

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS
CONTINENTAIS

Liberação de polissacarídeos extracelulares por *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae) em função do crescimento em diferentes fontes de nitrogênio.

Fernanda Reinhardt Piedras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande-RS

2007

À Elisa, à Estela e ao Sérgio,
pelo afeto com que me presenteiam todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Danilo Giroldo pela competência, segurança e atenção dedicados no percurso dessa pesquisa.

Aos Professores Doutores Cléber Palma Silva, João Sarkis Yunes, Maria Isabel Machado e Paulo Baisch, seus alunos e laboratoristas, pela pronta acolhida, de forma atenciosa e gentil.

Ao Professor Doutor Armando Vieira, da UFSCar, pelo apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Dr. Alexandre Matthiensen e Dr. Paulo César Oliveira Vergne de Abreu pelos questionamentos e valiosa contribuição na qualificação do projeto de pesquisa.

Aos amigos Iara, Letícia, Rita, Alberto, Cláudio e Léo pela companhia, conversas e amizade nesses dois anos de curso e trabalho conjunto no Laboratório.

Aos meus pais, Sérgio e Estela, e minha irmã e grande amiga, Elisa, por estarem ao meu lado, acreditando na realização dos meus sonhos e sempre dispostos a ajudar.

Ao Marcio e sua família pelo incentivo e carinho dedicados.

Aos colegas, professores e funcionários do programa de Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais pelas experiências de vida, conhecimentos e apoio.

A FAPERGS pelo apoio através da concessão de uma bolsa de estudos.

SUMÁRIO

A. LISTA DE FIGURAS	ii
B. LISTA DE TABELAS	iv
C. RESUMO	v
D. ABSTRACT	vi
1. Introdução	01
2. Objetivos	04
3. Metodologia	05
3.1) Organismo e condições de cultivo	05
3.2) Experimentos	06
3.3) Análises	07
3.4) Análises Estatísticas	09
3.5) Parametrização matemática da remoção do nitrogênio	10
4. Resultados	10
4.1) Primeiro Experimento	10
4.1.1) Crescimento	10
4.1.2) Excreção de Carboidratos	12
4.1.2 a) Carboidratos Extracelulares Totais	12
4.1.2 b) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados	16
4.2) Segundo Experimento	18
4.2.1) Crescimento	18
4.2.2 a) Carboidratos Extracelulares Totais	20
4.2.2 b) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados	23
5. Discussão	26
6. Conclusões	31
7. Referências Bibliográficas	32

A. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Spondylosium pygmaeum*, aumento de 1000 X em contraste de fase mostrando medidas de altura e largura das células (5,7 μm e 6,3 μm respectivamente), bem como a largura do istmo (4,72 μm). 6
- Figura 2:** Esquematização dos experimentos. 9
- Figura 3:** Densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). 11
- Figura 4:** Concentração de clorofila-a de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). 12
- Figura 5:** Concentração de carboidratos totais de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). 13
- Figura 6:** Concentração de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de *Spondylosium pygmaeum* em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). 14
- Figura 7:** Taxa de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM) com *Spondylosium pygmaeum*. 14
- Figura 8:** Concentração de nitrato (μM) em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). 15
- Figura 9:** Composição dos monossacarídeos (%) liberados no início e no final do experimento 1 (nitrato). 17

Figura 10: Densidade celular de <i>Spondylosium pygmaeum</i> em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	19
Figura 11: Concentração de clorofila-a de <i>Spondylosium pygmaeum</i> em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	20
Figura 12: Concentração carboidratos totais de <i>Spondylosium pygmaeum</i> em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	21
Figura 13: Concentração de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de <i>Spondylosium pygmaeum</i> em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	22
Figura 14: Taxa de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo do experimento com <i>Spondylosium pygmaeum</i> em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	22
Figura 15: Concentração de amônio (μM) em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM).	23
Figura 16: Composição dos monossacarídeos (%) liberados no início e no final do experimento 2 (amônio).	25

B. LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados referentes à porcentagem de cada monossacarídeo identificado em relação ao polissacarídeo total (%) nas diferentes fases do crescimento de *Spondylosium pygmaeum*, quando cultivado em meio preparado com nitrato.

(A) Fases LOG: crescimento exponencial, (B) Fases EST: estacionária. 16

Tabela 2: Dados referentes à porcentagem de cada monossacarídeo identificado em relação ao polissacarídeo total (%) nas diferentes fases do crescimento de *Spondylosium pygmaeum*, quando cultivado em meio preparado com amônio.

(A) Fases LOG: crescimento exponencial, (B) Fases EST: estacionária. 24

C. RESUMO

A produção extracelular de compostos orgânicos pelo fitoplâncton possui grande importância ecológica, principalmente pelo incremento da biodiversidade funcional gerada a partir de associações entre o fito e o bacterioplâncton. Entretanto, muito pouco se conhece a respeito dos processos fisiológicos que controlam este mecanismo. O objetivo deste trabalho é determinar o efeito da fonte de nitrogênio e da sua disponibilidade na excreção de carboidratos totais, bem como na composição dos polissacarídeos extracelulares produzidos por *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae). Esta linhagem foi isolada de um pequeno lago, localizado no extremo sul do Brasil (Rio Grande, RS), e está sendo mantida em condições axênicas na coleção de culturas de microalgas dulcícolas do Departamento de Ciências Morfobiológicas da FURG. Foram realizados experimentos testando duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM) e amônio (20 e 150 μM). O crescimento foi monitorado tanto pela densidade celular (contagem ao microscópio), como pelo teor de clorofila-*a* (espectrofotometria). A concentração das fontes de nitrogênio no meio foi determinada por cromatografia iônica (nitrato) e espectrofotometria (amônio), enquanto a produção de carboidratos extracelulares totais foi monitorada por espectrofotometria (método fenol-sulfúrico). A caracterização dos polissacarídeos extracelulares foi realizada por HPLC com detecção por pulsos amperométricos. Os resultados mostraram que *S. pygmaeum* atinge maior biomassa quando cultivada com nitrato, embora a taxa de crescimento tenha sido maior quando cultivada com amônio. A taxa de excreção aproxima-se de zero durante os experimentos, com ambos nutrientes. Desta forma, pode-se dizer que esta espécie cresce na mesma proporção que produz carboidratos extracelulares. Este resultado demonstra que o estado fisiológico não altera a taxa de excreção de carboidratos por célula. A composição dos polissacarídeos extracelulares produzidos por *S. pygmaeum* varia durante o crescimento e com a fonte de nitrogênio, bem como quando os nutrientes estão limitantes. Utilizando-se o nitrato como fonte de nitrogênio, encontrou-se a Galactose, a Glicose e Manose e/ou Xilose como os principais açúcares; enquanto que com amônio, encontrou-se a Glicose, Manose e/ou Xilose e a Fucose. Esta constituição predominante dos polissacarídeos produzidos pela linhagem assemelha-se aos de outras desmídias planctônicas.

Palavras-chave: fitoplâncton, Desmidiaceae, polissacarídeos extracelulares, nitrato, amônio.

D. ABSTRACT

The extracellular production of organic compounds by the phytoplankton has a remarkable ecological importance. Such products increment the functional biodiversity enhancing the associations between phytoplankton and bacterioplankton. However, the physiological mechanisms involved in this process are not properly understood. The aim of this research is to determine the effect of the nitrogen source and availability in the growth and release of total carbohydrates produced by *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae). The composition of extracellular polysaccharides was also evaluated. This strain was isolated from a small subtropical shallow lake, located in the extreme south of Brazil (Rio Grande RS). It has been maintained in axenic conditions in the culture collection of the Morpho-biological Department of Federal University of Rio Grande. The experiments were carried out comparing two availabilities of nitrate and ammonium (50 and 500 μM). The growth was monitored by cell countings on microscope and chlorophyll content. The extracellular content of nitrogen sources was determined both by ion chromatography (nitrate) and by colorimetric assay (ammonium), while the production of total extracellular carbohydrate was monitored by the phenol-sulfuric method. The characterization of the extracellular polysaccharides was determined by pulse amperometric detection in a high-performance liquid chromatography (HPLC-PAD). The results showed that *S. pygmaeum* have produced more biomass when cultivated with nitrate, although the growth rates were higher with ammonium. The rate of excretion per cell reach approximately zero during both experiments. Such result indicates that this strain grows in the same proportion that releases carbohydrates, and there is no influence of the physiological state on the rate of carbohydrates released per cell. The extracellular polysaccharides composition produced by *S. pygmaeum* varies throughout the growth phases and with the nitrogen sources, besides nutrient-limiting conditions. The predominant constitution of the polysaccharides produced by this strain is similar to other desmids.

Key words: phytoplankton, Desmidiaceae, extracellular polysaccharides, nitrate, ammonium.

1. INTRODUÇÃO

Os lagos e outras massas de água epicontinentais abrigam uma ampla variedade de formas de vida. Nestes locais, os organismos autotróficos convertem a energia da radiação solar em energia química durante a fotossíntese, utilizando-a na respiração celular e no acúmulo de biomassa, além de uma parcela liberada na forma de matéria orgânica dissolvida (MOD). O fitoplâncton é de extrema importância nestes ecossistemas, uma vez que esta comunidade constitui uma unidade básica de produção de matéria orgânica, tanto dissolvida como particulada, para toda a cadeia trófica (Reynolds, 2006). As substâncias orgânicas liberadas pelo fitoplâncton são constituídas principalmente por carboidratos, especialmente polissacarídeos, além de proteínas, lipídeos e pequenas moléculas de diferentes tipos (Myklesstad, 1995). Estas substâncias servem como fonte de energia e nutrientes para as comunidades heterotróficas, inclusive bactérias associadas (Freire-Nordi e Vieira, 1996).

A descoberta, por Pomeroy (1974) e Azam *et al.* (1983), da importância dos microorganismos no fluxo de energia e matéria orgânica dissolvida (MOD), devido a sua alta taxa metabólica por massa e também pela sua enorme abundância, gerou novas linhas de estudo no que diz respeito à interação das comunidades. Desta forma, os ciclos de MOD, gerados principalmente pela liberação pelos organismos fitoplanctônicos, possuem implicações diretas no crescimento bacteriano. Muitas espécies de desmídias têm como característica produzir grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares, formando uma camada chamada de “cápsula mucilaginosa” (Domozych, 2005). Este grande grupo de algas verdes é frequentemente relacionado à excreção de grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares tanto de natureza mais hidrofóbica, como os formadores de cápsulas, quanto dos mais hidrofílicos, que vão continuamente se dissolvendo e se transformam em componentes do “pool” de MOD em ambientes pelágicos continentais.

A parede celular das desmídias é normalmente coberta de poros através dos quais a mucilagem é secretada (Brook, 1981). A formação da mucilagem é resultado de processos fisiológicos relacionados ao metabolismo do carbono (Vieira e Myklesstad, 1986) e está associada à produção de vesículas do complexo de Golgi (Domozych e Domozych, 1993). A mucilagem associada às células de algas possui importantes funções na sua biologia, incluindo: (1) regulação da flutuação, pela

redução da sedimentação devido à baixa densidade do material orgânico extracelular; (2) prevenção da predação pelo zooplâncton através do aumento do tamanho e proteção mecânica contra enzimas e processos digestivos; (3) retirada rápida de metais traço, já que a forma solúvel da mucilagem pode se complexar com íons orgânicos e reduzir a toxicidade destes para as algas (Hutchinson, 1967; Porter, 1973; Brook, 1981; Reynolds, 1984; Decho, 1990; Domozych *et al.*, 2007). Além disso, a manutenção de cápsulas de mucilagem na superfície das células das microalgas poderia ser útil em ambientes oligotróficos, onde a baixa concentração de nutrientes pode limitar o crescimento. Nestes locais o efeito da captura de nutrientes pela mucilagem (Brook, 1981) ajudaria no desenvolvimento e na manutenção das populações de algas.

As formas solúveis de polissacarídeos extracelulares (EPS) compõem a maior parte do carbono dissolvido dos lagos (Tien *et al.*, 2002). Por isso, o estudo dos EPS solúveis é importante para o entendimento do ciclo do carbono na água doce. Entretanto, a composição da matéria orgânica dissolvida (MOD) excretada pelas algas, além de ser complexa, varia de espécie para espécie, dificultando o estudo dos mecanismos nutricionais que selecionariam determinadas populações bacterianas a se associarem com determinada espécie algal. Estudos sobre carboidratos dissolvidos demonstram que algumas situações podem favorecer sua excreção pelas microalgas, embora a resposta a uma situação particular deva ser espécie-específica. De acordo com Mykkestad (1995), a composição do meio em que se encontram os organismos fitoplanctônicos influencia na taxa de excreção de polissacarídeos. Assim, uma deficiência de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, além de outros fatores ambientais, aumentaria a taxa de produção de polissacarídeos extracelulares em muitas espécies, especialmente quando o crescimento é limitado e as condições de luz são ótimas, promovendo assim um excesso de fotoassimilação do carbono (Fogg, 1983). Nestas condições, a liberação de carboidratos estaria atuando como um mecanismo de proteção do aparato fotossintético (Smith e Underwood, 2000), além de que o crescimento de uma comunidade bacteriana associada geraria um retorno de nutrientes essenciais para a comunidade fitoplanctônica (Giroldo *et al.*, 2005). Acredita-se que a atividade bacteriana na MOD liberada pelo fitoplâncton acelere a mineralização de nutrientes essenciais, assim como o crescimento fitoplanctônico e, como consequência, possibilita uma coevolução de complexas comunidades planctônicas. Segundo

Wood e Van Valen (1990) a excreção poderia ser uma função adaptativa destes organismos.

Diversos autores analisaram a influência dos nutrientes na liberação de compostos orgânicos nas algas. Gouvêa *et al.* (2002) não encontraram correlação significativa entre o desenvolvimento da cápsula mucilaginosa de *Staurodesmus convergens* e a concentração de nitrato e fosfato no meio. Urbani *et al.* (2005) comparando a liberação de polissacarídeos em espécies de diatomáceas, em diferentes concentrações de nutrientes, encontraram que a limitação por fósforo possui grande relevância no aumento dos polissacarídeos liberados. E ainda, destacam as diferenças entre espécies nas características químicas dos compostos orgânicos liberados. Lombardi *et al.* (1998), ao analisar a influência da exaustão de nitrogênio na produção de carboidrato em *Micrasterias furcata*, concluíram que a concentração de nitrato é um fator que interfere somente no tamanho das fases de crescimento das algas. Desta forma, a excreção de matéria orgânica dissolvida tanto em culturas algais, quanto em populações naturais, acompanha a sua taxa fotossintética.

Embora a quantidade e a qualidade dos carboidratos liberados seja um processo espécie-específico, variações na taxa de liberação e na composição molecular durante as fases de crescimento foram observadas em muitas espécies (Vieira e Myklesad, 1986; Lombardi *et al.*, 1998; Giroldo e Vieira, 2005). O aumento da produção de polissacarídeos na fase estacionária tem sido atribuído à ausência da divisão celular nessa fase, sendo que a fotossíntese estaria ainda ativa, o que geraria maior liberação de compostos orgânicos, de acordo com a hipótese do excesso fotoassimilado (Fogg, 1983). Os polissacarídeos extracelulares compõem a maior fração do carbono orgânico liberado pelo fitoplâncton de água doce (Paulsen e Vieira, 1994) e, embora a excreção de produtos fotossintéticos seja considerada a maior fonte de carboidratos dissolvidos em águas de superfície (Biersmith e Benner, 1998), existe relativamente poucos estudos sobre a composição molecular dos carboidratos da matéria orgânica dissolvida excretada pelo fitoplâncton.

Paulsen e Vieira (1994) estudaram a composição dos polissacarídeos extracelulares de desmídias (*Hyalotheca dissiliens* e *Spondylosium panduriforme*), e encontraram, através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa, que o ácido glucurônico e a galactose são os açúcares presentes em maiores quantidades para ambas as espécies, mas em proporções diferentes. Fucose também foi um

monossacarídeo bem representado no EPS destas espécies, além de outros presentes em menores quantidades. Girollo *et al.* (2005) analisaram a relação entre *Staurastrum orbiculare* e a comunidade microbiana, e encontraram que os componentes dos EPS não são degradados na mesma taxa, ou seja, alguns açúcares são utilizados primeiramente pelas bactérias (como a fucose e a glicose), enquanto outros (ramnose e arabinose) possuem uma degradação mais lenta. Além disso, este estudo caracterizou o EPS de *S. orbiculare* encontrando os mesmos três monossacarídeos principais, porém com ligações glicosídicas diferentes das observadas nos estudos anteriores. Por outro lado, Lombardi *et al.* (1998) e Domozych (2005), caracterizaram o EPS de, respectivamente, *Micrasterias furcata* e *Penium margaritaceum*, que possuem compostos diferentes, principalmente ramnose e manose. Isso indica que pode haver, além de uma seleção funcional da composição do EPS, também uma determinação filogenética da composição principal dos polissacarídeos extracelulares.

Considerando os aspectos teóricos apresentados até o momento, é possível formular pelo menos quatro hipóteses de trabalho: (1) o cultivo de *Spondylosium pygmaeum* em condições de baixa disponibilidade de nutrientes aumenta a taxa de excreção de carboidratos por célula; (2) o padrão de crescimento e excreção de carboidratos em culturas de *Spondylosium pygmaeum* será alterado em função da fonte e da quantidade de nutrientes disponível; (3) a composição do polissacarídeo extracelular produzido por *Spondylosium pygmaeum* varia nas diferentes fases de crescimento em cultura e (4) o EPS produzido por *Spondylosium pygmaeum* será composto principalmente por fucose, galactose e ácido gluco ou galacturônico, não necessariamente nessa ordem.

Com o objetivo de testar as hipóteses acima formuladas, essa dissertação de mestrado visa, por meio de experimentos com culturas tipo “batch”, demonstrar a influência da disponibilidade e da qualidade de nitrogênio na fisiologia de *Spondylosium pygmaeum*. Pretende-se assim contribuir com o entendimento do comportamento ecofisiológico desta linhagem e, por conseqüência, deste importante grupo de algas verdes. Este entendimento é importante para conhecer as habilidades das espécies fitoplanctônicas e fornecer subsídios para a construção de perfis funcionais destas espécies, a fim de se construir uma classificação morfo-funcional adequada das microalgas (Reynolds *et al.*, 2002), tão importante para os avanços do estudo ecológico do fitoplâncton dulcícola.

2. OBJETIVOS

Geral:

Determinar o efeito da disponibilidade de duas fontes de nitrogênio em diferentes aspectos da fisiologia de *Spondylosium pygmaeum*.

Específicos:

Encontrar respostas fisiológicas da espécie quando cultivada em alta e baixa disponibilidade de amônio e nitrato, sendo elas:

- Taxa de crescimento
- Taxa de remoção das fontes de nitrogênio
- Taxa de liberação de carboidratos
- Composição dos polissacarídeos extracelulares dissolvidos

3. METODOLOGIA:

3.1) Organismo e condições de cultivo:

A espécie *Spondylosium pygmaeum* (Cooke) W. West (Desmidiaceae) é uma das menores desmídias filamentosas (Figura 1). Possui como característica células pequenas com largura e altura semelhantes (5 a 8 e 4 a 8 μm), sub-elípticas em vista apical, que se tocam por uma pequena superfície formando longos filamentos, envoltos por uma bainha mucilaginosa (Croasdale *et al.*, 1983).

Esta linhagem foi isolada de um pequeno lago subtropical raso (profundidade máxima 1,80 m), localizado no campus Carreiros da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Rio Grande, RS). A técnica utilizada foi a micromanipulação e sucessivas lavagens no microscópio óptico. As culturas foram mantidas em meio WC (Guillard e Lorenzen, 1972) em pH 7.0 sob condições axênicas e sob fotoperíodo 12:12h claro: escuro, com irradiância de 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura média de 25°C \pm 1°C. As culturas axênicas de *Spondylosium pygmaeum* foram obtidas por meio de sucessivas lavagens ao microscópio, usando meio WC enriquecido com peptona e glicose (250 mg/L cada) para acusar a presença de bactérias contaminantes, pela mudança de cor, uma vez que o meio turva-se pelo crescimento bacteriano.



Figura 1: *Spondylosium pygmaeum*, aumento de 1000 X em contraste de fase mostrando medidas de altura e largura das células (5,7 µm e 6,3 µm respectivamente), bem como a largura do istmo (4,72 µm).

3.2) Experimentos:

Foram realizados dois experimentos com culturas tipo “batch” de *Spondylosium pygmaeum*, as quais foram elaboradas com formulações distintas. Ambos os experimentos tiveram como objetivo comparar os parâmetros fisiológicos descritos mais adiante entre duas condições nutricionais distintas, alta disponibilidade e baixa disponibilidade para o crescimento em cultura, utilizando ainda duas fontes distintas de nitrogênio, nitrato e amônio. Foram preparadas culturas em frascos Erlenmeyers de 1,0 L (triplicatas) com 600 mL de meio WC em cada disponibilidade de nitrato (experimento 1) e amônio (experimento 2). Antes de serem inoculadas, as culturas passaram por um processo de aclimação a cada fonte de nitrogênio (trinta dias) e posterior esgotamento (“starvation”) dos estoques intracelulares de nitrogênio (7 dias) em que as mesmas foram expostas a um meio sem nitrogênio, a fim de esgotar o estoque intracelular de nitrogênio (Figura 2).

Testes preliminares indicaram que esse período é suficiente para esgotar as reservas nutricionais das algas, uma vez que não se observou crescimento durante os sete dias. Testes periódicos para a confirmação da ausência de bactérias nas culturas axênicas foram efetuados em meio WC com peptona e glicose (250 mg/L cada). Amostras (30 mL) foram retiradas periodicamente (a cada 72 horas) para a realização das análises subseqüentes.

3.3) Análises:

A cada amostragem uma alíquota de 4 mL foi fixada com Lugol para contagem ao microscópio com a Câmara de Neubauer. A taxa de crescimento e o tempo de duplicação foram estimados a partir das contagens, seguindo o método descrito em Lourenço (2006). O restante (26 mL) foi centrifugado por 5 minutos na velocidade de 2000 RPM. O precipitado foi utilizado para a determinação da concentração de clorofila-a por espectrofotometria, após a extração com metanol. A concentração de clorofila-a foi determinada pela equação descrita por Mackinney, 1951. Depois de adicionar 10 mL de metanol, as amostras foram mantidas no freezer e no escuro por pelo menos 12 horas. Passado este tempo, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro em 665 nm. O sobrenadante, restante da primeira centrifugação após a amostragem, foi utilizado para as seguintes análises: carboidrato total, nitrato/amônio extracelular e carboidrato qualitativo por HPLC-PAD. A concentração de carboidratos totais dissolvidos (Dubois *et al.*,1956) e de amônio dissolvido (Strickland e Parsons, 1972) foi determinada por métodos colorimétricos. O restante do filtrado foi congelado e utilizado nas análises cromatográficas de nitrato e carboidratos, utilizando cromatografia líquida de alto desempenho, acoplada à detecção eletroquímica por condutividade (HPIC) e por amperometria pulsada (HPLC-PAD), segundo Gremm e Kaplan (1997), respectivamente. A descrição dos métodos está apresentada a seguir.

3.3.1) Determinação da concentração extracelular de nitrato por cromatografia iônica (HPIC):

As análises de cromatografia iônica foram realizadas no Laboratório de Oceanografia Geológica da FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Isabel Machado. Para estas análises de cromatografia iônica as amostras foram submetidas à filtração a vácuo com filtro de éster de celulose (0,45 µm). As análises foram feitas pelo método da detecção por condutividade, utilizando um cromatógrafo Metrohn®. Para determinação dos ânions foi utilizada uma coluna simples Metrosep A Supp 5-100 (tamanho 4,0x100 mm) de álcool polivinil com supressão química. Como fase móvel foi utilizada uma solução de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, com fluxo médio de 0,6 mL por minuto, na temperatura de 20°C e pressão de 6,1 MPa. Foram injetados 10 µL de amostra por vez.

3.3.2) Caracterização dos carboidratos extracelulares por HPLC-PAD:

As análises em HPLC-PAD foram realizadas no Departamento de Botânica da UFSCar, sob a orientação do Prof. Dr. Armando Vieira.

As amostras retiradas nas fases estacionária e exponencial de crescimento foram analisadas em duas frações: carboidratos livres (CL), que incluem os monossacarídeos e dissacarídeos livres dissolvidos, e carboidratos poliméricos (CP), que incluem os oligo e polissacarídeos dissolvidos. Os carboidratos poliméricos foram hidrolizados com 35 µl de HCl 8M para cada 1 mL de amostra, a 100 °C por 12 horas (Gremm e Kaplan 1997), antes de serem injetadas no cromatógrafo, enquanto as amostras para análise de CLs foram injetadas diretamente. Foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de carboidratos por pulsos amperométricos (HPLC-PAD) Dionex®, modelo DX-500, equipado com uma bomba GP-40 e um detector ED-40. A metodologia de identificação e quantificação por HPLC-PAD foi descrita por Wicks *et al.* (1991) e Mopper *et al.* (1992) com modificações de Jørgensen e Jensen (1994) e de Gremm e Kaplan (1997). O eluente para a separação dos monossacarídeos foi NaOH 18 mM e para a recuperação da coluna foi NaOH 200 mM em um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a PA-10, cujas características são específicas para uma melhor separação de monossacarídeos, embora a detecção de dissacarídeos sem hidrólise seja também possível. As amostras foram analisadas em triplicata (25 µL por injeção) e

quantificadas por meio de curvas de calibrações com 8 concentrações próximas ao "range" observado nas mesmas.

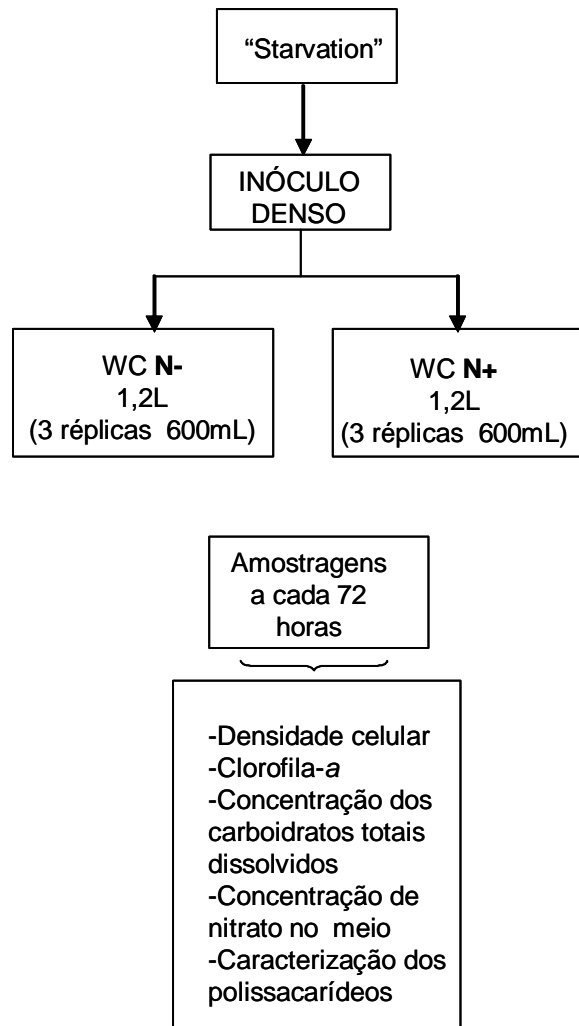


Figura 2: Esquematização dos experimentos

3.4) Análises Estatísticas:

Diferenças estatísticas significativas entre os resultados dos tratamentos ao longo do tempo, dos dois experimentos, foram determinadas utilizando a análise da variância (ANOVA). A comparação estatística entre os dois tratamentos nos dois experimentos foi realizada por meio do teste “t” de student.

3.5) Parametrização matemática da remoção do nitrogênio:

Foi adotado um modelo matemático para descrever a cinética de decaimento do nitrogênio, tanto na forma de nitrato como amônio.

O modelo prevê que as taxas de reação são proporcionais às quantidades de reagentes e define uma constante de reação (k) cuja unidade é tempo⁻¹. A equação correspondente é apresentada a seguir:

$$A_t = A_0 e^{-kt} \dots\dots\dots \text{Equação 1}$$

onde: A_t = concentração do reagente (quantidade de reagente remanescente); A_0 = concentração inicial do reagente; k = constante de reação; e = base do logaritmo natural; t = tempo.

Com a parametrização dessa equação, foi possível determinar os coeficientes de remoção de nitrogênio como parâmetro de comparação entre os diferentes tratamentos de fonte e disponibilidade de nitrogênio. As variações temporais das concentrações de nitrogênio extracelular foram utilizadas para as determinações dos coeficientes, durante a parametrização do modelo (Equação 1); para tanto se utilizou um método de regressão não linear (algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt), de acordo com Press *et al.* (1993). Como o objetivo deste estudo não foi detalhar o processo de remoção do nitrogênio, escolheu-se um modelo relativamente simples, cuja única função foi comparar os padrões de utilização em cada tratamento.

4. RESULTADOS

4.1) Primeiro Experimento

4.1.1) Crescimento

A Figura 3 mostra o crescimento monitorado pela densidade celular obtida para a espécie em duas condições de nutrientes: 10 μM (N-) e 100 μM (N+) de nitrato. Tanto nas amostras com alta, como com baixa disponibilidade de nitrogênio, observou-se uma fase *log* com aproximadamente 17 dias (Figuras 3A e 3B). Já na fase estacionária de crescimento encontrou-se maior diferença entre os tratamentos, como mostram os gráficos. Enquanto na Figura 3A observa-se um decréscimo na densidade celular após o dia 25, na Figura 3B entre os dias 25 e 30 as células da cultura permaneceram na fase estacionária. Somente ao final do experimento encontrou-se uma diferença significativa entre os dois tratamentos (no dia 31, ANOVA $p= 0,0206$). Ao final, no dia 36, N- possuía uma densidade celular de aproximadamente a metade da encontrada no tratamento N+. A análise estatística confirmou que houve crescimento significativo nos dois tratamentos (ANOVA $p < 0,0001$ para N+ e $p= 0,0109$ para N-).

De acordo com o cálculo da taxa intrínseca de crescimento (r), verifica-se que há pouca diferença entre os tratamentos: $r=0,14$ em N - e $r=0,13$ em N+. Desta forma, o crescimento da alga varia pouco entre os dois meios, sendo que a duplicação de sua biomassa é um pouco mais rápida (G) na baixa oferta de nutrientes ($G=4,9$ dias para N - e $G=5,3$ dias para N+).

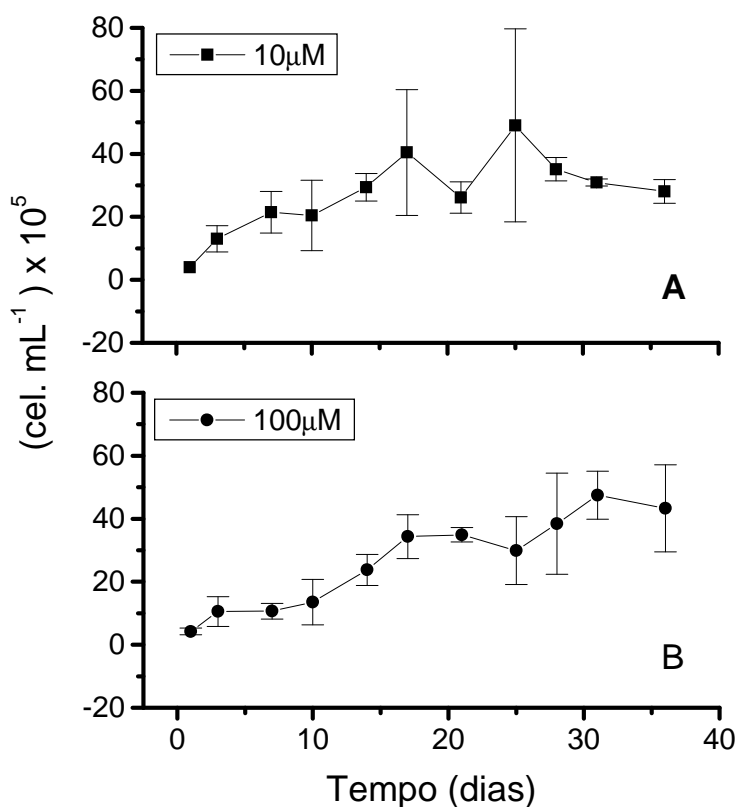


Figura 3: Densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

Nos gráficos de concentração de clorofila-a encontrou-se nitidamente uma resposta ao tratamento de baixa disponibilidade de nitrato, com uma diminuição da clorofila-a em N- (Figura 4A). Nas amostras com alta concentração de nutriente (Figura 4B) a concentração de clorofila-a aumentou até quase o trigésimo dia. As análises estatísticas comprovaram que houve diferença significativa entre os dois tratamentos (ANOVA $p= 0,001$). Nas amostras com baixa disponibilidade de nutriente (Figura 4A) observou-se um pico de clorofila aproximadamente no sétimo dia e depois um lento e contínuo decréscimo deste parâmetro; ou seja, há um aumento significativo da concentração de clorofila até o dia 7 (ANOVA $p < 0,0001$).

A diferença entre os resultados de densidade celular e concentração de clorofila-a demonstra que mesmo com nutrientes limitantes as células continuam a se dividir, apesar de perderem clorofila.

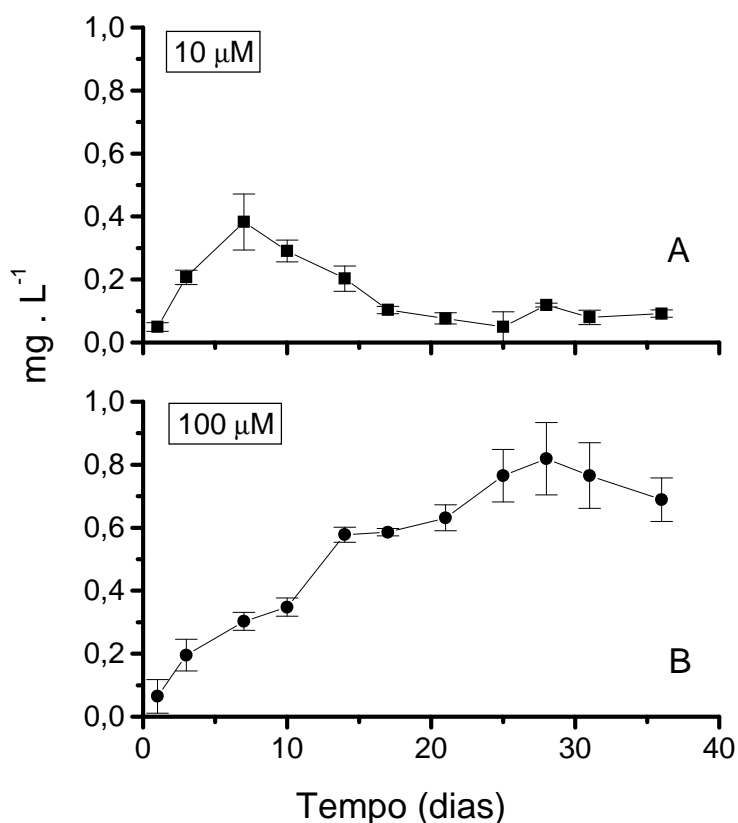


Figura 4: Concentração de clorofila-a de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 µM). As barras correspondem ao desvio padrão.

4.1.2) Excreção de Carboidratos

4.1.2 a) Carboidratos Extracelulares Totais

A liberação de carboidratos ocorreu de forma significativamente diferente entre os dois tratamentos apenas entre os dias 10 e 28 (ANOVA $p < 0,05$). Nas amostras com alta disponibilidade de nutriente (Figura 5B) a liberação de carboidratos foi significativamente maior nos dias 10, 17, 21 e 28. Mesmo com a concentração de carboidratos sendo maior para as amostras com alta disponibilidade de nutriente (Figura 5B), os dois tratamentos demonstram uma tendência semelhante, ou seja, ocorre um acúmulo de carboidratos extracelulares durante todo o tempo de cultivo.

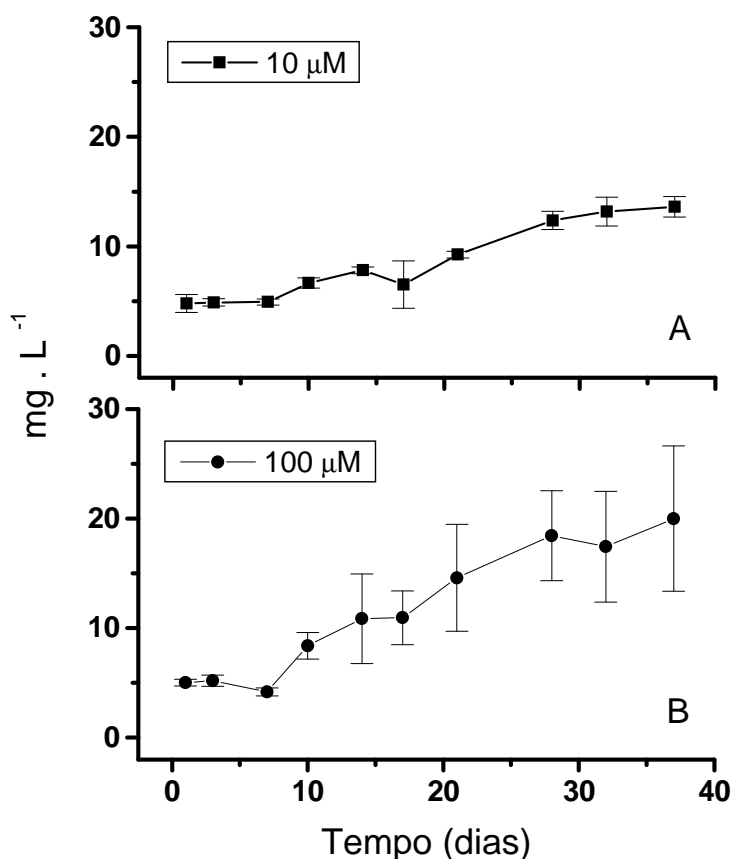


Figura 5: Concentração de carboidratos totais de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 µM). As barras correspondem ao desvio padrão.

A excreção de carboidratos totais dissolvidos liberados por célula foi similar entre os tratamentos (sem diferenças significativas), seguindo a mesma tendência (Figura 6) e mantendo um valor aproximado de 0,4 mg de carboidrato extracelular por célula. Da mesma forma, a taxa de excreção por célula, por dia, aproxima-se de zero durante o experimento (Figura 7). Tal resposta ocorre porque esta espécie cresce na mesma proporção que produz carboidratos extracelulares. Este resultado demonstra que o estado fisiológico não altera a taxa de excreção de carboidratos por célula.

O padrão de queda na excreção de carboidratos por célula, observado na Figura 6, ocorre devido a um crescimento muito acelerado no início do experimento, o qual não foi acompanhado pela liberação de carboidratos. O carboidrato dissolvido presente no início do experimento foi trazido pelo inóculo, fazendo com que a relação carboidrato dissolvido/ densidade celular seja alta nos primeiros dias. Este

padrão tem como consequência as taxas negativas de carboidrato por célula, por dia, observadas na Figura 7.

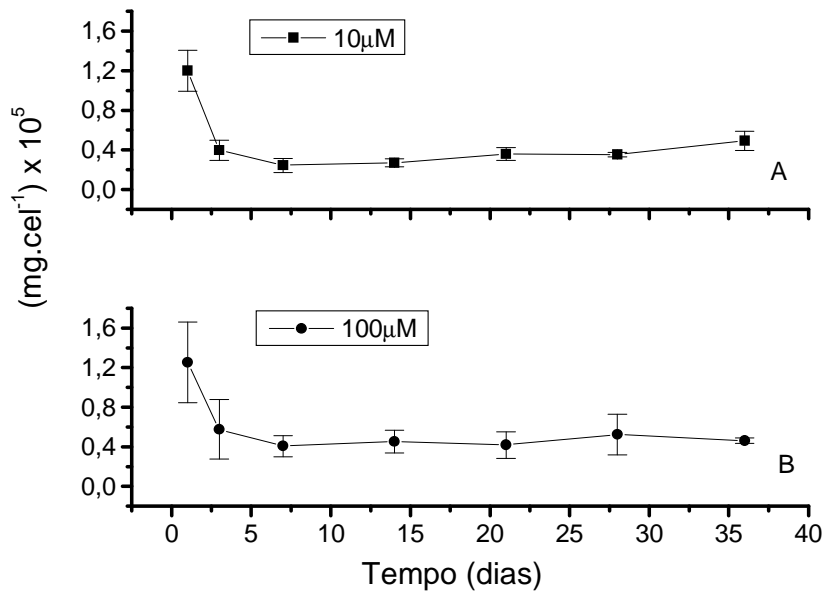


Figura 6: Concentração de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de *Spondylosium pygmaeum* em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

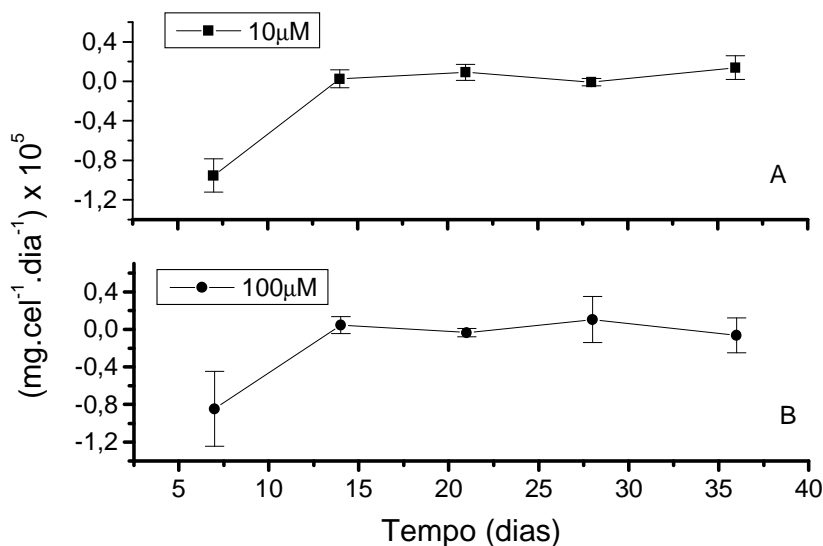


Figura 7: Taxa de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo com *Spondylosium pygmaeum* em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

A Figura 8 mostra o decaimento do nitrato ao longo do experimento para os dois tratamentos, bem como a parametrização dos dados. Observa-se que quando há baixa disponibilidade de nitrato, a remoção deste nutriente é mais rápida ($k = 0,47$), e nos primeiros 7 dias a fonte de nitrogênio termina. Por outro lado, nas amostras com alta disponibilidade de nitrato, a remoção ocorre de forma mais lenta ($k = 0,07$).

O modelo utilizado teve alto coeficiente de ajuste aos dados, explicando mais de 90% do comportamento experimental ($r^2 = 0,99$ e $0,94$).

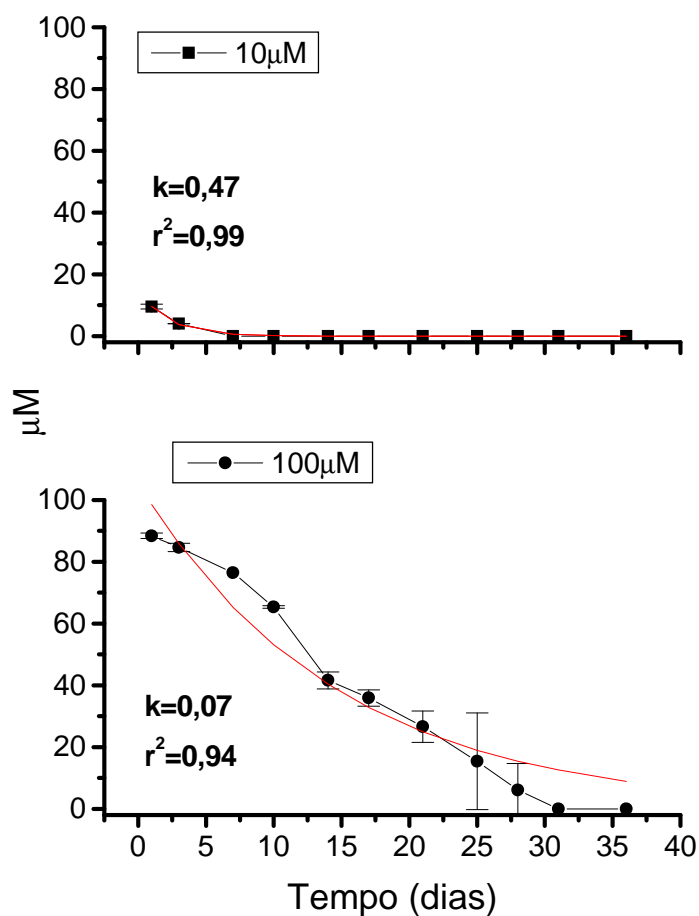


Figura 8: Concentração de nitrato (μM) em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de nitrato (10 e 100 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

4.1.2 b) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados

A Tabela 1 e a Figura 9 mostram a composição dos polissacarídeos encontrados ao longo do experimento, para os dois tratamentos. Não houve liberação significativa de carboidratos livres.

Tabela 1: Dados referentes à porcentagem de cada monossacarídeo em relação ao polissacarídeo total (%) nas diferentes fases do experimento 1 de *Spondylosium pygmaeum* (A) Fases LOG: crescimento exponencial, (B) Fases EST: estacionária.

	100µM NO ₃		10µM NO ₃	
	LOG	EST	LOG	EST
Fucose	13,5 ± 0,6	10,5 ± 0,3	12,7 ± 4,2	17,9 ± 0,3
Rhamnose	12,7 ± 9,6	7,9 ± 0,8	3,6 ± 0,6	3,5 ± 0,2
Arabinose	11,9 ± 7,4	6,7 ± 0,1	2,5 ± 0,7	3,9 ± 0,5
Galactose	17,2 ± 0,9	17,6 ± 1,1	17,1 ± 0,8	11,9 ± 0,1
Glicose	16,2 ± 7,2	19,0 ± 0,5	32,0 ± 6,3	15,3 ± 0,1
Manose e/ou xilose	18,4 ± 3,5	21,2 ± 1,2	23,0 ± 4,5	28,7 ± 1,8
Ac. Galacturônico	5,6 ± 1,5	9,1 ± 0	2,5 ± 1,3	2,2 ± 0,5
Ac. Glucurônico	5,4 ± 3,0	4,2 ± 2,1	6,5 ± 2,9	16,6 ± 0,8

As análises de cromatografia dos polissacarídeos dissolvidos identificaram variações na composição durante as fases de vida de *S. pygmaeum* (ao longo do experimento) nos dois tratamentos. De acordo com a Figura 9, observa-se que no tratamento N-, a Galactose diminuiu significativamente (Teste “t” de Student p=0,0129) sua proporção, enquanto o Ácido Glucurônico teve um aumento significativo (Teste “t” de Student p=0,0428), conforme a fase estacionária foi estabelecida. Com outros componentes importantes, como a Manose e/ou xilose, houve um aumento, assim como para Fucose, mas não de forma significativa estatisticamente.

No tratamento com alta concentração de nutriente (N+) a Fucose foi o único monossacarídeo que diminuiu significativamente sua proporção (Teste “t” de Student p=0,0282) durante o experimento. Nesse tratamento a Galactose, a Glicose e a Manose e/ou Xilose foram os principais componentes (de acordo com a Tabela 1).

Utilizando o teste “t” de Student monocaudal encontrou-se diferença significativa entre o início e fim do experimento também para a Glicose (Teste “t” de Student $p=0,0325$), além da Galactose (Teste “t” de Student $p=0,0039$) e do Ácido Glucurônico (Teste “t” de Student $p=0,0296$) na menor concentração (N-).

No tratamento com alta concentração de nutriente (N+), utilizando o teste “t” de Student monocaudal, encontrou-se diferença significativa entre o início e fim do experimento também para o Ac. Galacturônico ($p=0,0421$), além da Fucose ($p=0,0141$).

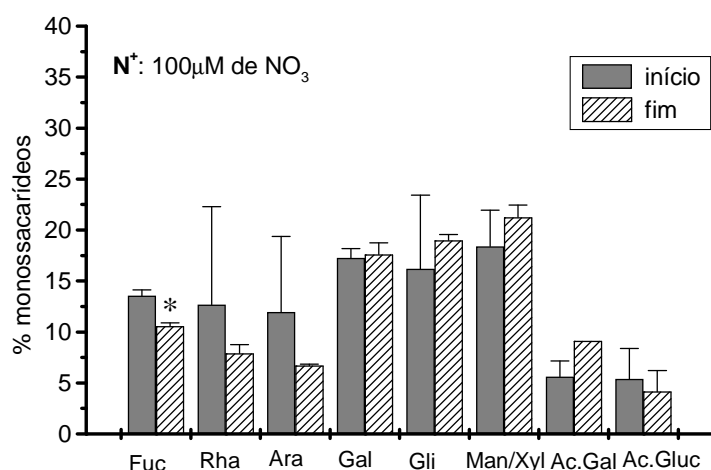
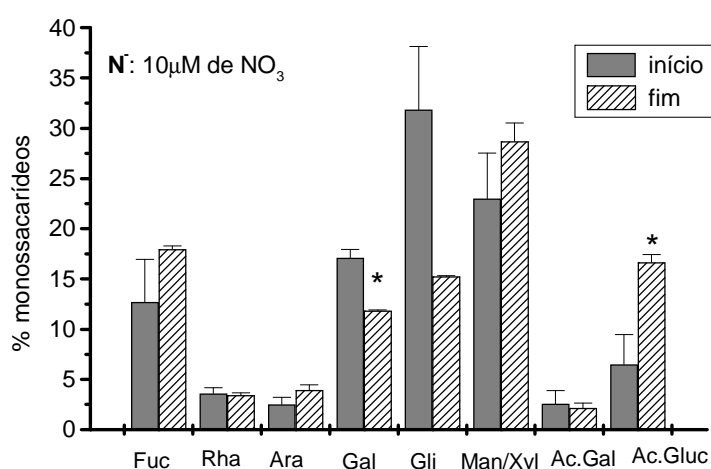


Figura 9: Composição dos monossacarídeos (%) liberados no início e no final do experimento 1 (nitrito). Abreviações: Fuc, fucose; Rha, rhamnose, Ara, arabinose; Gal, galactose; Gli, glicose; Man/Xyl, manose e/ou xilose; Ac. Gal, ácido galacturônico; Ac.Glu, ácido glucurônico. O asterisco (*) indica diferença significativa entre o início e o fim do experimento (Teste-t de Student com $p<0,05$). As barras correspondem ao desvio padrão.

4.2) Segundo Experimento

4.2.1) Crescimento

A Figura 10 mostra as curvas de crescimento obtidas para *Spondylosium pygmaeum* em duas condições de nutrientes: 20 μM (NH_4^-) e 150 μM (NH_4^+) de amônio. Nas amostras com baixa concentração de nutriente (Figura 10A) observou-se uma fase *log* com aproximadamente 7 dias, um crescimento menor que o encontrado no tratamento NH_4^+ (Figura 10B), que apresentou uma fase *log* de aproximadamente 15 dias. Já a fase estacionária de crescimento foi maior para o tratamento NH_4^- ; durou até o vigésimo dia, e depois a densidade celular começou a diminuir. Uma diferença significativa entre os dois tratamentos no crescimento de *Spondylosium pygmaeum* ocorreu somente no final do experimento, no dia 26 (ANOVA $p = 0,0042$).

O cálculo da taxa intrínseca de crescimento (r), para *Spondylosium pygmaeum*, neste experimento, encontrou um crescimento mais rápido no tratamento com baixa disponibilidade de nutrientes do que com uma oferta ótima de nutrientes ($r=0,3$ em NH_4^- , e $r=0,16$ em NH_4^+). Desta forma, com amônio a microalga duplica sua biomassa mais rapidamente na baixa oferta de nutrientes ($G=2,3$ dias em NH_4^- , e $G=4,3$ dias em NH_4^+); assim como foi encontrado no tratamento com nitrato, mas aqui com uma diferença maior.

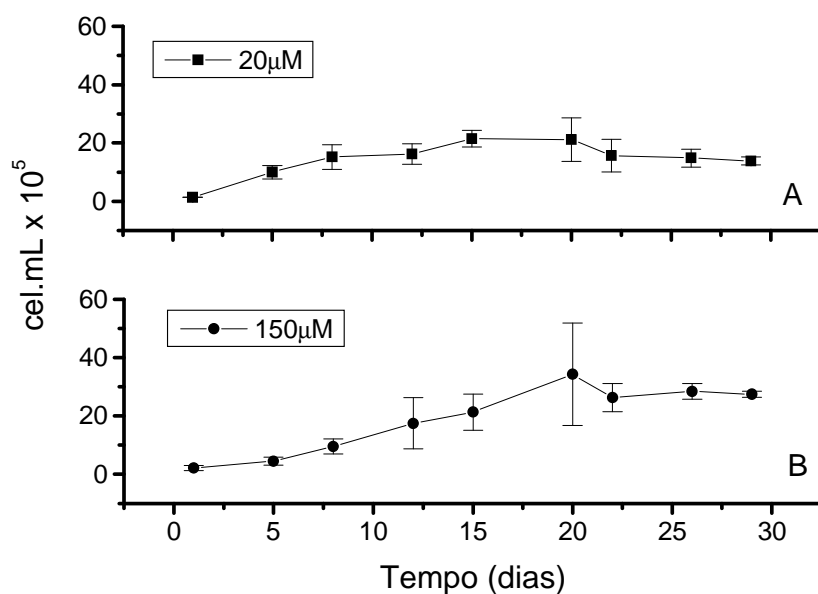


Figura 10: Densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

Nos gráficos de concentração de clorofila-a confirma-se que entre os dias 20 e 23 o tratamento NH_4^+ (Figura 11B) tem sua densidade celular no máximo, enquanto o tratamento NH_4^- (Figura 11A) apresenta uma baixa variação na concentração de clorofila-a. Comparando estatisticamente os dois tratamentos, observa-se que desde o dia 12 até o final do experimento o valor de clorofila-a difere significativamente (ANOVA $p < 0,05$). Da mesma forma que quando cultivada com nitrato, *S. pygmaeum* diminui seu teor de clorofila-a embora mantenha a densidade populacional.

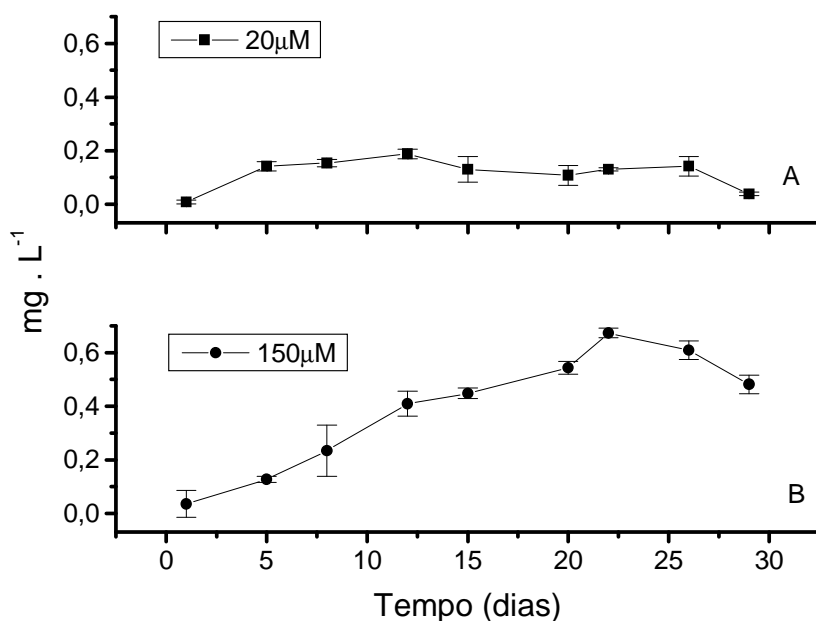


Figura 11: Concentração de clorofila-a de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

4.2.2 a) Carboidratos Extracelulares Totais

A liberação de carboidratos ocorreu de forma significativamente diferente entre os dois tratamentos nos dias 15 e 20 do experimento (ANOVA $p=0,0392$ e $p=0,0266$; respectivamente); apresentando um pico nas amostras do tratamento com baixa disponibilidade de nutriente (NH_4^-) (provavelmente devido a um erro de amostragem; nesse caso também com diferença significativa entre os experimentos). Outra possível explicação para um aumento na concentração dos carboidratos totais no início do experimento (na fase *log* de crescimento) seria devido à transferência para um novo meio de cultura, levando o metabolismo ser direcionado rapidamente para a adaptação, o que prejudicaria momentaneamente o crescimento, mesmo com a atividade fotossintética seguindo a funcionar ativamente como no antigo meio de cultura.

No final do experimento os dois tratamentos (NH_4^- e NH_4^+) apresentaram uma produção de carboidratos extracelulares semelhante.

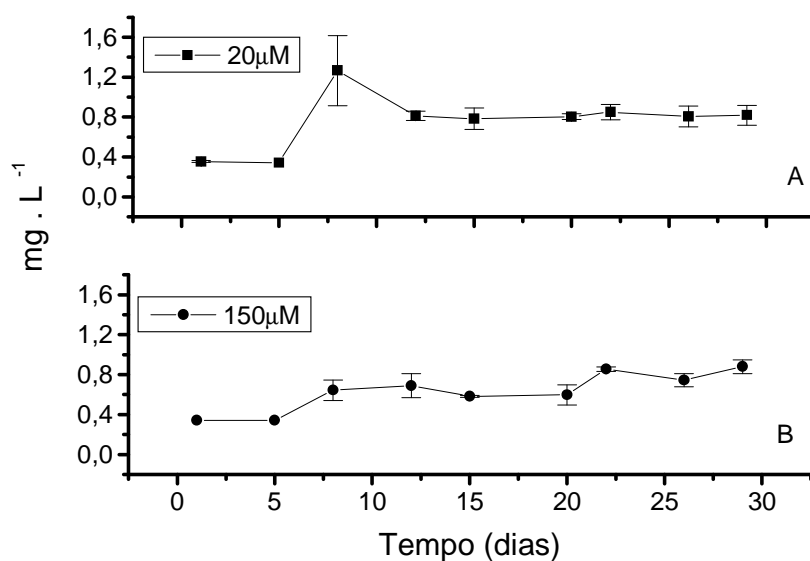


Figura 12: Concentração de carboidratos totais de *Spondylosium pygmaeum* em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

A excreção de carboidratos por célula foi similar entre os tratamentos (sem diferenças significativas), com valores baixos (Figura 13). Cada célula fixou a excreção em aproximadamente 0,05 mg por célula, sem se alterar com o estado fisiológico. A taxa diária de produção de carboidratos extracelulares por célula (Figura 14) aumentou a partir do dia 12, e depois se manteve sem variar, alcançando valores próximos de zero. Assim como no experimento com nitrato, a alga parece crescer na mesma proporção que excreta carboidratos. Este padrão de diminuição da produção de carboidrato extracelular por célula ocorre quando *S. pygmaeum* foi cultivada com amônio e nitrato.

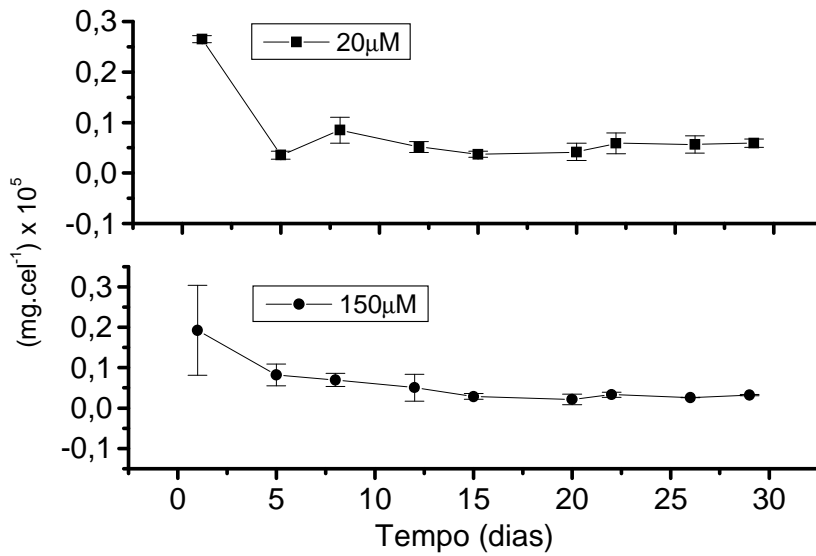


Figura 13: Concentração de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de *Spondylosium pygmaeum* em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

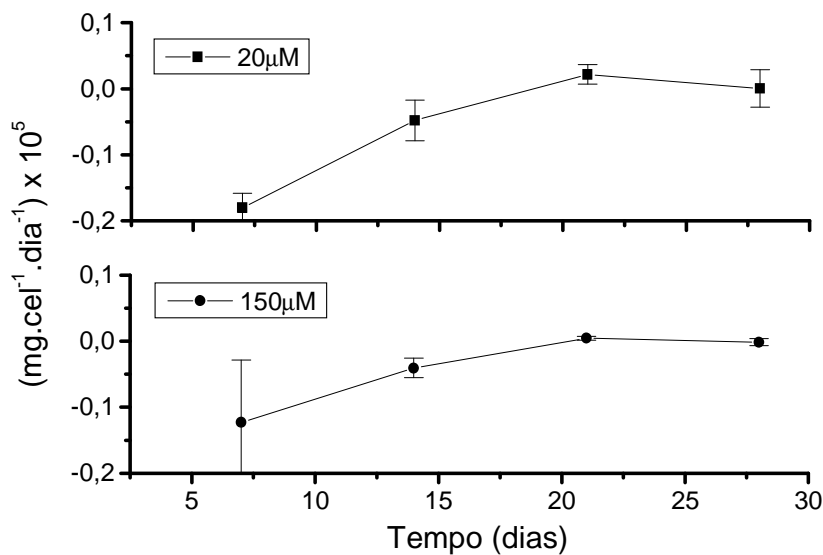


Figura 14: Taxa de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo do experimento com *Spondylosium pygmaeum* em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

A Figura 15 mostra a taxa de decaimento do amônio ao longo do tempo, para os dois tratamentos. Observa-se que na baixa concentração de amônio, a remoção deste nutriente é mais rápida do que na alta disponibilidade de amônio oferecido. Além disso, antes do quinto dia a fonte de amônio chega quase ao seu mínimo. Já nas amostras com alta disponibilidade de amônio oferecida, a remoção ocorre de forma mais lenta e a fonte de nitrogênio não chega a ser exaurida, embora o crescimento tenha cessado. Provavelmente o crescimento de *S. pygmaeum* em amônio proporciona outro fator que limita o crescimento, pois a partir do décimo quinto dia de experimento a quantidade de amônio no meio se estabiliza em aproximadamente 100 μM de nitrogênio amoniacal.

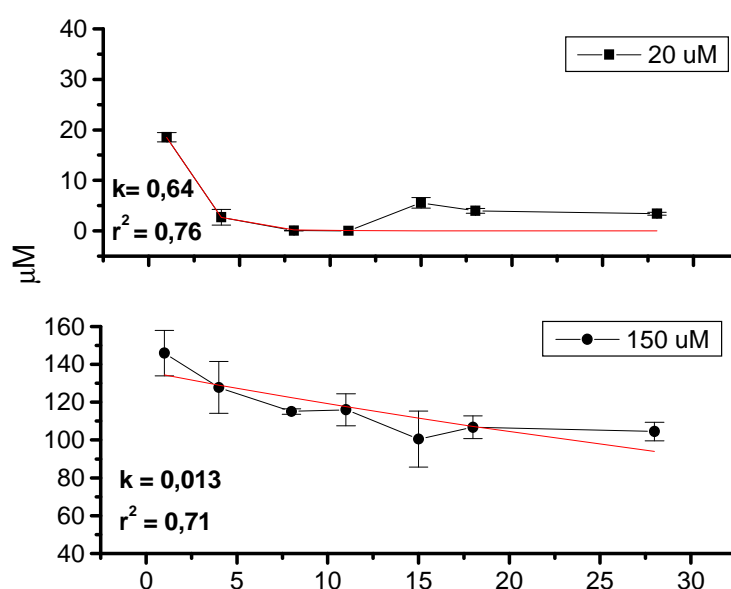


Figura 15: Concentração de amônio (μM) em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de amônio (20 e 150 μM). As barras correspondem ao desvio padrão.

4.2.2 b) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados

As análises de cromatografia dos polissacarídeos dissolvidos deste experimento encontraram poucas variações na composição durante as fases de vida das algas (ao longo do experimento) e entre os dois tratamentos (NH_4^- e NH_4^+). Em

ambos os tratamentos a Glicose, a Manose e/ou xilose, a Fucose e a Galactose foram os açúcares presentes em maiores concentrações (Tabela 2). Diferente do experimento 1, com nitrato, neste experimento não foi verificada a presença de Ácido Galacturônico.

Tabela 2: Dados referentes à porcentagem de cada monossacarídeo em relação ao polissacarídeo total (%) nas diferentes fases do experimento 2 de *Spondylosium pygmaeum*. (A) Fases LOG: crescimento exponencial, (B) Fases EST: estacionária.

	150µM NH ₄		20µM NH ₄	
	LOG	EST	LOG	EST
Fucose	19,8 ± 0,3	20,5 ± 1,3	19,1 ± 1,9	16,5 ± 1,5
Rhamnose	5,2 ± 0,8	2,8 ± 1,6	5,9 ± 0,4	1,8 ± 0,4
Arabinose	5,3 ± 1,7	4,0 ± 0	3,6 ± 2,4	2,8 ± 0,1
Galactose	17,1 ± 1,5	17,3 ± 0,1	16,9 ± 3,8	13,1 ± 1,1
Glicose	23,1 ± 1,1	23,4 ± 0,5	29,6 ± 5,6	27,9 ± 1,8
Manose e/ou xilose	21,5 ± 2,7	21,6 ± 1,1	17,7 ± 3,9	26,5 ± 0,4
Ac. glucurônico	8,1 ± 2,3	10,4 ± 0,8	7,2 ± 1,1	11,2 ± 0,2

A Figura 16 mostra que no tratamento com baixa concentração de nutrientes a Rhamnose diminuiu significativamente ($p=0,0092$) sua concentração; enquanto o Ácido Glucurônico teve um aumento significativo ($p =0,0347$). Fazendo o teste monocaudal encontrou-se diferença significativa entre o início e fim do experimento também para a Manose e/ou xilose ($p= 0,0359$);

Já no tratamento com alta concentração de nutriente a composição dos polissacarídeos extracelulares permanece a mesma, com nenhum monossacarídeo aumentando significativamente a sua concentração durante o experimento. Tal resposta pode estar relacionada com o fato de que o nutriente não está limitante neste tratamento, diferente do experimento com nitrato.

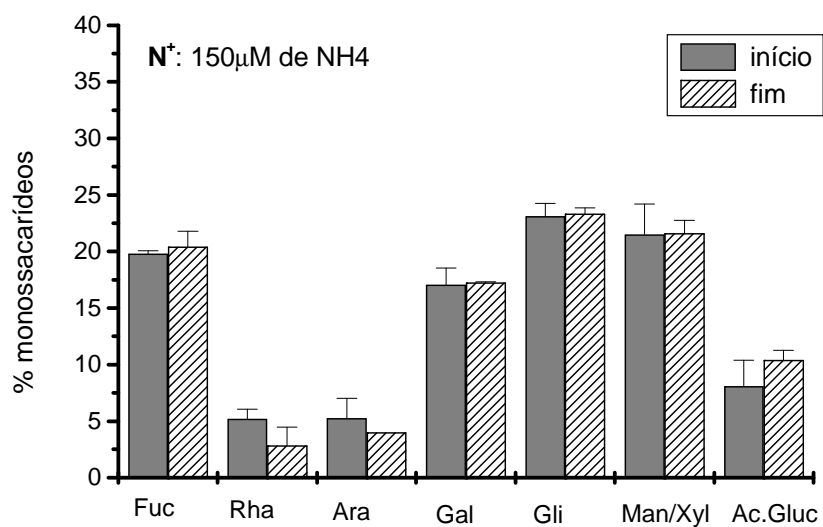
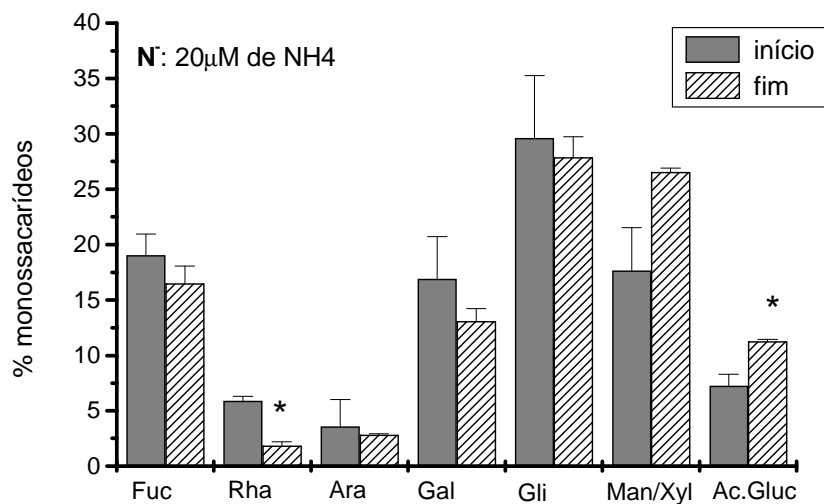


Figura 16: Composição dos monossacarídeos (%) liberados no início e no final do experimento 2 (amônio). Abreviações: Fuc, fucose; Rha, rhamnose, Ara, arabinose; Gal, galactose; Gli, glicose; Man/Xyl, manose e/ou xilose; Ac. Glu, ácido glucurônico. O asterisco (*) indica diferença significativa entre o início e o fim do experimento ($p < 0,05$). As barras correspondem ao desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

As principais fontes de nitrogênio para o crescimento do fitoplâncton incluem componentes inorgânicos (nitrato, nitrito, amônia) e moléculas orgânicas (uréia, aminoácidos, peptídeos) (Padisák, 2004). A preferência pelo amônio sobre o nitrato já foi relatada para muitas espécies do fitoplâncton (Dortch, 1990). Maguer *et al.* (2007) observou que quando o amônio é a fonte preferencial de nitrogênio, sua taxa de assimilação é maior que a taxa de assimilação do nitrato em células deficientes de nitrogênio; mas similar em células repletas de nitrogênio. Além disso, muitos organismos têm a capacidade de estocar, em um período curto, uma grande quantidade de nutrientes (como o nitrato e o amônio), de uma forma suficiente para suprir os requerimentos no crescimento de células que estariam em um meio com deficiência de nutriente (Padisák, 2004).

No presente trabalho, verificou-se que a variação na disponibilidade de duas fontes de nitrogênio (nitrato e amônio) tem conseqüências em diferentes aspectos da fisiologia de *Spondylosium pygmaeum*. Observou-se que as máximas densidades celulares encontradas estavam relacionadas com as mais altas concentrações de nitrogênio oferecido nos diferentes meios de cultura. O número total de células, durante as fases exponencial e estacionária, dos tratamentos com baixa concentração de nutriente (N⁻ e NH₄⁻) foi menor do que nos tratamentos com alta concentração de nutriente (N⁺ e NH₄⁺).

Assume-se que, sob limitação de nutrientes (nitrogênio ou fósforo), a população fitoplanctônica diminua seu crescimento, enquanto a realização da fotossíntese continua ativa; desta forma, ocorre um excesso de fotoassimilação do carbono (Fogg, 1983). Segundo Myklesstad (1995), este excesso de carbono levaria ao aumento da produção de carboidratos extracelulares. No entanto, os experimentos realizados neste estudo demonstraram que a composição dos carboidratos extracelulares varia com a quantidade/qualidade de nutriente disponível no meio de cultura e com a fase de vida das algas. Porém, os resultados não confirmaram a relevância da limitação de nutrientes na determinação do aumento da liberação de polissacarídeos, destacando apenas a variação na composição destes nas diferentes fases de vida e com os diferentes nutrientes oferecidos. *Spondylosium pygmaeum* parece não alterar sua proporção de carboidrato extracelular produzido em função do estado fisiológico, contradizendo resultados

anteriores para outras desmídias (Lombardi *et al.*, 1998 e Girollo e Vieira, 2005). A hipótese do excesso fotoassimilado (Fogg, 1983), amplamente aceita na literatura, preconiza que células em limitação nutricional mantêm a fotossíntese, mas não utilizam o carbono assimilado no crescimento, e sim na excreção de carboidratos. A estratégia utilizada por *S. pygmaeum* para conter o excesso de carbono fotoassimilado parece diferente do proposto nesta hipótese, pois *S. pygmaeum* diminui significativamente a concentração de pigmentos durante a deficiência nutricional e dessa forma evita a entrada excessiva de elétrons pelo aparato fotossintético. Paralelamente, esta espécie demonstra também uma notável capacidade de estoque intracelular de nutrientes, uma vez que mesmo em deficiência nutricional, consegue manter a população, inclusive aumentando a densidade celular. Observa-se ainda que *Spondylosium pygmaeum* sobrevive a ausência de nitrogênio, visto que nos dois tratamentos de ambos os experimentos ocorre a manutenção da densidade celular concomitante à exaustão da fonte.

De maneira geral, pode-se supor que o fitoplâncton possui maior afinidade pelo amônio do que pelo nitrato, já que menos energia é requerida para incorporar o amônio, que é uma molécula menor, a qual não precisa ser reduzida, enquanto o nitrato necessita ser reduzido por uma enzima específica (Dortch, 1984). Entretanto, estudos como o feito por Yamamoto *et al.* (2004) indicam que esta preferência pelo amônio não pode ser aplicada para todo o fitoplâncton. De acordo com o cálculo da taxa intrínseca de crescimento (r) encontrada para a espécie nas condições experimentais, pode-se dizer que seu tempo de duplicação da biomassa é menor em baixas concentrações de nutriente, com preferência pelo amônio. Encontrou-se um tempo para a biomassa ser duplicada (G) de apenas 2,3 dias para o amônio (na menor concentração-limitante), ao passo que no experimento com nitrato o tempo de duplicação da biomassa neste tratamento é de 4,9 dias. Isso pode indicar que quanto menos nutrientes, mais rápida é a taxa de crescimento e de remoção de nutriente nesta espécie. As taxas de crescimento parecem confirmar as taxas de decaimento de nutrientes, onde se encontrou quase uma exaustão dos nutrientes na primeira semana de experimento na concentração limitante (com ambas as fontes de nitrogênio). Tal resposta confirma a utilização dos nutrientes para a rápida duplicação da biomassa em um meio com concentrações nutricionais mais baixas.

Diversos trabalhos têm abordado a cinética de assimilação do nitrogênio inorgânico dissolvido pelo fitoplâncton marinho, entretanto para as espécies de água

doce há menos atenção acerca desse importante padrão (Reynolds, 2006). Porém, embora as taxas de remoção de nitrogênio tenham sido maiores com o amônio, o cultivo com este nutriente pareceu limitar o crescimento antes de seu esgotamento no meio de cultura, de modo que a biomassa total das culturas cultivadas com nitrato foi maior que as cultivadas com amônio. Possivelmente o cultivo de *S. pygmaeum* em amônio proporciona algum outro fator que limita sua captura e conseqüentemente o crescimento da espécie, fator este que merece ser investigado em experimentos futuros.

A hipótese de que as condições nutricionais limitantes acarretariam um aumento da taxa de excreção de carboidratos por célula foi rejeitada para esta espécie, inclusive com resultados similares entre os tratamentos, nos dois experimentos. Observou-se que a taxa de produção de carboidrato é aproximadamente zero, sem haver influencia do estado fisiológico, nos levando a concluir que a excreção e o crescimento ocorrem ao mesmo tempo, na mesma proporção, em *Spondylosium pygmaeum*.

Supõe-se também, que quanto maior a disponibilidade de nitrogênio, maiores são suas taxas de captura, até que se atinja a máxima capacidade de retirada de nitrogênio (Maguer *et al.*,2007). Porém, os resultados mostrados neste trabalho indicam que *S. pygmaeum* se comporta de forma diferente quando exposta a concentrações muito altas de nitrogênio, pois esta linhagem demonstrou em todos os experimentos uma maior taxa de remoção de nutrientes na disponibilidade mais baixa de nitrogênio. Possivelmente, neste aspecto exista também uma adaptação diferenciada de *S. pygmaeum*, que parece ser um eficiente competidor em baixas disponibilidades nutricionais, capturando mais rapidamente nitrogênio nesta condição, e estocando-o também com eficiência, garantindo a longevidade da população. Nesta espécie, a assimilação de nitrogênio possivelmente depende do estoque intracelular deste nutriente, de modo que quando tais reservas estão repletas, a assimilação ocorre de forma mais lenta. Embora o teor de nitrogênio intracelular, que é um importante indicador da captura de nutrientes, não tenha sido monitorado, a taxa de decaimento extracelular reflete indiretamente tal captura com uma metodologia mais acessível e que sustenta adequadamente as conclusões deste trabalho.

O polissacarídeo produzido por *Spondylosium pygmaeum* é formado por açúcares que variaram sua quantidade nas diferentes fases de vida destas algas.

Primeiramente, tendo o nitrato como fonte de nitrogênio, encontrou-se a Galactose, a Glicose e Manose e/ou Xilose como os principais açúcares. Semelhante constituição foi encontrada para outras desmídias, como *Spondylosium panduriforme* (Paulsen e Vieira, 1994), com altas quantidades de galactose (30%); e *Micrasterias furcata* (Lombardi *et al.*, 1998), com 24% de galactose. Num estudo realizado com diatomáceas (Urbani *et al.*, 2005) encontrou-se a glicose como o mais abundante monômero para três espécies durante a fase de crescimento (*log*). Também a proporção de ácidos urônicos merece destaque, confirmando que o polissacarídeo produzido por esta linhagem assemelha-se ao de outras desmídias planctônicas (Girollo *et al.*, 2005). No segundo experimento, quando a fonte de nitrogênio utilizada foi o amônio, encontrou-se a Glicose, Galactose, Manose e/ou Xilose e a Fucose como os açúcares em maiores concentrações. Outra diferença observada entre as fontes de nitrogênio foi que o Ácido Galacturônico não foi encontrado quando *S.pygmaeum* foi cultivada com amônio.

Os resultados encontrados para *Spondylosium pygmaeum* demonstram que a baixa concentração de nutrientes afeta a qualidade dos açúcares liberados em cada fase de vida das algas. Nas amostras com alta concentração de nutrientes (100 μM de NO_3 e 150 μM de NH_4) houve variação significativa do início para o final do experimento (durante as fases de vida das algas) somente no experimento 1, para a Fucose. Já nas amostras com deficiência de nutrientes ocorreram mais variações no que diz respeito à qualidade do açúcar liberado ao longo do tempo de experimento. Tal resposta indica que a deficiência nutricional gera uma alteração fisiológica nas células, que pode tanto ser consequência das adaptações desta espécie a essa condição, como pode ter um outro significado adaptativo, adicionando ao composto extracelular propriedades que beneficiem a espécie na deficiência nutricional. Tanto os ácidos urônicos, como a fucose, açúcares que aumentaram em proporção na cultura com baixa disponibilidade nutricional, são açúcares hidrofóbicos (fucose) e reativos (ácidos urônicos), bastante relacionados ao processo de agregação e coagulação de florações (Vieira *et al.*, 2006). Este processo já foi demonstrado em diatomáceas marinhas como um processo adaptativo e seu significado na água doce vem sendo cada vez mais reforçado (Vieira *et al.*, 2007 em prep.). Espécies fitoplanctônicas tenderiam a agregar-se em condições de exaustão nutricional, como finais de florações, e desta forma aumentariam suas taxas de afundamento, atingindo áreas mais profundas e mais ricas em nutrientes, fortalecendo assim o

inóculo da nova população (Passow *et al.*, 1994). Porém, a importância deste processo na água doce ainda precisa ser melhor esclarecida, assim como o papel dos polissacarídeos neste processo.

A liberação de compostos altamente energéticos, como os carboidratos, pelo fitoplâncton foi muitas vezes considerada como um paradoxo (Passow *et al.*, 2004). Entretanto, sob condições particulares, a taxa de remineralização dos nutrientes pode ser suficientemente rápida para ter um efeito positivo na população fitoplanctônica (Wood e Van Valen, 1990; Passow *et al.*, 1994).

Atualmente diversos pesquisadores vêm estudando os benefícios envolvidos na liberação dos compostos orgânicos pelo fitoplâncton. A utilização destes compostos pela comunidade bacteriana já foi demonstrada (Colombo *et al.*, 2004), evidenciando que os carboidratos liberados agem como uma fonte importante de carbono, capaz de suportar uma densa população bacteriana. Acredita-se que a atividade bacteriana nestes compostos seja capaz de acelerar a remineralização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento do fitoplâncton. Giroldo *et al.* (2007) encontraram uma densa população bacteriana nos compostos extracelulares de três espécies de fitoplâncton de água doce, confirmando que tal comportamento está presente em uma grande variedade de espécies de fitoplâncton, tanto marinhas, como continentais.

6. CONCLUSÕES

- A microalga de água doce *Spondylosium pygmaeum* mantém a sua taxa de excreção de carboidratos por célula em aproximadamente zero, independente das condições nutricionais do meio de cultivo e da fase de vida.
- Entre os nutrientes utilizados, o amônio foi o que gerou um menor tempo para a duplicação da biomassa de *S. pygmaeum*. Por outro lado, quando esta microalga é cultivada com nitrato, foi observada uma maior densidade celular e biomassa.
- *S. pygmaeum* demonstrou uma maior taxa de remoção de nutrientes quando encontrada em meio de cultivo com nutrientes em concentrações mais baixas; evidenciando que a espécie pode ser uma eficiente competidora em ambientes oligotróficos.
- A composição dos polissacarídeos extracelulares produzidos por *S. pygmaeum* varia ao longo das fases de vida destas algas, principalmente quando os nutrientes estão em condições limitantes, e também quando a espécie é cultivada em diferentes fontes de nitrogênio.
- A constituição predominante dos polissacarídeos produzidos por esta linhagem assemelha-se ao encontrado para outras desmídias planctônicas, o que provavelmente pode estar relacionado com uma determinação filogenética destes compostos extracelulares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-RELL, L. A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*.1983; 10: 257-263.

BARSETT, H; PAULSEN, B. S.; HABE, Y. Further characterization of polysaccharides in seeds from *Ulmus glabra* Huds. *Carbohydrate Polymers*. 1992; 18:125-130.

BIERSMITH, A; BENNER, R. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. *Marine Chemistry*. 1998; 63:131-44.

BROOK, A. J. *The biology of desmids*. Blackwell, Oxford. 1981; p276.

COLOMBO, V.; VIEIRA, A. A. H.; MORAES, G. Activity of glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on degradation of extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004; 5:110-116.

CROASDALE, H.; BICUDO, C. E .M.; PRESCOTT, G. W. *A Synopsis of North American Desmids*. Vols.2-5. University of Nebraska. 1983.

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

DOMOZYCH, D. S.; DOMOZYCH, C. R. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. Part 2: Ultrastructure and immunocytochemistry. *Journal of Phycology*.1993; 29: 659-667.

DOMOZYCH, D. S. The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation. *Biofilms*.2005; 2: 129-144.

DOMOZYCH, D. S., ELLIOTT, L., KIEMLE, S. N. *Pleurotaenium trabecula*, a desmid of wetland biofilms: The extracellular matrix and adhesion mechanisms. *Journal of Phycology*.2007;43 (5): 1022-1038.

DORTCH, Q.; CONWAY, H. L. Interaction between nitrate and ammonium uptake, variation with growth rate, nitrogen source and species. *Marine Biology*.1984; 79:151-164.

DORTCH, Q. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*.1990; 61:183-201.

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

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina*.1983; 26: 3-14.

FREIRE-NORDI, C. S.; VIEIRA, A. A. H. Utilization of extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* Kors (Chlorophyceae) by heterotrophic bacteria. *Revista de Microbiologia*. 1996; 27:27-32.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H.; PAULSEN, B. S. Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae). *Phycologia*.2005; 6:671-677.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research*. 2005; 27:695-705.

GIROLDO, D.; ORTOLANO, P. I. C.; VIEIRA, A. A. H. Bacterial-algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater biology*. 2007; 52: 1281-1289.

GOUVÊA, S. P.; VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T. No effect of N or P deficiency on capsule in *Staurodesmus converens* (Zygnematophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*. 2002; 41(6): 585-589.

GREMM, T. J.; KAPLAN, L. A. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC-PAD and pulse amperometric detection. *Limnology and Oceanography*. 1997; 42: 385-393.

GUILLARD R. R. L.; LORENZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology*. 1972; 8:10-14.

HUTCHINSON, G.E. *A treatise on limnology*, Vol. II. Introduction to lake biology and limnology. John Wiley, New York. 1967; p1115.

JØRGENSEN, N. O. G.; JENSEN, R. E. Microbial fluxes of free monosaccharides and total carbohydrates in freshwater determined by PAD-HPLC. *Microbial Ecology*. 1994; 14:79-94.

LOMBARDI, A.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, A. L. Extracellular carbohydrate production by *Micrasterias furcata* (Desmidiaceae) grown in various nitrate concentrations. *Hoehnea*. 1998; 25:1-9.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. RIMA, São Carlos. 2006. p. 606.

MACKINNEY, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. 140: 315-322.

MAGUER, J.; L'HELGUEN, S.; MADEC, C.; LABRY, C.; LE CORRE, P. Nitrogen uptake and assimilation kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): effect of n-

limited growth rate on nitrate and ammonium interactions. *Journal of Phycology*.2007; 43, 295-303.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C. A.; CHEVOLOT, L.; GERMAIN, C.; REVUELTA, R.; DAWSON, R. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. *Environmental Science and Technology*. 1992; 26: 133-38.

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

PADISÁK, J. Phytoplankton in: Reynolds, C.S.; O'Sullivan, P.E. (orgs.) *The Lakes Handbook*; v.1 Oxford Blackwell publishing 2004.251-298p.

PASSOW, U; ALLDREDGE, A.L.; LOGAN, B.E. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep Sea Research 1*. 1994; 41:5-57.

PAULSEN, B. S.; VIEIRA, A. A. H. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polysaccharides produced by *Spondylosium panduriforme*. *Journal of Phycology*. 1994; 30: 638-641.

POMEROY, L. R. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*.1974; 24:499-504.

PORTER, K.G. Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton. *Nature*. 1973; 244: 179-180

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

REYNOLDS, C. S. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. New York: Cambridge University Press. 1984, p 384.

REYNOLDS, C. S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 2002; 24:417-428.

REYNOLDS, C. S. *Ecology of Phytoplankton*. New York: Cambridge University Press. 2006, p 93.

SAMUELSEN, A. B; PAULSEN, B. S; WOLD, J. K; OSUKA, H; YAMADA, H.; ESPEVIK, T. Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. *Phytotherapy Research*. 1995; 9:211-218.

SMITH, D. J.; UNDERWOOD, G. J. C. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*. 2000; 36:321-333.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, R. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada. 2ed. Ottawa : Bulletin 167. 1972. 311p.

TIEN, C. J.; KRIVTSOV, V.; LEVADO, E.; SIGEE, D. C.; WHITE, K. N. Occurrence of cell-associated mucilage and soluble extracellular polysaccharides in Rostherne Mere and their possible significance. *Hydrobiologia*. 2002; 485:245-252.

URBANI, R.; MAGALETTI, E.; SIST, P.; CICERO, A. M. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status. *Science of the Total Environment*. 2005; 353: 300-306.

VIEIRA, A. A. H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus*. *Journal of Plankton Research*. 1986; 8: 985-994.

VIEIRA, A. A. H.; GIROLDO, D.; ORTOLANO, P. I. C. Aggregate formation in axenic and microbial co-inoculated batch cultures of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae). *Acta Limnologica Brasiliensia*. 2006; 18: 1-7.

WICKS, R. J.; MORAN, M. A.; PITTMAN, L. J.; HODSON, R. E. Carbohydrates signatures of macrophytes and their dissolved degradation products as determined by a sensitive high-performed ion chromatography method. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991; 57:3135-3143.

WOOD, A. M.; VAN VALLEN, L. M. Paradox Lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine microbial foods webs*. 1990; 4: 103-116.

YAMAMOTO, T.; OH, S. J.; KATAOKA, Y. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science*. 2004; 70:108-115.

