1994; Fatibello *et al.*, 2004), a complexação, ligação e remoção de metais do meio aquático (Lombardi & Vieira, 1998; Shah *et al.*, 2000; Freire-Nordi *et al.*, 2005;

Gouvêa *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2005) e o consumo por organismos macroheterotróficos (Nogueira *et al.*, 2005).

No entanto, entre esta grande variedade de interações que podem ocorrer entre algas e bactérias nos sistemas aquáticos destaca-se como uma das mais importantes a liberação por parte do fitoplâncton de COD útil para a assimilação bacteriana (Wiebe & Smith, 1977; Cole *et al.*, 1982; Bell *et al.*, 1983; Gajewski & Chróst, 1995; Lee & Rhee, 1997). A liberação de carboidrato por células algais ativas ou senescentes é uma fonte de recurso de alta qualidade para a população microheterotrófica dentro dos ambientes aquáticos (Girollo *et al.*, 2005; Girollo & Vieira, 2005) e, por conseguinte, um importante suporte para o crescimento bacteriano (Freire-Nordi & Vieira, 1996; Freire-Nordi *et al.*, 1998; Girollo *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2004; Girollo *et al.*, 2005). Uma grande fração do carbono orgânico produzido pelo fitoplâncton é ciclado pelos organismos microheterotróficos, por isso grande atenção deve ser dada a esta via de recuperação de recursos.

As cadeias de polissacarídeos extracelulares microbianos e algais podem ser atacados de maneira exoenzimática ou endoenzimática levando a uma degradação rápida ou lenta, respectivamente. Mesmo homopolissacarídeos lineares podem ser degradados por várias enzimas diferentes. Em contraste a este sistema, a hidrólise de muitos heteropolissacarídeos extracelulares de origem microbiana pode ser realizada por apenas uma polissacaridase, altamente específica, agindo de forma endoenzimática que produz uma série de oligossacarídeos de estrutura repetitiva ou múltiplos desta (Sutherland, 1999).

A fonte da mistura de enzimas que degrada polissacarídeos pode ser proveniente de uma única espécie microbiana ou, mais comumente, uma mistura de espécies. Devido a este fato, na natureza, os microorganismos coexistem próximos e são freqüentemente encontrados em consórcios capazes de degradar substratos complexos, como usualmente são os polissacarídeos extracelulares de algas, que não poderiam ser utilizados por espécies individuais.

É relativamente raro encontrar uma cultura bacteriana pura capaz de degradar um grupo de polissacarídeos sozinha, isto porque as enzimas que degradam polissacarídeos são usualmente muito específicas, e dificilmente estas irão agir sobre mais de um polissacarídeo a menos que as estruturas sejam muito similares, embora poucos casos sejam conhecidos (Sutherland, 1999).

Em âmbito internacional muitos trabalhos tratam da relação de glicosidases com homopolissacarídeos de interesse industrial, como por exemplo, celulose e amido (Guilbot & Mercier, 1985; Gorton *et al.*, 1994), ou heteropolissarídeos como as hemiceluloses (Gorton *et al.*, 1994) e também outros tipos, como aqueles produzidos por bactérias lácticas, importantes para a produção de produtos fermentados de leite (Pham *et al.*, 2000; Van Casteren *et al.*, 2000).

Outros autores investigaram a relação entre atividade enzimática extracelular e substratos de carboidratos artificiais, assim como o modo de utilização destes substratos por bactérias (Hoppe, 1983; Somville, 1984; Hoppe *et al.*, 1988; Chróst *et al.*, 1989; Foreman *et al.*, 1998; Sinsabaugh & Foreman, 2001). Contudo, são escassos os trabalhos que tratam da relação entre glicosidases específicas com os diversos

tipos de polissacarídeos naturais de ambientes aquáticos (Chróst, 1991; Münster, 1991; Münster *et al.*, 1992 b), especialmente aqueles produzidos por algas, assim como suas implicações ecológicas.

A proposição do presente trabalho é diminuir esta lacuna existente entre as pesquisas com polissacarídeos de interesse econômico e os encontrados naturalmente nos corpos d'água. A necessidade de trabalhos laboratoriais utilizando populações produtoras de enzimas extracelulares, tanto as adsorvidas às superfícies quanto aquelas livres em solução, provenientes de ambientes aquáticos, também deve ser destacada pois se sabe que a interpretação de dados vindos de campo é, por vezes, problemática e deve ser muito cuidadosa devido à complexidade das vias metabólicas e das muitas condições sem controle, sendo, portanto, muito difícil entender a regulação das enzimas apenas por dados obtidos em campo (Overbeck, 1991).

No Brasil não são conhecidos estudos a respeito de ectoenzimas ou enzimas extracelulares ligadas a superfícies, em ambientes aquáticos.

O reservatório de Barra Bonita recebe as águas dos rios Piracicaba e Tietê, ambos eutrofizados, sendo que este segundo rio contribui com o despejo de grande parte do esgoto da cidade de São Paulo. Considera-se, portanto, que haja uma alta atividade enzimática presente para a degradação tanto dos compostos glicosídicos presentes no próprio esgoto quanto dos carboidratos excretados pelas populações bacterianas e fitoplanctônicas que tiveram seu crescimento elevado pelo aumento do suprimento de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, presentes nestes despejos. Um grande aumento da quantidade de nutrientes no reservatório tem

ocorrido nos últimos anos tornando evidente uma aceleração do processo de eutrofização neste sistema (Calijuri & Dos Santos, 1996).

Em um reservatório eutrofizado como Barra Bonita onde a produção primária é altíssima durante todo o ano (Tundisi *et al.*, 1994) a biomassa de origem fotossintética liberada diretamente para o corpo d'água na forma de polissacarídeos extracelulares é marcadamente alta. Em um exercício teórico, se considerarmos que a taxa de excreção em populações fitoplanctônicas é em torno de 5% da produtividade na forma particulada e que 90% da matéria orgânica excretada é composta por polissacarídeos (Vieira *et al.*, 1994) teríamos uma quantidade de cerca de 11.700 toneladas de carbono, na forma de polissacarídeos extracelulares, sendo liberados por ano em todo o reservatório (entretanto, tudo indica que estes valores estejam subestimados). A obtenção do maior número possível de informações sobre o destino dessa biomassa é, portanto, uma abordagem necessária para o estudo da ecologia, e limnologia do reservatório.

O desenvolvimento de programas de manejo da qualidade de água dos reservatórios requer conhecimento suficiente sobre o metabolismo ecológico do sistema. Entender este metabolismo significa estudar os processos envolvidos e a transferência de energia entre os diversos níveis tróficos (Calijuri & Dos Santos, 2001).

1.1. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi relacionar quantitativamente e qualitativamente as glicosidases envolvidas na degradação de polissacarídeos com estes substratos que ocorrem “dissolvidos” no Reservatório de Barra Bonita (SP). Os polissacarídeos, por sua vez, possivelmente estarão sazonalmente relacionados com as principais espécies fitoplanctônicas encontradas neste reservatório (*Anabaena spiroides*, *Microcystis* spp., *Aulacoseira granulata*, *Aulacoseira granulata* var. *granulata*, *Planktothrix tropicalis*, *Cylindrospermopsis* sp e *Cryptomonas* sp).

Neste sentido, para o desenvolvimento do objetivo central, foram abordadas as seguintes hipóteses:

1. Existe uma correlação direta entre os polissacarídeos presentes no Reservatório de Barra Bonita e suas principais espécies fitoplanctônicas.
2. Existe uma correlação direta entre os polissacaridases presentes no Reservatório de Barra Bonita e suas principais espécies fitoplanctônicas.
3. A população bacteriana do Reservatório de Barra Bonita participa da produção de polissacaridases envolvidas na degradação de polissacarídeos presentes na represa.
4. As polissacaridases apresentam-se compartimentalizadas na coluna d'água do Reservatório de Barra Bonita.
5. Existe um perfil dinâmico das populações fitoplanctônicas com periodicidade anual.

As estratégias aplicadas para determinação das hipóteses assumidas foram:

1. Utilizar um ponto de coleta do Reservatório de Barra Bonita situado a 3 km da barragem como representativo da represa.
2. Estabelecer seis níveis de profundidade como representativos dos diferentes estratos da coluna d'água.
3. Utilizar uma filtração fracionada de amostras representativas da coluna d'água para estabelecer a compartimentalização.
4. Realizar análises periódicas (mensais) da composição polissacarídica do Reservatório de Barra Bonita.
5. Realizar análises periódicas (mensais) das atividades enzimáticas do Reservatório de Barra Bonita.
6. Determinar a atividade polissacaridásica das populações bacterianas do Reservatório de Barra Bonita sobre os polissacarídeos da coluna d'água e sobre o polissacarídeo das principais espécies fitoplanctônicas produzido em laboratório.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de Estudo

O Reservatório de Barra Bonita (Fig. 1), que é formado pela junção dos rios Tietê e Piracicaba, fica situado entre os municípios de Barra Bonita e Igarapu (SP). Construído em 1963, é o primeiro e o mais eutrofizado do Médio Tietê, integrando o complexo de seis barragens nas porções média e baixa deste rio. Tem como principal finalidade a geração de energia elétrica, mas também é utilizado nas atividades de lazer e navegação (Calijuri, 1988).

Este reservatório está localizado a 468 m de altitude e apresenta as seguintes características:

- 
- Profundidade máxima: 30,2 m
 - Área: 32.484 hectares
 - Profundidade média: 10,2 m
 - Volume total: $3.160 \times 10^6 \text{ m}^3$
 - Área inundada: 310,00 km²
 - Superfície da bacia hidrográfica: 32.330 km²
 - Perímetro aproximado: 525 Km
 - Tempo de residência da água: entre 30 e 180 dias

As bacias hidrográficas dos rios Tietê e Piracicaba estão entre as mais populosas do país. A maior densidade populacional está localizada na área urbana devido ao êxodo rural provocado pela monocultura de cana-de-açúcar. A região de Barra Bonita é ocupada por cerca de 114.000 ha de cana-de-açúcar e possui uma das maiores indústrias de álcool do mundo (1,7 milhões de litros por dia) que descarrega seus resíduos no Rio Tietê. Os reservatórios a jusante sofrem grandes impactos devido a estas práticas de cultivo industrial (Calijuri, 1988).

O processo de eutrofização do reservatório foi agravado a partir de 1983, quando se optou por um maior despejo dos esgotos da cidade de São Paulo para o Rio Pinheiros e o lançamento destes no Rio Tietê.

A região na qual o reservatório insere-se está localizada numa área de transição entre os climas tropical e subtropical, não apresentando estações climáticas bem definidas (Calijuri & Tundisi, 1990).

Os níveis de precipitação maiores no verão (o trimestre mais chuvoso é dezembro, janeiro e fevereiro) e menores no inverno (o trimestre mais seco é junho, julho e agosto) são os marcadores sazonais mais nítidos nesta área (Calijuri, 1988). A direção dos ventos coincide com o eixo longitudinal do reservatório, predominando os ventos leste e sudeste de acordo com dados fornecidos pela AES Tietê (UHE Barra Bonita). Barra Bonita possui um regime polimítico de circulação com curtos períodos de estratificação (Calijuri & Tundisi, 1990).

Para a região do reservatório de Barra Bonita, os solos predominantes são latossolo vermelho distroférico e nitossolo vermelho distroférico, ambos provenientes de rocha alcalina (basalto) da formação Serra Geral, e latossolo vermelho-amarelo

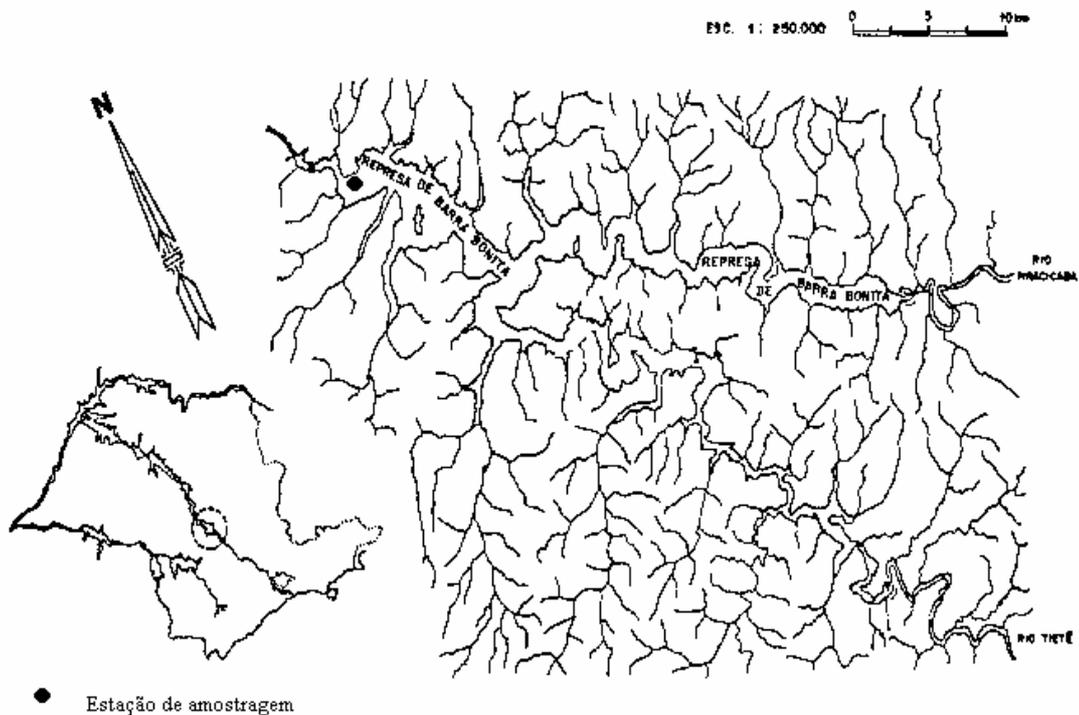


Figura 1: Localização do Reservatório de Barra Bonita no Estado de São Paulo e da estação de coleta no reservatório.

distrófico e argissolo vermelho-amarelo distrófico, provenientes da formação Botucatu (Embrapa, 1999).

2.2. Coleta de Amostras

As coletas d'água foram realizadas com auxílio de garrafa tipo Niskin (previamente lavada e enxaguada com água do reservatório) em 6 profundidades (0, 1, 3, 5, 10 e fundo, com profundidade média $18 \text{ m} \pm 1,84$ variando conforme as estações do ano). A penetração de luz na coluna d'água foi determinada por quantameter LI-COR (LI-250, LI-COR Inc.) com sensor esférico LI-193AS. Também foram medidas as variáveis pH, condutividade elétrica, concentração de oxigênio dissolvido e temperatura da água por eletrodos (Horiba U-23).

As amostras de água de cada profundidade foram previamente filtradas em malha com poros de 100 μm para eliminação de formas zooplanctônicas e grandes partículas de detritos, e acondicionadas dentro de frascos esterilizados de 2 L em caixas de isopor com gelo. Os experimentos tiveram início aproximadamente 2-3 horas após a coleta, tempo necessário para se chegar ao laboratório em São Carlos. Como o intuito do projeto é abordar o estudo de processos e não abordagens limnológicas no sentido clássico do termo, a maior parte dos experimentos foi efetuada em um único ponto nas coordenadas 22° 32' 34,5" S, 48° 29' 26,4" O. Este ponto está situado a cerca de 3 km a montante da barragem, na parte mais larga do reservatório, e onde a mistura das águas de ambos os rios já é completa.

A partir de janeiro de 2003 as análises de nutrientes passaram a ser feitas no laboratório em substituição ao uso do Horiba no campo para as medidas de fósforo, nitrogênio e sílica, seguindo-se as seguintes determinações: nitrito e sílica (Golterman *et al.*, 1978), nitrato (Mackereth *et al.*, 1978), amônia (segundo Koroleff, 1976), nitrogênio e fósforo total (Valderrama, 1981), fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico (Strickland & Parsons, 1960).

2.3. Distribuição das Glicosidases Extracelulares nos Diferentes Tamanhos de Partículas Presentes na Coluna D'Água do Reservatório

Um dado extremamente importante é o conhecimento da distribuição das ectoenzimas e enzimas extracelulares envolvidas com a degradação dos polissacarídeos na coluna d'água: se ocorrem dissolvidas na água, adsorvidas às partículas inorgânicas ou orgânicas como células, colóides, etc. Para isto foi montado

um experimento de fracionamento da água integral em uma amostra representativa de toda a coluna d'água (amostra composta por água de todas as profundidades).

A amostra previamente tratada com azida a 0,05%, que se revelou, pelos testes realizados, ser a substância mais adequada para interromper a atividade celular sem inibir a atividade enzimática extracelular, foi fracionada de modo a serem obtidas as seguintes frações: 100-10 μm ; 10-1,2 μm ; 1,2-0,2 μm ; <0,2 μm (< 0,2 μm = fração livre ou dissolvida). O processo de filtração foi realizado com extremo cuidado usando-se pressões de vácuo muito baixas (menor que 90 mm Hg) principalmente com os filtros de menor poro.

No entanto, após a primeira coleta (realizada em abril de 2003) foram feitas algumas modificações no método que passou a contar com as seguintes frações: 70-10 μm ; 10-1,2 μm ; 1,2-0,45 μm ; 0,45-0,2 μm e <0,2 μm (= fração livre ou dissolvida).

Para o ensaio da presença de enzimas foi utilizada a metodologia descrita no item E (seção Análises).

2.4. Análise Mensal dos Polissacarídeos e da Atividade Enzimática Presentes no Reservatório

Partindo-se do pressuposto que a predominância das espécies fitoplancônicas mais importantes do reservatório varia ao longo do ano e que, portanto, a composição dos polissacarídeos na coluna d'água se altera neste período, foram efetuados experimentos visando relacionar quantitativamente e qualitativamente a atividade enzimática das glicosidases e as populações algais, pelos polissacarídeos presentes na água. No laboratório, as amostras de água foram analisadas para a quantificação dos

carboidratos presentes e para a determinação da composição monossacarídica (tanto monossacarídeos livres quanto poliméricos) por Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Pulso Amperométrico (HPLC-PAD item C, seção Análises).

A análise da atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item E (seção Análises). As amostras de cada profundidade foram misturadas em partes iguais para compor uma amostra integrada, que representa toda a coluna d'água, para a medida de atividade enzimática total da amostra.

Concomitantemente a esta análise foram acompanhadas as abundâncias relativas das espécies fitoplanctônicas no ponto de coleta das amostras por outro projeto de doutoramento, simultaneamente, no mesmo local e realizada a contagem de bactérias coradas com DAPI em microscópio de epifluorescência (item D, seção Análises).

2.5. Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações

Microheterotróficas Naturais em Laboratório

Este experimento foi realizado em julho de 2004 e repetido em setembro de 2004. Para cada um deles foram coletadas amostras integradas de 40 L de água do reservatório, filtrados previamente em rede de 70 μm . Também o inóculo foi coletado em garrafa especial autoclavada que filtra a entrada do ar (Figura 2).

No laboratório, 20 L da amostra integrada foram filtrados em filtros de fibra de vidro GF/F (poros de 0,70 μm , previamente lavados e autoclavados) e concentrados

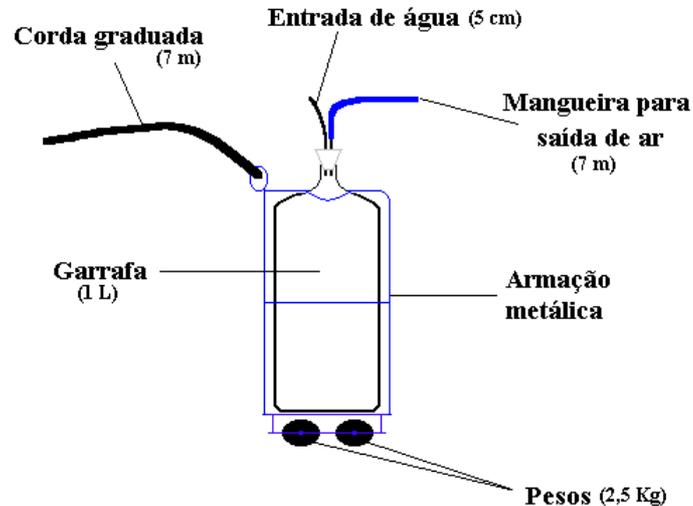


Figura 2: Sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do Reservatório de Barra Bonita (SP) para compor o inóculo da comunidade microbiana. O sistema é lavado com HCl 10% e autoclavado. A entrada de água permanece tampada e é manuseada apenas dentro da represa para evitar contaminação por bactérias aéreas. A água entra na garrafa quando se abre a saída de ar em cada uma das profundidades-alvo. Um filtro feito com algodão na mangueira de ar evita a queda de partículas aéreas no interior da garrafa.

em filtrador de fibra oca (cartucho de 10 KDa) até restar 300 mL. Aliquotas desta amostra concentrada foram então analisadas para a quantificação e análise da composição monossacarídica dos carboidratos poliméricos por cromatografia de gás (Seção Análises, item B) e por HPLC-PAD (Seção Análises, item C).

Do restante da amostra coletada em campo, 10,2 L foram divididos em três garrafões de 4 L com sistema para retirada de amostras (perfazendo um total de 3,4 L

em cada garrafão), autoclavados em seguida. Após o resfriamento das amostras foram montados os experimentos. Dois garrafões receberam 100 mL da amostra concentrada com os polissacarídeos a serem degradados (concentração final de $0,54 \text{ mg mL}^{-1}$) e mais 200 mL do inóculo de água da represa previamente filtrada em poros de $5 \mu\text{m}$ para reter partículas e células do fitoplâncton mas não as populações de microheterótrofos (bactérias e eventualmente fungos e leveduras).

Também um frasco controle foi preparado da mesma maneira descrita acima mas tratado com azida a 0,05%. Os frascos do experimento, com tampa provida de ventilação estéril (condição aeróbica), foram mantidos em estufa a temperatura de 25°C no escuro, agitados duas a três vezes ao dia.

Durante 40 dias foram retiradas amostras de 150 mL assepticamente dos frascos, incluindo o controle, com intervalos de 24 h ou mais, para a análise da degradação dos polissacarídeos que foi acompanhada por cromatografia de exclusão em gel Sepharose CL-6B (item A) do substrato remanescente e por análises em HPLC-PAD dos monossacarídeos do polissacarídeo remanescente após hidrólise (Seção Análises, item C).

Paralelamente foram contadas as bactérias coradas com DAPI em microscópio de epifluorescência (Axioplan Zeiss) (Seção Análises, item D). Os conteúdos de proteína e carboidrato foram determinados em amostras filtradas em membrana de poro $0,45 \mu\text{m}$ através dos métodos de Lowry *et al.* (1951) (utilizando-se albumina como proteína padrão) e de Dubois *et al.* (1956) (utilizando-se glicose como padrão) respectivamente. A atividade enzimática foi determinada através da utilização dos MUF-substratos (Seção Análises, item E).

2.6. Degradação dos Polissacarídeos Produzidos pelas Espécies Predominantes do Fitoplâncton em Culturas Axênicas no Laboratório

Para estes experimentos foram utilizados polissacarídeos produzidos por *Aulacoseira granulata* e *Microcystis aeruginosa*, espécies estas que predominam no fitoplâncton durante todo o ano, responsáveis pela maior parte da biomassa produzida no reservatório.

Para a obtenção do polissacarídeo foram efetuadas culturas axênicas de *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Elekin e *Aulacoseira granulata* var. *granulata* (Ehrenberg) Simonsen em garrafões de 20 L de capacidade com 18 L de meio de cultura específico (ASM-1 para a cianófitica e WC/C com o dobro da concentração de sílica para a diatomácea) em pH 7,0. As culturas cresceram sob irradiância de $200 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por tubos fluorescentes de 40 W, com fotoperíodo 12:12 horas e em temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, aeradas por borbulhamento com ar filtrado e umedecido em água acidificada (pH 2) e autoclavada. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, as células foram separadas do meio de cultura por filtração tangencial em cartuchos de fibra oca com poros de $0,65 \mu\text{m}$. O meio de cultura foi, então, concentrado em rotaevaporador (Büchi 461) a 40°C , dialisado por 24 h em água corrente e 24 h em água destilada (renovada várias vezes) em tubos de diálise (Spectrapor®) com poros que excluem moléculas de até 12.000- 14.000 Da, previamente fervidos em NaOH 2% (p/v) e por fim o material foi liofilizado em aparelho Labconco 4.5.

Para a montagem do experimento, uma amostra de água integrada foi autoclavada e enriquecida com polissacarídeo liofilizado obtido (concentração final de aproximadamente 1 mg mL^{-1}) e, sob condições assépticas, inoculada com água do

reservatório filtrada em poros de 5 µm para reter partículas e células do fitoplâncton mas não as populações de microheterótrofos. Foram feitas duas réplicas do experimento. Como controle foi utilizado outro frasco com água preparada da mesma forma, mas sem o acréscimo da população microheterotrófica. Os frascos do experimento, com tampa provida de ventilação estéril, foram mantidos em estufa a temperatura de 25°C no escuro, agitados duas a três vezes ao dia.

Durante 40 dias foram retiradas amostras de 150 mL assepticamente dos frascos, incluindo o controle, com intervalos de 24 h, para as análises da degradação do polissacarídeo (por HPLC-PAD, item C), da atividade enzimática (Seção Análises, item E) e contagens bacterianas por coloração com DAPI (Seção Análises, item D). O conteúdo de proteína foi determinado através do método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se albumina como proteína padrão. O conteúdo de carboidrato total foi determinado através do método de Dubois *et al.* (1956) com glicose como padrão. A diversidade bacteriana em três datas (início, meio e fim do experimento) foi analisada utilizando-se regiões espaçadoras intergênicas (REI's, Seção Análises, item F).

Análises

A) Cromatografia de Exclusão por Permeação em Gel

As amostras diárias obtidas nos experimentos 2.5. e 2.6. foram analisadas por cromatografia de exclusão por permeação em gel, à temperatura ambiente e pH 7, para o acompanhamento da degradação do polissacarídeo. É suposto que com o ataque bacteriano, o polissacarídeo de alta massa molecular seja gradualmente transformado em frações de menor massa molecular.

O gel Sepharose CL-6B (Pharmacia, 1×10^4 - 1×10^6 Da) foi utilizado em uma coluna cromatográfica de vidro com dimensões 1,6 x 100 cm e acessórios compatíveis da Pharmacia. A taxa de eluição (fluxo) foi de $1,67 \text{ mL min}^{-1}$ e água mais 2% de butanol como eluente. O volume de amostra injetado no sistema foi de aproximadamente 5% do volume total da coluna. Blue-dextran (2.000 kDa), Dextran T-100 (100 kDa) e Dextran T-10 (10 kDa), todos da Pharmacia, foram usados como referência de tamanho molecular. As amostras cromatografadas por permeação em gel foram coletadas em frações de 5,0 mL em coletor de frações Frac-200 LKB (Pharmacia) e analisadas pelo método fenol- sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) para a localização das frações. O quociente V_e/V_t foi calculado para cada cromatografia, sendo que V_e é o volume de eluição do início desta até o pico, e V_t o volume total do gel contido na coluna.

B) Cromatografia de Gás

Para a análise dos monossacarídeos componentes das amostras obtidas no experimento 2.5, amostras liofilizadas do material foram analisadas em cromatógrafo de gás HP 5890 Série II equipado com coluna DB-5 (J & W Scientific) de sílica com 30 m e 0,32 mm de diâmetro interno e detector FID. As metodologias seguidas foram as de Reinhold (1972) e Chaplin (1982) com algumas modificações introduzidas por Paulsen & Vieira (1994).

A preparação da amostra liofilizada para análise em cromatógrafo a gás inclui os seguintes itens: metanolização, retirada do HCl e derivatização. Para a determinação da composição de monossacarídeos utilizou-se aproximadamente 1 mg da amostra em pó. A esta quantidade de amostra (colocada em tubos selados com

revestimento de Teflon®) acrescentou-se 1,02 µg de manitol dissolvido em 1 M HCl/metanol (o manitol é usado como padrão interno). Esta mistura foi deixada em estufa a 80 °C por 20 horas com a tampa bem apertada.

Após a metanólise o HCl/metanol foi retirado das amostras por secagem por fluxo com nitrogênio (grau de pureza 4.0) até sua completa evaporação. As amostras foram então lavadas três vezes com 100 µL de metanol, secas com nitrogênio e colocadas dentro de dessecador sob vácuo. O dessecador foi colocado dentro de estufa (60°C) por 2 horas. Antes da derivatização as amostras foram reacetiladas para detectar os açúcares aaminados N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina. O procedimento de reacetilação consiste no acréscimo de 0,1 mL de piridina e 0,1 mL de ácido acético glacial, após a agitação aguardou-se 2-3 minutos e secou-se com nitrogênio. Após a secagem acrescentou-se 1 mL de HCl/metanol (0,5 M) e levou-se a estufa a 65°C por 1 hora. As amostras foram então lavadas três vezes com 100 µL de metanol e secas com nitrogênio.

Para a derivatização utilizou-se 200 µL de TMS (hexametil-disilazano + trimetil-clorsilan + piridina, na proporção 2: 1: 3). A solução foi agitada (em agitador “vortex”) por 30 segundos e depois deixada por meia hora em temperatura ambiente, antes das análises.

A amostra foi injetada em cromatógrafo de gás com microseringa previamente lavada com piridina. Apenas 1 µL de amostra tratada foi injetada utilizando-se o seguinte programa de temperatura: 140°C na injeção da amostra, seguido de uma elevação de 1°C por minuto até 170°C e a partir deste ponto elevação da temperatura

de 6°C por minuto até 250°C e, para a limpeza da coluna, elevação de 20°C por minuto até 300°C. As análises foram feitas no modo “split”. A identificação e determinação das concentrações dos monossacarídeos foi feita pelo software “ChemStation” (HP) a partir de curvas de calibração realizadas com os açúcares arabinose, ribose, ramnose, fucose, xilose, manose, galactose, ácido galacturônico, glicose, ácido glicurônico, N- acetil-glicosamina, N-acetil-galactosamina (todos da Sigma-Aldrich™).

C) Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Pulso Amperométrico (HPLC-PAD)

Para a identificação e quantificação dos monossacarídeos componentes das amostras por HPLC-PAD obtidas nos experimentos descritos nos itens anteriores, amostras de 50 mL foram filtradas em filtros GF/F (Whatman™), concentradas em rotaevaporador a 40°C por 100 vezes. As amostras concentradas para 1 mL de volume foram hidrolisadas com 300 µl HCl 8 M por 12 horas seguindo-se a metodologia de Gremm & Kaplan (1997) modificada pelo seguinte passo de lavagem: as amostras são lavadas por 3 vezes com 1 mL de água deionizada em rotaevaporador com passos de 30 segundos em ultrassom entre cada lavagem. Foram feitas 3 réplicas para cada amostra.

Após a hidrólise as amostras foram injetadas em HPLC DX500 equipado com detector eletroquímico PAD (Dionex™) e coluna Dionex Carbo Pac PA-10 (Dionex™) para a análise dos monossacarídeos presentes. O aparelho consta de uma bomba de gradiente GP40, um detector eletroquímico ED40 e um injetor manual LC5 com uma válvula Rheodyne 9125 e um compartimento para 25 µL de amostra.

O detector eletroquímico ED40 é equipado com uma célula amperométrica, um eletrodo de ouro e um eletrodo de referência. O eluente usado para a separação dos monossacarídeos foi 18 mM NaOH e a regeneração da coluna foi feita com eluente 200 mM a um fluxo de 1 mL min⁻¹.

Os monossacarídeos livres são determinados em amostras não hidrolisadas. Para a quantificação dos monossacarídeos poliméricos (MP) é feito o cálculo:

$$MP = MH - MNH$$

Onde: MH = Monossacarídeos de amostras hidrolisadas (totais) e
MNH = Monossacarídeos de amostras não hidrolisadas (livres).

As curvas de calibração foram realizadas com os açúcares: fucose, ramnose, galactose, glicose, manose, xilose, ácido galacturônico, ácido glicurônico, frutose e ribose (todos da Sigma-Aldrich™).

Através da metodologia utilizada nas detecções em HPLC-PAD os açúcares manose e xilose são coeluídos e por esta razão aparecem juntos nas determinações.

D) Coloração com DAPI

A coloração com 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) é baseada na metodologia de Porter & Feig (1980).

Para cada 2 mL de amostra fixada em formol (3,6 %) adicionou-se 1,2 mL de solução de trabalho (1 mL de solução estoque de DAPI 1 µg mL⁻¹ dissolvidos em 7 mL

de água destilada estéril) e mais 20 mL de água destilada esterilizada, totalizando uma concentração final de $0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DAPI. Deixou-se a solução em repouso por 30 minutos e então filtrou-se em filtro de policarbonato preto diâmetro de 2 cm com poro $0,45 \mu\text{m}$ sob pressão de 5 cm Hg. Colocou-se a membrana corada em uma lâmina com uma gota de óleo de imersão sem fluorescência e cobriu-se com lamínula. As lâminas foram analisadas e contadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan.

E) Análise da Atividade Enzimática

A atividade enzimática nas amostras foi analisada pelo aumento de fluorescência emitido pela Metilumbeliferona (MUF) liberada pela hidrólise enzimática dos MUF- substratos (não-fluorescentes) (Hoppe, 1983; Chróst & Krambeck, 1986; Hoppe *et al.*, 1988). Para isto foram utilizados nove diferentes MUF- substratos: 4-MUF- α -L- arabinopiranosídeo, 4-MUF- β -D- fucosídeo, 4-MUF- β -L- fucosídeo, 4-MUF- β -D- galactosídeo, 4-MUF- α -D- glicosídeo, 4-MUF- β -D- glicosídeo, 4-MUF- α -D- manopiranosídeo, 4-MUF- β -D- manopiranosídeo e 4-MUF- α -L- ramnopiranosídeo (Sigma Chemical CO), que foram escolhidos com base nos monossacarídeos presentes no reservatório identificados por cromatografia de gás e HPLC-PAD.

O método utilizado, resumido na Fig. 3 é baseado no protocolo de Chróst e Krambeck (1986) com modificações descritas em Chróst & Velimirov (1991). Água do reservatório autoclavada foi utilizada como branco. A concentração dos substratos e o tempo de incubação das amostras foram estipulados a partir de pré-experimentos em temperatura próxima à verificada em campo.

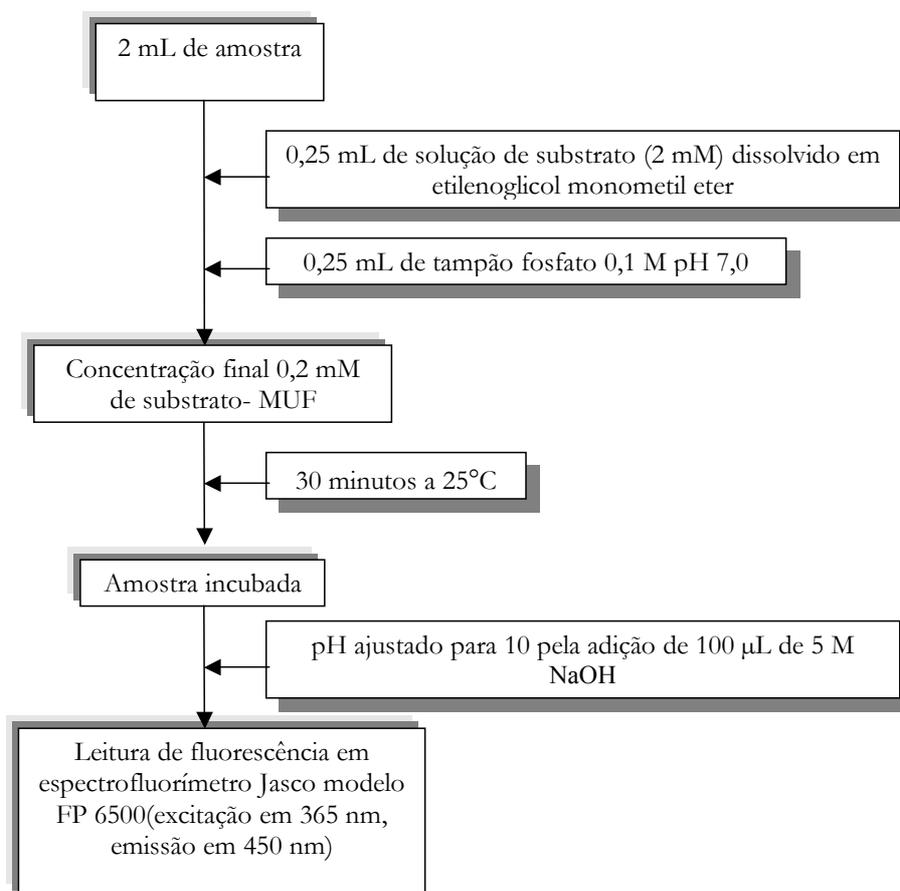


Figura 3: Fluxograma apresentando os processos envolvidos na análise da atividade enzimática das amostras (modificado de Chróst & Velimirov, 1991).

A metodologia utilizada em nosso laboratório basicamente foi: em cada uma das três réplicas de 2 mL de amostra usadas são acrescentados 0,25 mL de solução de MUF- substrato (2 mM) dissolvido em etilenoglicol monometil éter (Methylcellosolve®) mais água deionizada e 0,25 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 produzindo uma concentração final 0,2 mM; a incubação das amostras com os substratos dura 30 minutos a 25°C. Após o tempo de incubação, o pH é ajustado para 10 pela adição de 100 µL de 5 M NaOH para interromper a atividade enzimática e

produzir o máximo de fluorescência pelas moléculas de MUF (Chróst & Krambeck, 1986; Münster *et al.*, 1989).

A leitura de fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro Jasco (FP 6500) em temperatura constante de 20°C. Para a obtenção da fluorescência da molécula MUF a excitação foi feita no comprimento de onda 365 nm e a emissão lida no comprimento de onda 450 nm (fendas de 10 nm monocromador de emissão e 5 nm monocromador de excitação).

A quantificação da atividade enzimática foi realizada por uma curva de calibração preparada com sete concentrações de 4-metilumbeliferona (Sigma Chemical CO) 1; 5; 12,5; 25; 50; 100; 150 nM dissolvidas em água do Reservatório de Barra Bonita autoclavada em pH 10,0. Foram feitas três réplicas onde 0,25 mL de tampão fosfato 0,1M e 0,25 mL de água do reservatório autoclavada foram acrescentados a 2 mL de cada concentração de 4-metilumbeliferona perfazendo as concentrações finais dadas acima.

F) Diversidade Bacteriana por Regiões Espaçadoras Intergênicas

A análise da diversidade bacteriana foi realizada por uma metodologia baseada em regiões espaçadoras intergênicas (REIs) dos genes. Por esta metodologia as regiões espaçadoras intergênicas dos microorganismos amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) são adicionadas, por meio de um plasmídeo sintético com genes de resistência a ampicilina, a células de *Escherichia coli*. Tendo em vista que apenas as células que possuem o plasmídeo se desenvolverão em placas com ampicilina, após o plaqueamento as REIs em estudo são separadas do plasmídeo sintético, analisadas por

seqüenciamento e comparadas com organismos já seqüenciados do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

O primeiro passo é a extração do DNA das amostras, neste caso três amostras referentes ao início, meio e fim do experimento do item 2.5 com o polissacarídeo de *A. granulata*. A extração foi realizada seguindo a metodologia descrita na apostila técnica da Fundação André Tosello modificada por um passo de lavagem. Centrifugou-se um volume de 1,5 mL de amostra por 30 minutos a 12000 rpm e o material sedimentado contendo as bactérias foram ressuspensos em 100 µL de solução de lise (50 ng µL⁻¹ de proteinase K em tampão TE Tris+EDTA pH 8,0). As amostras foram, então, deixadas em banho-maria por 15 minutos a 55 °C e depois mais 15 minutos a 80 °C. Centrifugou-se novamente por 7 minutos a 12000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo.

Em seguida as amostras foram lavadas para a retirada da proteinase K que poderia continuar agindo sobre o DNA extraído. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, acrescentando-se o mesmo volume de fenol-clorofórmio (24:1) e levando-se ao "vortex". A solução foi centrifugada por 13000 rpm por 15 minutos. Foram formadas duas fases sendo a superior transferida para outro tubo, acrescentando-se o mesmo volume de clorofórmio e levando-se ao "vortex". Em seguida centrifugou-se a amostra a 13000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo, acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. Centrifugou-se a 13000 rpm por 15 minutos e verteu-se o sobrenadante. Ao material sedimentado acrescentou-se 500 µL de etanol 70%. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos,

descartando-se o sobrenadante e deixando-se o material sedimentado secar. Procedeu-se à reação de PCR com 10 µL e congelou-se o restante para reações futuras. Para o próximo passo o material sedimentado foi ressuspenso em água.

O segundo passo corresponde à reação de amplificação. As amostras de DNA foram amplificadas utilizando-se “primers” para o 16S DNAr do Domínio *Bacteria* de acordo com o seguinte procedimento. Uma mistura de reação foi preparada com os componentes, cujas concentrações finais são descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração final dos reagentes para execução do PCR do Domínio *Bacteria*.

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (15 µL)
*Solução tampão da <i>Taq</i>	10 X	1 X	1,5 µL
Primer 968f	10 µM	0,1 µM	0,5 µL
Primer 1401r	10 µM	0,1 mM	0,5 µL
**DNTP's	25 mM	200 µM	2 µL
<i>Taq</i> -polimerase	5 U/µL	2 U	0,2 µL
Mg	50 mM	1,3 mM	0,4 µ
DNA	-	-	4 µL
H ₂ O	-	-	5,9 µL

* Solução tampão da *Taq* 10X (100mM Tris-HCl pH 8,6, 500 mM KCl, 1% Triton X-100).

** Solução de nucleosídeos trifosfatados (A, T, C, G).

Os “primers” usados para o DNA 16S do Domínio *Bacteria* foram:

- 968f- [5' - gc clamp- AAC GCG AAG AAC CTT AC- 3']. Posição 968-984 do RNAr 16S, relativo à seqüência de *E. coli*, forward.
- 1401r-[5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 3']. Posição 1378-1401 do RNAr 16S, relativo à seqüência de *E. coli*, reverse.

O programa usado para amplificação foi: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos; 10 ciclos a 94°C por 1 minuto, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e por fim 1 ciclo de 72 °C por 2 minutos e resfriamento a 4 °C. As amplificações foram feitas com uso de um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

Em seguida uma corrida em gel agarose 0,8% (em tampão TBE 1X , Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM, mais brometo de etídio) foi realizada para confirmar a qualidade dos produtos de PCR. Outra corrida em gel agarose 0,8% (em tampão TBE mais brometo de etídio) foi realizada injetando-se 55 µL da amostra de DNA amplificado em cada canaleta para fornecer material para o próximo passo.

O terceiro passo foi a purificação dos fragmentos de DNA obtidos pela amplificação e a determinação do tamanho e quantidade destes. Para isso as bandas obtidas na última corrida em gel agarose foram recortadas, colocadas em tubos e purificadas utilizando-se um kit de purificação (Promega™). Em seguida fez-se uma corrida em gel agarose 1% (em tampão TBE mais brometo de etídio), juntamente com um “ladder” para quantificar o DNA (High DNA Mass Ladder, Invitrogen™) e outro para determinar o tamanho dos fragmentos (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™).

O quarto passo foi a clonagem dos produtos do PCR que foi realizada com o kit InsT/Aclone (Fermentas™). Neste passo os fragmentos do DNA das amostras em questão são inseridos em um plasmídeo (pTZ57R/T). Este plasmídeo possui uma seqüência gênica de resistência à ampicilina e um gene *lacZ*, cuja seqüência é interrompida pela presença de um inserto, passando a ser um gene não funcional.

O quinto passo é o procedimento de transformação. Em condições assépticas acrescentou-se 1 μL do plasmídeo ligado com o DNA das amostras a um tubo com 1 mL de bactérias *Escherichia coli* competentes (cepa DH5 α), ou seja, capazes de receber o novo plasmídeo. Estas bactérias receberam um choque térmico (para que suas membranas permitam a entrada do plasmídeo modificado) em banho-maria por 1,5 minuto a 42 °C e em seguida foram colocadas no gelo. Acrescentaram-se 800 μL de meio LB Broth, e levando-se à estufa giratória por 1 hora a 37°C. Em seguida plaquearam-se 200 μL destas bactérias em meio LB Broth mais ágar com ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo 50 μL a 200 mM) e x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo 40 μL a 20%) e deixou-se crescer em Shaker a 37 °C, 200 rpm por 18 horas.

Por causa do gene de resistência à ampicilina apenas as células que receberam o plasmídeo pTZ57R/T puderam se desenvolver formando colônias. O IPTG induz a atividade da enzima β -galactosidase, cuja expressão é ditada pelo gene *lacZ*. O X-gal é um substrato cromogênico que é hidrolisado pela β -galactosidase para formar um precipitado azul intenso. Quando o plasmídeo possui o inserto, este interrompe o *lacZ*. Com isso, na placa as colônias brancas possuem o inserto (fragmentos de DNA de interesse) enquanto as colônias azuis não possuem o inserto.

O sexto passo é o pré-inóculo. Com um palito estéril picaram-se as colônias positivas (brancas) colocando-as em meio LB Broth com ampicilina (10 mg mL⁻¹) deixando-as crescer em Shaker a 37 °C, 200 rpm por 18 horas. Esse meio turvo foi centrifugado e o material sedimentado transferido para o próximo passo.

O sétimo passo são as mini-preparações. Ao material sedimentado adicionaram-se 200 µL de uma solução de Tris HCl (100 mM, pH 2,5) mais EDTA (10 mM, pH 8,0) levando-o ao “vortex”. Em seguida foram adicionados 10 µL de RNase, levando-se ao “vortex” novamente e adicionando-se 200 µL de uma solução de NaOH (0,2 N) mais SDS (1%). Inverteu-se os tubos por 5 vezes e incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo foram adicionados 200 µL de uma solução de acetato de potássio (3 mM, pH 4,88) invertendo-se os tubos novamente por 5 vezes. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, passando-se o sobrenadante para outro tubo e adicionando-se um volume de isopropanol. Centrifugaram-se as amostras por 15 minutos a 13200 rpm e o isopropanol foi jogado fora. O material sedimentado resultante foi seco a 60 °C por toda a noite.

O oitavo passo é o seqüenciamento. As amostras foram amplificadas utilizando-se o kit DYEnamic™ ET dye terminator (GE) segundo as instruções do fabricante e analisado por eletroforese capilar em um aparelho MegaBACE™ (GE). Os resultados foram obtidos utilizando-se o software MegaBACE Fragment Profiler e comparados com organismos já seqüenciados do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Análises estatísticas

Foram realizadas análises de correlação de Spearman que quantificam quão bem duas variáveis variam juntas e análises de regressão múltipla. As análises de regressão múltipla foram feitas entre as variáveis biológicas (abundância bacteriana, fitoplâncton total, densidade de *Microcystis* sp, *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena spiroides*, *Aulacoseira granulata* e *Cryptomonas* sp), atividade heterotrófica (α -arabinosidase, β - fucosidase, α -glicosidase, β - glicosidase, β - galactosidase, α -manosidase, β - manosidase e α - ramnosidase) e variáveis físicas e químicas (carboidratos totais, combinados e livres, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, turbidez e precipitação) para relacionar concentrações de carboidratos e as médias de atividade glicolítica por data de coleta. As análises de regressão múltipla foram realizadas para elucidar quais variáveis físicas, químicas ou biológicas mais influenciaram as variações das atividades heterotróficas no conjunto de dados investigados.

3. RESULTADOS

3.1. Dados Limnológicos

3.1.1. Pluviosidade

Os dados de pluviosidade foram cedidos pela AES Tietê (UHE Barra Bonita), empresa responsável pela operação da hidrelétrica de Barra Bonita e estão apresentados na Fig. 4.

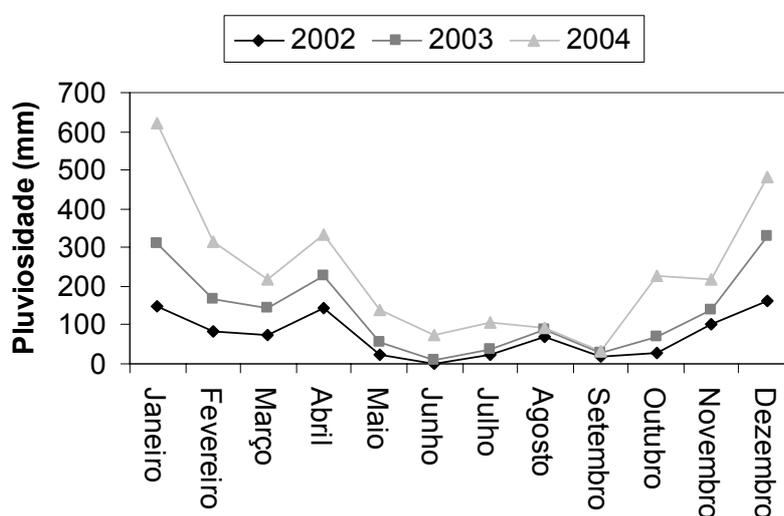


Figura 4: Pluviosidade mensal (mm) registrada no Reservatório de Barra Bonita (SP) de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

Pode-se observar que a precipitação foi maior nos meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março. Associados aos maiores níveis de precipitação estiveram também as temperaturas mais elevadas, menores tempos de residência da água e maiores irradiações solares (Dellamano-Oliveira, 2006). Os níveis de precipitação menores durante o inverno caracterizam a estação seca que inclui os meses de maio, junho, julho, agosto e setembro. Abril e outubro são considerados

meses de transição entre as estações seca e chuvosa. A estação seca caracteriza-se por uma maior ação dos ventos, menores temperaturas, e maiores tempos de residência da água (Dellamano-Oliveira, 2006). Esta classificação será utilizada para a discussão dos resultados obtidos em campo.

3.1.2. Parâmetros Físicos e Químicos

A Tabela 2 apresenta um resumo de algumas das variáveis pesquisadas. Os dados completos estão apresentados nos Anexos de 1 a 3.

Tabela 2: Parâmetros de qualidade da água do Reservatório de Barra Bonita (SP) verificados durante o período de amostragem de agosto de 2002 a janeiro de 2004.

Parâmetro		Mínimo-Máximo	Média (SD)
Disco de Secchi (profundidade)	m	0,22-3,90	1,26 (0,92)
Condutividade	$\mu\text{S cm}^{-1}$	100,15-287,33	141,15 (3,09)
pH		5,85-7,89	6,50 (0,32)
Temperatura	$^{\circ}\text{C}$	19,65-28,42	24,08 (0,39)
Oxigênio dissolvido	mg L^{-1}	5,46-8,78	6,36 (1,06)
Turbidez	NTU	58,04-108,88	86,43 (20,30)
Nitrogênio total	$\mu\text{g L}^{-1}$	1806,04-3562,29	2962,85 (526,30)
Nitrito	$\mu\text{g L}^{-1}$	1,38-48,32	19,23 (17,26)
Nitrato	$\mu\text{g L}^{-1}$	1528,44-3162,74	2154,57 (484,51)
Amônia	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,42-104,69	21,75 (30,67)
Fósforo inorgânico	$\mu\text{g L}^{-1}$	13,01-170,14	62,65 (47,11)
Fósforo total	$\mu\text{g L}^{-1}$	31,02-225,33	97,61 (60,75)
Fósforo total dissolvido	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,07-210,50	62,01 (50,26)
Sílica	mg L^{-1}	0,47-10,76	3,39 (2,81)

3.2. Atividade Enzimática das Glicosidases

3.2.1. Análise Mensal da Atividade Enzimática de Glicosidases Presentes no Reservatório

A Fig. 5 mostra uma representação esquemática da coluna d'água onde podemos observar as variações verticais da atividade enzimática no reservatório. Em geral, os máximos de atividade enzimática ocorreram na profundidade 3 m, ou seja, estão presentes dentro da zona eufótica.

A média da atividade das glicosidases para o período integral de coletas foi de $23,74 \pm 22,67$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para α -L-arabinosidase; $19,46 \pm 12,88$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para β -D- fucosidase; $7,49 \pm 8,37$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para β -L- fucosidase; $24,37 \pm 20,23$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para α -D- glicosidase; $48,27 \pm 20,80$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para β -D- glicosidase; $24,60 \pm 43,54$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para β -D- galactosidase; $37,05 \pm 37,82$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para α -D- manosidase; $26,41 \pm 21,90$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para β -D- manosidase e $21,06 \pm 18,36$ n moles $L^{-1} h^{-1}$ para α -L- ramnosidase (Tabela 3).

Após os 18 meses de coleta podemos observar uma tendência sazonal na atividade enzimática total como pode ser observado pelas Figs. 6 e 7. Foram observados máximos de atividade enzimática total (Fig. 6) nos meses de outubro de 2002 (maior máximo verificado), dezembro de 2002 e novamente em dezembro de 2003 e picos de atividade enzimática mais baixos em março, maio e julho de 2003.

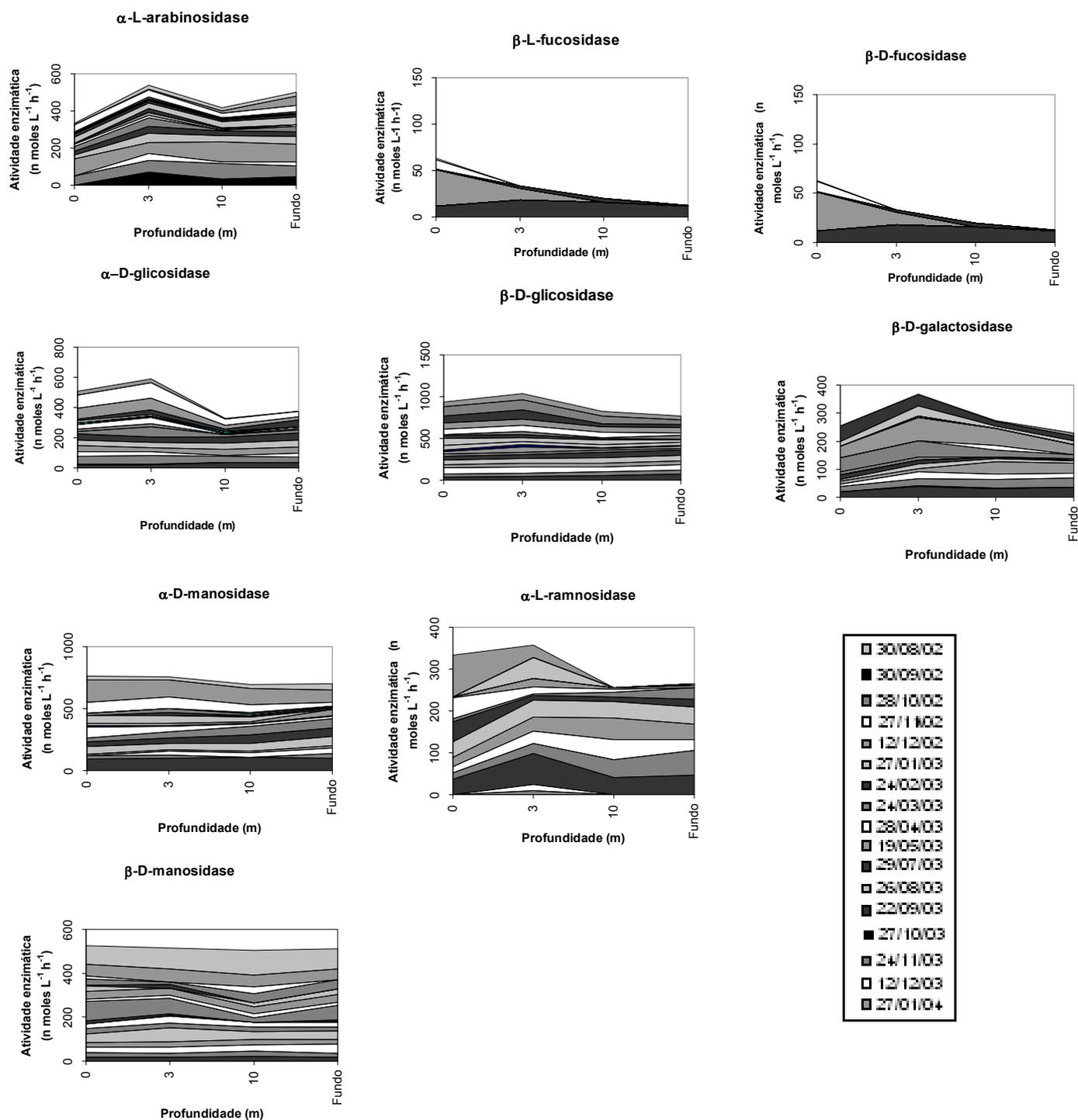


Figura 5: Atividade enzimática ($n \text{ moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) total nas amostras de água em diferentes profundidades (m) do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Média das medidas ($n=18$).

Tabela 3: Valores médios de atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) de diferentes enzimas na coluna d'água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004. * = não detectado.

Data	a-L-ara	b-D-fuc	b-L-fuc	a-D-glic	b-D-glic	b-D-gal	a-D-ma	b-D-man	a-L-ram
30/8/02	16.05	29.08	14.88	28.29	51.43	188.05	105.39	19.42	0.00
30/9/02	36.96	25.92	8.23	2.20	40.91	1.45	20.71	21.79	0.00
28/10/02	64.81	30.09	18.31	46.32	68.51	27.53	29.17	30.54	56.75
27/11/02	13.91	29.06	23.64	21.01	42.23	17.91	14.16	22.41	34.57
12/12/02	87.99	28.62	15.53	37.91	61.80	24.50	61.62	44.74	22.95
27/1/03	30.95	39.68	11.62	40.63	53.45	11.38	55.53	21.01	36.04
24/2/03	25.00	*	*	*	26.24	9.08	*	24.39	46.23
24/3/03	25.42	21.82	0.06	45.48	49.86	3.78	35.87	2.31	16.93
28/4/03	8.90	7.07	*	13.64	16.22	7.49	8.65	6.83	13.10
19/5/03	6.57	1.88	*	9.93	18.90	36.78	2.72	12.59	18.51
30/6/03	0.00	*	*	2.20	40.91	4.13	20.72	21.79	2.49
29/7/03	1.07	3.64	1.74	4.58	27.14	55.12	6.74	34.47	*
26/8/03	33.99	4.73	*	1.06	24.56	0.00	6.06	16.75	1.24
22/9/03	11.59	*	0.32	6.70	55.61	1.60	17.32	4.41	*
27/10/03	9.38	11.90	0.00	25.95	71.27	0.00	3.96	30.98	*
24/11/03	5.03	*	0.19	47.33	66.31	18.46	71.08	11.55	*
12/12/03	32.83	*	2.62	68.29	95.00	32.08	135.23	52.94	24.96
27/1/04	16.84	*	0.24	12.81	58.44	3.52	34.99	96.54	*

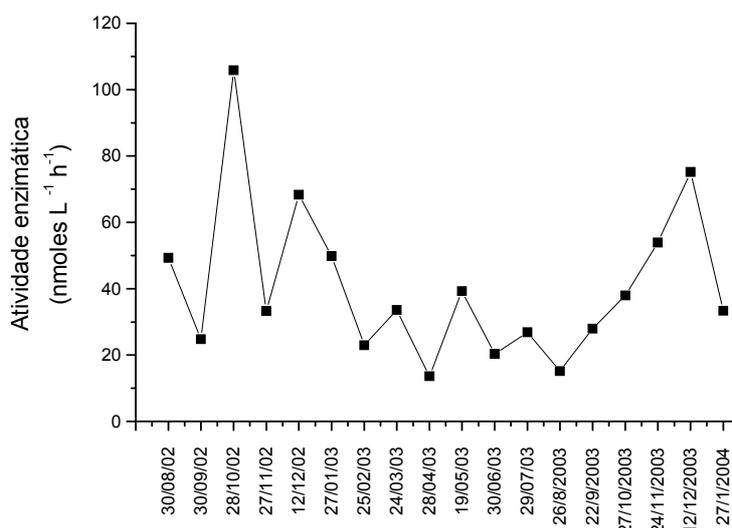


Figura 6: Variação dos valores médios da atividade enzimática total ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004.

Quando observamos o comportamento das enzimas separadamente (Fig. 7) verificamos para algumas delas um claro padrão sazonal com atividades elevadas durante o período chuvoso (primavera e verão) e diminuindo nos períodos de menor precipitação (outono e inverno), o que pode ser corroborado pela significativa correlação (correlação de Spearman $r = 0,5$; $p < 0,001$) encontrada entre a atividade enzimática total e os valores de precipitação. Apenas as enzimas β -D- galactosidase e β -D- manosidase não seguiram este padrão.

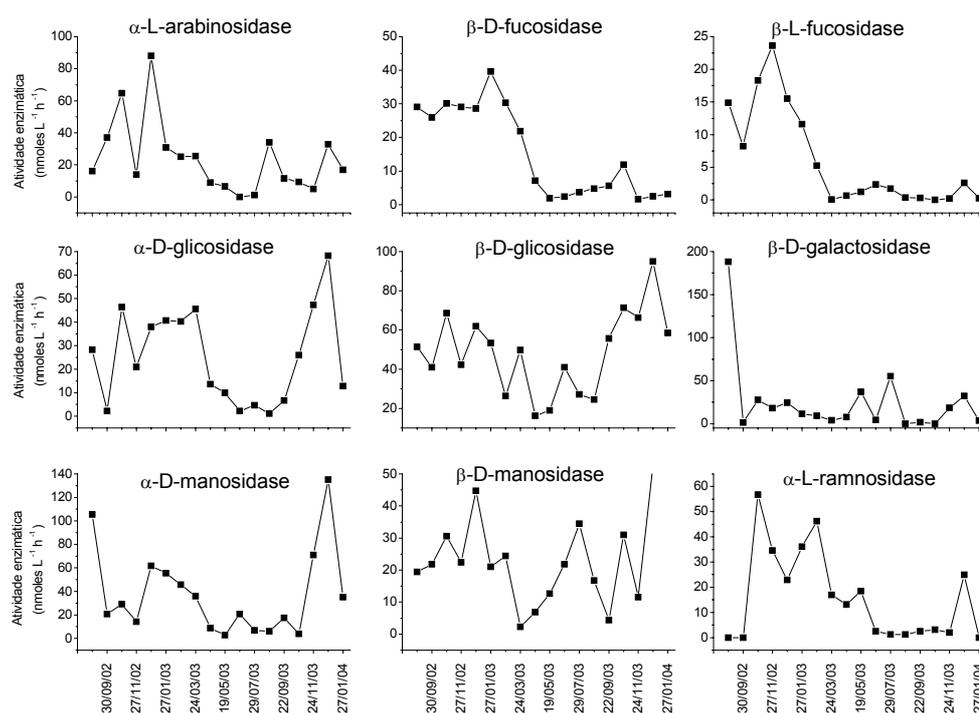


Figura 7: Média da atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) para cada enzima nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) determinada mensalmente de agosto de 2002 a janeiro de 2004.

3.2.2. Distribuição das Glicosidasas Extracelulares nos Diferentes Tamanhos de Partículas Presentes na Coluna D'Água do Reservatório

A Fig. 8 apresenta os resultados da distribuição de atividade enzimática entre os diferentes tamanhos de partícula.

Em novembro de 2002 as maiores atividades enzimáticas de três enzimas, α -L-arabinosidase, β -D-galactosidase e α -D-manosidase, estavam associadas às maiores partículas principalmente às frações de 100-10 e 10-1,2 μ m e, no caso da última enzima, apenas na fração 100-10 μ m foi verificada atividade. Entretanto para outras enzimas (β -D-fucosidase, α -D e β -D- glicosidase) verificou-se que a maior parte da atividade enzimática estava presente na fração menor de 0,2 μ m. Durante esta coleta não foi verificada ação enzimática sobre os substratos β -L-fucosídeo, β -D- manopiranosídeo e α -L-ramnopiranosídeo.

Em abril de 2003 as atividades de todas as enzimas estiveram bem distribuídas entre todos os tamanhos de partículas. Apenas β -D-fucosidase não apresentou atividade na fração livre.

Em junho de 2003 apenas uma pequena parte da atividade estava presente na fração livre para as enzimas α -L-arabinosidase, β -L-fucosidase e α -D- glicosidase. A enzima β -L-fucosidase teve sua maior atividade relacionada com as frações de maior tamanho e não foi verificada atividade na fração livre. As enzimas β -D- galactosidase, α -D e β -D-manosidase e α -L-ramnosidase apresentaram a maior parte da atividade na fração livre. A enzima β -D- glicosidase apresentou aproximadamente a mesma atividade na fração livre e nas frações aderidas a partículas.

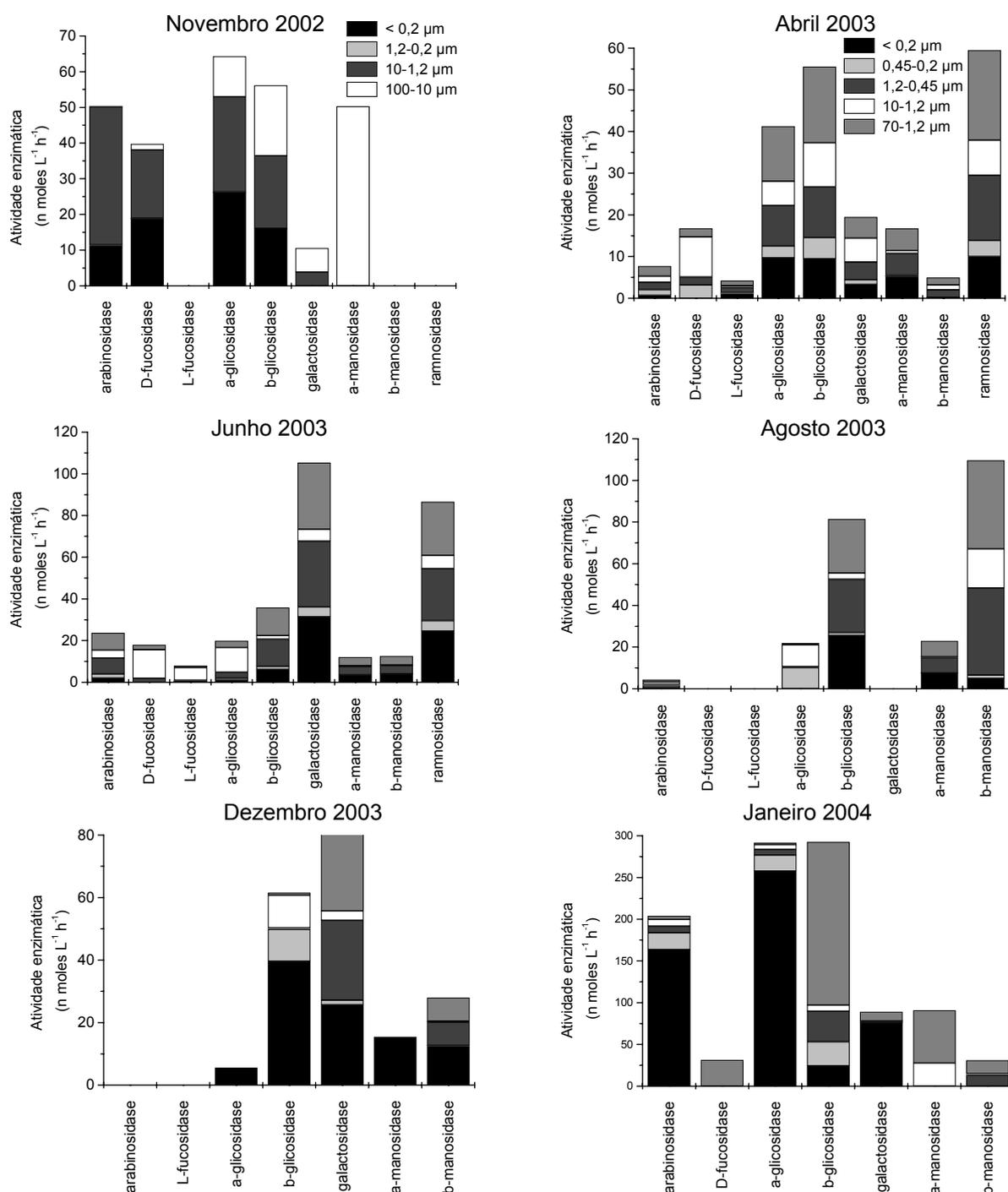


Figura 8: Atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) nos diferentes frações de tamanho de partículas e fração livre quantificada de novembro de 2002 a janeiro de 2004 na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita (SP).

Em agosto embora ocorra alguma variação, para a maioria das enzimas as maiores atividades foram registradas nas frações 70-10 μm , 1,2-0,45 μm (que abrangem a maior parte da atividade de enzimas ligadas a células bacterianas e de fungos) e < 0,2 μm em proporções mais ou menos iguais para cada uma das frações. É o que podemos verificar para as enzimas β -D- glicosidase, α -D- e β -D- manosidase. A enzima α -D- glicosidase não apresentou atividade na fração livre, neste mês.

Em dezembro de 2003 grande parte da atividade enzimática ocorreu na fração livre para todas as enzimas verificadas no período (α -D- e β -D- glicosidase, β -D- galactosidase, α -D- e β -D- manosidase).

O último experimento de fracionamento da atividade enzimática foi realizado em janeiro de 2004. Nesta coleta as maiores atividades enzimáticas foram encontradas na fração de tamanho maior (70-10 μm) e na fração de tamanho menor. A fração menor que 0,2 μm foi responsável por 80 a 89% da atividade enzimática registrada para as enzimas α -L-arabinosidase, α -D-glicosidase e β -D-galactosidase. Elevadas atividades para as enzimas β -D-fucosidase, β -D- glicosidase, α -D- e β -D- manosidase foram registradas para a fração maior (70-10 μm). Não foi verificada atividade na fração livre para os substratos β -D-fucosidase, α -D- e β -D- manosidase, assim como não houve ação enzimática em nenhuma das frações sobre o substrato β -L-fucosídeo. O substrato α -L-ramnopiranosídeo não foi utilizado neste experimento.

A Fig. 9 apresenta um resumo da atividade enzimática total nas frações verificada no período de estudo e como podemos observar há uma tendência de elevação das atividades enzimáticas durante a estação chuvosa.

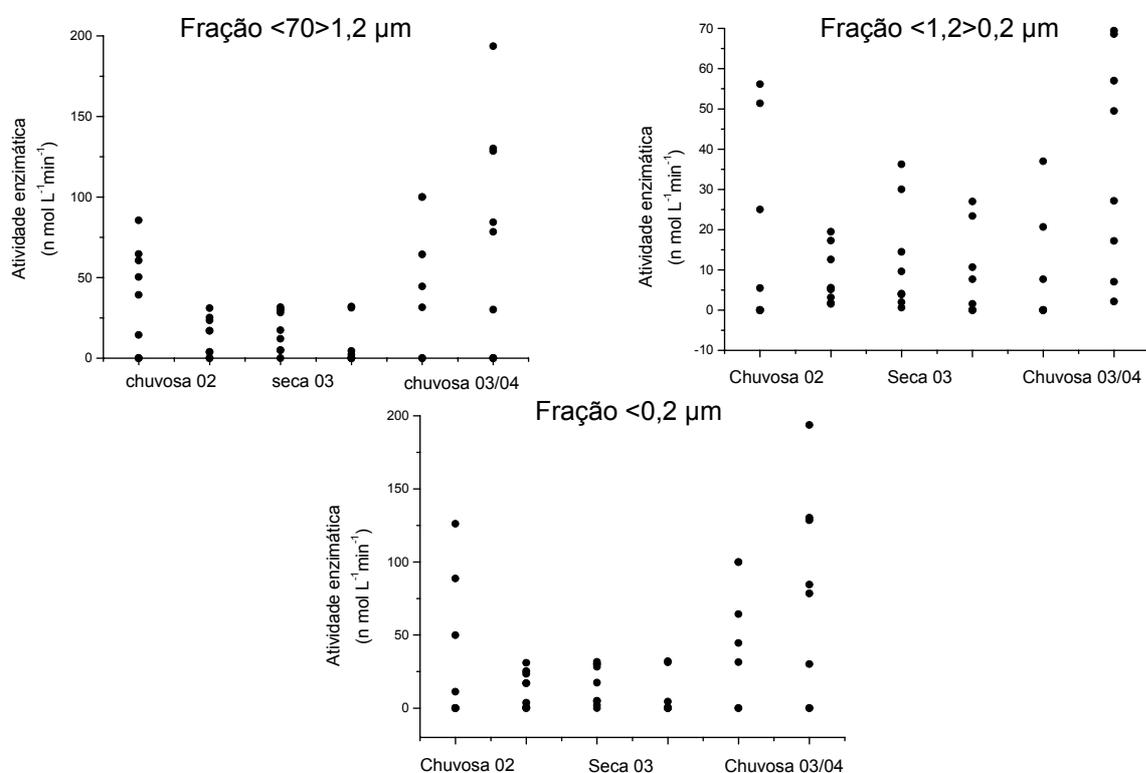


Figura 9: Atividade enzimática total (n moles L⁻¹ h⁻¹) nas diferentes frações, quantificada nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de novembro de 2002 a janeiro de 2004.

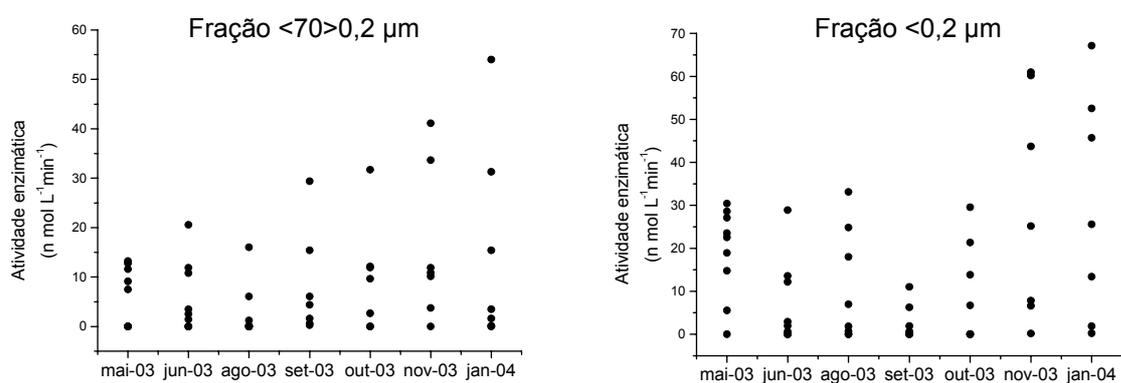


Figura 10: Atividade enzimática total (n moles L⁻¹ h⁻¹) separada entre as frações 70-0,2 μm e menor que 0,2 μm nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2003 a janeiro de 2004.

Este padrão temporal voltou a ser visto através dos dados obtidos a partir de maio de 2003 quando durante as coletas mensais foram realizadas além das medidas de atividade enzimática total as medidas da atividade presente na fração dissolvida ($<0,2 \mu\text{m}$) (Figs. 9 e 10). A Fig. 9 apresenta um resumo das atividades enzimáticas totais vistas neste período.

Na Fig. 11 são apresentados os resultados da separação da atividade de cada enzima nas duas frações: $70-0,2 \mu\text{m}$ e $< 0,2 \mu\text{m}$ para o período de maio de 2003 a janeiro de 2004. Quatro enzimas apresentaram maiores valores durante a estação seca: α -L-arabinosidase, β -D-fucosidase, β -L-fucosidase e β -D-galactosidase e as demais durante a estação chuvosa: α -D-glicosidase, β -D-glicosidase, α -D-manosidase e β -D-manosidase. Os valores de atividade enzimática na fração livre alcançaram em média 12% da atividade total entre 2003 e 2004 (Tabela 4).

Quando comparamos os valores de atividade na fração livre com o número de bactérias (Fig. 12) podemos observar que estes dois dados estão relacionados. Essa relação entre a atividade da fração livre e a densidade bacteriana é confirmada pela correlação de Spearman ($r=0,50$). Provavelmente quanto maior a quantidade de células bacterianas mais enzimas livres são produzidas e liberadas para o ambiente, como seria de se esperar. Podemos assumir que a atividade registrada na fração dissolvida não é proveniente de danos durante a filtração devido aos cuidados tomados no processo.

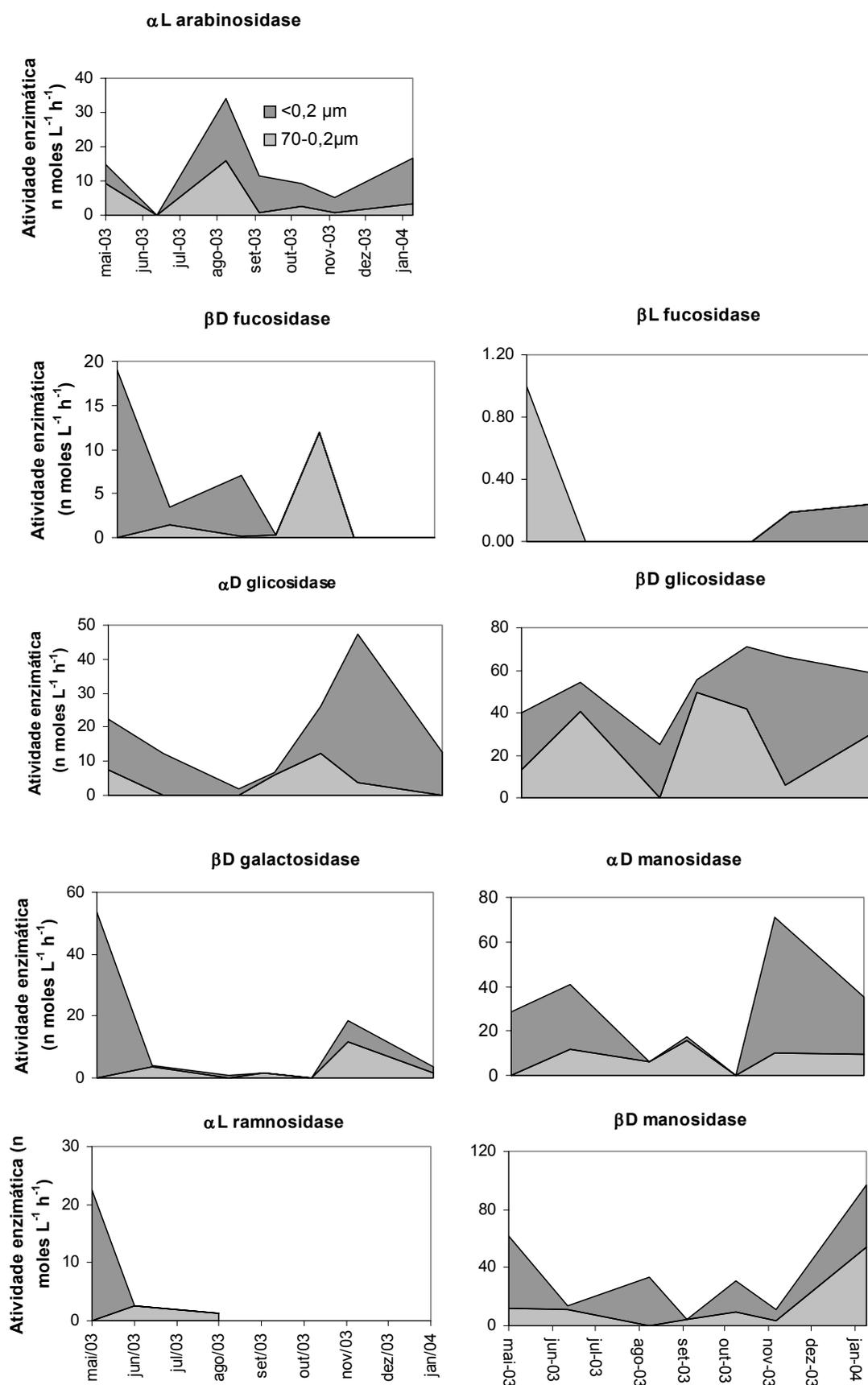


Figura 11: Atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) separada entre as frações 70-0,2 μm e menor que 0,2 μm nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2002 a janeiro de 2004.

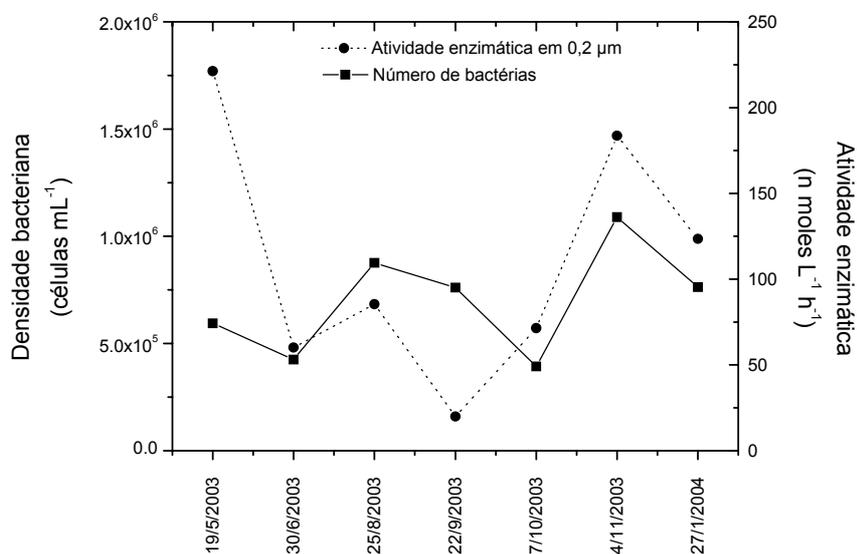


Figura 12: Atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) na fração livre comparada com a densidade bacteriana (células mL⁻¹) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente de maio de 2003 a janeiro de 2004.

Tabela 4: Porcentagem de atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) encontrada na fração livre em relação ao total para cada enzima nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente durante o período de maio 2003 a janeiro de 2004.

Enzima	Média fração <0,2 μm
α-L-Arabinosidase	8.40
β-D- Fucosidase	5.58
β-L -Fucosidase	0.11
α-D- Glicosidase	14.24
β-D- Glicosidase	26.94
β-D-Galactosidase	9.04
α-D- Manosidase	20.85
β-D- Manosidase	22.58
α-L-Ramnosidase	7.52

3.3. Análise Mensal dos Polissacarídeos Presentes no Reservatório

Os resultados das análises da composição monossacarídica dos carboidratos obtidos nos 20 meses de estudo (junho de 2002 a janeiro de 2004) foram combinados em três tabelas (Tabelas 5, 6 e 7) e nas Figs. 13, 14, 15, 16 e 17.

Como em média 92% do total de carboidratos nas amostras de água de Barra Bonita tinha estrutura polimérica, o mais correto seria usar os termos carboidratos *coloidais e dissolvidos* pois a maioria dos carboidratos poliméricos de grande massa molecular ocorre na forma coloidal. Por outro lado, ocorrem também carboidratos livres e poliméricos de baixa massa que não formam colóides e estão realmente na forma dissolvida. Porém por questão prática, continuaremos a usar o termo “dissolvido”.

Os padrões de distribuição dos açúcares nas profundidades amostradas são vistos de maneira resumida na Fig. 13. Os máximos das quantidades de açúcar ocorreram na maioria das vezes em 5 m de profundidade, mas algumas vezes também em 1, 3 e 0 m. É interessante notar que as maiores quantidades de carboidratos entre 1 e 3 m estão localizadas na zona eufótica, ou seja, coincidem com a camada de máxima produção primária (Antonio, 2006), assim como foi observado para a distribuição de atividade enzimática.

A quantidade de carboidratos totais variou de 0,50 (julho de 2003) a 6,83 mg L⁻¹ (abril de 2003) sendo em média 2,43 mg L⁻¹ ± 1,85 e puderam ser verificados 4 máximos da quantidade de carboidratos totais dissolvidos (Fig. 14); o primeiro ocorreu de agosto de 2002 a outubro de 2002, o segundo em dezembro de 2002, o terceiro em abril de 2003, e o último em setembro de 2003. Pode-se deduzir destes dados que a quantidade

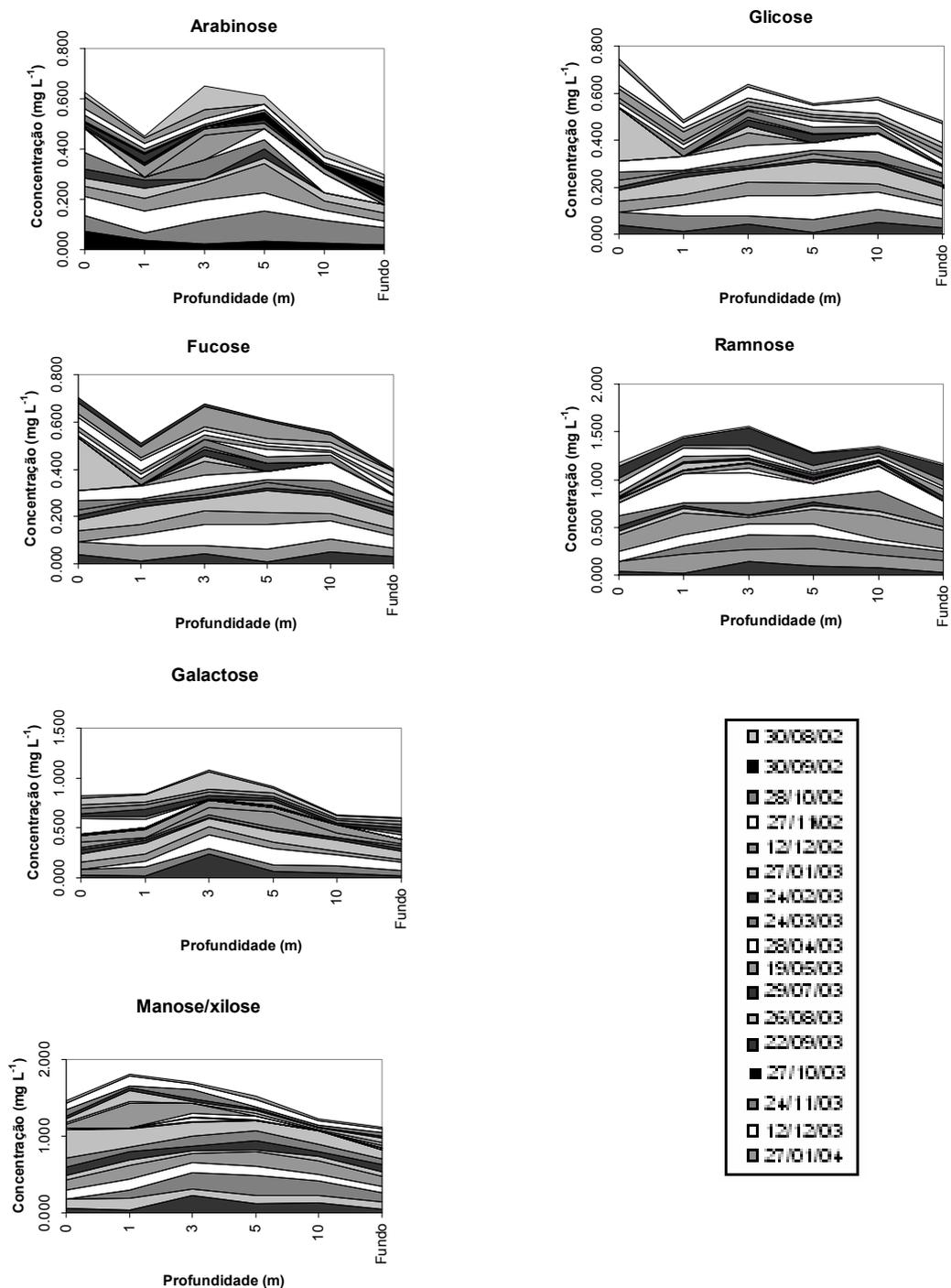


Figura 13: Análise da composição monossacarídica total (mg L⁻¹) nas amostras de água em diferentes profundidades do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Média das medidas (n=18).

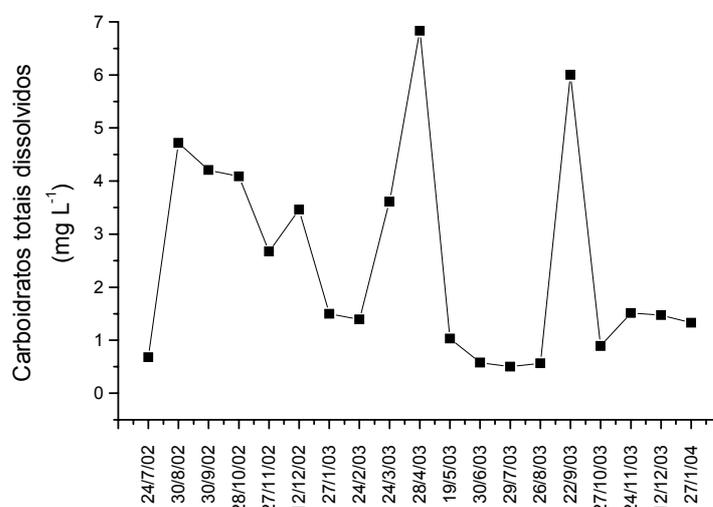


Figura 14: Concentração de carboidratos totais dissolvidos (mg L^{-1}) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

de carboidratos dissolvidos no reservatório é cerca de 7.679 toneladas ano^{-1} , levando-se em consideração a média anual de $2,43 \text{ mg L}^{-1}$ de carboidratos totais e o volume do reservatório.

As Tabelas 5 e 6 e a Fig. 15 apresentam os açúcares totais dissolvidos detectados pelas análises por HPLC-PAD. Os carboidratos totais dissolvidos foram compostos principalmente por glicose ($0,03\text{-}2,99 \text{ mg L}^{-1}$, média de $0,59 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,63$) e manose/xilose ($0\text{-}2,43 \text{ mg L}^{-1}$, média de $0,51 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,55$) e ramnose (média de $0,42 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,37$). Também por quantidades menores de, em ordem decrescente de concentração, galactose (média de $0,28 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,27$), arabinose (média de $0,18 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,15$), fucose (média de $0,17 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,12$), frutose (média de $0,17 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,56$),

Tabela 5: Valores médios para composição monossacarídica total de carboidratos (mg L⁻¹) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. * = não detectado.

Data	Fuc.	Ram.	Ara.	Gal.	Gli.	Man./Xil.	Fru.	Rib.	Ac.Gal.	Ac.Gli.
10/6/02	0.29	0.70	0.32	0.43	1.21	0.49	0.23	0.12	*	*
25/6/02	0.05	0.06	0.04	0.08	0.17	0.17	0.00	0.04	*	*
24/7/02	0.08	0.11	0.05	0.09	0.14	0.18	0.02	0.01	*	*
14/8/02	0.15	0.26	0.08	0.21	0.31	0.35	0.01	0.01	*	*
30/8/02	0.18	0.40	0.23	0.41	1.00	2.43	0.05	0.01	*	*
30/9/02	0.30	0.88	0.21	0.38	0.71	0.65	0.15	0.03	*	*
28/10/02	0.40	0.65	0.46	0.61	0.74	1.05	0.08	0.00	*	*
27/11/02	0.26	0.54	0.38	0.36	0.44	0.66	0.03	0.00	*	*
12/12/02	0.39	1.06	0.34	0.56	0.88	0.94	0.03	0.01	*	*
13/1/03	0.28	0.78	0.25	0.38	0.63	0.61	0.03	0.03	*	*
27/1/03	0.09	0.23	0.17	0.16	0.47	0.03	0.04	0.02	*	*
24/2/03	0.09	0.12	0.10	0.12	0.12	0.53	0.18	0.04	0.07	0.02
24/3/03	0.14	0.61	0.19	0.36	1.22	0.91	0.18	0.01	0.00	0.00
28/4/03	0.30	1.34	0.22	0.38	0.41	1.22	2.70	0.01	0.14	0.11
19/5/03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73	0.02	0.08	0.00	0.20	0.00
30/6/03	0.22	0.17	0.13	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
29/7/03	0.04	0.02	0.02	0.01	0.07	0.02	0.03	0.02	0.20	0.09
26/8/03	0.01	0.00	0.03	0.03	0.10	0.07	0.00	0.00	0.07	0.25
22/9/03	0.12	0.72	0.54	1.22	2.99	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
27/10/03	0.11	0.13	0.10	0.13	0.20	0.14	0.02	0.00	0.03	0.03
24/11/03	0.10	0.23	0.09	0.21	0.46	0.31	0.00	0.00	0.06	0.05
12/12/03	0.15	0.35	0.13	0.21	0.27	0.19	0.03	0.03	0.08	0.05
27/1/04	0.10	0.28	0.11	0.17	0.26	0.31	0.00	0.00	0.05	0.05

Tabela 6: Valores médios em porcentagem para composição monossacarídica total de carboidratos nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. * = não detectado.

Data	Fuc.	Ram.	Ara.	Gal.	Gli.	Man./Xil.	Fru.	Rib.	Ac.Gal.	Ac.Gli.
10/6/02	8	19	9	11	32	13	6	3	*	*
25/6/02	8	10	6	13	29	28	0	6	*	*
24/7/02	12	16	7	13	20	27	3	1	*	*
14/8/02	11	19	6	15	22	25	1	0	*	*
30/8/02	4	8	5	9	21	52	1	0	*	*
30/9/02	9	27	6	12	21	20	4	1	*	*
28/10/02	10	16	12	15	19	26	2	0	*	*
27/11/02	10	20	14	14	17	25	1	0	*	*
12/12/02	9	25	8	13	21	22	1	0	*	*
13/1/03	9	26	8	13	21	20	1	1	*	*
27/1/03	6	17	12	12	34	2	3	2	*	*
24/2/03	7	8	8	9	8	38	13	3	5	1
24/3/03	4	17	5	10	34	25	5	0	0	0
28/4/03	4	20	3	6	6	18	39	0	2	2
19/5/03	0	0	0	0	71	2	8	0	20	0
30/6/03	39	30	22	3	4	0	0	0	2	0
29/7/03	8	3	4	2	14	4	6	3	40	18
26/8/03	1	0	5	6	18	13	0	0	13	45
22/9/03	2	12	9	20	50	7	0	0	0	0
27/10/03	12	14	11	15	23	16	2	0	3	3
24/11/03	7	15	6	14	30	21	0	0	4	3
12/12/03	10	24	9	14	18	13	2	2	5	3
27/1/04	8	21	8	13	19	23	0	0	4	4

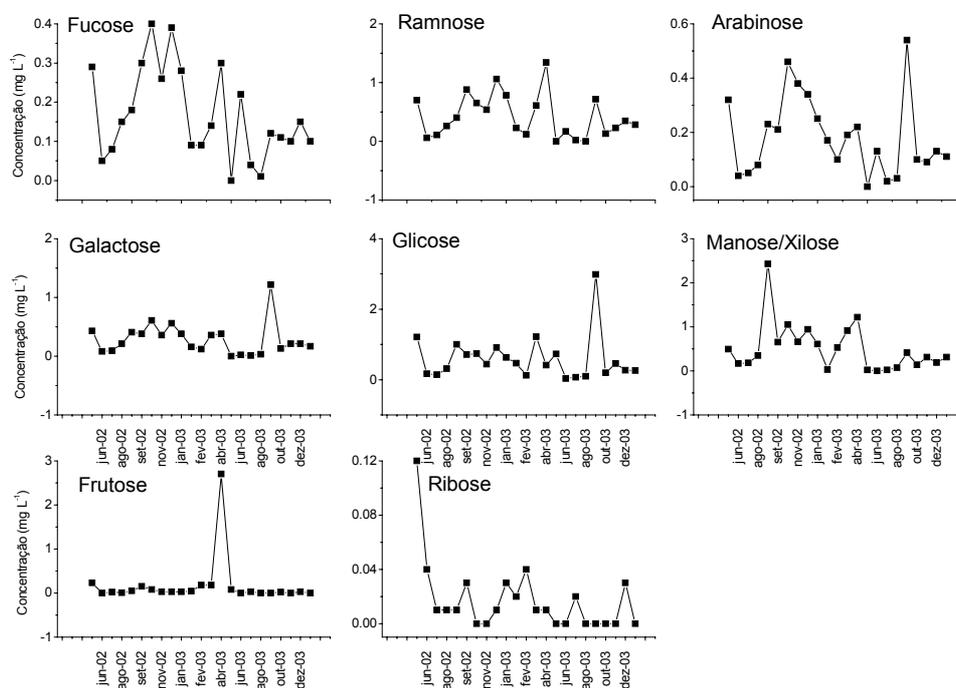


Figura 15: Concentração dos monossacarídeos dissolvidos (mg L^{-1}) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

ácido galacturônico (média de $0,08 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,07$), ácido glicurônico (média de $0,05 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,07$), e ribose (média de $0,02 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,03$).

As abundâncias relativas dos monossacarídeos encontradas em nosso estudo foram em média: 24% glicose, 21% manose/xilose, 17% ramnose, 12% galactose, 7% fucose, 7% arabinose, 7% frutose, 3% ácido galacturônico, 2% ácido glicurônico e 1% ribose, valores muito próximos aos encontrados para ambientes de água doce como será discutido a seguir.

Tabela 7: Composição de carboidratos dissolvidos em porcentagem nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

Data	Combinado (%)	Livre (%)
10/6/02	90	10
25/6/02	90	10
24/7/02	96	4
14/8/02	98	2
30/8/02	99	1
30/9/02	73	27
28/10/02	97	3
27/11/02	100	0
12/12/02	98	2
13/1/03	99	1
27/1/03	99	1
24/2/03	100	0
24/3/03	99	1
28/4/03	100	0
19/5/03	93	7
30/6/03	91	9
29/7/03	98	2
26/8/03	58	42
22/9/03	82	18
27/10/03	77	23
24/11/03	98	2
12/12/03	88	12
27/1/04	99	1

Em média 92% ($2,28 \text{ mg L}^{-1} \pm 1,75$) do total de carboidratos dissolvidos (Tabela 7) tinham estrutura polimérica, ou seja estavam combinados, sendo que as maiores porcentagens de carboidratos poliméricos foram encontradas em novembro de 2002, fevereiro de 2003 e abril de 2003 e a menor em agosto de 2003.

Os carboidratos dissolvidos livres, compostos principalmente por glicose mas também por quantidades muito pequenas de todos os monossacarídeos averiguados, variaram de 0 a $1,13 \text{ mg L}^{-1}$ (em média $0,16 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$) atingindo 8% (em média) do total de carboidratos dissolvidos.

Os máximos verificados para os carboidratos totais dissolvidos coincidiram com os máximos registrados para densidade fitoplanctônica (florações) tendo as cianobactérias dominado durante os meses mais chuvosos (principalmente *Microcystis* sp, *M. aeruginosa* e *Anabaena spiroides*) enquanto que as diatomáceas (principalmente *A. granulata*) e criptofíceas (*Cryptomonas* sp) estiveram presentes em maiores densidades durante os meses mais secos (dados obtidos em colaboração com Dellamano-Oliveira, 2006) (Fig. 16).

O primeiro aumento da quantidade de carboidrato total dissolvido foi concomitante às densidades fitoplanctônicas de 13.189 células mL⁻¹ (agosto de 2002) e 12.081 células mL⁻¹ (outubro de 2002). Em agosto de 2002 *M. aeruginosa*, *Microcystis* sp e *A. granulata* foram os organismos que mais contribuíram em densidade contrariando o predomínio de diatomáceas e criptofíceas nos meses mais secos talvez por estes serem meses de transição entre as estações seca e chuvosa (Figs. 16 e 17). Em outubro de 2002 apenas as cianofíceas predominaram (*M. aeruginosa*, *Microcystis* sp e *A. spiroides*). Os principais monossacarídeos verificados nestas datas foram manose/xilose, glicose, ramnose e galactose (Fig. 15, Tabelas 5 e 6). As altas concentrações desses monossacarídeos talvez expliquem as maiores atividades enzimáticas observadas em agosto de 2002 para α -D- manosidase e β -D- galactosidase. O mesmo pode ter acontecido em outubro de 2002, quando se destaca uma elevada atividade enzimática das enzimas α -D- e β -D- manosidase, α -D- e β -D- glicosidase, β -D- galactosidase e α -L- ramnosidase (Tabela 3 e Fig. 7).

Resultados

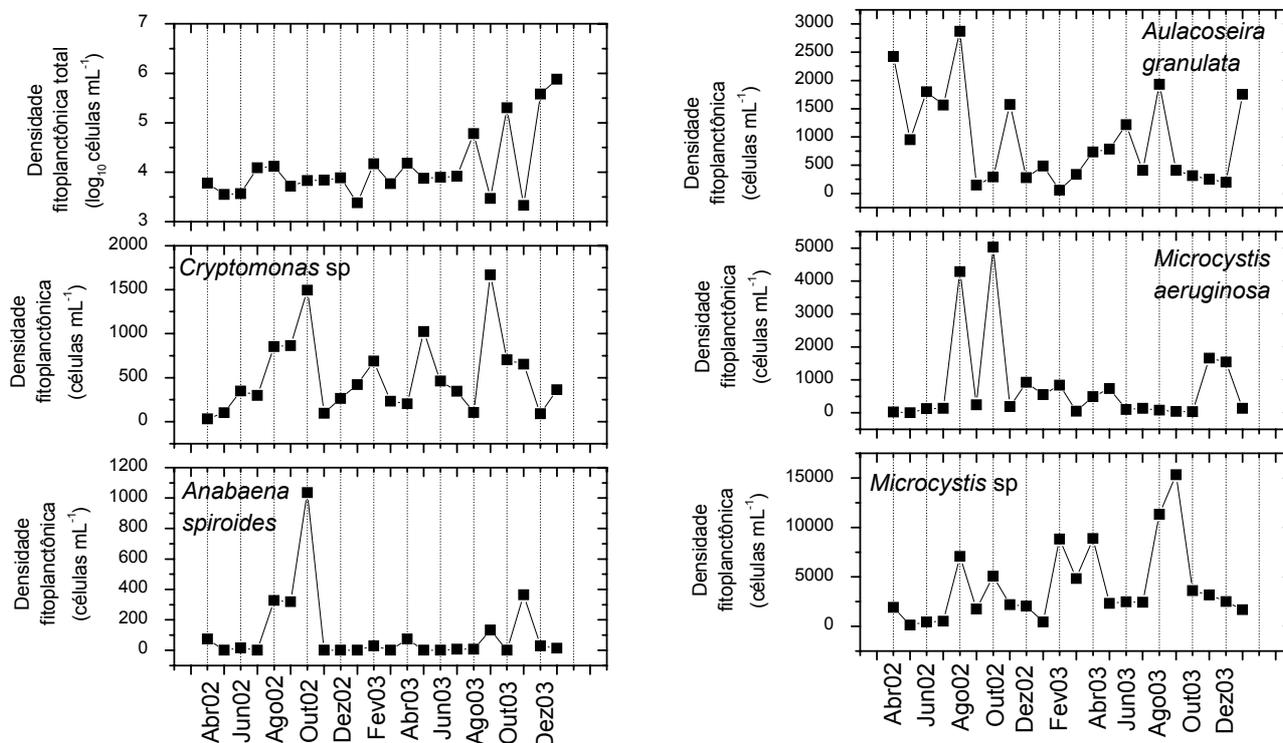


Figura 16: Densidades fitoplanctônicas (células mL⁻¹) das populações predominantes nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

Em dezembro de 2002 foi observada uma pequena elevação do número de indivíduos do fitoplâncton (7.769 células mL⁻¹) (*M. aeruginosa* e *Microcystis* sp) que coincidiu com a concentração máxima de carboidratos verificada na data (Figs. 16 e 17). Os principais monossacarídeos presentes nesta data foram ramnose, manose/xilose, glicose e galactose (Fig. 15, Tabelas 5 e 6). Nesta data foi verificada uma grande atividade enzimática total composta pelas atividades das enzimas α -L-arabinosidase, α -D- e β -D-manosidase, α -D- e β -D- glicosidase.

Durante a concentração máxima de carboidrato em abril de 2003 foi observada a maior densidade fitoplanctônica ($15.173 \text{ células mL}^{-1}$) e o maior pico de carboidrato total, com o predomínio de cianofíceas (*Microcystis* sp) e diatomáceas (*A. granulata*) (Figs. 16 e 17). As principais atividades enzimáticas desta data foram das enzimas α -D- e β -D- glicosidase e α -L- ramnosidase (Tabela 3 e Fig. 7). Em setembro de 2003, *Microcystis* sp e *Cryptomonas* sp foram os organismos que mais contribuíram com a densidade fitoplanctônica de $2.976 \text{ células mL}^{-1}$ (Figs. 16 e 17). O máximo na concentração de carboidratos observado nesta data foi composto principalmente de glicose, galactose e ramnose e as maiores atividades enzimáticas registradas foram para α -D- e β -D- glicosidase e α -D-manosidase, assim como uma elevação da atividade de β -D- fucosidase em outubro de 2003.

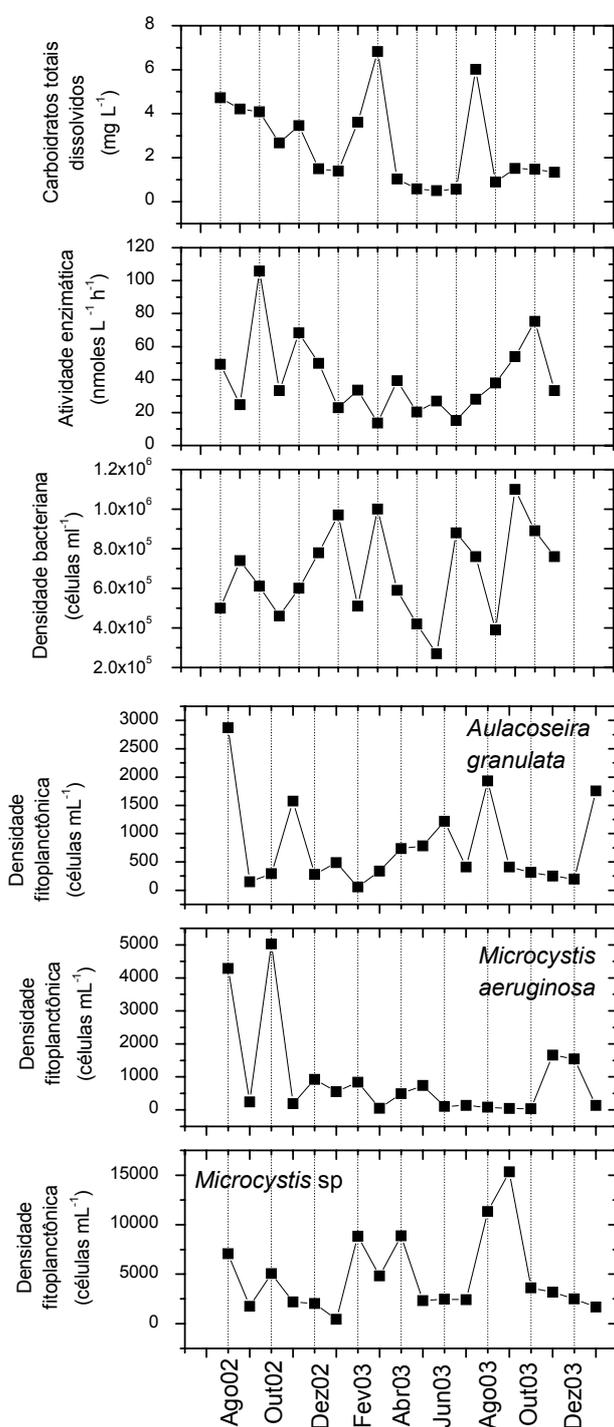


Figura 17: Distribuição conjunta das densidades fitoplancônica e bacteriana (células mL⁻¹), dos carboidratos totais dissolvidos (mg L⁻¹) e da atividade enzimática extracelular (n moles L⁻¹ h⁻¹) nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) coletadas mensalmente no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

3.4. Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações

Microheterotróficas Naturais em Laboratório

A degradação dos polissacarídeos foi acompanhada pelas metodologias já descritas, por 43 dias, durante os quais foram feitas 15 amostragens de forma asséptica dos frascos experimentais e do controle, com intervalos de 24 h nos primeiros 8 dias e com intervalos de tempo maiores após este período.

A cromatografia em gel (Fig. 18) revelou que o polissacarídeo proveniente da água do reservatório era composto por várias frações com diferentes massas moleculares: $V_e/V_t = 0,3; 0,4; 0,6$ e $0,7$ (volume eluído/volume total).

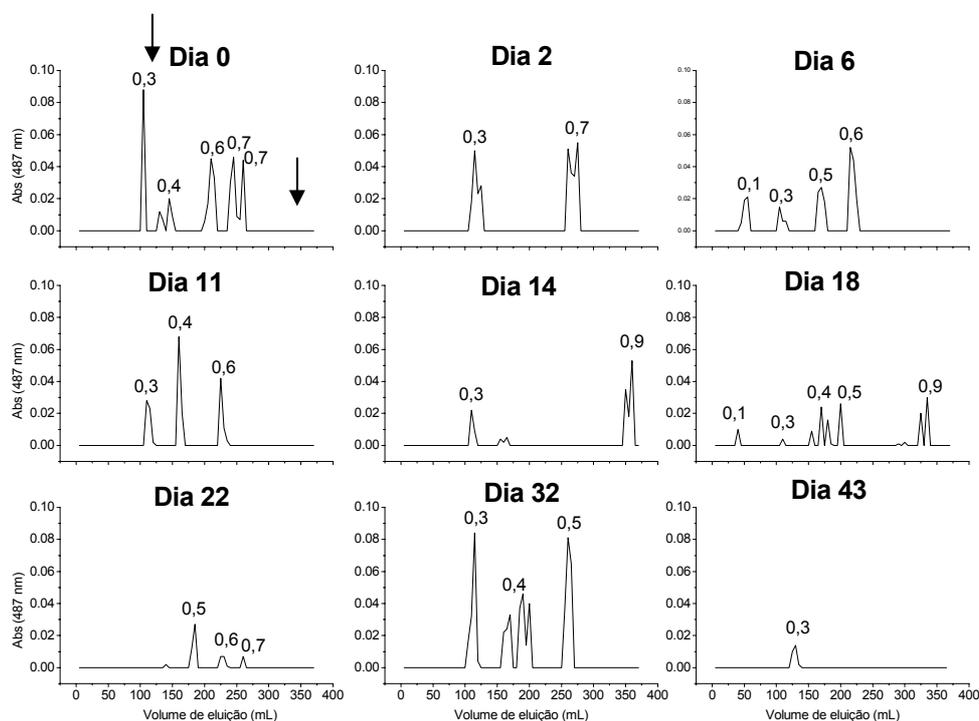


Figura 18: Frações provenientes do substrato em decomposição que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).

Baseando-se nas análises de cromatografia em gel temos que o consumo do polissacarídeo aparenta ser um processo rápido, pois podemos observar que até o 18º dia de experimento praticamente todo o material de alta massa molecular ($V_e/V_t = 0,3$) acrescentado já havia sido consumido. A partir do 6º dia de experimento (fração de $V_e/V_t = 0,1$) e culminando com o 32º dia há a produção de novo material de alta massa molecular, supostamente por parte das bactérias.

A principal fração do polissacarídeo de $V_e/V_t 0,3$ foi eluída juntamente com a molécula de referência (Blue-Dextran 2×10^6 Da, $V_e/V_t = 0,3$), e tendo sido analisada por HPLC-PAD, revelou-se composta por glicose (23%), e ramnose (12%) e por proporções praticamente iguais dos demais açúcares (fucose 7%, manose/xilose 7%,

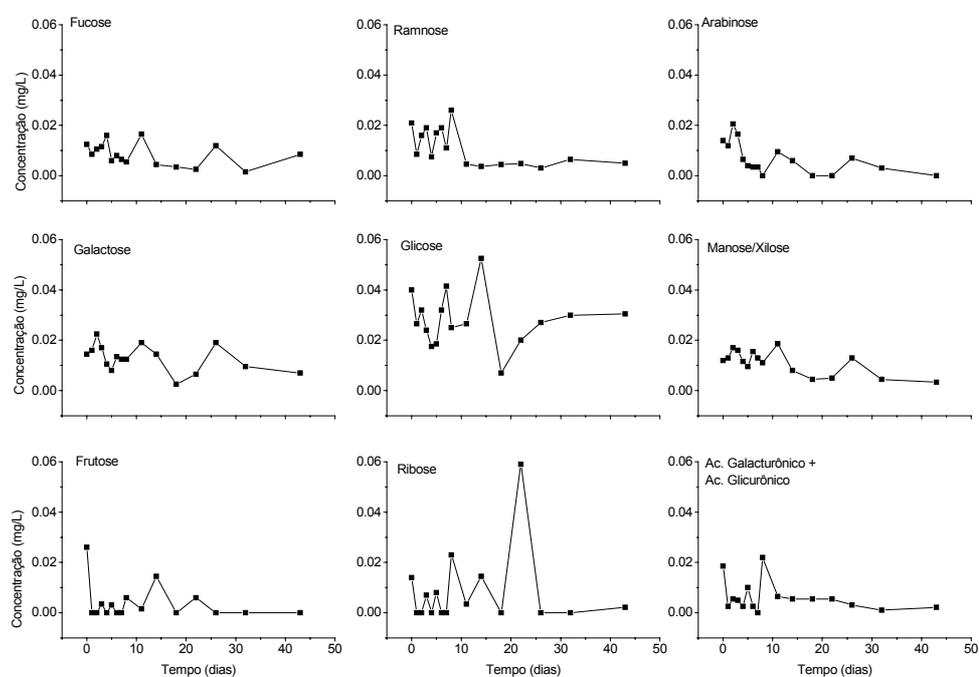


Figura 19: Composição monossacarídica total (mg L⁻¹) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004

ribose 8%, ácido galacturônico 9% e ácido glicurônico 2%).

A concentração dos diferentes monossacarídeos (Fig. 19) variou durante o experimento e alguns monossacarídeos parecem ter sido produzidos no período, como por exemplo glicose e ribose.

O consumo do polissacarídeo foi acompanhado de altas atividades enzimáticas principalmente no início do processo. De um modo geral a atividade enzimática (Fig. 20) apresentou-se dividida em duas fases, a primeira, provavelmente devida ao consumo do polissacarídeo acrescentado, que vai do início do experimento até

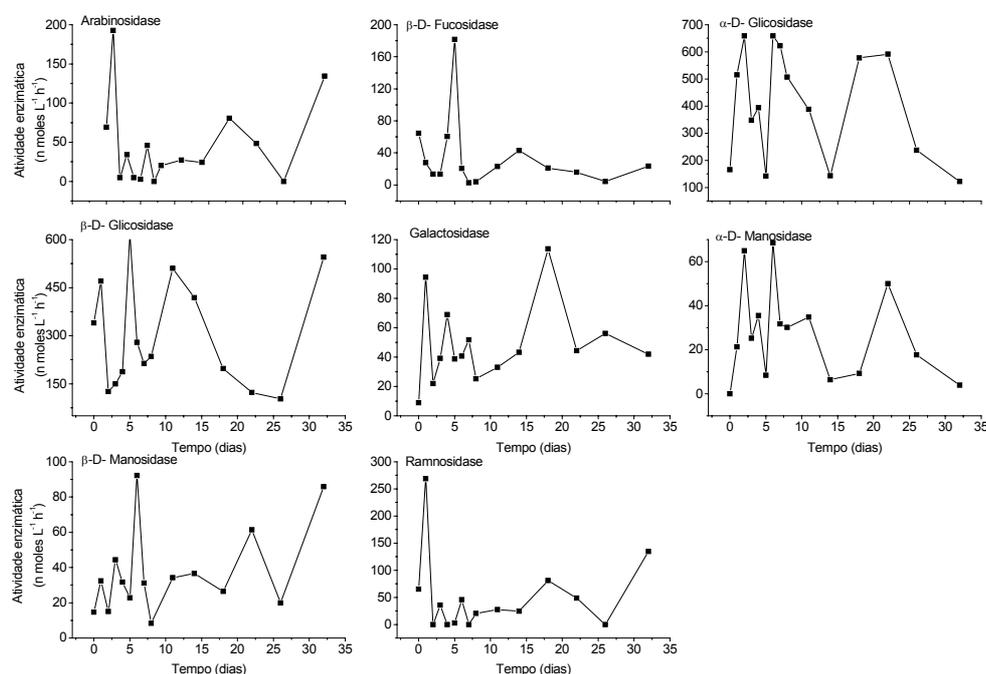


Figura 20: Atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004.

aproximadamente o dia 8 quando tem início uma segunda fase de elevada atividade enzimática. Esta segunda fase possivelmente é uma resposta à presença dos excretados das próprias bactérias ou pelo desenvolvimento de uma outra população bacteriana com potenciais para produção de enzimas extracelulares diferentes. De fato, pode-se visualizar as duas diferentes populações pelas contagens bacterianas (Fig. 22).

As medidas de carboidrato e proteínas (Fig. 21) revelam que, apesar dos picos de produção destas moléculas pelas populações microheterotróficas, o polissacarídeo inicial (cuja concentração de carboidrato era de $2,22 \text{ mg mL}^{-1}$) foi sendo gradativamente consumido até o final do experimento. A produção de proteínas durante o experimento alcançou máximos nos dias 1, 8 e 22 sendo que os dois primeiros máximos coincidem com os máximos observados para a densidade bacteriana devendo-se tratar, portanto, de produção de proteína na forma de biomassa bacteriana. A concentração de proteína no polissacarídeo inicial é de $4,12 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

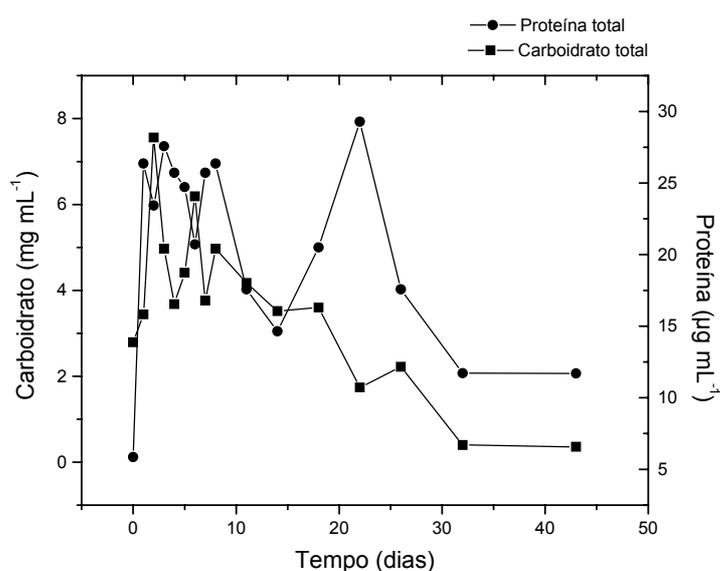


Figura 21: Concentração de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004.

As contagens bacterianas confirmam o que já havia sido antevisto através dos dados de concentração de proteínas, ou seja, a presença de duas populações distintas no consumo do polissacarídeo. A primeira população bacteriana alcançando um número máximo de organismos de $4,88 \times 10^5$ (no 3º dia de experimento) foi composta principalmente por cocos e bacilos e a segunda população alcançando números máximos de $3,17 \times 10^5$ no 8º dia de experimento com dominância de cadeias de bacilos (Fig. 22).

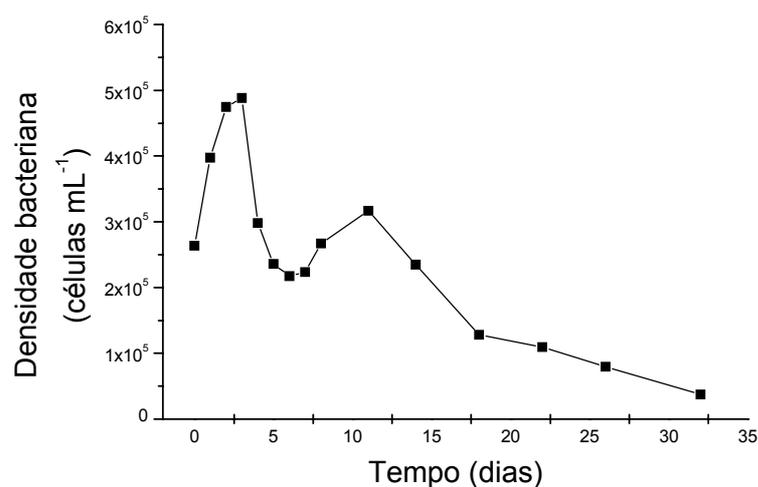


Figura 22: Densidade bacteriana (células mL⁻¹) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais em Laboratório realizado em julho de 2004.

Para que houvesse uma confirmação dos resultados obtidos o experimento de degradação foi repetido em setembro de 2005 e durante 22 dias foram retiradas amostras e realizadas as mesmas análises descritas anteriormente.

Os resultados obtidos neste experimento concordam com o obtido em julho pois também neste caso houve um rápido consumo do polissacarídeo. Até o 8º dia de experimento todo polissacarídeo já havia sido consumido sendo que no 6º dia há o aparecimento de várias frações menores que o polissacarídeo, o que provavelmente são fragmentos do polissacarídeo inicial. Devemos ter em mente que a massa molecular obtida através de cromatografia em gel é apenas aparente, pelo fato do gel separar por tamanho e tipo e não exatamente por massa (Pazur, 1986).

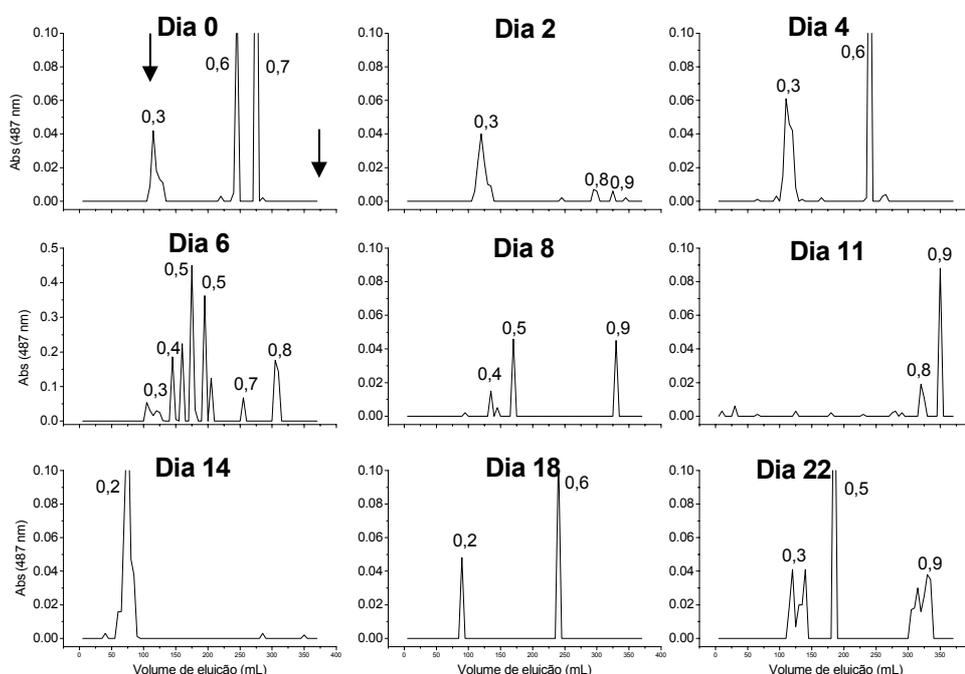


Figura 23: Frações provenientes do substrato em decomposição que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).

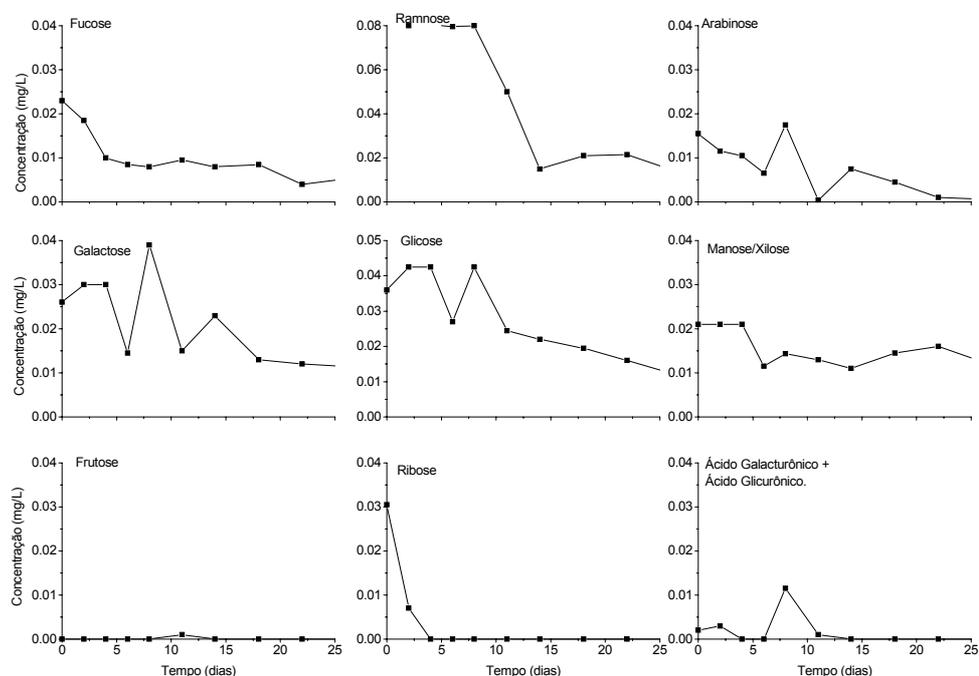


Figura 24: Composição monossacarídica total (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005.

O polissacarídeo inicial foi eluído juntamente com o Blue-Dextran (2×10^6 Da, $V_e/V_t = 0,3$) dentro do “void volume” (Fig. 23) sendo composto principalmente por ramnose (36%) e glicose (16%), mas também por fucose (10%), arabinose (7%), galactose (11%), manose/xilose (5%), ribose (13%) e ácido glicurônico (1%).

Alguns açúcares parecem ter sido produzidos durante o experimento (arabinose, galactose e glicose), contudo a maior parte deles foi degradada até níveis muito baixos e se mantiveram dessa forma até o final (Fig. 24). Ramnose foi o açúcar mais abundante encontrado, tendo sido degradado até o 14º dia de experimento.

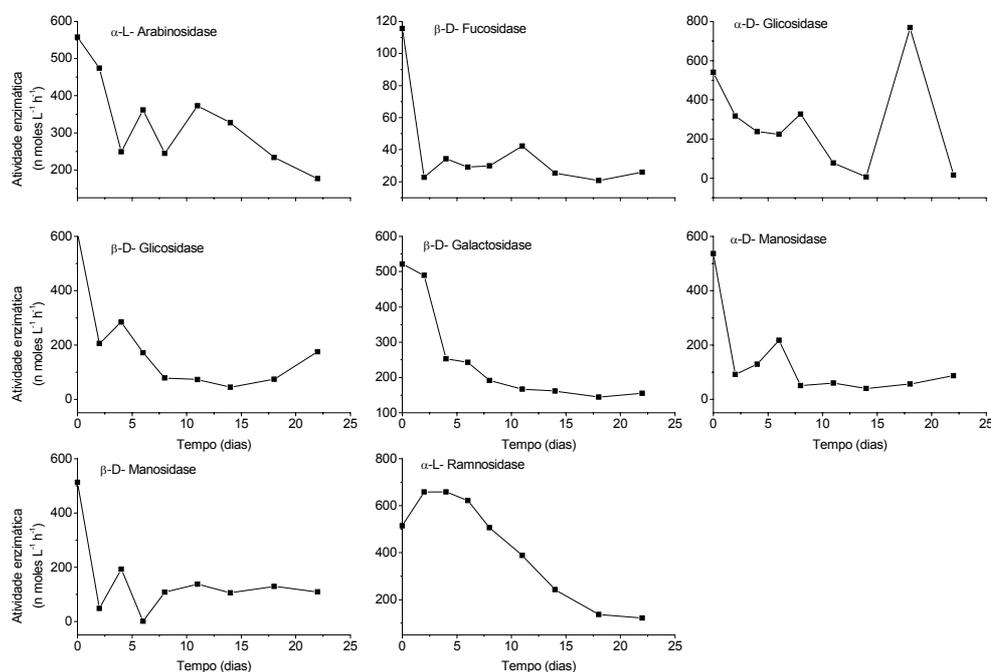


Figura 25: Atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005.

Os monossacarídeos arabinose e ribose mantiveram-se em níveis muito baixos durante o experimento e não foram produzidos durante a degradação.

Para todos os substratos a atividade enzimática foi mais elevada durante o início do experimento, no entanto, para a enzima α -D- glicosidase um elevado pico de atividade enzimática foi registrado próximo ao término do experimento, mais precisamente no 18º dia de experimento (Fig. 25). Assim como seria esperado a maior atividade enzimática foi alcançada pela enzima α -L- ramosidase que sofreu uma diminuição em sua atividade conforme seu respectivo substrato era degradado.

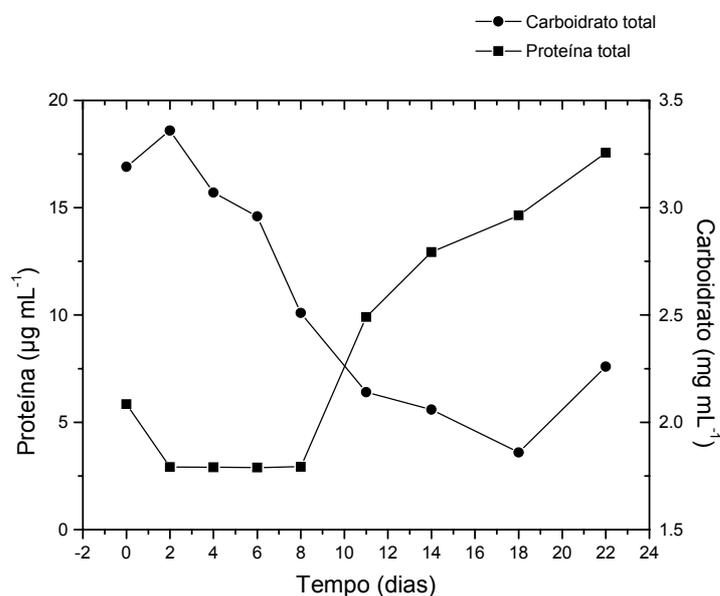


Figura 26: Concentração de carboidratos (mg mL⁻¹) e proteínas (µg mL⁻¹) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005.

A quantidade de carboidrato foi reduzida de 3,19 até 1,86 mg mL⁻¹ enquanto que a concentração de proteínas elevou-se de 5,85 a 17,56 µg mL⁻¹. Este aumento da concentração de proteínas corrobora o aumento da densidade bacteriana (Fig. 26) assim como o crescimento bacteriano está relacionado com a degradação do polissacarídeo (Fig. 27).

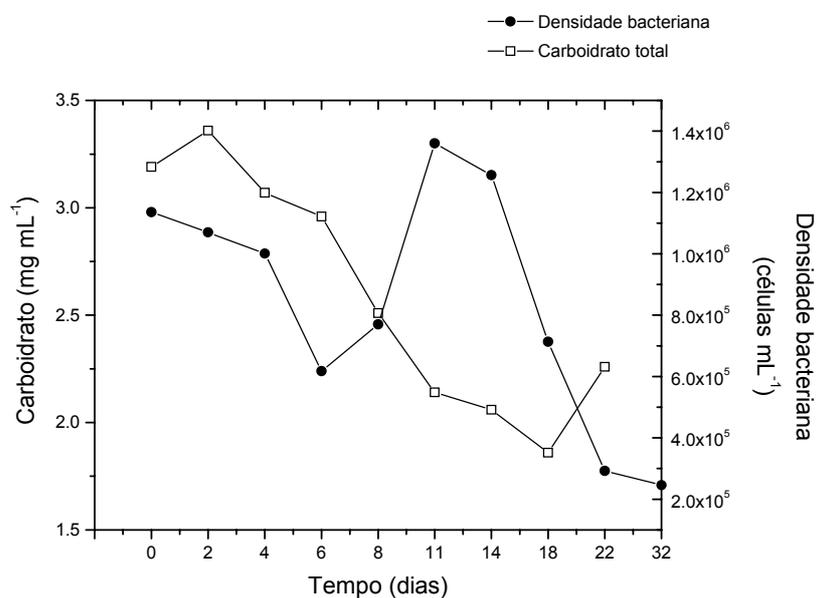


Figura 27: Comparação entre crescimento bacteriano (células mL⁻¹) e concentração de carboidratos (mg mL⁻¹) durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos da Coluna d'Água por Populações Microheterotróficas Naturais realizado em setembro de 2005.

As quantidades de carboidrato dos controles destes dois experimentos mantiveram-se sempre constantes e a cromatografia em gel destas amostras revelou que o polissacarídeo permaneceu inalterado do início até o fim do experimento (dados não apresentados).

3.5. Degradação dos Polissacarídeos Produzidos pelas Espécies Predominantes do Fitoplâncton em Culturas Axênicas no Laboratório

3.5.1. *Aulacoseira granulata*

Este experimento foi realizado em agosto de 2004 e podemos verificar que a degradação do polissacarídeo da diatomácea *A. granulata* foi mais lenta do que a observada para os polissacarídeos naturais (Fig. 28). Porém, no 32º dia de experimento quase todo polissacarídeo já havia sido degradado. Podemos observar também a formação de compostos de menor massa molecular que são fragmentos do polissacarídeo inicial (6º dia, fração de $V_e/V_t = 0,5$ e $0,8$; dia 8 fração de $V_e/V_t = 0,5$).

O polissacarídeo acrescentado foi eluído juntamente com a molécula de referência (Blue Dextran 2×10^6 Da) com V_e/V_t de $0,4$ e pôde ser observado do dia 0 até o 32º dia de experimento.

O polissacarídeo de *A. granulata* apresentou elevadas proporções de ramnose (33%), e consideráveis quantidades de fucose (19%) e manose/xilose (18%) assim como o obtido por Gouvêa *et al.* (2005) para a composição polimérica deste mesmo polissacarídeo analisada através de cromatografia de gás com diferenças apenas nas porcentagens obtidas. Quantidades menores de glicose (16%) e galactose (14%) também foram verificadas.

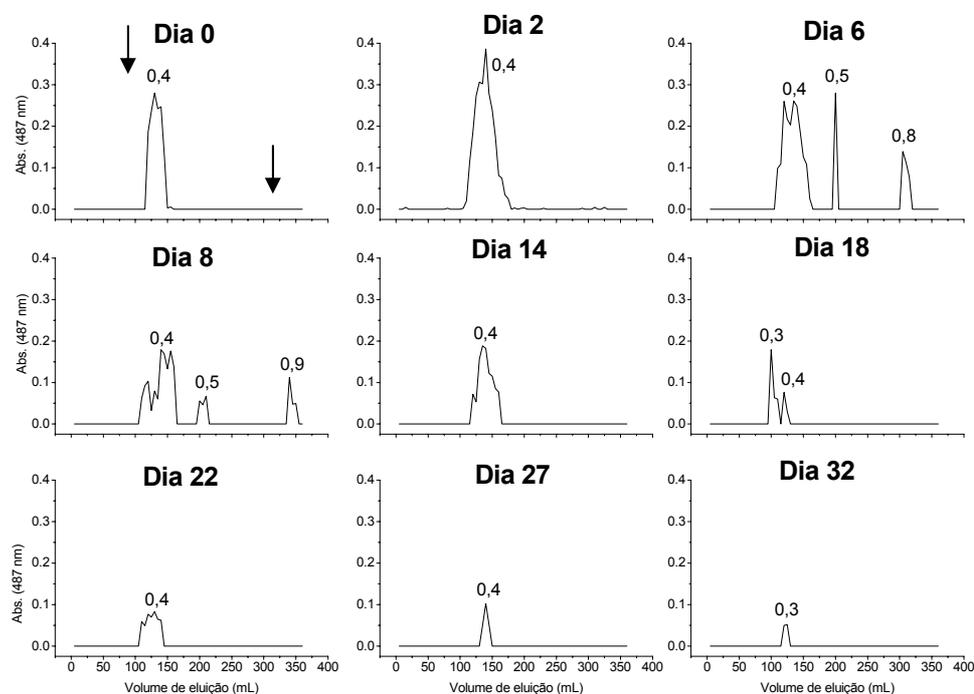


Figura 28: Frações do substrato em decomposição (polissacarídeo da diatomácea *Aulacoseira granulata*) que foram eluídas através de cromatografia em gel em Sepharose CL-6B. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).

A Fig. 29 mostra a participação de cada monossacarídeo nas frações produzidas por degradação do polissacarídeo de *A. granulata*, analisadas por HPLC-PAD. O monossacarídeo galactose demonstra uma degradação muito rápida, dentro dos primeiros 6 dias, já para os demais monossacarídeos a maior parte foi consumida até o 11º dia de experimento. Todos os monossacarídeos presentes na composição do polissacarídeo apresentaram um padrão de decomposição muito típico. O açúcar ribose e os açúcares ácidos, como será discutido adiante, são indicativos da atividade

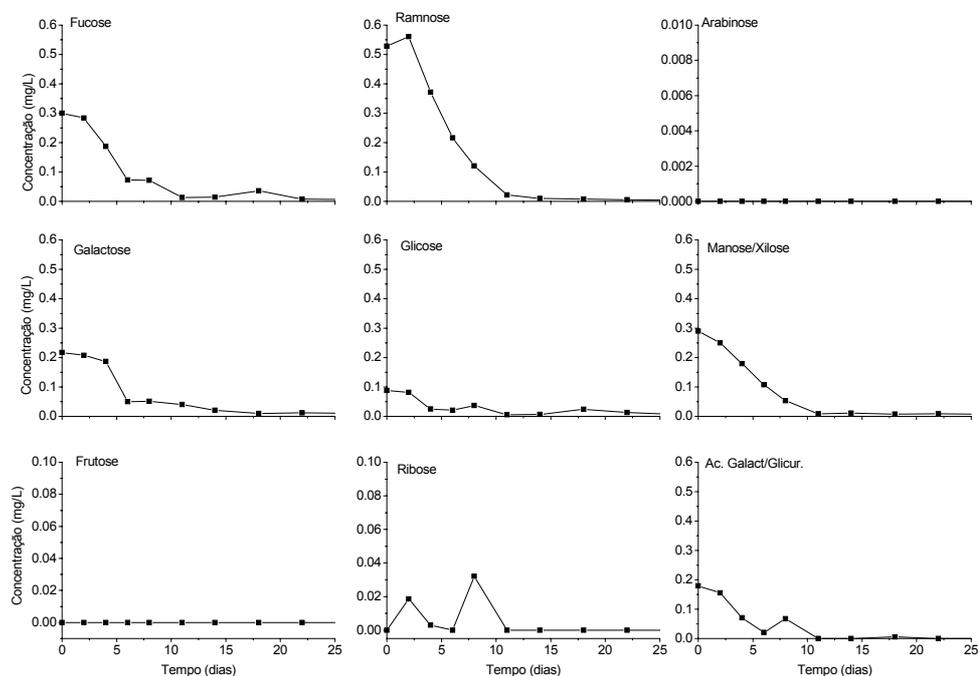


Figura 29: Composição monossacarídica (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos Produzidos por *Aulacoseira granulata* em Culturas Axênicas no Laboratório.

microbiana e parecem ter sido produzidos no decorrer do experimento. O monossacarídeo arabinose e o dissacarídeo frutose não foram detectados.

As atividades enzimáticas observadas durante a degradação, principalmente nos primeiros quinze dias, foram consideradas muito elevadas (Fig. 30). As maiores atividades foram alcançadas por β -D- fucosidase, α -D- e β -D- glicosidase. Embora não exista arabinose no polissacarídeo de *A. granulata*, atividade enzimática sobre o substrato correspondente foi verificada, o que nos leva a crer que possa ocorrer uma falta de especificidade relacionada a este MUF-substrato.

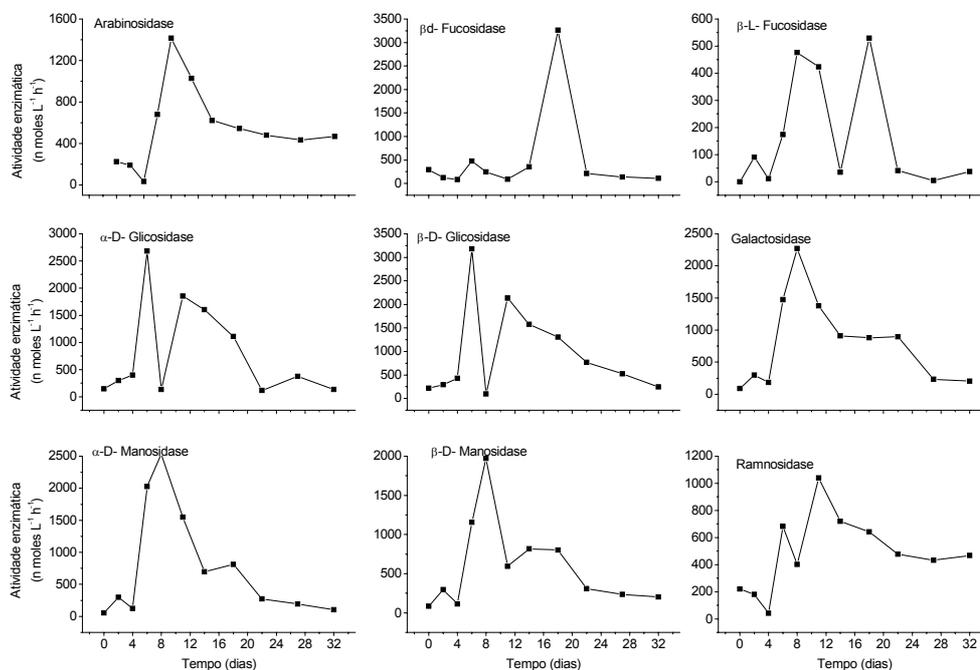


Figura 30: Atividade enzimática (n moles L⁻¹ h⁻¹) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea *Aulacoseira granulata*.

Na Fig. 31 estão apresentados os dados das concentrações de proteínas e de carboidratos. A partir de uma concentração inicial de 42,24 mg mL⁻¹ de carboidrato e de 50,3 μg mL⁻¹ de proteína observamos o consumo do carboidrato acrescentado e a formação de proteínas pelas populações microbianas.

A Fig. 32 apresenta os números de bactérias registrados durante o experimento que sugerem a presença de duas populações, a primeira (dia 0-6° dia) composta basicamente de cocos e poucas cadeias de bacilos e a segunda (8°-32° dia de experimento) composta em sua quase totalidade por cadeias de bacilos.

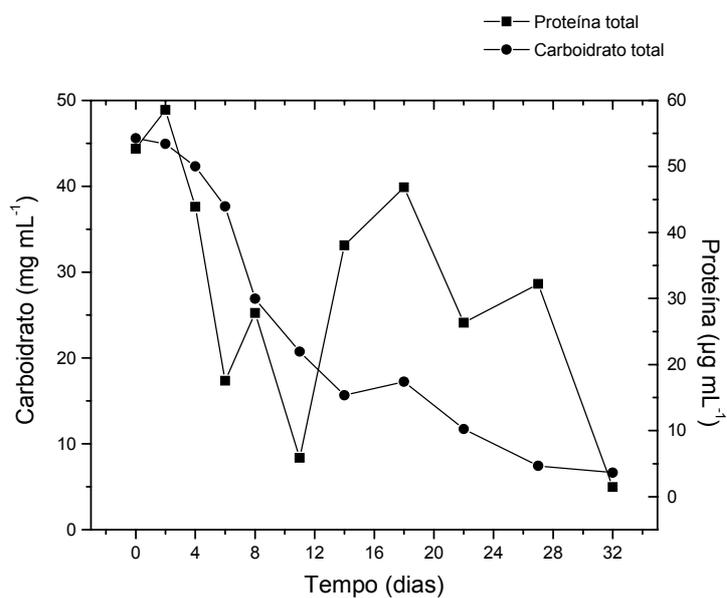


Figura 31: Concentrações de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea *Aulacoseira granulata*.

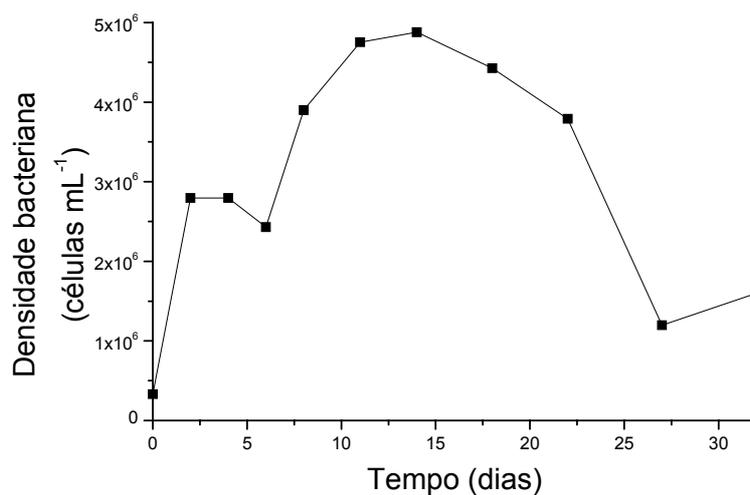


Figura 32: Densidade bacteriana (células mL^{-1}) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea *Aulacoseira granulata*.

A Fig. 33 mostra a eletroforese em gel de agarose obtida após a amplificação do 16S DNAr da comunidade pertencente ao Domínio *Bacteria* de três amostras (0, 14 e 32 dias) durante o experimento.

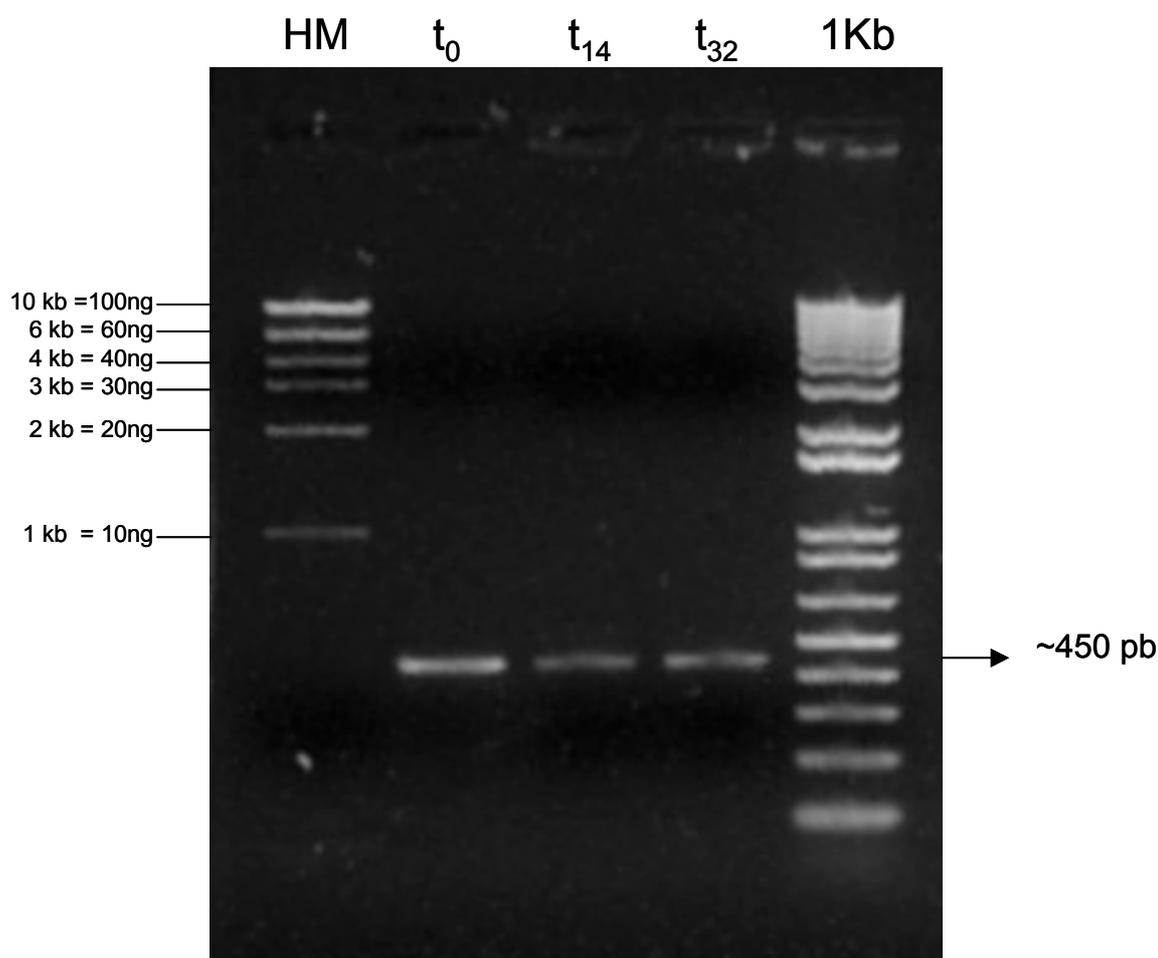


Figura 33: Imagem do gel de agarose 1% após a purificação do DNA mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana presente durante a decomposição do polissacarídeo da diatomácea *Aulacoseira granulata*. As três amostras dia 0 (t_0), dia 14 (t_{14}) e dia 32 (t_{32}) estão entre os dois “ladders”. HM (High DNA Mass Ladder) em ng e 1 kb (1 kb Plus DNA Ladder) com o tamanho aproximado dos fragmentos de DNA obtidos.

Nota-se que amplificação do material foi bem sucedida e que os fragmentos possuem aproximadamente 450 pares de bases. A amostra do dia 0 (t₀) continha 180 ng de DNA em 5 µL, a segunda e terceira amostra (dia 14 e dia 32) continham 60 ng de DNA em 5 µL.

Após o seqüenciamento os resultados das amostras dos três dias foram comparados com organismos já seqüenciados do BLAST e verificou-se que *Pseudomonas putida* está presente na degradação, assim como duas bactérias não-cultiváveis de ambientes naturais, cujas seqüências já conhecidas também estão presentes. Os resultados são apenas iniciais, no entanto os seqüenciamentos serão refeitos para que parte da população bacteriana presente possa ser definida.

3.5.2. *Microcystis aeruginosa*

Este experimento seguiu o mesmo protocolo utilizado no experimento com o polissacarídeo de *A. granulata* e foi realizado em dezembro de 2005. O polissacarídeo inicial era composto de 3 frações de tamanho muito próximos ($V_e/V_t = 0,2; 0,3$ e $0,4$) (Fig. 34) sendo compostas principalmente por glicose (28%) e ramnose (26%), mas também por galactose (18%) e manose/xilose (18%) e quantidades menores de fucose (8%), ácido galacturônico (2%) e ácido glicurônico (1%).

As frações de V_e/V_t de 0,2 a 0,4 foram consumidas rapidamente até o 6º dia de experimento e neste dia podemos observar as várias frações de menor massa molecular formadas a partir destas frações de alta massa molecular iniciais. A fração de $V_e/V_t = 0,3$ sofreu um consumo gradativo até o 32º dia de experimento.

Na Fig. 35 estão demonstrados os resultados da composição monomérica durante o experimento de degradação onde podemos observar a produção dos açúcares glicose e ácido glicurônico + ácido galacturônico pelas populações bacterianas

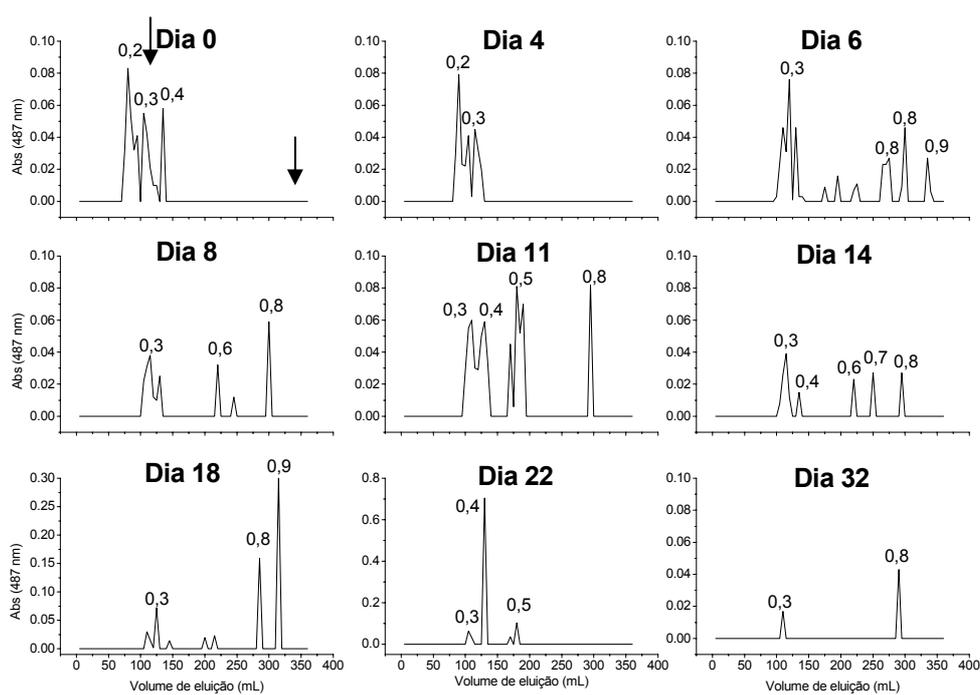


Figura 34: Frações do substrato em decomposição (polissacarídeo da cianofícea *Microcystis aeruginosa*) que foram eluídas através de cromatografia de gel em Sepharose CL-6B. Valores de V_e/V_t sobre os picos. As setas indicam a posição dos dextrans 2,000 kDa (V_e/V_t 0,3) e 10 kDa (V_e/V_t 0,9).

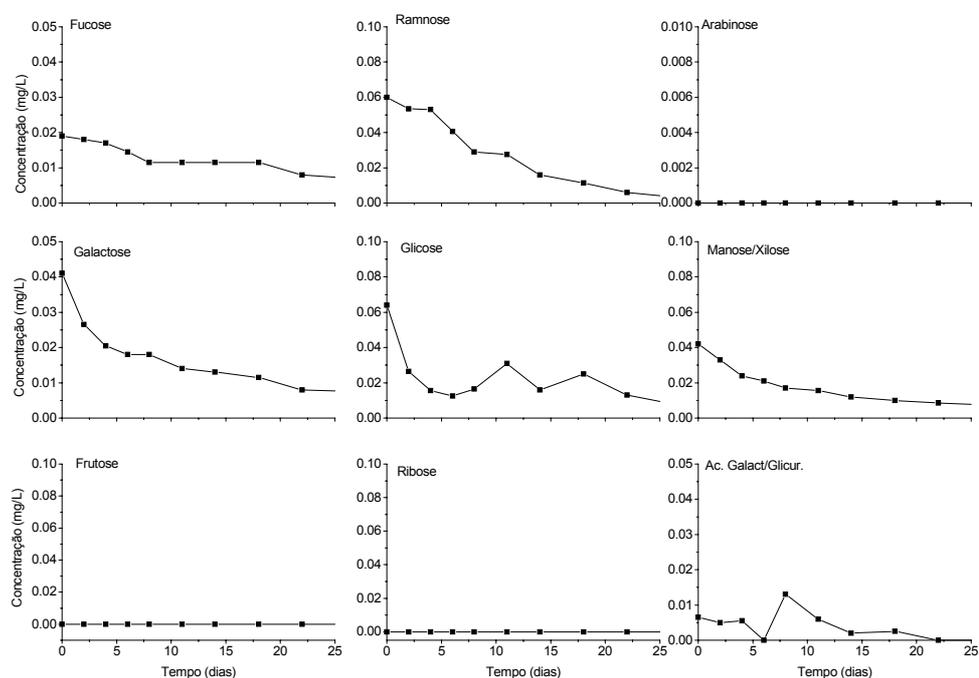


Figura 35: Composição monossacarídica (mg L^{-1}) das amostras retiradas durante o experimento de Degradação dos Polissacarídeos Produzidos por *Microcystis aeruginosa* em Culturas Axênicas no Laboratório.

e a degradação por parte destas dos açúcares fucose, ramnose, galactose, manose/xilose. Não foram detectados os monossacarídeos arabinose e ribose e o dissacarídeo frutose.

Comparadas com os resultados da degradação do polissacarídeo de *A. granulata* as atividades enzimáticas obtidas para este polissacarídeo são muito reduzidas (Fig. 36). Como seria esperado não foi registrada atividade de α -L- arabinosidase mas foram verificadas elevadas atividades das enzimas responsáveis pela quebra de compostos de glicose, ramnose, e galactose em conformidade com a composição do monossacarídeo de *M. aeruginosa*.

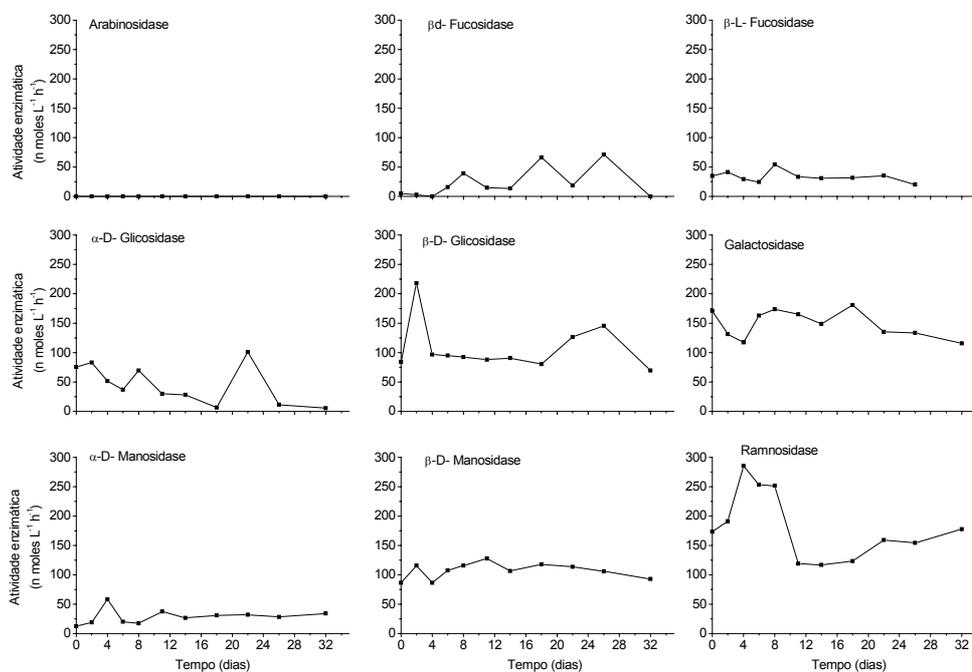


Figura 36: Atividade enzimática ($\text{n moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofíceia *Microcystis aeruginosa*.

Nas Figs. 37 e 38 estão apresentados os resultados das concentrações de proteínas e carboidratos e as contagens de bactérias durante o experimento e através da comparação destes gráficos podemos observar que a primeira população de bactérias (dia 0 até 14º dia do experimento) foi responsável pela produção de grande parte das proteínas medidas durante o experimento.

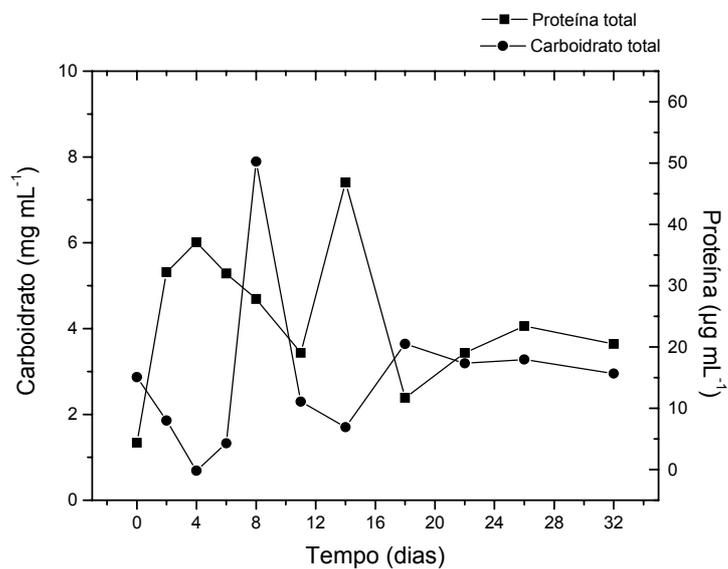


Figura 37: Concentrações de carboidratos (mg mL^{-1}) e proteínas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofíceia *Microcystis aeruginosa*.

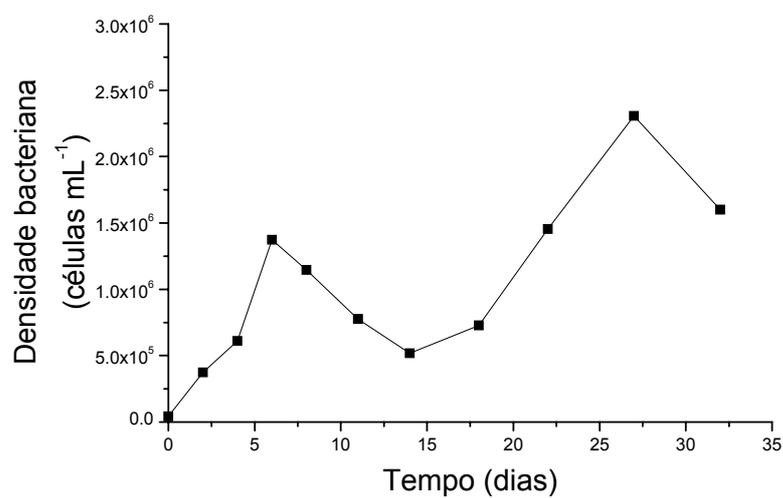


Figura 38: Densidade bacteriana (células mL^{-1}) das amostras retiradas durante a decomposição do polissacarídeo da cianofíceia *Microcystis aeruginosa*.

4. DISCUSSÃO

Os valores de atividade enzimática para glicosidases verificados em nosso estudo são razoavelmente altos comparados com os dados da literatura, onde foi utilizado o mesmo método de análise (Tabela 8). Para as enzimas α e β -glicosidase, de maneira particular, nossos valores estiveram próximos aos de Richardot *et al.* (1999) e de Mudrik & Skórczewski (2004) este último trabalho realizado em um ambiente eutrófico, um lago com influência do mar. No entanto, é interessante observar que Richardot *et al.* (1999) realizaram seu estudo em um reservatório oligotrófico. Para as demais enzimas os valores encontrados em outros trabalhos foram geralmente inferiores aos registrados em nosso trabalho, o que nos leva a cogitar que o Reservatório de Barra Bonita possa ser um local onde esteja presente grande atividade de populações microheterotróficas.

As variações verticais de atividade enzimática encontram respaldo na literatura (Münster *et al.*, 1992 a,b; Münster, 1992; Chróst, 1992; Mudrik & Skórczewski, 2004) e nos dão uma primeira idéia da relação entre este fator e a concentração de carboidratos pois as duas variáveis apresentaram comumente medidas máximas dentro da zona eufótica. Grande parte da comunidade fitoplanctônica está presente nesta zona, dessa maneira espera-se que esta seja uma região onde haja uma elevada atividade microheterotrófica para a decomposição dos materiais excretados por estas populações.

Uma análise das médias e desvios padrão da atividade enzimática em Barra Bonita mostra uma grande variação temporal, assim como observado por Sinsabaugh

Tabela 8: Atividades das enzimas α e β -glicosidase, α e β -galactosidase e α e β -manosidase determinada em vários ambientes aquáticos.

Enzima	Atividade enzimática (nmoles L ⁻¹ h ⁻¹)	Localidade	Referência
α -glicosidase	0.05-2.6	Fjord marinho eutrófico	Hoppe, 1983
	7.6 (0.1-22.6); 3.3 (0.9-9.8)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1989
	0.7-5.0	Reservatório eutrófico	Vrba et al., 1992
	6.7 (0.1-90)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
	13.5 (0.35-31.2)	Reservatório oligotrófico	Richardot et al., 1999
	0.01-2.4	Rio	Sinsabaugh et al., 1997
	92.5 (60.7-158.8)	Lago estuarino	Mudryk & Skórczewsi, 2004
	24.37 (0-105.84)	Reservatório eutrófico	neste estudo
β -glicosidase	0.06-2.4	Fjord marinho eutrófico	Hoppe, 1983
	5.07-11.75	Lago eutrófico	Chróst & Krambeck, 1986
	23.6 (4.4-61.3); 13.5 (6.4-40.6)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1989
	4.83-82.25	Lago eutrófico	Chróst, 1989
	1.37-8.47	Lago eutrófico	Chróst et al., 1989
	23.6 (4.4-68)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
	2.0-7.9	Reservatório eutrófico	Vrba et al., 1992
	32.6 (7-75.9)	Reservatório oligotrófico	Richardot et al., 1999
	0.001-1.37	Rio	Sinsabaugh et al., 1997
	163.6 (55.7-363.9)	Lago estuarino	Mudryk & Skórczewsi, 2004
	48.27 (7.43-116.90)	Reservatório eutrófico	neste estudo
α -galactosidase	11.1 (0.1-117)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
β -galactosidase	1.43-3.07	Lago eutrófico	Chróst & Krambeck, 1986
	1.15-9.28	Lago eutrófico	Chróst et al., 1989
	8.7 (0.1-65)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
	24,60 (0-81,64)	Reservatório eutrófico	neste estudo
α -manosidase	6.9 (0.1-102)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
	26,41 (0-114,61)	Reservatório eutrófico	neste estudo
β -manosidase	6.2 (0.1-81)	Lago Polihúmico	Münster et al., 1992a
	21,06 (0-69,98)	Reservatório eutrófico	neste estudo

& Foreman (2001) que, analisando a atividade enzimática do Rio Otawa (Ohio, EUA), verificou desvios padrão com a mesma magnitude das médias de atividade enzimática. Esta grande flutuação temporal concorda com o fato, bem documentado na literatura, de que a atividade das glicosidases é a mais dinâmica dentre todas as classes de enzimas mais estudadas (glicosidases, proteases e fosfatases) em ambientes naturais (Sinsabaugh et al., 1997; Foreman et al., 1998; Sinsabaugh & Foreman, 2001).

A localização da atividade enzimática nos diferentes tamanhos de partícula mostrou uma grande variação de atividade das frações entre os meses amostrados com

uma predominância de maiores atividades nas frações de maior tamanho de partícula (70-10 μm) e na fração livre (<0,2 μm) sem que houvesse um padrão de distribuição temporal da atividade entre as frações.

Devemos destacar a discussão a respeito das enzimas livres, pois muitos autores consideram que estas só apareçam durante a manipulação das amostras (Chróst, 1989; Wetzel, 1991), sendo portanto originadas do dano às células no momento da filtração. Chamamos atenção ao fato de que em nosso trabalho o processo de filtração foi realizado com extremo cuidado usando-se pressões de vácuo muito baixas (menor que 90 mm Hg), principalmente com os filtros de menor poro. Uma liberação de enzimas livres devido a um artefato de técnica não concorda com o padrão sazonal visto na atividade das diferentes frações. Segundo Vrba *et al.* (1992) o padrão sazonal assumido pelas enzimas dissolvidas (α - glicosidase, β - glicosidase e β - N-acetilglicosaminidase) com máximos de atividade na primavera e verão, exclui a possibilidade de dano seletivo.

Entretanto, as enzimas livres podem ter sua produção dependente de uma variedade muito grande de fatores diretos, como concentração de substrato, falta de nutrientes (Albertson *et al.*, 1990), e indiretos como pela alimentação do zooplâncton (Bochdansky *et al.*, 1995) e inclusive por lise pela ação de vírus (Karner & Rassoulzadegan, 1995).

Desse modo, a distribuição da atividade enzimática nas diferentes frações obedece às condições encontradas em cada estudo como as espécies bacterianas, o estágio de desenvolvimento do “bloom” fitoplanctônico, juntamente com os números totais de bactérias e outros parâmetros relacionados, que se refletem nos padrões de

atividade enzimática observados. Esses resultados concordam com os obtidos por Hoppe que, em 1983, já alertava para o fato da origem da atividade exoenzimática ser um problema muito complexo, sendo as medidas apresentadas representativas somente para a amostra específica, ou seja, que não deveriam ser generalizadas.

O padrão sazonal observado tanto através das atividades enzimáticas totais, quanto através da distribuição de atividade nas diversas enzimas e nas frações de tamanho de partícula pode, assim como as variações verticais já discutidas, ser dependente das concentrações de substrato. De acordo com Pantoja & Lee (1999), as taxas da hidrólise de peptídeos nas frações livre e ligadas a partículas podem variar tanto com o tamanho da molécula do substrato (com uma preferência de excreção de enzimas específicas na degradação de peptídeos maiores), quanto com a quantidade de substrato (mais enzimas livres seriam liberadas quando houvesse altas concentrações de substrato).

A concentração de substrato ditando os padrões de atividade enzimática também pode ser percebida através do desenvolvimento das florações do fitoplâncton em nosso estudo. Após cada floração a liberação de carboidratos combinados foi seguida de um evento de alta atividade enzimática, ou seja, a produção de enzimas extracelulares pelos microorganismos microheterotróficos esteve relacionada ao influxo de matéria orgânica polimérica como observado por outros autores (Hoppe, 1983; Chróst, 1989; 1991; Chróst *et al.*, 1989). A relação verificada entre florações de algas, aumento da concentração de carboidratos e aumento da atividade enzimática já havia sido observada por muitos autores (Chróst, 1989; Chróst, 1992; Gajewski & Chróst, 1995; Kisand & Tammert, 2000; Riemann *et al.*, 2000).

Dessa forma observando-se atentamente os dados podemos sugerir que os altos valores encontrados de manose/xilose, glicose, ramnose e galactose em agosto e outubro de 2002 originaram-se dos polissacarídeos liberados por florações de *M. aeruginosa*. Isto porque esta cianofícea, que representou a maior densidade de indivíduos nestas datas, apresenta estes três monossacarídeos como os principais componentes do polissacarídeo produzido em culturas axênicas em laboratório, como visto em Gouvêa *et al.*, 2005 e Vieira *et al.*, 2006 (Tabela 9).

As altas atividades para as enzimas α -D- e β -D- manosidase e β -D- galactosidase verificadas nestas datas são corroboradas pelos resultados das análises de regressão múltipla que mostram uma correlação positiva entre galactose e *M. aeruginosa* ($p < 0,05$) e entre β -D- galactosidase e *M. aeruginosa* ($p < 0,02$).

No mês de dezembro de 2002 os principais monossacarídeos presentes: ramnose, manose/xilose, glicose e galactose, foram provavelmente também liberados por florações de *M. aeruginosa* que ocorreram nesta data. As atividades enzimáticas registradas nesta data (α -D- e β -D-manosidase, α -D- e β -D- glicosidase) confirmam estes resultados. A elevada atividade verificada para a enzima α -L- arabinosidase não corresponde aos principais monossacarídeos nesta data, assim como não faz parte da composição monossacarídica do polissacarídeo de nenhum dos principais representantes do fitoplâncton. Podemos suspeitar que pode ter havido uma falta de especificidade por parte do MUF-substrato utilizado. Este fato já havia sido verificado durante o experimento de degradação do polissacarídeo de *A. granulata*.

Tabela 9: Composição do polissacarídeo extracelular produzido pelas principais microalgas no Reservatório de Barra Bonita (SP). Fuc= Fucose, Ram= Ramnose, Ara= Arabinose, Gal= Galactose, Gli= Glicose, Man= Manose, Xil= Xilose, Acgal= Ácido Galacturônico, Acgli= Ácido Glicurônico.

	Fuc	Ram	Ara	Gal	Gli	Man	Xil	Acgal	Acgli	Referência
<i>Aulacoseira granulata</i>	15,5	18,4	*	10,1	15,4	12,4	17,2	*	12,5	Gouvêa <i>et al.</i> , 2005
<i>Microcystis aeruginosa</i>	9,9	18,4	*	16,3	13,4	7,4	19,7	8,9	*	Gouvêa <i>et al.</i> , 2005
<i>Cryptomonas obovata</i>	41,6	15,3	*	4,4	2,1	3,6	2,7	*	4,3	Giroldo & Vieira, 2002
<i>Anabaena spiroides</i>	5,6	21,9	0,8	2	29,3	24,2	7,8	1,8	6,6	Colombo <i>et al.</i> , 2004

A explicação para as altas concentrações de carboidratos verificadas em abril de 2003, pode também estar relacionada com a composição dos produtos de excreção dos organismos dominantes do fitoplâncton: *Microcystis* sp e *A. granulata*. Estas microalgas novamente influenciaram a composição monossacarídica das amostras coletadas nestas datas: manose/xilose, ramnose e glicose, todos presentes em grandes quantidades nos polissacarídeos extracelulares destas duas microalgas (Gouvêa *et al.*, 2005). Como seria esperado altas atividades das enzimas relacionadas a estes monossacarídeos foram observadas: α -D- e β -D- glicosidase e α -L- ramnosidase.

Em setembro de 2003 grandes florações formadas por *Microcystis* sp e *Cryptomonas* sp foram observadas e mais uma vez a composição monossacarídica do polissacarídeo destas espécies pode ser revelada pelos monossacarídeos predominantes: glicose, galactose, ramnose e manose/xilose. Estes picos de carboidratos dissolvidos foram seguidos por elevadas atividades de α -D- e β -D- glicosidase e α -D- manosidase. Por análise de regressão múltipla a atividade da enzima α -L- ramnosidase esteve correlacionada com as densidades de *A. granulata* ($p < 0,05$)

provavelmente devido ao polissacarídeo desta alga que apresenta consideráveis quantidades de ramnose em sua composição. A floração de *Cryptomonas* sp verificada nesta data pode ter sido a responsável pela elevação da atividade de β -D- fucosidase em outubro de 2003, pois fucose é o principal monossacarídeo na composição do polissacarídeo desta criptofíceia. O atraso na elevação da atividade desta enzima provavelmente se deve ao estágio inicial de desenvolvimento em que se encontrava a floração de *Cryptomonas* sp.

Cada um dos diferentes estágios da floração apresenta mudanças na concentração e na composição da matéria orgânica (Smith *et al.*, 1995; Riemann *et al.*, 2000). Dessa maneira, durante o período de crescimento ativo do fitoplâncton as enzimas extracelulares não devem exercer um papel importante no metabolismo do reservatório, mantendo níveis baixos, porque a maior parte da matéria orgânica liberada por estas populações nesta situação é composta por compostos de baixo peso molecular (como monossacarídeos e aminoácidos) que estão disponíveis de forma direta para o bacterioplâncton.

Entretanto durante o período de pós-floração a produção de enzimas extracelulares é a resposta do bacterioplâncton para a fonte de carbono de diferentes tipos que se tornam disponíveis (Kisand & Tammert, 2000). Depois de uma floração típica, as células fitoplanctônicas que estão morrendo liberam compostos poliméricos como polissacarídeos e proteínas (Kisand & Tammert, 2000) elevando as concentrações de carboidratos totais (Ittekkot *et al.*, 1982; Sakugawa & Handa, 1985; Tien *et al.*, 2002; Hayakawa, 2004) e desencadeando uma elevação das atividades enzimáticas. A degradação do polissacarídeo produzido por *A. granulata* mostrou

máximos de atividade enzimática durante a primeira fase de degradação, o que já havia sido verificado durante a degradação do polissacarídeo extracelular excretado por *Anabaena spiroides* por Colombo *et al.* (2004). Estes experimentos de degradação em laboratório nos ajudam a esclarecer os eventos que podem ocorrer em campo.

A partir do momento em que os carboidratos poliméricos são lançados no meio, o período para que este material seja degradado pode variar muito. A degradação dos dois polissacarídeos algais utilizados em nossos experimentos seguiu tempos para consumo total (*A. granulata* 33 dias e *M. aeruginosa* 35 dias) observados em outros trabalhos em que também foram utilizados polissacarídeos de culturas unialgais axênicas como Giroldo *et al.* (2003) (polissacarídeo de *Thalassiosira* sp, 30 dias), Giroldo *et al.* (2005) (polissacarídeo de *Staurastrum orbiculare*, 14 dias), Freire-Nordi & Vieira (1996) (polissacarídeo de *Ankistrodesmus densus*, 30-40 dias), Colombo *et al.* (2004) (polissacarídeo de *Anabaena spiroides*, 29 dias). Dentro desta perspectiva, os polissacarídeos liberados em um determinado período de queda da população fitoplanctônica podem demorar várias semanas para serem consumidos.

Essa pode ser uma explicação para o fato de alguns picos de atividade enzimática aparecerem atrasados em relação ao pico de carboidrato total que o desencadeou. Porém como a mobilização das enzimas extracelulares bacterianas é rápida (uma questão de horas, Chróst, 1991; Middelboe & Søndergaard, 1993) . Outro fato que deve ser levado em consideração é que, devido ao complexo esquema de ligações entre os monossacarídeos de um polissacarídeo, as populações microbianas podem preferir atacar regiões específicas da molécula e com isso alguns monossacarídeos podem ser degradados em uma taxa mais lenta. Este foi o resultado

verificado por Giroldo *et al.* (2003) que, durante a degradação do polissacarídeo de *Thalassiosira* sp, observou que os monossacarídeos ramnose e fucose eram consumidos em taxas menores que os demais. Conforme a estrutura do polissacarídeo que está sendo degradado, com o consumo dos monossacarídeos mais externos, outras ligações podem ser expostas justificando um aumento da enzima específica em questão, o que pode responder aos atrasos na atividade enzimática observados.

Os resultados obtidos mostram que os polissacarídeos provenientes das populações naturais de Barra Bonita foram degradados mais rapidamente (18 e 8 dias aproximadamente) que os polissacarídeos obtidos em culturas unialgais. Talvez esta maior dificuldade na degradação dos polissacarídeos algais puros seja devida à necessidade de grupos bacterianos mais especializados com capacidades enzimáticas diferentes para sua degradação como verificado por Giroldo (2003). Ou mais provavelmente os polissacarídeos que foram obtidos no ambiente para o experimento de degradação, podem ter sido parcialmente degradados dentro do reservatório e não eram os recém excretados ou liberados pelo fitoplâncton e bacterioplâncton. Este fato prejudica uma comparação mais direta com os polissacarídeos de origem algal.

A composição do polissacarídeo de *M. aeruginosa* revelado pela composição monomérica das florações de dezembro de 2002 e abril de 2003 e no experimento de degradação deste polissacarídeo em laboratório é muito parecida à verificada por De Philippis & Vicenzini (1998) para várias cianofíceas. Uma comparação dos resultados obtidos por esses autores, revela que o monossacarídeo mais freqüentemente encontrado e também o mais abundante entre os polissacarídeos de cianofíceas (mais

de 90% dos polímeros estudados) é a glicose, seguido de galactose, manose e ramnose (80 a 85% dos polímeros) e pelos açúcares ácidos glicurônico e galacturônico (50% dos polímeros analisados).

As abundâncias relativas dos monossacarídeos encontrados no reservatório de Barra Bonita estão presentes em valores muito próximos aos verificados em outros ambientes de água doce (Sweet & Perdue, 1982; Gremm & Kaplan, 1997; Repeta *et al.*, 2002; Hayakawa, 2004). Glicose realmente é o açúcar mais encontrado nos biopolímeros presentes em ambientes naturais, onde também estão presentes, com aproximadamente a mesma abundância equimolecular, os açúcares galactose, manose, xilose, arabinose, fucose e ramnose (Sweet & Perdue, 1982; Gremm & Kaplan, 1997; Repeta *et al.*, 2002; Hayakawa, 2004). Os ácidos urônicos (ácido glicurônico e galacturônico) estão presentes em concentrações iguais a ou menores do que os açúcares neutros (Aluwihare *et al.*, 1997).

As medidas de quantidade de açúcares nos ambientes aquáticos não fornecem apenas informações sobre mudanças no pool dos carboidratos dissolvidos mas também indicações a respeito do material de origem do carboidrato em questão. Por exemplo, a arabinose é abundante em regiões com alta atividade bacteriana e os carboidratos provenientes de solos e plantas contêm altos níveis de xilose e arabinose (Hayakawa, 2004). Alta porcentagem de xilose também indica uma influência de angiospermas, bem como elevada porcentagem de arabinose e galactose indica contribuições de tecidos vasculares não lenhosos de plantas (Cowie & Hedges, 1984).

No entanto estes monossacarídeos arabinose, galactose, glicose, manose e xilose, além de fucose e ramnose, podem todos ser provenientes da degradação do

polissacarídeo liberado pelas populações fitoplanctônicas, enquanto que os monossacarídeos frutose e ribose não ocorrem em heteropolissacarídeos e são, na maioria das vezes, provenientes do material intracelular de células em decomposição tanto de material autóctone quanto alóctone.

5. CONCLUSÃO

As hipóteses assumidas para este trabalho foram aceitas, ou seja, há uma estreita relação entre liberação de polissacarídeos produzidos por populações fitoplanctônicas e a produção de enzimas extracelulares pelos microorganismos microheterotróficos no Reservatório de Barra Bonita. Confirmam esta constatação, em primeiro lugar, o acoplamento entre os máximos das concentrações de carboidratos e as atividades enzimáticas máximas dentro da zona eufótica, fato este que conecta as populações fitoplanctônicas e microheterotróficas em uma mesma região otimizando a ciclagem de substratos compostos de carboidratos. Em segundo lugar, o fato dos monossacarídeos constituintes do polissacarídeo extracelular das algas dominantes em cada data de coleta poderem ser deduzidos a partir das concentrações dos monossacarídeos registrados em campo, assim como resultaram em atividades enzimáticas específicas mais pronunciadas.

6. BIBLIOGRAFIA

- ADEMARK, P.; DE VRIES, R.P.; HAGGLUND, P.; STALBRAND, H. & VISSER, J. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur. J. Biochem.* 268: 2982-2990.
- ALBERTSON, N.H.; REPETA, D.J. & CHEN, R.F. 1990. Exoprotease activity of two marine bacteria during starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 218-223.
- ALLEN, H.L. 1976. Dissolved organic matter in lakewater: characteristics of molecular weight size-fractions and ecological implications. *Oikos* 27: 64-70.
- ALUWIHARE, L; REPETA, D.J & CHEN, R.F. 1997. A major polymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water. *Nature* 387: 166-169.
- ANTONIO, S. 2006. Produtividade primária da matéria orgânica dissolvida excretada pelo fitoplâncton do Reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil. São Carlos, UFSCar, 110 p. (Tese).
- ARNOSTI, C. & REPETA, J. 1994. Extracellular enzyme activity in anaerobic bacterial cultures: evidence of pullulanase activity among mesophilic marine bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 60: 840-846.
- BELL, R.; AHLGREN, G.M. & AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring [³H] thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1709-1721.
- BIDDANDA, B. & BENNER, R. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42: 306-318.
- BOCHDANSKY, A.B. PUSKARIC, S. & HERNDL, G.J. 1995. Influence of zooplankton grazing on free dissolved enzymes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 121: 53-63.
- BURKE, R.M. & CAIRNEY, J.W.G. 1997. Carbohydrase production by the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* under solid-state fermentation condition. *Mycological Res.* 101: 1035-1039.
- CALIJURI, M.C. 1988. Respostas fisio-ecológicas da comunidade fitoplanctônica e fatores ecológicos em ecossistemas com diferentes estágios de eutrofização. São Carlos, EESC/USP, 293 p. (Tese).
- CALIJURI, M.C. & DOS SANTOS, A.C.A. 1996. Short-term changes in the Barra Bonita reservoir (São Paulo, Brazil): emphasis on the phytoplankton communities. *Hydrobiologia* 330: 163-175.
- CALIJURI, M.C. & DOS SANTOS, A.C.A. 2001. Temporal variations in phytoplankton primary production in a tropical reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). *Hydrobiologia* 445: 11-26.

- CALIJURI, M.C.; TUNDISI, J.G. 1990. Limnologia comparada das represas do Lobo (Broa) e Barra Bonita- Estado de São Paulo: mecanismos de funcionamento e bases para o gerenciamento. *Ver. Brasil. Biol.*, 50: 893-913.
- CHAPLIN, M.F. 1982. A rapid and sensitive method for the analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* 123: 336-341.
- CHRÓST, R. J. 1989. Characterization and significance of beta-glucosidase activity in lake water. *Limnol. Oceanogr.* 34: 660-672.
- CHRÓST, R.J. 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. CHRÓST, R.J. New York: Springer-Verlag, p. 29-54.
- CHRÓST, R. J. 1992. Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. *Hydrobiologia* 243: 61-70.
- CHRÓST, R.J. & KRAMBECK, H.J. 1986. Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* 106: 79-90.
- CHRÓST, R. J. & VELIMIROV, B. 1991. Measurements of enzyme-kinetics in water samples: effect of freezing and soluble stabilizer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70: 93-100.
- CHRÓST, R. J.; MÜNSTER, U.; RAI, H.; ALBRECHT, D.; WITZEL, P.K. & OVERBECK, J. 1989. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic-matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J. Plankton Res.* 11: 223-242.
- COLE, J.J.; LIKENS, G.E. & STRAYER, D.L. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: an important carbon source for planktonic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 27: 1080-1090.
- COLOMBO, V.; VIEIRA, A. & 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.
- COWIE, G.L & HEDGES, J.I. 1984. Determinations of sugars in plankton, sediments and wood by capillary gas chromatography of equilibrated isomeric mixtures. *Anal. Chem.* 56: 497-504.
- DE PHILIPPIS, R. & VICENZINI, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS. Microbiol. Rev.* 22: 151-175.
- DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J. 2006. Comunidade fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita e sua relação com a composição e quantidade de polissacarídeos extracelulares e agregados gelatinosos. São Carlos, UFSCar, 99 p. (Tese).
- DIXON, M., & WEBB, E.C. *Enzymes*. 1979. New York. Academic Press. 1116 p.
- DUBOIS, M; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 1999. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, 412 p.

- FARKAS, E.; THIEM, J. & AJISAKA, K. 2000. Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor*. *Carbohyd. Res.* 328: 293-299.
- FATIBELLO S.H.S.A., VIEIRA A.A.H. & FATIBELLO-FILHO O. 2004. A rapid spectrophotometric method for determination of transparent exopolymer particles (TEP) in Freshwater. *Talanta* 62: 81-85.
- FERMI, C. 1906. The presence of enzymes in soil, water and dust. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 26: 330-334.
- FOGG, G.E. 1983. Ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* 26: 3-14.
- FOREMAN, C.M.; FRANCHINI, P. & SINSABAUGH, R.L. 1998. The trophic dynamics of riverine bacterioplankton: relationships among substrate availability, ectoenzyme kinetics, and growth. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1344-1352.
- FREIRE-NORDI, C. & VIEIRA, A.A.H. 1996. Utilization of extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* Kors (Chlorophyceae) by heterotrophic bacteria. *Rev. Microbiol.* 27: 27-32.
- FREIRE-NORDI, C.; VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O. 1998. Selective permeability of the extracellular envelope of microalgae *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyceae) as revealed by electron paramagnetic resonance EPR technique. *J. Phycol.* 34: 631-637.
- FREIRE-NORDI, C.S.; VIEIRA, A.A.H. & NASCIMENTO, O.R. 2005. The metal binding capacity of *Anabaena spiroides* extracellular polysaccharide: an EPR study. *Process Biochem* 40: 2215-2224.
- GAJEWSKI, A. & CHRÓST, R.J. 1995. production and enzymatic decomposition of organic matter by microplankton. *J. Plankton Res.* 17: 709-728.
- GALLEGO, M.V.; PINAGA, F.; RAMON, D. & VALLES, S. 2001. Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *J. Food Sci.* 66: 204-209.
- 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). São Carlos, UFSCar, 152 p. (Tese).
- GIROLDO, D. & VIEIRA, A.A.H. 2002. An extracellular sulfated fucose-rich polysaccharide produced by a tropical strain of *Cryptomonas obovata* (Cryptophyceae). *J. Appl. Phycol.* 14: 185-191.
- 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: 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. & PAULSEN, B.S. 2005. Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae). *Phycologia* 44: 1-7.
- GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S. & OHNSTAD, M.A.M. 1978. Methods for chemical analysis of freshwater. (IBP Handbook, n. 8, 2nd Ed.). Oxford. Blackwell Scientific Publications. 213 p.
- GORTON, L.; MARKO-VARGA, G.; DOMÍNGUEZ, E. & EMNÉUS, J. 1994. Analysis of mono-, oligo- and polysaccharides by enzyme reaction detection. In: Analytical applications of immobilized enzyme reactors. LAM S. & MALIKIN, G. New York. Blackie Academic & Professional. p. 51-130.
- GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A.A.H. & LOMBARDI, A.T. 2005. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. *Chemosphere* 60: 1332-1339.
- GREMM, T.J. & KAPLAN, L.A. 1997. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC and pulsed amperometric detection. *Limnol. Oceanogr.* 42: 385-393.
- GROSSART, H. P. & SIMON M. 1997. Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1651-9.
- GROSSART, H. P. & SIMON, M. 1993. Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): Occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance. *Limnol. Oceanogr.* 38: 532-46.
- GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch. 1985. In: The Polysaccharides-Volume 3. ASPINALL, G.O. Orlando: Academic Press, p. 1-105.
- HARVEY, H.W. 1925. Oxidation in sea water. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 13: 953-969.
- HASHIMOTO, W.; NANKAI, H.; SATO, N.; KAWAI, S. & MURATA, K. 1999. Characterization of alpha-L-rhamnosidase of *Bacillus* sp GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan. *Arch. Biochem. Biophys.* 368: 56-60.
- HAYAKAWA, K. 2004. Seasonal variations and dynamics of dissolved carbohydrates in Lake Biwa. *Org. Geochem.* 35: 169-179.
- HOPPE, H.G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 299-308.
- HOPPE, H.G.; KIM, S.J. & GOCKE, K. 1988. Microbial decomposition in aquatic environments: combined process of extracellular enzyme activity and substrate uptake. *Appl. Environ. Microb.* 54: 784-790.
- HUTCHINSON, G.E. 1967. A treatise on limnology. II. Introduction to lake biology and limnology. New York. John Wiley and Sons, Inc. 1115 p.
- IGNATIADIS, L. & FOGG, G.E. 1973. Studies of the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve in cultures. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 53: 937-956.

- ITTEKOT, V.; DEGENS, E.T. & BROCKMAN, U. 1982. Monosaccharide composition of acid-hydrolysable carbohydrates in particulate matter during a plankton bloom. *Limnol. Oceanogr.* 27: 770-776.
- JØRGENSEN, N.O.G. & JENSEN, E.R. 1994. Microbial fluxes of free monosaccharides in freshwater determined by PAD-HPLC. *Microb. Ecol.* 14: 79-93.
- KARNER, M. & RASSOULZADEGAN, F. 1995. Extracellular enzyme activity: indications for the high short-term variability in a coastal marine ecosystem. *Microb. Ecol.* 30: 143-156.
- KASNOWSKI, A. & WŁODARCZAK, K. 1991. Enzymatic characterization of vibriionaceae strains isolated from environment and cold-blooded animals. *Acta Microbiol. Pol.* 40: 71-76.
- KEITH, S.C. & ARNOSTI, C. 2001. Extracellular enzyme activity in a river-bay-shelf transect: variations in polysaccharide hydrolysis rates with substrate and size class. *Aquat. Microb. Ecol.* 24: 243-253.
- KISAND, V. & TAMMERT, H. 2000. Bacterioplankton strategies for leucine and glucose uptake after a cyanobacterial bloom in an eutrophic shallow lake. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1965-1972.
- KOROLEFF, F. 1976. Determination of nutrients. In: *Methods of Sea Water Analysis* GRASSHOFF, K. Verlag. Chemie Weinheim. p. 117-181.
- KURAKAKE, M. & KOMAKI, T. 2001. Production of beta-mannanase and beta-mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Curr. Microbiol.* 42: 377-380.
- KURIMURA, Y.; TSUJI, Y.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. & TOCHIKURA, T. 1995. Efficient production and purification of extracellular 1,2- α -L-fucosidase of *Bacillus* sp K40T. *Biosci. Biotech. Bioch.* 59: 589-594.
- LANCELOT, C. 1984. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the southern Bight of the North Sea. *Estuar. Coas. Shelf Sci.* 18: 65-77.
- LEE, D.Y. & RHEE, G.Y. 1997. Kinetics of cell death in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and the production of dissolved organic carbon. *J. Phycol.* 33: 991-998.
- LEPPARD, G. G. 1995. The characterization of algal and microbial mucilage and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environment* 165: 103-131.
- LOMBARDI, A.T. & VIEIRA, A.A.H. 1998. Cooper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp (Chrysophyceae). *Phycologia* 37: 34-39.
- LOMBARDI, A.T.; HIDALGO, T.M.R. & VIEIRA, A.A.A. 2005. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 60: 453-459.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- LUONTERI, E.; SIIKAAHO, M.; TENKANEM, M. & VIIKARI, L. 1995. Purification and characterization of 3 alpha-arabinosidases from *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.* 38: 279-291.
- MACCAMMON, S.A.; INNES, B.H., BOWMAN, J.P., FRANZMANN, P.D., DOBSON, S.J., HOLLOWAY, P.E., SKERRAT, J.H., NICHOLS, P.D. & RANKIN, L.M. 1998. *Flavobacterium hibernum* sp. nov, a lactose -utilizing bacterium from a freshwater Antarctic lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1405-1412.
- MACKERETH, F.J.H.; HERON, J. & TALLING, J.F. 1978. Water analysis: Some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association. Scientific Association. Kendall. Titus Wilson & Son Ltd. 117 p.
- MANZANARES, P., OREJAS, M., IBANEZ, E., VALLES, S. & RAMON, D. 2000. Purification and characterization of an alpha-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Let. Appl. Microbiol* 31: 198-202.
- MATHESON, N.K & MAC CLEARY, B.V. 1985. Enzymes metabolizing polysaccharides and their application to the analysis of structure and function of glycans. In: The Polysaccharides-Volume 3. ASPINALL, G.O. Orlando: Academic Press. p. 1-105.
- MEYER-REIL, L.A. 1987. Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments. *Appl. Environ. Microb.* 53: 1748-1755.
- MIDDELBOE, M. & SØNDERGAARD, M. 1993. Bacterioplankton growth yield: seasonal variations and coupling to substrate lability and b-glucosidase activity. *Appl. Environ. Microb.* 59: 3916-3921.
- MUDRIK, Z.J. & SKÓRCZEWSKI, P. 2004. Extracellular enzyme activity at the air - water interface of an estuarine lake. *Estuar. Coas. Shelf Sci.* 59: 59-67.
- MÜNSTER, U. 1991. Extracellular enzyme activity in eutrophic and polyhumic lakes. In: Microbial Enzymes in Aquatic Environments. CHRÓST, R.J. New York. Springer-Verlag, p. 97-122.
- MÜNSTER, U. 1992. Extracellular enzymes in a polyhumic lake: important regulators in detritus processing. *Hydrobiologia* 229: 225-238.
- MÜNSTER, U.; EINIÖ, P. & NURMINEN, J. 1989. Evaluation of the measurements of extracellular enzyme activities in a polyhumic lake by means of studies with 4-methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* 115: 321-337.
- MÜNSTER, U.; EINIÖ, P.; NURMINEN, J. & OVERBECK, J. 1992 a. Extracellular enzymes in a polyhumic lake: important regulators in detritus processing. *Hydrobiologia* 229: 225-238.
- MÜNSTER, U.; NURMINEN, J.; EINIÖ, P. & OVERBECK, J. 1992 b. Extracellular enzymes in a small polyhumic lake: origin, distribution and activities. *Hydrobiologia* 243: 47-59.
- MYKLESTAD, S.M. 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Total Environ.* 165: 155-164.

- MYKLESTAD, S.; HAUG, A. & LARSEN, B. 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt.II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 137-144.
- NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T. & VIEIRA, A.A.H. 2005. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity *Symocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). *Freshwater Biol.* 50: 1560-1567.
- OVERBECK, J. 1991. Early studies on ecto-and extracellular enzymes in aquatic environments. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. CHRÓST, R.J. New York: Springer-Verlag, p. 29-54.
- PANTOJA, S. & LEE, C. 1999. Peptide decomposition by extracellular hydrolysis in coastal and salt marsh sediment. *Mar. Chem.* 63: 273-291.
- PASSOW U., ALLDREDGE, A.L. & LOGAN, B.E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep Sea Res.* 41: 335-357.
- PAULSEN, B.S.; VIEIRA, A.A.H. 1994. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30: 638-641.
- PAZUR, J.H. Neutral polysaccharides. 1986. In: CHAPLIN, M.F., Kennedy, J.F. *Carbohydrate Analysis: a practical approach*. Irl. Press, Oxford-England, p.55-64.
- PHAM, P.L.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G. & CERNING, J. 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2302-2310.
- PORTER, K.G. 1973. The plant-animal interface in freshwater ecosystems. *Am. Sci.* 65: 159-170.
- PORTER, K.G. & FEIG, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- PRICE, N.M. & MOREL, M.M. 1990. Role of extracellular enzymatic reactions in natural waters. In: *Aquatic chemical kinetics*. STUMM, W. New York. John Wiley & Sons, Inc. p. 235-258
- RABIU, B.A.; JAY, A. J.; GIBSON, G.R. & RASTALL, R.A. 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by beta-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl. Environ. Microb.* 67: 2526-2530.
- REINHOLD, V.N. 1972. Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. *Methods Enzimol.* 25: 244-249.
- REPETA, D.J., QUAN, T.M., ALUWIHARE, L.I. & ACCARDI, A.M. 2002. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 955-962.
- REYNOLDS, C.S. 1986. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge. Cambridge University Press. 384 p.
- REYNOLDS, C.S. & WALSBY, A.F. 1980. Sinking and floating. In *Studies in ecology*. MORRIS, I. Oxford: Blackwell Scientific Publ. p. 371-412.

- RICHARDOT, M., DEBROAS, D., THOUVENOT, A., ROMAGOUX, J.C.; BERTHON, J.L. & DEVAUX, J. 1999. Proteolytic and glycolytic activities in size-fractionated surface water samples from an oligotrophic reservoir in relation to plankton communities. *Aquat. Sci.* 61: 279-292.
- RIEMANN, L., STEWARD, G.F. & AZAM, F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 578-587.
- SABATER, S. & ROMANÍ, A.M. 1996. Metabolic changes associated with biofilm formation in an undisturbed Mediterranean stream. *Hydrobiologia* 335: 107-113.
- SAKUGAWA, H. & HANDA, N. 1985. Isolation and chemical characterization of dissolved and particulate polysaccharides in Mikawa Bay. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49: 1185-1193.
- SHAH, V.; RAY, A.; GARG, N. & MADANWAR, D. 2000. Characterization of extracellular polysaccharide produced by a marine cyanobacterium, *Cyanothece* sp ATCC 51142, and its exploitation toward metal removal from solutions. *Curr. Microbiol.* 40: 274-278.
- SINSABAUGH, R.L. & FOREMAN, C.M. 2001. Activity profiles of bacterioplankton in a eutrophic river. *Freshwater Biol.* 46: 1239-1249.
- SINSABAUGH, R.L., FINDLAY, S., FRANCHINI, P. & FISCHER, D. 1997. Enzymatic analysis of riverine bacterioplankton production. *Limnol. Oceanogr.* 42: 29-38.
- SMITH C.D., GRIEG F.S., LONG R.A. & AZAM F. 1995. Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Res. II* 42: 75-97.
- SOMVILLE, M. 1984. Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1181-1185.
- SPIJKERMAN, E. & COESEL, P. F. M. 1998. Different response mechanisms of two planktonic desmid species (Chlorophyceae) to a single saturating addition of phosphate. *J. Phycol.* 34: 438-45.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. 1960. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 125: 1-18.
- SUTHERLAND, I. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr. Polymers* 38: 319-328.
- SWEET, M.S. & PERDUE, E.M. 1982. Concentration and speciation of dissolved sugars in river water. *Environ. Sci. Technol.* 16: 692-698.
- TIEN, C.J.; KRIVTSOV, V.; LEVADO, E.; SIGEE, D.C. & WHITE, K.N. 2002. Occurrence of cell-associated mucilage and soluble extracellular polysaccharides in Rostherne Mere and their possible significance. *Hydrobiologia* 485: 245-252.
- TRYLAND, I. & FIKSDAL, L. 1998. Enzyme characteristics of β D- galactosidase and β D- glucosidase- positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 64: 1018-1023.
- TUNDISI, J.R.; TUNDISI, T.M.; ROCHA, O.; HENRY, R. & CALIJURI, M.C. 1994. Mecanismos de funcionamento em represas (estruturas e função) em relação às bacias

- hidrográficas (bases biogeofísicas e usos). Relatório científico n° 2.USP/UFSCar/UNESP.
- VALDERRAMA, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.* 10: 1109-1122.
- VALLENTYNE, J.R. 1957. The molecular nature of organic matter in lakes and oceans, with lesser reference to sewage and terrestrial soils. *J. Fish. Res. Board Can.* 14: 33-82.
- VAN CASTEREN, W.H.M.; EIMERMANN, M.; VAN DER BROEK, L.A.M.; VINCKEN, J.P.; SCHOLS, H.A. & VORAGEN, A.G.J. 2000. Purification and characterization of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B39 and B891. *Carbohydr. Res.* 329: 75-85.
- VIEIRA, A.H., GIROLDO, D. & ORTOLANO, P.I.C. 2006. A aggregate formation in axenic and microbial co-inoculated batch cultures of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae). *Acta Limnol. Brasiliensis* 18: 1, 00-00.
- VIEIRA, A.A.H.; NASCIMENTO, O.R. & SARTORI, A.L. 1994. Release of extracellular polysaccharide by *Spondylosium panduriforme* (Desmidiaceae). *Rev. Microbiol.* 25: 6-10.
- VIEIRA, A.A.H.; ORTOLANO, P.I.C.; GIROLDO, D.; PAULSEN, B.S.; BITTAR, T.B. & LOMBARDI, A.T. 2006. Role of *Aulacoseira granulata* in the aggregates formation on an eutrophic reservoir. Em preparação.
- VRBA, J.; NEDOMA, J.; ŠIMEK, K & SEĎA, J. 1992. Microbial decomposition of polymer organic matter related to plankton development in a reservoir: activity of α -, β -glucosidase, and β -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine. *Arch. Hydrobiol.* 126: 193-211.
- WANGERSKY, P.J. 1978. Production of dissolved organic matter. In Kinne, O. Marine Ecology. New York. John Wiley and Sons, Inc. p. 115-200.
- WEISS M.S., ABELE U., WECKESSER J., WELTE W., SCHILTZ E. & SCHULZ G.E. 1991. Molecular architecture and electrostatic properties of bacterial porin. *Science* 254: 1627-1630.
- WETZEL, R.G. 1991. Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and interspecific communication. In: Microbial Enzymes in Aquatic Environments. CHRÓST, R.J. New York. Springer-Verlag, p. 6-28.
- WIEBE, W.J. & SMITH, D.F. 1977. Direct measurements of dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs. *Mar. Biol.* 42:213-223.
- WOOD, A.M. & VAN VALLEN, L.M. 1990. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine Microbial foods webs.* 4: 103

Anexo 1: Parâmetros físico-químicos registrados para o Reservatório de Barra Bonita

(SP) no período de abril 2002 a janeiro de 2004. a) pH, b) Temperatura (°C), c) Oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e d) Condutividade (µS m⁻¹).

a)

Coletas	Min.	Máx.	Média	Desv. Pad.
29/4/2002	6.34	6.52	6.41	0.08
11/5/2003	5.58	6.5	6.02	0.32
10/6/2002	5.38	6.08	5.85	0.26
25/6/2002	5.43	6.17	5.85	0.27
8/7/2002	5.2	6.13	5.82	0.34
24/7/2002	6.03	6.36	6.25	0.13
14/8/2002	5.38	6.08	5.85	0.26
14/10/2002	6.46	8.02	7.49	0.70
13/11/2002	5.09	6.33	5.93	0.45
12/12/2002	4.96	6.17	5.78	0.45
13/1/2003	5.43	6.61	6.24	0.44
27/1/2003	6.28	6.82	6.57	0.20
25/2/2003	5.4	6.7	6.05	0.12
24/3/2003	5.89	6.18	6.00	0.12
28/4/2003	7.08	8.89	7.89	0.70
19/5/2003	6.28	6.74	6.59	0.17
30/6/2003	5.6	6.4	6.07	0.29
29/7/2003	5.8	6.7	6.35	0.34
26/8/2003	6.30	6.60	6.48	0.12
22/9/2003	6.60	7.00	6.88	0.16
27/10/2003	6.10	6.80	6.65	0.28
24/11/2003	7.50	8.20	7.85	0.29
11/12/2003	6.53	8.77	7.71	0.85
27/1/2004	6.99	7.81	7.34	0.33

b)

Coletas	Min.	Máx.	Média	Desv. Pad.
29/4/2002	26.20	26.70	26.35	0.21
11/5/2002	25.20	25.20	25.20	0.00
10/6/2002	22.60	23.20	22.83	0.26
25/6/2002	22.00	22.20	22.10	0.09
8/7/2002	21.30	21.60	21.40	0.15
24/7/2002	19.70	20.10	19.90	0.19
14/8/2002	22.60	23.20	22.83	0.26
14/10/2002	22.10	27.10	25.77	1.85
13/11/2002	24.30	24.30	24.30	0.00
12/12/2002	26.20	27.80	26.52	0.64
13/1/2003	27.00	27.40	27.32	0.16
27/1/2003	27.30	27.30	27.30	0.00
25/2/2003	27.10	29.70	28.42	1.00
24/3/2003	25.90	26.00	25.97	0.05
28/4/2003	24.10	27.60	25.48	1.33
19/5/2003	22.90	23.40	23.27	0.20
30/6/2003	21.60	21.70	21.65	0.05
29/7/2003	20.40	20.50	20.47	0.05
26/8/2003	19.70	19.65	19.65	0.05
22/9/2003	22.20	21.42	21.42	0.73
27/10/2003	24.50	23.45	23.45	0.89
24/11/2003	26.00	25.12	25.12	0.71
11/12/2003	26.50	26.05	26.05	0.26
27/1/2004	25.40	25.17	25.17	0.12

c)

Coletas	Min.	Máx.	Média	Desv. Pad.
29/4/2002	4.82	6.42	5.31	0.63
11/5/2003	5.79	6.63	6.13	0.38
10/6/2002	3.8	5.2	4.48	0.61
25/6/2002	4.8	5.6	5.28	0.29
8/7/2002	8.8	6.6	7.70	0.65
24/7/2002	8.1	9.4	8.78	0.51
14/8/2002	3.8	5.1	4.47	0.61
14/10/2002	0.9	9.7	5.30	4.16
13/11/2002	6.7	8.1	7.22	0.50
12/12/2002	3.2	6.6	4.47	1.30
13/1/2003	0.3	3.7	2.88	1.31
27/1/2003	3.8	4.2	3.93	0.14
25/2/2003	3.7	8.6	5.87	2.24
24/3/2003	4.64	5.36	4.88	0.30
28/4/2003	4.06	7.3	6.93	4.60
19/5/2003	8.52	9.01	8.43	1.19
30/6/2003	5.74	7.71	6.51	0.71
29/7/2003	6.21	6.45	6.38	0.09
26/8/2003	7.20	6.19	6.19	0.55
22/9/2003	5.17	4.48	4.48	0.53
27/10/2003	5.80	5.02	5.02	0.65
24/11/2003	9.07	7.91	7.91	1.16
11/12/2003	8.02	5.81	5.81	2.03
27/1/2004	5.18	4.67	4.67	0.36

d)

Coletas	Min.	Máx.	Média	Desv. Pad.
29/4/2002	100.15	100.15	100.15	0.00
11/5/2003	100.15	100.15	100.15	0.00
10/6/2002	123.00	123.00	123.00	0.00
25/6/2002	125.00	125.00	125.00	0.00
8/7/2002	126.00	126.00	126.00	0.00
24/7/2002	128.00	129.00	128.17	0.41
14/8/2002	123.00	123.00	123.00	0.00
14/10/2002	137.00	139.00	138.67	0.82
13/11/2002	100.00	104.00	101.50	1.22
12/12/2002	100.00	101.00	100.50	0.55
13/1/2003	99.00	143.00	140.00	35.42
27/1/2003	138.00	138.00	138.00	0.00
25/2/2003	126.00	127.00	126.83	0.41
24/3/2003	148.00	149.00	148.50	0.55
28/4/2003	160.00	164.00	161.50	1.64
19/5/2003	127.40	127.80	127.72	0.16
30/6/2003	130.20	130.40	130.30	0.06
29/7/2003	133.80	134.00	133.90	0.06
26/8/2003	100.40	136.50	115.45	16.64
22/9/2003	141.80	142.80	142.50	0.38
27/10/2003	150.20	150.40	150.35	0.08
24/11/2003	152.90	153.70	153.32	0.29
11/12/2003	257.00	296.00	287.33	15.00
27/1/2004	265.00	266.00	265.67	0.52

Anexo 2: Medidas de irradiância realizadas no Reservatório de Barra Bonita (SP)

através de “quantameter” no período de novembro de 2002 a dezembro de 2003. Prof.

= profundidade medida em cm, intensidade luminosa medida em $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

	27/11/02		12/12/02		27/01/03		25/02/03		28/04/03		19/05/03	
%	Prof.	μmol										
100	0	1510	0	175	0	250	0	430	0	1620	0	1300
75	38	1133	20	131	65	187	44	323	9	1215	82	975
50	100	755	60	88	93	125	67	215	48	810	119	650
25	180	378	123	44	170	63	138	108	96	405	205	325
10	271	151	232	18	248	25	212	43	166	162	296	130
1	579	15	489	2	503	3	407	4	440	16	469	13

	30/06/03		29/07/03		26/08/03		22/09/03		27/10/03		24/11/03	
%	Prof.	μmol										
100	0	1200	0	1100	0	1500	0	1500	0	500	0	140
75	48	900	81	825	67	1125	24	1125	52	375	90	105
50	112	600	96	550	99	750	48	750	67	250	92	70
25	185	300	161	275	171	375	96	375	111	125	142	35
10	297	120	246	110	289	150	152	150	1.95	50	190	14
1	594	12	523	11	545	15	307	15	4.2	5	255	1.4

12/12/03		
%	Prof.	μmol
100	0	125
75	51	93
50	64	63
25	90	31
10	124	13
1	225	1

Anexo 3: Quantificação dos nutrientes presentes nas amostras de água do Reservatório de Barra Bonita (SP) analisadas mensalmente no período de janeiro 2003 a janeiro de 2004. Nitrito, Nitrato, Nitrogênio total, Amônia, Fósforo inorgânico, Fósforo total e Fósforo total dissolvido em $\mu\text{g L}^{-1}$ (\pm Desvio padrão). Sílica em mg L^{-1} (\pm Desvio padrão).

Nitrito			Nitrato			N ₂ total		
Data	$\mu\text{g/L}$		Data	$\mu\text{g/L}$		Data	$\mu\text{g/L}$	
27/1/2003	11.18	$\pm 0,82$	27/1/2003	1674.04	$\pm 339,67$	27/1/2003	3331.67	$\pm 50,47$
25/2/2003	15.02	$\pm 11,15$	25/2/2003	2007.16	$\pm 213,30$	25/2/2003	2588.54	$\pm 141,57$
24/3/2003	1.38	$\pm 0,13$	24/3/2003	2393.02	$\pm 96,40$	24/3/2003	2412.54	$\pm 308,59$
28/4/2003	2.24	$\pm 0,61$	28/4/2003	2436.28	$\pm 162,97$	28/4/2003	2940.51	$\pm 97,09$
19/5/2003	5.72	$\pm 3,26$	19/5/2003	2532.02	$\pm 114,15$	19/5/2003	3107.60	$\pm 94,64$
30/6/2003	3.09	$\pm 0,59$	30/6/2003	2860.83	$\pm 380,79$	30/6/2003	1806.04	$\pm 479,19$
29/7/2003	2.76	$\pm 1,09$	29/7/2003	3162.74	$\pm 303,56$	29/7/2003	2301.97	$\pm 82,73$
26/8/2003	22.89	$\pm 2,95$	26/8/2003	1528.44	$\pm 116,12$	26/8/2003	3366.56	$\pm 114,70$
22/9/2003	20.20	$\pm 2,83$	22/9/2003	1896.67	$\pm 15,91$	22/9/2003	3562.29	$\pm 29,87$
27/10/2003	30.44	$\pm 10,4$	27/10/2003	1933.00	$\pm 12,18$	27/10/2003	3351.35	$\pm 138,31$
24/11/2003	48.32	$\pm 0,31$	24/11/2003	1899.83	$\pm 10,99$	24/11/2003	3327.29	$\pm 58,39$
11/12/2003	46.59	$\pm 6,70$	11/12/2003	1883.72	$\pm 12,19$	11/12/2003	3110.73	$\pm 47,80$
27/1/2004	40.12	$\pm 0,85$	27/1/2004	1801.61	$\pm 26,82$	27/1/2004	3310.00	$\pm 149,81$

Amônia			P inorg.			P total		
Data	$\mu\text{g/L}$		Data	$\mu\text{g/L}$		Data	$\mu\text{g/L}$	
27/1/2003	4.17	$\pm 10,21$	27/1/2003	28.57	± 4	27/1/2003	128.67	$\pm 9,78$
25/2/2003	0.00		25/2/2003	20.50	$\pm 13,08$	25/2/2003	76.17	$\pm 11,48$
24/3/2003	4.48	$\pm 5,16$	24/3/2003	43.17	± 7	24/3/2003	63.67	$\pm 4,8$
28/4/2003	7.19	$\pm 9,52$	28/4/2003	30.25	$\pm 10,21$	28/4/2003	53.33	$\pm 7,15$
19/5/2003	28.75	$\pm 35,90$	19/5/2003	13.00	$9,74$	19/5/2003	31.00	$\pm 4,98$
30/6/2003	3.64	$\pm 1,55$	30/6/2003	46.83	$\pm 8,81$	30/6/2003	49.50	$\pm 8,31$
29/7/2003	2.71	± 3	29/7/2003	55.33	$\pm 8,91$	29/7/2003	42.33	$\pm 6,15$
26/8/2003	62.19	$\pm 13,34$	26/8/2003	20.79	$\pm 8,19$	26/8/2003	44.00	$\pm 18,14$
22/9/2003	0.42	$\pm 1,02$	22/9/2003	109.72	$\pm 5,88$	22/9/2003	89.17	$\pm 13,9$
27/10/2003	33.85	$\pm 44,89$	27/10/2003	170.14	$\pm 25,89$	27/10/2003	146.42	$\pm 8,54$
24/11/2003	10.10	$\pm 11,06$	24/11/2003	81.39	$\pm 22,96$	24/11/2003	176.92	$\pm 43,59$
11/12/2003	20.52	$\pm 29,77$	11/12/2003	72.75	$\pm 18,67$	11/12/2003	225.33	$\pm 169,76$
27/1/2004	104.69	$\pm 3,13$	27/1/2004	121.94	$\pm 13,36$	27/1/2004	142.42	$\pm 80,96$

P total dissolv.		
Data	$\mu\text{g/L}$	
27/1/2003	74.67	$\pm 10,98$
25/2/2003	63.50	$\pm 19,5$
24/3/2003	49.17	$\pm 11,97$
28/4/2003	25.67	$\pm 15,3$
19/5/2003	65.67	$\pm 8,94$
30/6/2003	46.83	$\pm 8,81$
29/7/2003	55.33	$\pm 8,91$
26/8/2003	20.79	$\pm 8,19$
22/9/2003	46.98	$\pm 11,68$
27/10/2003	61.21	$\pm 6,09$
24/11/2003	210.50	$\pm 43,34$
11/12/2003	85.75	$\pm 40,95$
27/1/2004	0.07	$\pm 0,07$

Sílica		
Data	mg/L	
27/1/2003	*	*
25/2/2003	4.67	$\pm 0,12$
24/3/2003	4.79	$\pm 0,18$
28/4/2003	4.60	$\pm 0,078$
19/5/2003	10.76	$\pm 0,37$
30/6/2003	3.60	$\pm 0,06$
29/7/2003	3.83	$\pm 2,03$
26/8/2003	2.81	$\pm 0,17$
22/9/2003	1.49	$\pm 1,14$
27/10/2003	1.74	$\pm 0,34$
24/11/2003	0.99	$\pm 0,29$
11/12/2003	0.47	$\pm 0,31$
27/1/2004	0.90	$\pm 0,06$

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)