

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

INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE FOSFATO NO CRESCIMENTO, NA  
PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS E NA MORFOLOGIA DE  
*Chloromonas* sp. (CHLOROPHYCEAE)

ALBERTO CARLOS DE SOUZA CAMPOS

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, sob orientação do Dr. Danilo Giroldo.

Rio Grande, Abril de 2008

*A minha sobrinha Vitória,  
um anjo que passou por  
este mundo e deixou muita  
saúde entre nós.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo seu esforço em proporcionar a minha formação educacional.

Aos meus irmãos Márcia e Rodrigo, pela amizade e comprometimento em todos os momentos que passamos juntos.

A minha esposa Ângela pelo incentivo e apoio, e as minhas filhas Francielle e Marcelle, por tantas vezes terem entendido minha ausência e esforço.

Ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Giroldo, pela sua simplicidade desde que nos conhecemos, colocando-se sempre a disposição para orientação, além disso pela sua compreensão nas minhas limitações de tempo e de conhecimento na área de ecofisiologia. Agradeço por sua dedicação e empenho na realização desta dissertação, também pelo companheirismo e amizade demonstrado em muitos momentos, que espero manter embora esta etapa de estudo tenha sido encerrada.

A Fundação Universidade Federal do Rio Grande por ter contribuído para minha formação acadêmica e pelo incentivo a minha qualificação profissional nesta instituição.

Ao Prof. Dr. Fernando D’Incao, Chefe do Departamento de Oceanografia, pelo apoio e incentivo, principalmente pela dispensa parcial das minhas atividades profissionais.

Ao Prof. Dr. Jorge Pablo Castello, Chefe do Laboratório de Recursos Pesqueiros Pelágicos, por ter compreendido a importância pessoal e institucional da realização desta etapa de formação.

Ao Prof. Dr. Cleber Palma, por ter disponibilizado o Laboratório de Limnologia e seus equipamentos para a realização dos experimentos e também pela sua amizade e descontração em muitos momentos de convívio.

A todos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos seus valiosos ensinamentos e dedicação.

A Prof(a). Vera Nozari Susin, mesmo afastada da universidade, me prestou relevantes informações e conhecimentos para a preparação das aulas do estágio de docência.

A minha amiga e colega técnica Clara, por ter sempre atendido as minhas solicitações e me orientado na realização dos experimentos.

A minha colega técnica Mara, pelos momentos de convívio nas festas e no Laboratório de Limnologia.

A Sr(a) Elodina Acosta dos Santos, técnica do Laboratório de Botânica – DCMB, pelo seu apoio e empenho no desenvolvimento do meu estágio de docência, principalmente nas atividades de coleta em campo e na montagem das aulas práticas.

A minha colega e técnica Eunice Segatto, do Laboratório de Botânica - DCMB, pela sua disponibilidade em prestar auxílio na preparação dos reagentes utilizados nas aulas práticas do estágio de docência e também na montagem das aulas.

A Universidade Federal de São Carlos – SP na pessoa do Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, por ter permitido a realização das análises cromatográficas das amostras.

Aos colegas do mestrado e de convívio no Laboratório, Letícia, Thaís, Thasiana, Rita, Fernanda, Antônio, Cláudio, Savênia, Miriam, Patrícia.

Ao mestrando Leonardo (Léo), por ter cedido gentilmente dados de sua monografia que colaboraram para esta dissertação.

A Eneida, técnica da Biblioteca Setorial do Departamento de Oceanografia, pelo seu auxílio na consulta e renovação das bibliografias.

Ao Sr. Votto, secretário-executivo do Departamento de Oceanografia pelas suas orientações prestadas em muitos encaminhamentos burocráticos.

Ao Sr. Cláudio, secretário da SUPPOSG, pelas orientações e esclarecimentos prestados no decorrer do meu afastamento.

Aos colegas do Laboratório de Recursos Pesqueiros Pelágicos, Fernando, Thaís, Renato, Ricardo, Gabriel, Natália, pelo incentivo e apoio.

Ao meu colega e amigo Márcio, técnico do Laboratório de Recursos Pesqueiros Demersais, pelas dicas de informática e colaboração.

## SUMÁRIO

A. LISTA DE FIGURAS .....	vii
B. LISTA DE TABELAS .....	x
C. RESUMO .....	xi
D. ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1 Organismos e condições de cultivo .....	8
3.2 Experimento I .....	11
3.3 Experimento II .....	12
3.4 Análises .....	12
3.4.1 Morfologia celular .....	12
3.4.2 Densidade celular .....	12
3.4.3 Teor de clorofila-a .....	13
3.4.4 Teor de carboidratos totais dissolvidos .....	13
3.4.5 Caracterização dos carboidratos dissolvidos .....	14
3.4.6 Análise de proteínas totais dissolvidas .....	14
3.4.7 Análise do fosfato dissolvido .....	15
3.4.8 Análise estatística .....	15
4. RESULTADOS .....	17
4.1 Experimento I .....	17
4.1.1 Morfologia celular .....	17
4.2 Experimento II .....	20
4.2.1 Crescimento celular .....	20
4.2.2 Excreção de carboidratos extracelulares totais .....	27
4.2.3 Caracterização dos carboidratos extracelulares excretados.....	30
4.2.4 Excreção de proteínas extracelulares totais .....	32
5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	36
6. CONCLUSÕES .....	43
7. BIBLIOGRAFIA .....	44

## A. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Células vivas em diferentes estágios de divisão celular de *Chloromonas* sp. (Volvocales – Chlorophyceae), após sete dias de cultivo em meio WC. Aumento de 1000 X. A barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ . **9**
- Figura 2:** Foto do Lago Polegar localizado no Campus Carreiros – FURG – Rio Grande – RS. **9**
- Figura 3:** Foto dos inóculos na incubadora no Laboratório de Botânica Criptogâmica – DCMB – FURG. **10**
- Figura 4:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período inicial do crescimento em meio depletado (5  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) parede celular, (2) cloroplastos, (3) pirenóides. **18**
- Figura 5:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período intermediário (14 dias) de crescimento em meio depletado (5  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplasto, (2) pirenóides. **18**
- Figura 6:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período final (35 dias) de crescimento em meio depletado (5  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos, (2) parede celular. **19**
- Figura 7:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período inicial (7 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos, (2) pirenóides. **19**
- Figura 8:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período intermediário (21 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplasto, (2) pirenóides. **20**
- Figura 9:** *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período final (28 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu\text{M}$ ): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos. **20**

**Figura 10:** Densidade celular de *Chloromonas* sp. em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de fosfato : (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio-padrão. **21**

**Figura 11:** Concentração de clorofila-a de *Chloromonas* sp. em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de fosfato : (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio-padrão. **23**

**Figura 12:** Relação concentração clorofila-a (mg) pelo número de células em função do tempo de cultivo de *Chloromonas* sp. mantidas em duas concentrações de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão. **24**

**Figura 13:** Decaimento do fosfato dissolvido em culturas de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão. **26**

**Figura 14:** Concentração de carboidratos extracelulares totais de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão. **28**

**Figura 15:** Taxa de excreção de carboidratos de *Chloromonas* sp. por célula em função do tempo de cultivo em duas disponibilidades de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo. **29**

**Figura 16:** Composição dos monossacarídeos liberados em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50  $\mu$ M e 7 dias em 5  $\mu$ M) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50  $\mu$ M e 14 dias em 5  $\mu$ M). Abreviações: Fuc (fucose), Ram (Ramnose), Ara (Arabinose), Glucos (Glucosamina), Gli (Glicose), Man/Xil (Manose/Xilose), Ác. Ga (Ácido Galacturônico), Ác. Glu (Ácido Glucorônico). As barras correspondem ao desvio padrão. **32**



**Figura 17:** Concentração absoluta de proteínas extracelulares totais de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão. **33**

**Figura 18:** Taxa de excreção de proteínas extracelulares totais de *Chloromonas* sp. por célula por dia em função do tempo de cultivo em duas disponibilidades de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo. **35**

## B. LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição do meio WC utilizado no cultivo de *Chloromonas* sp. **10**

**Tabela 2:** Taxa intrínseca de crescimento ( $r$ ), Taxa de crescimento convertida para duplicação por dia ( $K$ ) e o Tempo de duplicação da biomassa em dias ( $G$ ) de *Chloromonas* sp. para duas disponibilidades de fosfato. **25**

**Tabela 3:** Porcentagem dos monossacarídeos identificados por HPLC-PAD em relação ao polissacarídeo total em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50  $\mu$ M e 7 dias em 5  $\mu$ M) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50  $\mu$ M e 14 dias em 5  $\mu$ M). **30**

**Tabela 4:** Relação dos valores de significância (Teste “t” de Student, p-valor) para os monossacarídeos excretados em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50  $\mu$ M e 7 dias em 5  $\mu$ M) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50  $\mu$ M e 14 dias em 5  $\mu$ M). **31**

## C. RESUMO

Os lagos naturais apresentam uma ampla variação na produtividade e o fósforo é o elemento de contribuição mais importante para a fertilidade na maioria dos lagos. Nos ambientes aquáticos continentais, o fósforo apresenta-se sob a forma de fosfato, tendo origem de fontes naturais ou artificiais. A quantidade e qualidade dos nutrientes disponíveis no meio afetam o crescimento das algas, pois influenciam a taxa de produção fotossintética. Substâncias orgânicas, principalmente polissacarídeos, são liberadas pelas células fitoplanctônicas durante todas as fases de crescimento e a sua taxa de liberação depende de condições fisiológicas e ambientais. Organismos heterotróficos, como bactérias, usam compostos ricos em carbono e incrementam as associações interespecíficas, nas quais as microalgas poderão se beneficiar pela mineralização microbiana de nutrientes essenciais. Este trabalho tem como objetivo principal analisar a influência da disponibilidade de fosfato na morfologia, no crescimento e na produção de compostos orgânicos por *Chloromonas* sp. (Volvocales – Chlorophyceae). O organismo utilizado nos experimentos foi uma linhagem subtropical de *Chloromonas* sp., isolada de um lago oligo-mesotrófico no extremo sul do Brasil (Rio Grande, RS). As culturas experimentais foram realizadas em triplicata em duas disponibilidades de fosfato (5 e 50  $\mu\text{M}$ ). As amostragens foram realizadas em intervalos de 72 horas, até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento para a análise dos seguintes parâmetros: morfologia celular, crescimento (densidade celular e teor de clorofila-a), produção de carboidratos (fenol-sulfúrico e HPLC-PAD) e proteínas extracelulares, além do decaimento do fosfato (espectrofotometria). Os resultados demonstraram que a morfologia celular e o crescimento são influenciados pela disponibilidade de fosfato, assim como a produção de carboidratos e proteínas extracelulares. A análise morfológica demonstrou que houve fragmentação dos cloroplastos e variação no número de pirenóides com o envelhecimento da cultura. O esgotamento de fosfato na menor concentração (5  $\mu\text{M}$ ) ocorreu ainda durante a primeira semana e após 15 dias na maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ). A depleção de fosfato limitou o crescimento e correlacionou-se com a diminuição da relação clorofila/célula, confirmando as observações morfológicas. As taxas de excreção de carboidratos aumentaram com a entrada da cultura na fase estacionária de crescimento, ao contrário das proteínas, cuja taxa de excreção foi constante durante o experimento. Os principais carboidratos extracelulares foram polissacarídeos compostos principalmente

por galactose, arabinose, ramnose, manose e/ou xilose, glicose e ácido galacturônico. Esses polissacarídeos receberam contribuição da dissolução das paredes celulares que, nesta Ordem (Volvocales) são ricas em glicoproteínas compostas por hidroxiprolina ligada principalmente à galactose e arabinose (“perophorins”), porém os demais componentes indicaram a produção de outro(s) polissacarídeo(s) extracelular(es), rico(s) principalmente em ácido galacturônico.

Palavras-chave: fosfato, polissacarídeos, crescimento, *Chloromonas*, cultivo.

## D. ABSTRACT

Natural lakes show a large range of productivity and phosphorus, especially phosphate, is the main nutrient to determine trophic status in most of freshwater environments. Nutrient sources and availability influence algal growth because of their significance in photosynthesis and physiological processes. Dissolved organic matter (DOM), mainly polysaccharides, is released by phytoplanktonic cells during all growth phases and the rate of such release depends on physiological and environmental conditions. Heterotrophic organisms, such as planktonic bacteria, use these carbon rich compounds and increase interspecific associations, in which phytoplanktonic species could be benefited by microbial re-mineralization of essential nutrients. The aim of this work was to describe the phosphate availability influence on the morphology, growth and release of organic compounds by a subtropical *Chloromonas* sp. (Volvocales – Chlorophyceae). This strain was isolated from an oligo-mesotrophic pond in the extreme south of Brazil (Rio Grande - RS). Experimental cultures were carried out in triplicates and in two phosphate availability (5 and 50  $\mu\text{M}$ ). Samples were taken at 72-hours intervals until growth establishment (stationary phases), in order to analyze the following parameters: cell morphology, growth (cell density and chlorophyll content), extracellular carbohydrate (phenol-sulfuric and PAD-HPLC) and protein (Folin) content, besides phosphate decay (colorimetric assay). Our results showed a significant influence of phosphate availability on *Chloromonas* sp. morphology and growth, as well as on the production of extracellular carbohydrates and proteins. Morphological analysis showed chloroplast fragmentation and also reduction on the pyrenoid number with culture aging. Phosphate was exhausted during the first week of cultivation in the lower availability (5  $\mu\text{M}$ ) and after 15 days in higher availability (50  $\mu\text{M}$ ). Phosphate depletion was correlated to the growth limitation and to the decrease of the chlorophyll content per cell, confirming morphological observation. Rates of carbohydrate release increased when stationary growth was reached, in contrast to protein release rates, which were constant during the whole experiment. Polysaccharides were the main classis of extracellular carbohydrates produced by *Chloromonas* sp. and they were composed mainly by galactose, arabinose, rhamnose, mannose and/or xylose, glucose and galacturonic acid. Such polysaccharides were, in part, derived from the dissolution of cell wall, which in this Order (Volvocales) are rich in glycoproteins composed of hydroxiprolin linked mainly to galactose and arabinose (pherophorins). However, the

others components indicated the production of more than one polysaccharide, probably composed of galacturonic acid.

Key words: phosphate, polysaccharides, *Chloromonas*, growth, culture.

## 1) INTRODUÇÃO

Os lagos naturais apresentam uma ampla variação na produtividade, dependendo principalmente das entradas externas e regeneração de nutrientes nestes ambientes. O fósforo é o elemento de contribuição mais importante para a fertilidade na maioria dos lagos, sendo que baixos níveis deste elemento limitam a produção nesses sistemas. Um estudo sobre a taxa de crescimento e produção do fitoplâncton no Lago Tanganica evidenciou que a limitação de macronutrientes ocorreu durante o período estudado, e a limitação de fósforo foi mais importante que a limitação de nitrogênio (Stenuite *et al.*, 2007; Ricklefs, 2003). Nos pequenos lagos do “Canadian Shield” (Platô Laurenciano), a produtividade aumentou significativamente em resposta à adição experimental de fósforo, enquanto um aumento nos teores de nitrogênio e carbono não produziu os mesmos efeitos. No experimento, a região que foi fertilizada com sacarose e nitrato não apresentou qualquer mudança na produção orgânica; já a outra região, separada da primeira por uma cortina de plástico, recebeu fósforo, além de carbono e nitrogênio, e ficou coberta por uma forte floração de cianobactérias após dois meses. Além disso, o fósforo é um grande constituinte dos ácidos nucleicos, das membranas celulares e dos sistemas de transferência de energia (Ricklefs, 2003). A função do fósforo no metabolismo das algas é relatada em vários estudos, nos quais este elemento é frequentemente limitante para o crescimento.

A influência da disponibilidade de fósforo no crescimento e na alocação de carbono em *Scenedesmus subspicatus* mostrou que, em elevadas concentrações de fósforo, houve um aumento rápido na densidade celular até a fase estacionária. Já em baixa concentração, a biomassa ao final do crescimento exponencial foi menor e, além disso, a concentração de fósforo intracelular mostrou-se relacionada diretamente com a disponibilidade externa, sendo também elevada em altas disponibilidades deste elemento. A relação carboidrato:proteína aumentou nas culturas com baixa disponibilidade de fósforo, isto é explicado porque a depleção deste elemento promoveu uma mudança na alocação de carbono, aumentando ambas as taxas de produção de carboidratos e lipídios (Sigeo *et al.*, 2007).

Um estudo comparativo sobre a resposta fisiológica para o fósforo em dois fenótipos, colonial e unicelular, de *Microcystis* formadores de florações, mostrou que a quantidade de fósforo por célula foi geralmente maior em amostras predominantemente coloniais do que unicelulares (Shen & Song, 2007). Além disso, o consumo de fósforo foi menor nas colônias em relação ao fenótipo unicelular, indicando que a forma

unicelular requer mais fósforo para o crescimento. Os baixos valores de consumo e a elevada quantidade de fósforo por célula podem ser os fatores chave que determinam o sucesso das formas coloniais em condições de limitação do fósforo.

Os compostos que contém fósforo desempenham um papel muito importante em quase todas as fases do metabolismo, em particular na transformação energética associada com as reações de fosforilação na fotossíntese. O fósforo é requerido para a síntese de nucleotídeos, fosfatídeos, fosfoglicídeos e outros compostos fosforilados intermediários. Além disso, o fosfato se combina geralmente na forma de éster, formando enzimas de baixo peso molecular e vitaminas essenciais para o metabolismo algal. As taxas de absorção de fósforo estão diretamente correlacionadas com a presença de íons e compostos da água, como o potássio, e também com a disponibilidade de micronutrientes e compostos orgânicos (Wetzel, 1981).

Nos ambientes aquáticos continentais o fósforo apresenta-se sob forma de fosfato, tendo origem de fontes naturais ou artificiais. Dentre as fontes naturais, as rochas da bacia de drenagem constituem a fonte básica de fosfato para os ecossistemas aquáticos continentais; outros fatores naturais que permitem aporte de fosfato são o material particulado presente na atmosfera e o fosfato resultante da decomposição de organismos de origem alóctone. As fontes artificiais mais importantes são esgotos domésticos e industriais, fertilizantes agrícolas e material particulado de origem industrial contido na atmosfera (Esteves, 1998).

O crescimento de uma população de microalgas é resultado de interações entre fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão principalmente relacionados às próprias taxas metabólicas das espécies, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal, enquanto que os fatores físico-químicos são principalmente a luz, a temperatura e a disponibilidade de nutrientes. Um estudo da periodicidade do plâncton em uma pequena lagoa com *Dinobryon sertularia* como uma das espécies dominantes, mostrou que as populações de *D. sertularia* foram inversamente relacionadas com as concentrações de fosfato e nitrogênio inorgânico. Este aumento da biomassa está relacionado com a utilização dos nutrientes no metabolismo das algas, principalmente para fotoassimilação de carbono e crescimento (Lehman, 1976). A quantidade e a qualidade dos nutrientes disponíveis no meio afetam o crescimento algal, pois influenciam a taxa de produção fotossintética, e para um crescimento saudável, as microalgas requerem uma série de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Meinerz, 2004).



Os membros da Classe Chlorophyceae apresentam uma grande variedade de níveis de organização, variando desde flagelados livres, unicelulares ou coloniais, passando por espécies cocóides, palmelóides, multicelulares (filamentosas ou talosas) e também sifonadas (multinucleadas) (van den Hoek *et al.*, 1995). A grande maioria das Chlorophyceae habita preferencialmente lagos mesotróficos ou eutróficos e são cosmopolitas, devido à dispersão pelo vento. Os principais representantes das Chlorophyceae lacustres pertencem às Ordens Chlorococcales (*Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Pediastrum*) e Volvocales (*Chlamydomonas*, *Eudorina*, *Volvox*) (Esteves, 1998).

Os organismos pertencentes à Ordem Volvocales são sempre flagelados na fase vegetativa, podendo ser unicelulares ou coloniais. A grande maioria das Volvocales ocorre em ambientes aquáticos, mas há espécies terrestres e poucas formas marinhas, sendo que ainda há um número limitado de espécies que ocorrem na neve. Águas superficiais com elevados níveis de nutrientes (nitrato, amônio, fosfato) são frequentemente ricas em Volvocales, porém há também muitas formas especialistas que são restritas a águas pobres em nutrientes e acidificadas (van den Hoek *et al.*, 1995). As algas verdes encontradas na neve, *Chloromonas tughillensis* e *Chloromonas chenangoensis* apresentam comportamentos diferentes a respeito do crescimento, sendo que as mudanças no pH afetam as taxas de divisão celular, e as espécies respondem diferentemente a estas mudanças. *Chloromonas tughillensis* apresenta um pH ótimo de crescimento próximo de 5,3; enquanto populações de *Chloromonas chenangoensis* crescem melhor em condições mais alcalinas (pH > 7,0) (Hoham *et al.*, 2007).

Morita *et al.* (1999) evidencia a função dos pirenóides no mecanismo de concentração do gás carbônico, comparando a morfologia, fisiologia e a análise molecular filogenética de duas linhagens de *Chlamydomonas* e *Chloromonas* (Volvocales). No estudo realizado, uma das importantes constatações foi que a matriz dos pirenóides das duas espécies exibe uma maior concentração de moléculas de Rubisco em relação à região dos tilacóides (tilacóide e estroma); entretanto, a densidade de moléculas de Rubisco nas matrizes dos pirenóides foi baixa comparada com às outras espécies de *Chlamydomonas* examinadas e de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Os pirenóides têm sido sugeridos como sendo um dos fatores fundamentais para a elevada afinidade por CO<sub>2</sub> na fotossíntese algal, denominada de mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub>.

As células da Ordem Volvocales em geral possuem ao seu redor um envelope de glicoproteína, composto principalmente de hidroxiprolina, mas com galactose, arabinose, manose e resíduos de glicose aderidos. Em algumas espécies representativas da Classe o envelope de glicoproteína é vestigial, sendo que tais células flageladas parecem estar nuas. Paredes contendo celulose nunca estão presentes (van den Hoek *et al.*, 1995). As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina são componentes estruturais da parede celular, resultando em mais de 10 – 20 % do peso seco. Estes compostos estão implicados em todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo respostas ao estresse ambiental. A hidroxiprolina ligada a açúcares, que é restrita a algas verdes e plantas, ocorre em duas formas distintas, ligada à arabinose ou galactose. A hipótese da contigüidade da hidroxiprolina, proposta para plantas superiores, prediz que a arabinolização ocorre em resíduos de hidroxiprolina contíguos adjacentes e a galactolização em resíduos hidroxiprolina não adjacentes (Hallmann, 2006). A arabinolização envolve a ligação de homoligossacarídeos lineares alcançando de um a quatro resíduos de arabinose. A hidroxiprolina arabinolizada aumenta com a contigüidade da hidroxiprolina (Kieliszewski & Shpak, 2001).

Substâncias orgânicas são liberadas pelas células fitoplanctônicas durante todas as fases de crescimento. Carboidratos, especialmente polissacarídeos, muitas vezes compreendem 80 – 90 % do total do material excretado (Myklestad, 1995). A excreção de matéria orgânica dissolvida pelo fitoplâncton tende a ser preferencialmente um processo passivo do que um processo ativo. Porém, pelo menos a liberação de polissacarídeos extracelulares é um processo ativo envolvendo vesículas do Golgi (Bjørnsen, 1988; Domozych & Domozych, 1993; Domozych *et al.*, 2007). A liberação de compostos simples, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, a partir de células em crescimento ativo, provavelmente ocorre em sua maior parte por difusão através da membrana. As taxas de liberação dependem do gradiente de concentração da substância através da membrana, e da permeabilidade constante desta em relação ao composto. Embora também seja possível a excreção ativa de pequenos compostos, não há provas convincentes de que nas algas se efetue este processo. As moléculas grandes como polissacarídeos, proteínas e substâncias polifenólicas, provavelmente são excretadas por meio de complicados processos, tais como a fusão da membrana com as vesículas intracelulares que contém tais compostos. As taxas de liberação extracelular dependem de fatores fisiológicos e ambientais que afetam a

permeabilidade da membrana e das concentrações intracelulares das células fitoplanctônicas (Wetzel, 1981; Vieira & Myklestad, 1986; Giroldo & Vieira, 2002).

A liberação extracelular de compostos orgânicos representa em primeiro lugar uma perda significativa de carbono fixado na fotossíntese. Em segundo lugar, a liberação de tais compostos orgânicos é sem dúvida muito mais importante do que parece, uma vez que atua modificando o crescimento, a conduta dos organismos e a dinâmica sucessional das populações de algas (Wetzel, 1981).

A produção de carboidratos extracelulares em culturas de *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae) demonstrou que a galactose é o monossacarídeo mais importante, sendo que a manose, glicose, xilose e arabinose foram encontradas em grandes quantidades, porém o conteúdo de ramnose foi muito baixo. Os polissacarídeos extracelulares encontrados em algumas espécies de diatomáceas marinhas contêm somente galactose, ramnose e fucose. Em algumas espécies de algas verdes os polissacarídeos extracelulares contêm galactose e arabinose em maiores proporções, enquanto que xilose, glicose, fucose, ramnose, manose e ácidos urônicos foram menos representativos (Vieira & Myklestad, 1986).

Os monossacarídeos muitas vezes presentes em polissacarídeos produzidos por Chlorophyceae são: galactose, xilose, arabinose, fucose, ramnose e manose. Na composição dos monossacarídeos das algas verdes, tais como nas desmídias *Spondylosium panduriforme* e *Hyalotheca dissiliens* encontrou-se a presença de açúcares como arabinose, fucose, xilose, galactose, glicose, ácido glucurônico e ramnose (Paulsen *et al.*, 1998).

O decréscimo e/ou limitação de nitrogênio e fósforo conduz as populações fitoplanctônicas a assumirem uma redução no crescimento, inibindo ou reduzindo a citocinese enquanto a fotossíntese é ainda ativa. A combinação de limitação de nutrientes e saturação de luz produz um excesso de fotoassimilação de carbono (Fogg, 1983). A alocação deste excesso ou realocação interna dos depósitos de carbono aumenta a produção de carboidratos e outras moléculas ricas em carbono como lipídios e ácidos orgânicos (Mayzaud *et al.*, 1989; Myklestad, 1995; Biddanda & Benner, 1997).

Segundo Giroldo e Vieira (2005), a maioria dos carboidratos liberados por três espécies fitoplanctônicas tropicais estava presente na forma polimérica, embora tanto carboidratos livres como poliméricos tenham sido produzidos em níveis capazes de sustentar populações bacterioplanctônicas. Organismos heterotróficos, incluindo populações de bactérias, usam compostos ricos em carbono e incrementam as

associações interespecíficas na região influenciada pelo carbono orgânico liberado pelo fitoplâncton conhecida como “fiosfera” (Bell & Mitchell, 1972; Bell & Sakshaug, 1980). Em tal associação, microalgas podem se beneficiar pela mineralização de nutrientes essenciais (Wood & Van Valen, 1990; Azam & Smith, 1991). Um exemplo de uma associação mais estreita, na qual ambos os organismos tiram proveito, é o caso de bactérias que se fixam aos heterocitos de espécies de *Anabaena* (Cyanobacteria) e utilizam substâncias ricas em compostos nitrogenados excretadas pela cianobactéria. O metabolismo das bactérias, em reciprocidade, provoca redução localizada de O<sub>2</sub>, o que incrementa a função da nitrogenase nos heterocitos, capacitando a cianobactéria a fixar N<sub>2</sub>, mesmo em ambientes com altas concentrações de O<sub>2</sub> (Paerl, 1978).

A excreção de substâncias ricas em energia parece ser comum em células fitoplanctônicas. Isto tem sido considerado como paradoxal para o fitoplâncton no oceano aberto, devido ao estímulo do crescimento de bactérias que são capazes de competir com o fitoplâncton por nutrientes (Wood & Van Valen, 1990; Passow *et al.*, 1994). Azam *et al.* (1983) relatam que a dinâmica da ação da alça microbiana (“microbial loop”) é resultado de várias interações ecológicas relacionadas: comensalismo, competição e predação. O comensalismo ocorre na produção da matéria orgânica dissolvida (MOD) pelo fitoplâncton e utilização pela bactéria. A produção de MOD é influenciada pela disponibilidade de nutrientes minerais e a competição por tais nutrientes é encontrada entre o fitoplâncton e as bactérias, gerando uma regulação deste processo tanto pelas condições de crescimento das algas, como pela disponibilidade de substratos orgânicos para o crescimento bacteriano. A predação por microflagelados em bactérias influencia o efeito da competição mencionado acima, sendo que a regeneração de nutrientes minerais como resultado da predação produziria uma retroalimentação (“feedback”) de alguns fluxos de material dentro da alça microbiana. Adicionalmente é preciso considerar que a natureza da associação entre o fito e o bacterioplâncton extrapola a relação comensalista e competitiva, caracterizando-se frequentemente como cooperativa (Giroldo *et al.*, 2007).

O fitoplâncton quando submetido à limitação de fósforo libera uma elevada quantidade de compostos extracelulares na fase exponencial, que não é utilizada eficientemente pelas bactérias heterotróficas. Então, um grande estoque de compostos orgânicos liberados pelo fitoplâncton e bactérias pode se acumular na coluna da água (Obernosterer & Herndl, 1995). O fitoplâncton também pode excretar moléculas que não são diretamente utilizadas pelos microheterótrofos, muitas destas moléculas são

inicialmente hidrolisadas em moléculas menores para depois serem absorvidas pelos microorganismos. Isto enfatiza o significado ecológico da atividade exoenzimática em sistemas marinhos como a área costeira da Bélgica (Lancelot, 1984).

Embora diversas funções tenham sido já propostas e documentadas para a excreção de matéria orgânica dissolvida pelo fitoplâncton, a complexidade exibida por alguns compostos, como muitos polissacarídeos extracelulares, continua ainda sendo uma questão paradoxal. O entendimento deste processo, importante como subsídio para o conhecimento dos processos ecológicos e evolutivos do ambiente planctônico, passa necessariamente pela realização de estudos mais aprofundados e em organismos de grupos taxonômicos os mais variados possíveis.

Considerando os aspectos teóricos apresentados até o momento, é possível formular pelo menos três hipóteses de trabalho: (1) o padrão de crescimento em culturas de *Chloromonas* sp. será alterado em função da disponibilidade de fosfato; (2) o cultivo de *Chloromonas* sp. em limitação de fosfato aumenta a taxa de excreção de carboidratos por célula; (3) os polissacarídeos extracelulares produzidos por *Chloromonas* sp. serão compostos principalmente por arabinose e galactose.

## **2) OBJETIVOS**

Este trabalho visa verificar a influência da disponibilidade de fosfato em diferentes aspectos fisiológicos e morfológicos de *Chloromonas* sp. As taxas de crescimento, de utilização de fosfato, de liberação de carboidratos e proteínas dissolvidas serão determinadas, bem como será caracterizada preliminarmente a composição dos carboidratos extracelulares produzidos por *Chloromonas* sp. quando cultivada em duas disponibilidades de fosfato. Além disso, alguns aspectos morfológicos serão observados durante o crescimento como parede celular, cloroplastos e pirenóides.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1) Organismo e condições de cultivo

O organismo utilizado foi uma linhagem subtropical não axênica de *Chloromonas* sp. (Chlorophyceae) (Fig. 1), isolada de um lago cuja tipologia trófica oscila durante o ano entre oligotrófico e mesotrófico (Furlanetto, 2006) e está localizado no campus Carreiros da FURG 32° 01' 44" S e 52° 05' 40" W (Rio Grande, RS).

Segundo Furlanetto (2006) este lago (Lago Polegar) teve sua origem por alagamento pluvial devido à remoção de areia para utilização como aterro na construção dos prédios da referida universidade, possui uma área em torno de 10.000 m<sup>2</sup>, em seu entorno ocorrem pequenos bosques de *Pinus* sp. e *Acacia* em margens opostas, sendo que a vegetação aquática predominante é da macrófita enraizada *Nymphoides indica*, a profundidade máxima do lago não ultrapassa 1,5 m durante todo ano (Fig. 2). Esta cepa está sendo mantida na Coleção de Culturas de Microalgas Dulcícolas do Laboratório de Botânica Criptogâmica – Departamento de Ciências Morfo-Biológicas – Fundação Universidade Federal do Rio Grande (CCMD-FURG). As culturas estão sendo mantidas em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972), em uma incubadora FANEM com temperatura controlada ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 14:10 h claro:escuro e com irradiância de aproximadamente  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$  (Fig. 3). Os cultivos experimentais foram realizados em duas disponibilidades de fosfato baseadas na definição do meio WC (Tabela 1): 50  $\mu\text{M}$  (WC completo) e 5  $\mu\text{M}$  (WC reduzido) em triplicata. Os cultivos foram mantidos em uma sala de cultivo no Laboratório de Limnologia – DCMB – FURG, nas mesmas condições dos inóculos.

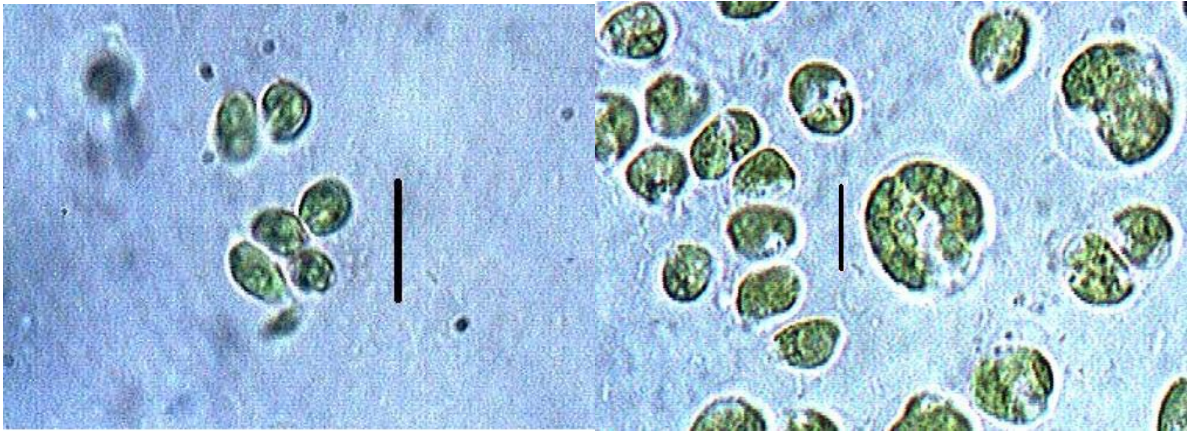


Figura 1 – Células vivas em diferentes estágios de divisão celular de *Chloromonas* sp. (Volvocales – Chlorophyceae), após sete dias de cultivo em meio WC. Aumento de 1000 X. A barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.



Figura 2 – Foto do Lago Polegar localizado no Campus Carreiros – FURG – Rio Grande – RS.

Tabela 1 – Composição do meio WC utilizado no cultivo de *Chloromonas* sp.

Reagentes	(mg/L)
CaCl <sub>2</sub>	36,8
MgSO <sub>4</sub>	37
NaHCO <sub>3</sub>	12,6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7
NaNO <sub>3</sub>	85
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	28,4
Micronutrientes	(mg/L)
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36
FeCl <sub>3</sub>	3,15
CuSO <sub>4</sub>	0,010
ZnSO <sub>4</sub>	0,022
CoCl <sub>2</sub>	0,010
MnCl <sub>2</sub>	0,018
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0006
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
Vitaminas	(mg/L)
Tiamina	0,1
Biotina	0,0005
B12	0,0005



Figura 3 – Foto dos inóculos na incubadora no Laboratório de Botânica Criptogâmica – DCMB – FURG.



### 3.2) Experimento I:

Inicialmente foram preparados os inóculos, adicionando cerca de 2 mL de um inóculo concentrado ( $10^7$  cel/mL aproximadamente) da CCMD-FURG, em dois frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio WC. Após um período aproximado de três semanas iniciou-se um processo para eliminar as reservas intracelulares de fósforo, bem como o fosfato extracelular remanescente nos inóculos, conhecido com “starvation” ou esgotamento.

O processo do “starvation” consiste no crescimento das culturas em meio WC sem fósforo por um período de tempo até o esgotamento das reservas nutricionais, principalmente nitrogênio e fósforo.

Na preparação do “starvation”, os inóculos foram colocados em tubos de polipropileno cônicos de centrifuga (tubos Falcon) e centrifugados utilizando uma centrifuga marca Sigma 2K15, por um tempo de 5 minutos a 2000 rpm. Logo após foi retirado o sobrenadante e mantido as células precipitadas no fundo. O precipitado foi lavado quatro vezes com 50 mL de WC P0 (sem fosfato) e ressuspendidas em 250 mL de WC P0. Esta cultura foi mantida nas condições experimentais por sete dias, pois testes preliminares indicaram que este período provoca a estabilização do crescimento e manutenção da densidade celular, indicando esgotamento das reservas nutricionais, inclusive de fósforo.

Durante o período de “starvation”, as culturas experimentais foram preparadas em seis frascos Erlenmeyers de 500 mL, com 250 mL de WC: três com WC 50  $\mu$ M de fosfato (completo) e três com WC 5  $\mu$ M de fosfato (reduzido). Usando tubos Falcon de 50 mL foram inoculados 30 mL da cultura esgotada nutricionalmente em cada Erlenmeyer de 500 mL.

Dessas culturas foram retiradas amostras de 20 mL a cada sete dias, incluindo o tempo zero, para a realização das seguintes análises:

- 3,5 mL foram fixados com lugol e utilizados para a observação da morfologia celular dos organismos no microscópio binocular marca Olympus – modelo CX41F.
- O restante foi mantido com as células vivas para observação e registro fotográfico imediato da espécie em diferentes fases de crescimento.

### **3.3) Experimento II:**

Para a determinação da produção de compostos orgânicos excretados pelas células, foram preparados inóculos em dois Erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio WC. Após o crescimento dos inóculos, as culturas experimentais foram elaboradas nas mesmas condições do primeiro experimento.

Durante um período de 48 a 72 horas foi realizada uma amostragem de 20 mL de cada cultura para as seguintes análises: 2 frações de 1 mL foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 RPM para dosagem do teor de carboidratos e proteínas totais dissolvidas, 4 mL foram fixados com lugol para determinação da densidade celular, 10 mL foram centrifugados por 5 minutos a 5000 RPM para determinação do teor de clorofila-a (precipitado), teor de fosfato dissolvido (sobrenadante) e composição dos carboidratos extracelulares (sobrenadante).

### **3.4) Análises**

#### **3.4.1) Morfologia Celular**

Na análise da morfologia de *Chloromonas* sp. foram observadas alíquotas de células vivas e células fixadas em lugol.

As observações das estruturas celulares como cloroplastos e pirenóides foram realizadas em aumento de 1000X, com o auxílio de um microscópio binocular marca Olympus – modelo CX41F, acoplado a uma câmera de captura de imagem marca Moticam 2000 e as imagens foram transferidas para um computador modelo AMD 64 – ATHLON, utilizando os softwares Motic McCamera e Motic Image.

#### **3.4.2) Densidade Celular**

Para a contagem das células utilizou-se um hemocitômetro de Neubauer e um microscópio binocular marca Studar<sup>lab</sup> com aumento de 100x.

Na determinação da densidade celular foi selecionada uma amostra fixada em lugol de cada cultura em diferentes disponibilidades de fosfato, sendo que uma alíquota de cada frasco foi transferida para a câmara de Neubauer. Para cada frasco foram feitas três réplicas e contados doze quadrantes em cada área diferente da câmara (inferior e superior).

O número de células por mL foi obtido através da seguinte fórmula:

$$= (n^{\circ} \text{ de células} / 0,75) \times 10000$$

### **3.4.3) Teor de Clorofila-a:**

A análise da clorofila-a presente nas amostras foi obtida a partir do precipitado contido nos tubos Falcon de 10 mL após a centrifugação. Na capela do Laboratório de Limnologia – DCMB – FURG, foi acrescentado 10 mL de metanol em cada amostra, as mesmas foram agitadas por alguns segundos e envolvidas em papel alumínio e reservadas no freezer durante um período de 12h.

No dia posterior, as amostras foram centrifugadas por um período de 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro marca Quimis, usando um comprimento de onda de 665 nm.

A concentração da clorofila-a (mg/L) foi determinada pela equação descrita por Mackinney (1951) usando-se a seguinte fórmula:

$$Cla = \text{Absorbância} \times 12,63 \times \text{Vol. Metanol (mL)} / \text{Vol. Centrifugado (mL)}$$

### **3.4.4) Teor de carboidratos totais dissolvidos:**

Para a determinação das concentrações de carboidratos totais usou-se o método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Foi retirada uma alíquota de 1 mL das amostras e transferida para um eppendorf, o qual foi centrifugado por um período de 5 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e o precipitado (“pellet”) foi reservado no eppendorf.

Para a determinação dos carboidratos extracelulares, na capela do Laboratório de Limnologia, adicionou-se 0,5 mL de fenol 4 % e 2,5 mL de ácido sulfúrico ao sobrenadante contido nos tubos de ensaio, agitou-se de 10 a 15 segundos e se aguardou por trinta minutos. Logo após, o sobrenadante com os reagentes foi analisado no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 475 nm.

Os valores obtidos na leitura do espectrofotômetro para os carboidratos extracelulares foram transformados em mg/L pela comparação com uma reta padrão utilizando glicose como referência.

Os carboidratos presentes nas amostras foram analisados por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um detector de pulsos amperométricos (HPLC-

PAD), sendo que estas análises foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos – SP e a metodologia será detalhada abaixo.

#### **3.4.5) Caracterização dos carboidratos dissolvidos:**

As análises por cromatografia líquida (HPLC-PAD) foram realizadas no Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos – SP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira.

As amostras utilizadas para a análise compreendem respectivamente a fase estacionária e a fase exponencial de crescimento, sendo que foram analisadas duas frações: carboidratos livres (CL), que incluem os monossacarídeos e dissacarídeos livres dissolvidos, e carboidratos poliméricos (CP), como 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 & Kaplan, 1997), antes de serem injetados no cromatógrafo, enquanto que as amostras para análise dos carboidratos livres (CL) foram injetadas diretamente em 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 para identificação e quantificação por HPLC-PAD foi descrita por Wicks *et al.* (1991) e Mopper *et al.* (1992) com modificações de Jørgensen & Jensen (1994) e de Gremm & Kaplan (1997). O eluente para a separação dos monossacarídeos foi NaOH 16 mM e para recuperação da coluna foi NaOH 200 mM em um fluxo de 1 mL/min. A eluição dos ácidos urônicos foi realizada com a aplicação de um gradiente de acetato de sódio (partindo de 0 a 100 mM). A separação de xilose e manose não foi possível pela ausência de um sistema de injeção de base pós-coluna. 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 oito concentrações próximas as observadas nas amostras.

#### **3.4.6) Análise de proteínas totais dissolvidas:**

A dosagem de proteínas totais dissolvidas (Lowry *et al.*, 1951) foi realizada no sobrenadante de uma alíquota de 1 mL, que foi centrifugada de forma idêntica a

realizada para dosagem dos carboidratos dissolvidos. Foram preparadas duas soluções: uma solução composta de 50 volumes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1N mais um volume de Tartarato de Sódio e Potássio 1% misturado em  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,5% (1:1), a outra solução foi composta de Folin Ciocalteau diluído em água destilada (1:3). Para cada 1 mL de amostra foram adicionados 5 mL da primeira solução, aguardando-se 10 minutos para a reação, logo após adicionou-se 0,5 mL da segunda solução. Em seguida, aguardou-se por um período de 30 minutos para a reação e realizou-se a leitura em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda 750 nm. Os valores obtidos na leitura do espectrofotômetro para as proteínas extracelulares foram transformados em mg/L pela comparação com uma reta padrão utilizando albumina bovina como referência.

#### **3.4.7) Análise do fosfato dissolvido:**

Na determinação do decaimento de fosfato foi utilizado o método descrito em Baumgarten *et al.* (1996). Esse método dosa o fósforo sob as suas formas de íons ortofosfatos, os quais reagem com o molibdato de amônio em meio ácido, formando o complexo fosfomolibdato, que é reduzido pelo ácido ascórbico, resultando num composto azul, cuja absorção máxima é a de 885 nm. Essa reação é catalisada pelo tartarato de antimônio e potássio. Os valores obtidos na leitura do espectrofotômetro foram transformados em mg/L pela comparação com uma reta padrão utilizando dihidrogênio fosfato de potássio como referência.

#### **3.4.8) Análise Estatística:**

Os dados obtidos com os experimentos foram analisados usando o software Origin 6.0, o que permitiu a construção de tabelas e gráficos.

Os resultados foram analisados estatisticamente aplicando-se ANOVA paramétrica e o teste de comparações múltiplas de Tukey, ANOVA não paramétrica e o teste de comparações múltiplas de Dunn, dependendo da representatividade da média (coeficiente de variação inferior a 15%). Foi utilizado também o teste “t” de Student para comparações com apenas duas médias. Todas as análises foram feitas utilizando o software Instat.

A parametrização matemática da remoção do fosfato e do decaimento de clorofila-a por célula durante o crescimento foi obtida a partir de um modelo matemático

que descreve a cinética do decaimento. Este modelo prevê que as taxas de reação são proporcionais às quantidades de reagentes e define uma constante de reação (K) cuja unidade é tempo<sup>-1</sup>. A equação que descreve o modelo é apresentada a seguir:

$$A_t = A_0 e^{-kt}$$

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 fósforo, e de decaimento de clorofila-a por célula, como parâmetros de comparação entre as diferentes disponibilidades de fosfato. As variações temporais das concentrações de fósforo extracelular e de teor de clorofila-a por célula foram utilizadas para as determinações dos coeficientes, durante a parametrização do modelo; para tanto se utilizou um método de regressão não linear (algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt), de acordo com Press *et al.* (1993).

## 4) RESULTADOS

### 4.1) Experimento I

#### 4.1.1) Morfologia celular:

A morfologia celular apresentou uma correlação com a disponibilidade de fosfato, evidenciando a influência do fósforo no metabolismo das células algais; principalmente na relação morfologia/crescimento. A linhagem de *Chloromonas* sp. usada neste estudo apresentou células globosas a elipsóides, com dois flagelos, parede celular delgada a um pouco ampla, cloroplasto único em forma de copo e parietal, com vários pirenóides. As células vivas quando observadas apresentaram movimentação ativa e quando em meio rico em fosfato suas dimensões foram maiores pelos processos de divisão celular mais acelerados do que no meio depletado.

Durante a realização do experimento em duas disponibilidades de fosfato, observou-se que ocorre uma variação na morfologia dos cloroplastos e na quantidade de pirenóides, permitindo estabelecer algumas características na estrutura das células.

Na cultura com menor disponibilidade de fosfato, a descaracterização dos cloroplastos e pirenóides começou a ocorrer já a partir de 14 dias de cultivo. A fragmentação dos cloroplastos e destruição dos pirenóides foi dependente do esgotamento dos nutrientes no meio e, portanto, ocorreu mais rapidamente no meio com menor disponibilidade de fosfato (Figuras 4 a 6).

No período inicial do cultivo em alta disponibilidade de fósforo (0 - 7 dias), os cloroplastos estão bem definidos, porém os pirenóides estão pouco evidentes. Já num período mais avançado do cultivo (14 – 21 dias), as células foram observadas em ativo processo de divisão celular, com pirenóides e cloroplastos evidentes. No final do cultivo (28 - 35 dias), devido ao esgotamento do fosfato, ocorre a fragmentação dos cloroplastos e uma menor evidência dos pirenóides (Figuras 7 a 9).

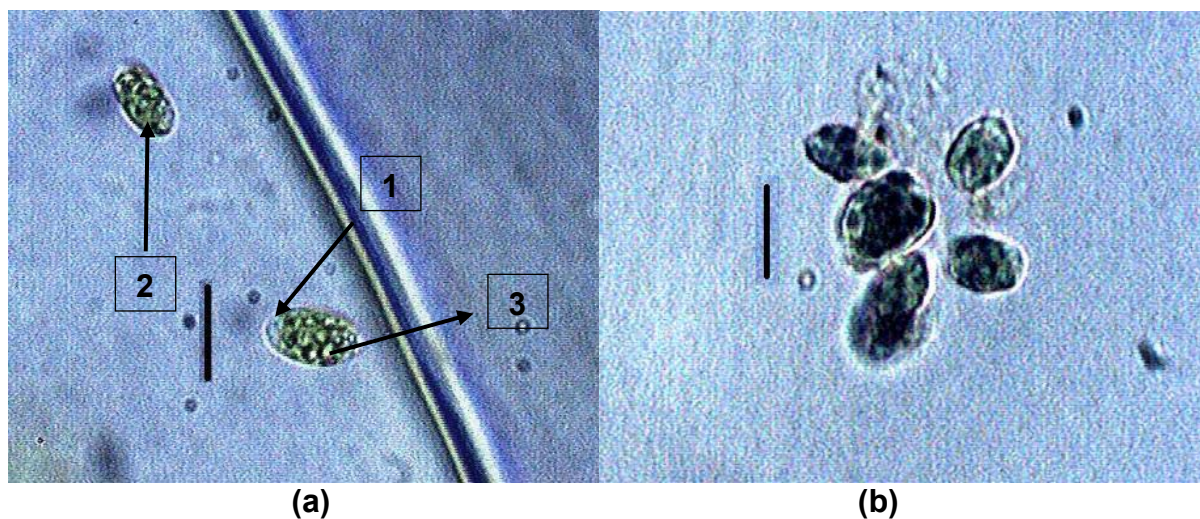


Figura 4 – *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período inicial do crescimento em meio depletado (5  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) parede celular, (2) cloroplastos, (3) pirenóides.

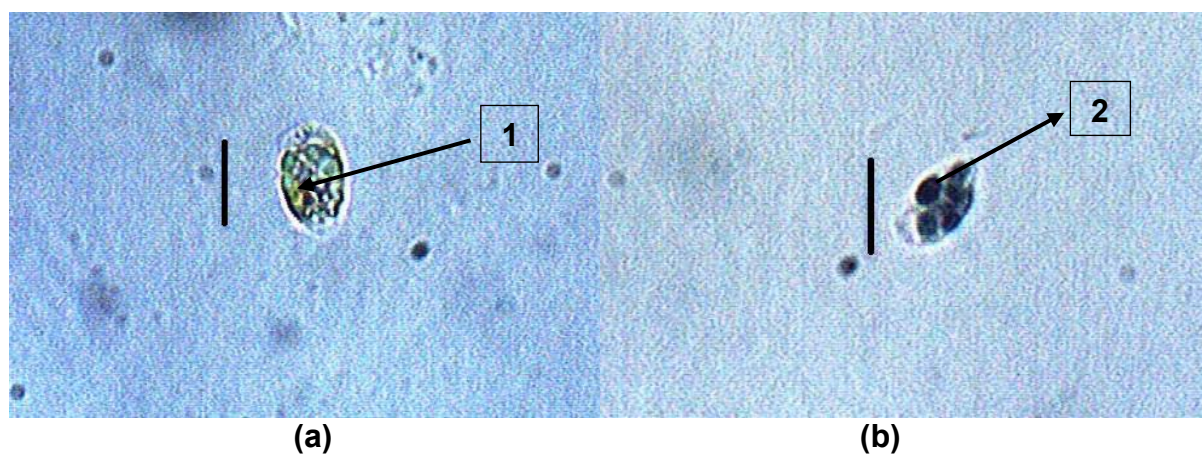


Figura 5 - *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período intermediário (14 dias) de crescimento em meio depletado (5  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplasto, (2) pirenóides.



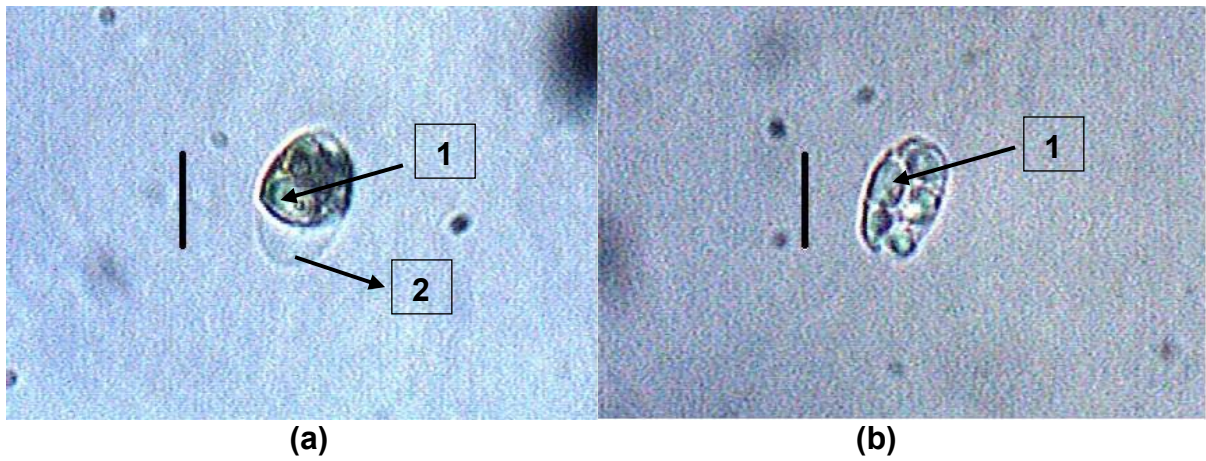


Figura 6 - *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período final (35 dias) de crescimento em meio depletado (5  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos, (2) parede celular.

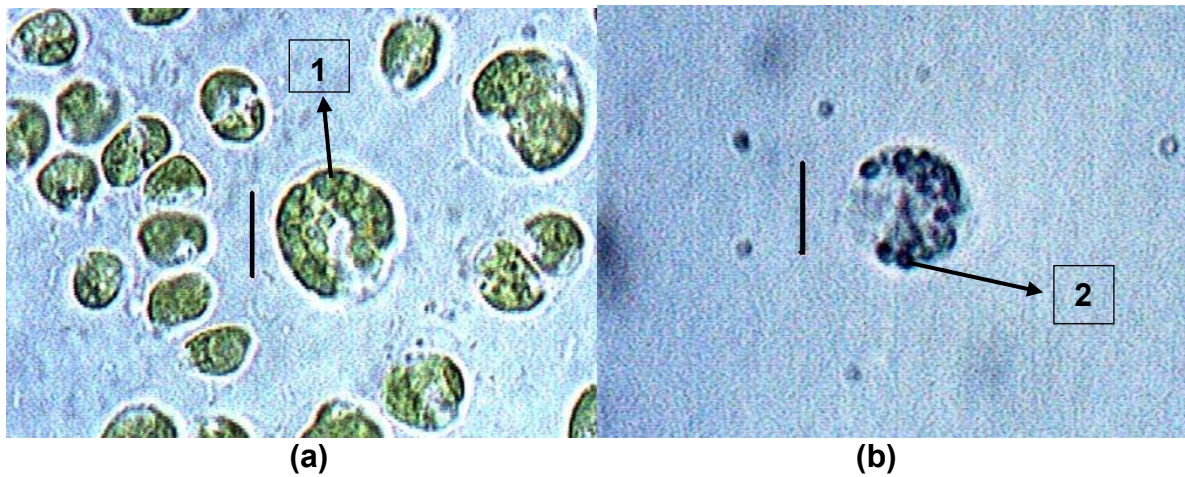


Figura 7 - *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período inicial (7 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos, (2) pirenóides.

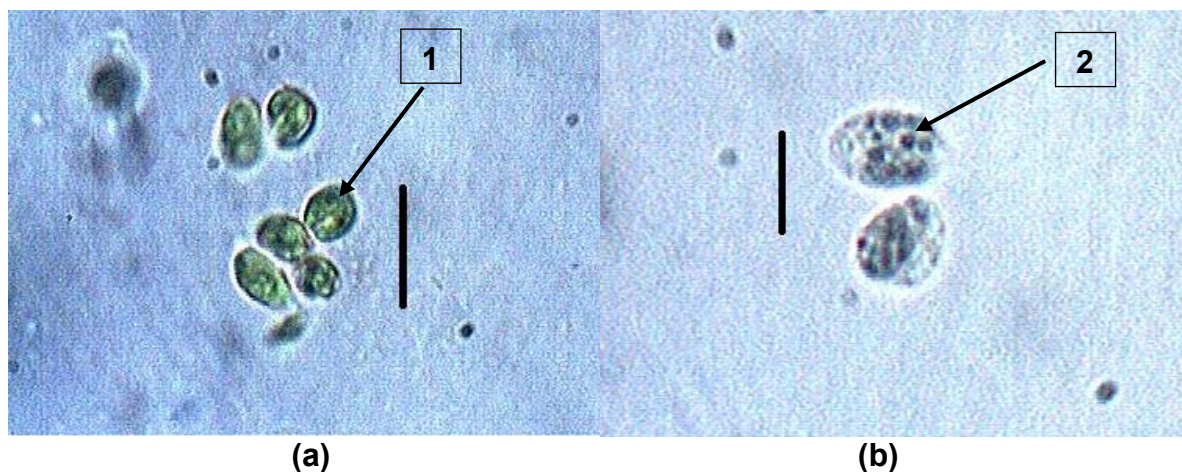


Figura 8 - *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período intermediário (21 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplasto, (2) pirenóides.

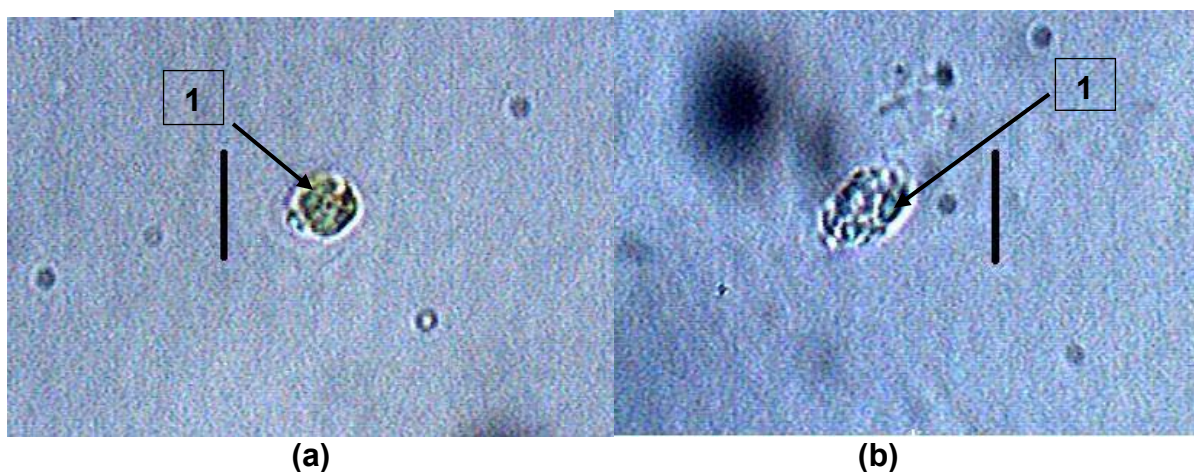


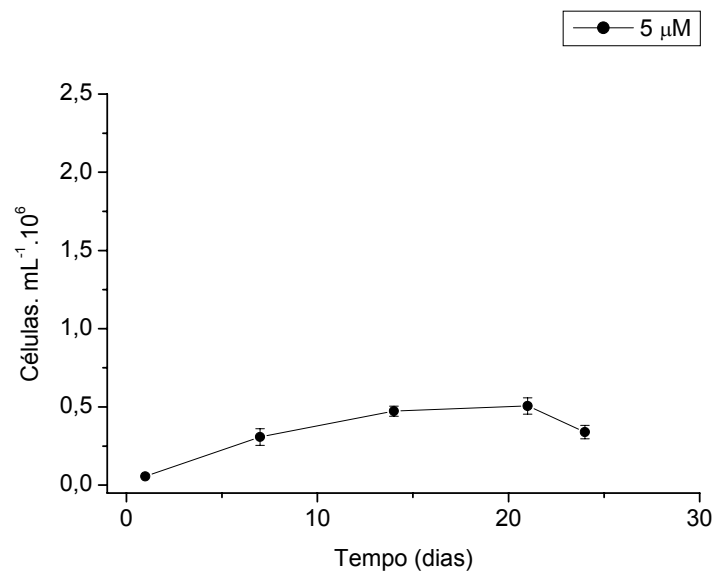
Figura 9 - *Chloromonas* sp. em aumento de 1000 X, mostrando a morfologia celular no período final (28 dias) de crescimento em meio completo (50  $\mu$ M): (a) células vivas, (b) células fixadas; (1) cloroplastos.

## 4.2) Experimento II

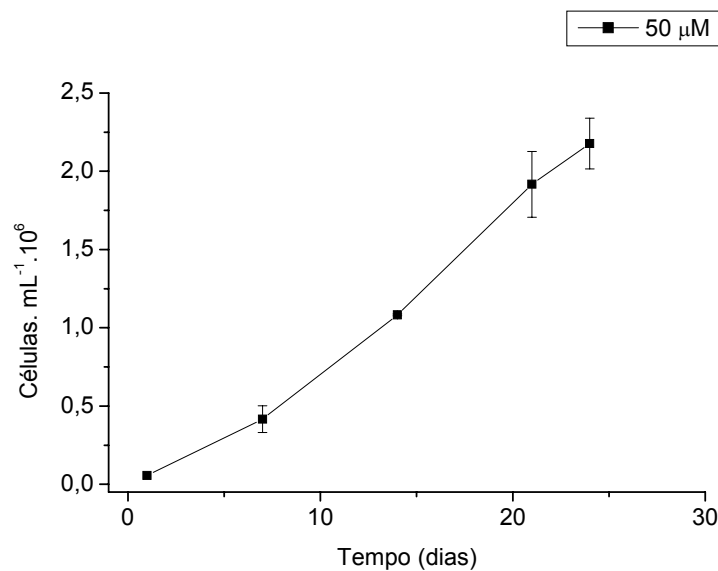
### 4.2.1) Crescimento celular:

A Figura 10 mostra o crescimento de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato 5  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. Na cultura com baixa concentração de fosfato (Fig. 10 A), a fase exponencial estabeleceu-se até o décimo quarto dia de cultivo, quando iniciou-se a fase estacionária que estendeu-se até o 21º dia com um valor médio de células de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células.  $\text{mL}^{-1}$ . A partir do 21º até 24º dia, houve uma

diminuição no crescimento com valores alcançando  $0,3 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup>, isto pode ser explicado pela limitação do fosfato. (ANOVA  $p < 0,0001$ , Tuckey  $0 < 7 < 14 = 21 > 24$ )



(A)

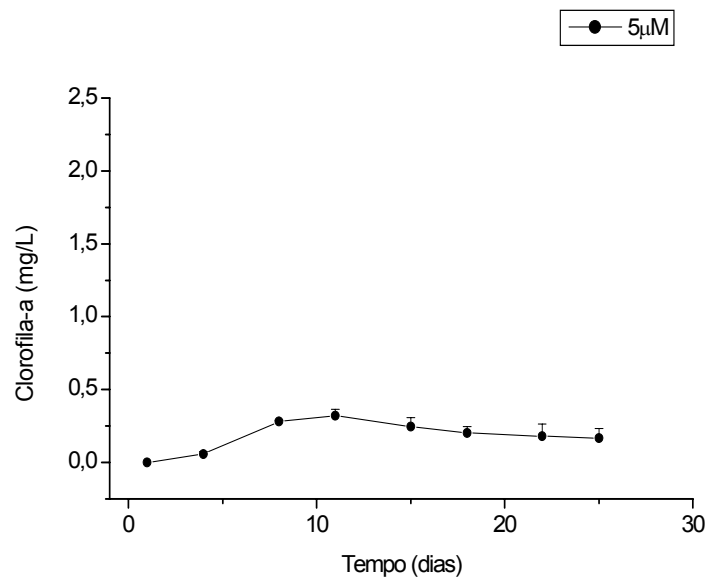


(B)

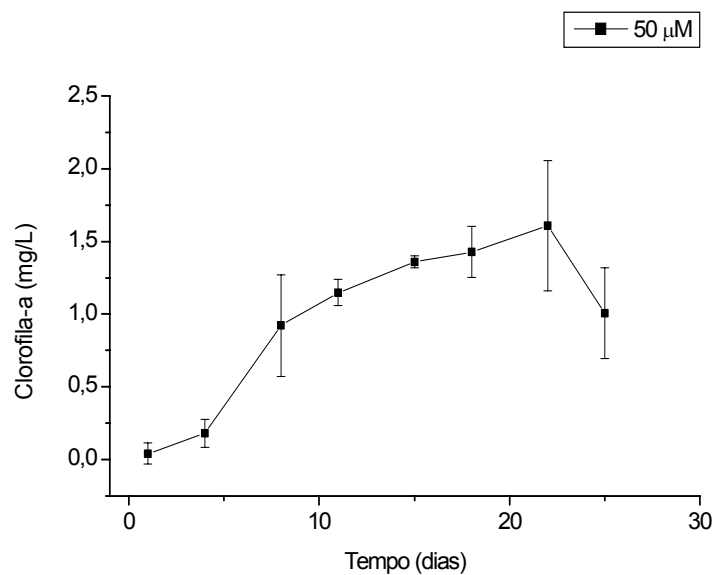
Figura 10: Densidade celular de *Chloromonas* sp. em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de fosfato : (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio-padrão.

A Figura 10 B mostra que as células quando submetidas à altas disponibilidades de fosfato apresentam um crescimento rápido. Este crescimento exponencial e constante foi observado do 1º ao 21º dia, a densidade celular apresentou uma ampla variação de aproximadamente 0,05 à  $2,1 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup>. A fase estacionária se estabeleceu a partir 21º dia, quando não houve mais variação significativa na densidade celular (ANOVA  $p < 0,0001$ ,  $0 < 7 < 14 < 21 = 24$ ).

As Figuras 11 A e B mostram que as densidade celulares observadas nas Figuras 10 A e B estão correlacionadas com os valores obtidos para clorofila-a, uma vez que as mesmas fases descritas anteriormente podem ser observadas nas Figuras 11 A e B .



(A)



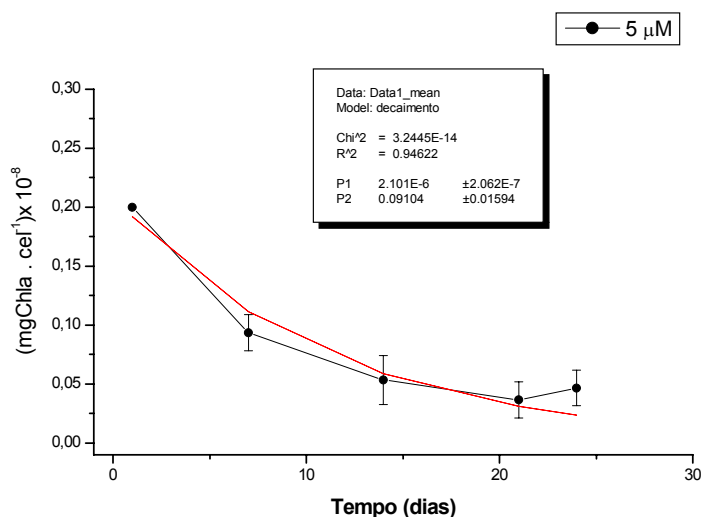
(B)

Figura 11: Concentração de clorofila-a de *Chloromonas* sp. em função do tempo de cultivo em meio preparado com duas concentrações de fosfato : (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio-padrão.

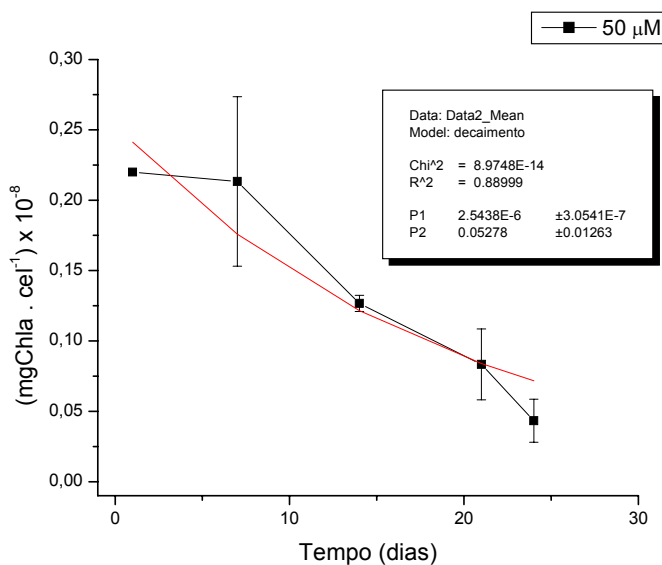
A Figura 12 mostra a relação clorofila-a por células de *Chloromonas* sp. nas duas disponibilidades de fosfato. Na cultura com baixa disponibilidade de fosfato (5 μM)

(Fig. 12 A) observa-se um rápido decaimento ( $k=0,09$ ), evidenciando a influência da disponibilidade de nutrientes na quantidade de pigmentos por célula.

Na alta disponibilidade de fosfato ( $50 \mu\text{M}$ ) (Fig. 12 B) verifica-se que a relação clorofila-a/célula apresenta um decaimento mais lento ( $k=0,05$ ) em comparação com a baixa disponibilidade nutricional, sendo que a quantidade de pigmento por célula diminui mais acentuadamente apenas quando as células param de se dividir, indicando a depleção nutricional.



(A)



(B)

Figura 12 – Relação concentração clorofila-a (mg) pelo número de células em função do tempo de cultivo de *Chloromonas* sp. mantidas em duas concentrações de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão.

A Tabela 2 mostra respectivamente a taxa intrínseca de crescimento ( $r$ ), a taxa de crescimento convertida para duplicações por dia ( $K$ ) e o tempo para biomassa ser duplicada ( $G$ ), calculada para a densidade celular em duas disponibilidades de fosfato:  $5 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ . A taxa intrínseca de crescimento foi maior para a cultura submetida à alta disponibilidade de fosfato ( $50\mu\text{M}$ ); conseqüentemente esta taxa se reflete no tempo para biomassa ser duplicada; na qual se observa que em baixa disponibilidade ocorre um maior tempo de duplicação, ao contrário da alta disponibilidade, em que há um menor tempo de duplicação das células.

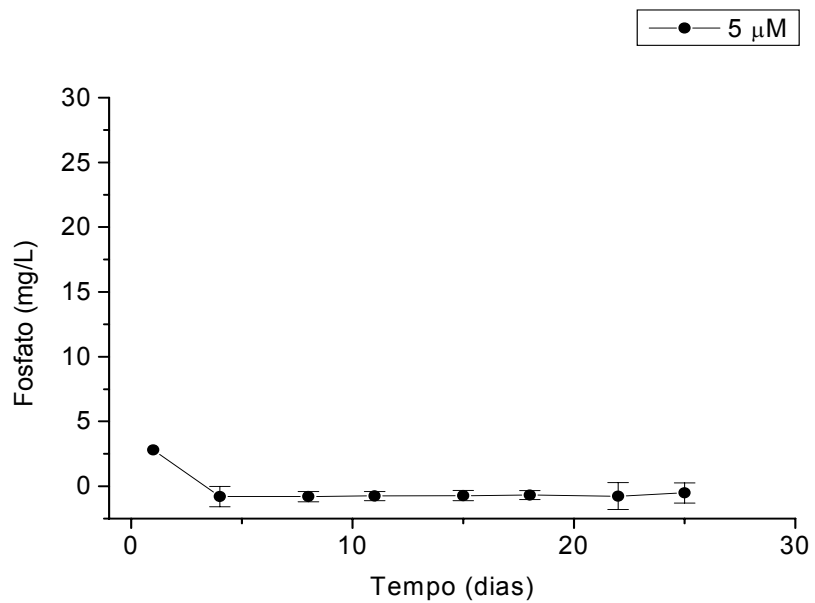
Tabela 2 – Taxa intrínseca de crescimento ( $r$ ), Taxa de crescimento convertida para duplicação por dia ( $K$ ) e o Tempo de duplicação da biomassa em dias ( $G$ ) de *Chloromonas* sp. para duas disponibilidades de fosfato.

	$5 \mu\text{M}$	$50 \mu\text{M}$
$r$	0,11	0,16
$K$	0,16	0,23
$G$	6,33	4,37

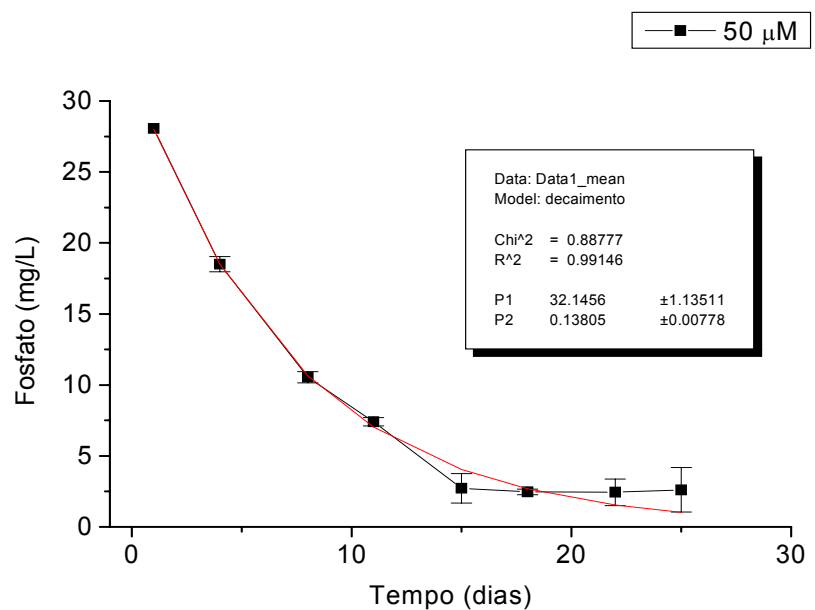
A Figura 13 mostra o decaimento do fosfato nas duas culturas, respectivamente:  $5 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ . Na menor concentração (Fig. 13 A) ocorre rapidamente o esgotamento do fosfato nos primeiros quatro dias de cultivo. A Figura 13 B mostra uma situação diferente para as culturas em alta concentração de fosfato, o esgotamento do fosfato ocorre mais lentamente ao longo do tempo, acompanhando o crescimento da cultura. Em ambos os casos há uma correlação entre o fim do crescimento e o esgotamento do fosfato.

A parametrização dos dados mostrou que quando há alta concentração de fosfato (Fig. 13 B), a remoção do nutriente ocorre de forma rápida ( $K = 0,13$ ), havendo o esgotamento do fosfato nos primeiros 15 dias do cultivo. O modelo aplicado permitiu observar um alto coeficiente de ajuste dos dados, explicando mais de 90 % do comportamento experimental ( $r^2 = 0,99$ ). Porém, em baixa concentração de fosfato (Fig. 13 A), não foi possível aplicar o modelo pois o decaimento foi total nos primeiros quatro dias de experimento, transformando a exponencial invertida esperada para a aplicação

do modelo em uma reta. Para tal modelagem teria sido necessária a amostragem diária nos primeiros dias de experimento.



(A)



(B)

Figura 13 – Decaimento do fosfato dissolvido em culturas de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão.

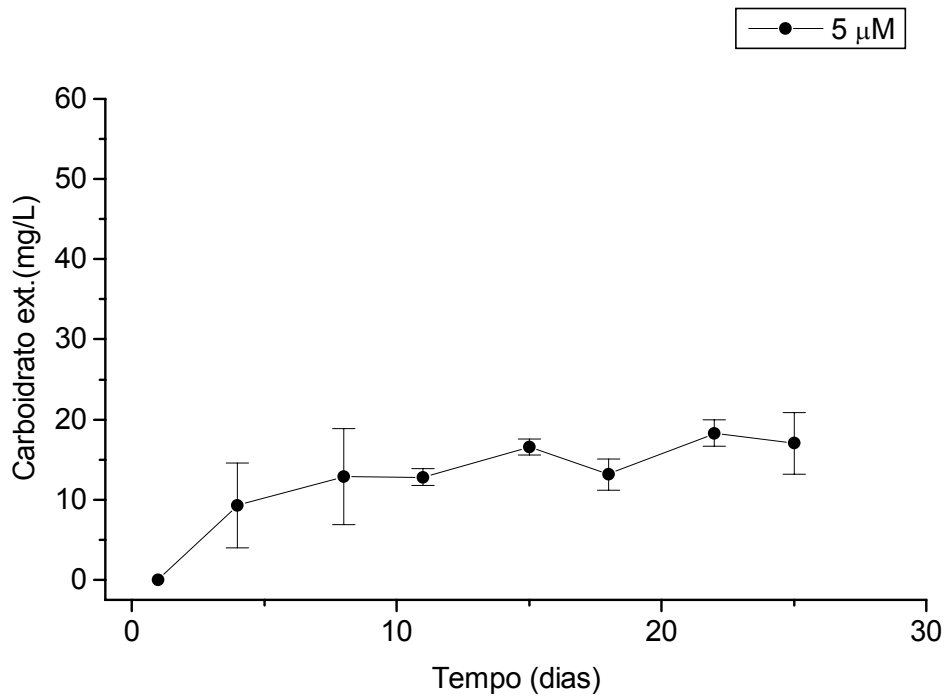


#### 4.2.2) Excreção de carboidratos extracelulares totais:

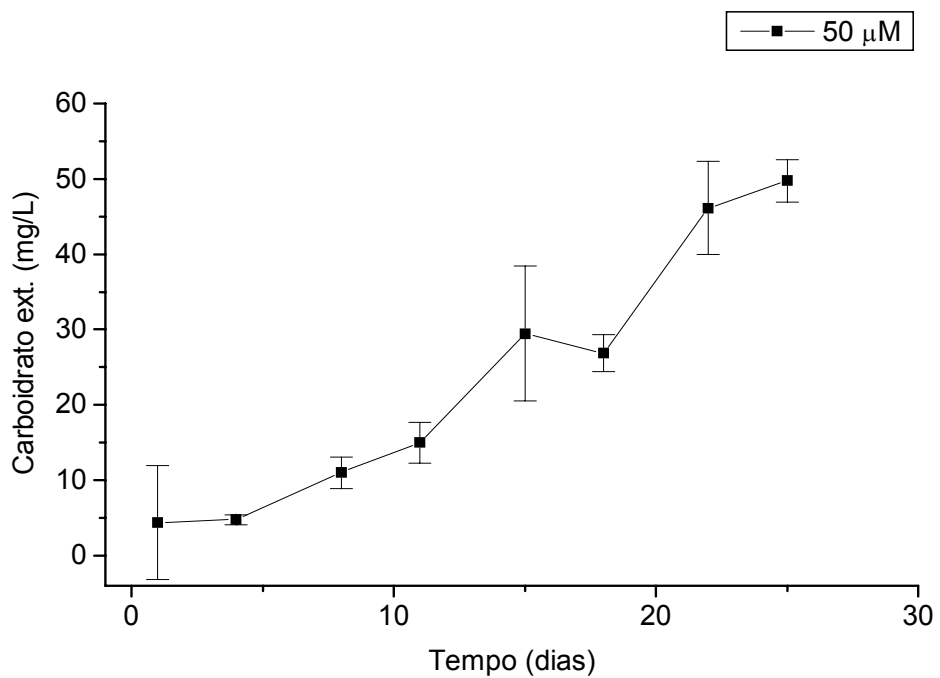
A Figura 14 mostra que a excreção dos carboidratos extracelulares totais de *Chloromonas* sp. ocorreu de forma distinta nas duas disponibilidades de fosfato.

Em baixa concentração do fosfato (5  $\mu$ M) (Fig. 14 A) verificou-se que nos primeiros 7 dias de cultivo (fase exponencial) houve uma maior excreção de carboidratos extracelulares, os valores variam entre zero e 16,5 mg/L. Nos últimos 10 dias de cultivo ficou evidente uma menor variação na concentração dos carboidratos extracelulares, evidenciando que a excreção de carboidratos acompanhou o crescimento.

As células submetidas a alta concentração de fosfato (50  $\mu$ M) (Fig. 14 B), mostraram que do 1º ao 22º dia a excreção dos carboidratos extracelulares ocorreu de forma significativa, os valores oscilaram entre 4,7 e 46,1 mg/L, sendo superiores aos obtidos nas amostras que estavam submetidas a uma baixa disponibilidade do fosfato. A partir do 22º ao 25º dia de cultivo, a concentração de carboidratos extracelulares apresentou pequena variação entre 46,1 e 49,7 mg/L, novamente correlacionando-se com o crescimento, pois este período coincide com a fase estacionária de crescimento.



(A)

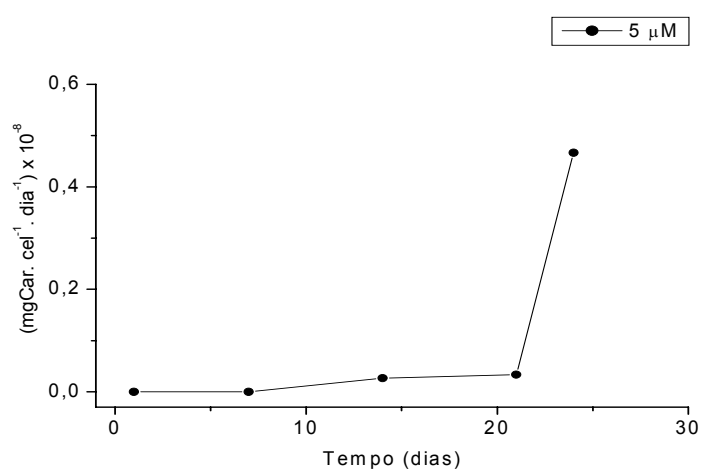


(B)

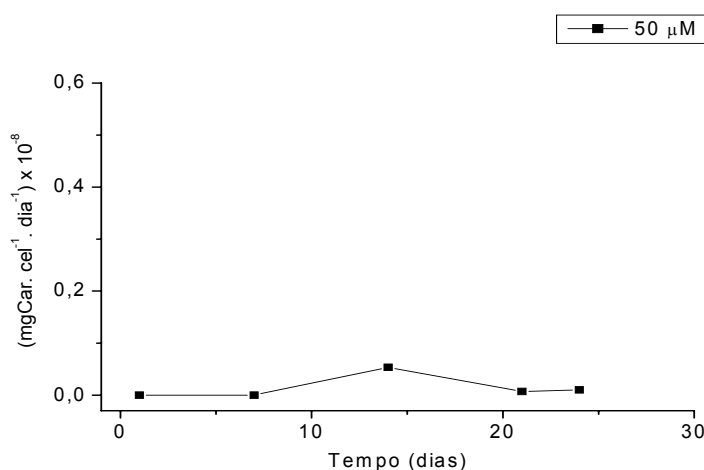
Figura 14 – Concentração de carboidratos extracelulares totais de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio depletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão.

A Figura 15 mostra a taxa de liberação de carboidrato total dissolvido por célula, por dia, nas duas disponibilidades de fosfato (5 e 50  $\mu\text{M}$ ).

Em ambas disponibilidades verifica-se que nos primeiros 7 dias de cultivo a taxa foi igual a zero, significando que as células dividiram-se na mesma proporção em que excretaram carboidratos. A partir do 10º ao 20º dia de cultivo ocorreu uma diferença na taxa de liberação de carboidratos entre as duas disponibilidades, sendo que em 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 15 A) a taxa aumentou significativamente na fase estacionária, evidenciando que as células aumentaram a excreção de carboidratos extracelulares em consequência da ausência de divisão celular. Já em 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 15 B), ocorreu uma menor variação na taxa de liberação de carboidratos por célula, se aproximando de zero no final do cultivo.



(A)



(B)

Figura 15 – Taxa de excreção de carboidratos de *Chloromonas* sp. por célula em função do tempo de cultivo em duas disponibilidades de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo.

#### 4.2.3) Caracterização dos carboidratos extracelulares excretados:

A grande maioria dos carboidratos extracelulares excretados por *Chloromonas* sp. foi composta por polissacarídeos, exceto pequenas liberações de carboidratos livres como Fucose e Ramnose. Em ambas as disponibilidades, os monossacarídeos componentes dos polissacarídeos excretados que apresentaram maiores concentrações foram: Ramnose, Arabinose, Galactose, Glicose e Manose/Xilose. Destes monossacarídeos citados, a Arabinose e a Galactose são os principais carboidratos excretados por *Chloromonas* sp., seguidos por Ramnose e Manose e/ou Xilose (Tabela 3).

A análise cromatográfica dos carboidratos dissolvidos identificados mostrou que alguns componentes dos polissacarídeos excretados como Galactose, Manose/Xilose, Ácido Galacturônico e Ácido Glucurônico apresentaram variação significativa (Teste “t” de Student,  $p = 0,0237$  à  $p = 0,0446$ ) nos valores entre a fase exponencial e a fase estacionária na alta disponibilidade de fosfato (Tabela 4). Constatou-se que diferenças significativas também ocorreram entre as fases exponenciais nas duas disponibilidades de fosfato para Fucose, Arabinose e Glucosamina (Teste “t” de Student,  $p = 0,02$  a  $p = 0,04$ ). Em alta disponibilidade de fosfato, o Ácido Galacturônico aumentou a sua concentração da fase exponencial para a fase estacionária, apresentando valores significativos (Teste “t” de Student,  $p = 0,0344$ ).

Tabela 3 – Porcentagem dos monossacarídeos identificados por HPLC-PAD em relação ao polissacarídeo total em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50  $\mu$ M e 7 dias em 5  $\mu$ M) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50  $\mu$ M e 14 dias em 5  $\mu$ M).

	50 $\mu$ M		5 $\mu$ M	
	LOG	EST	LOG	EST
Fucose	2,9 $\pm$ 0,9 *	5,0 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,2 *	6,1 $\pm$ 0,8
Ramnose	14,5 $\pm$ 0,5	14,4 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 2,2	9,8 $\pm$ 2,6
Arabinose	21,7 $\pm$ 2,4 *	19,2 $\pm$ 0,02	9,6 $\pm$ 0,05 *	12,7 $\pm$ 3,8
Glucosamina	9,0 $\pm$ 0,7 *	8,3 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,4 *	7,4 $\pm$ 1,4
Galactose	20,4 $\pm$ 0,3	18,8 $\pm$ 0,1	21,0 $\pm$ 0,06	20,5 $\pm$ 0,8
Glicose	11,2 $\pm$ 3,1	9,0 $\pm$ 0,6	21,5 $\pm$ 3,8	12,1 $\pm$ 2,1
Manose/Xilose	15,3 $\pm$ 0,1	13,3 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,4	14,9 $\pm$ 0,9
Ác. Galacturônico	2,8 $\pm$ 1,5	9,0 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 2,0	13,0 $\pm$ 3,7
Ác. Glucurônico	1,7 $\pm$ 0 *	2,7 $\pm$ 0,2 *	5,9 $\pm$ 2,9	3,0 $\pm$ 0,7

Tabela 4 – Relação dos valores de significância (Teste “t” de Student, p-valor) para os monossacarídeos excretados em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50  $\mu$ M e 7 dias em 5  $\mu$ M) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50  $\mu$ M e 14 dias em 5  $\mu$ M).

	LOG 50 $\mu$ M/EST 50 $\mu$ M	LOG 5 $\mu$ M/EST 5 $\mu$ M	LOG 50 $\mu$ M/LOG 5 $\mu$ M	EST 50 $\mu$ M/EST 5 $\mu$ M
Fucose	0,1025	0,7848	0,04*	0,2485
Ramnose	0,8139	0,8395	0,0829	0,1393
Arabinose	0,2902	0,3698	0,02*	0,138
Glucosamina	0,3097	0,2989	0,03*	0,514
Galactose	0,0237*	0,4681	0,1427	0,1106
Glicose	0,4337	0,0958	0,102	0,1924
Manose/Xilose	0,0116*	0,4865	0,0937	0,1482
Ác. Galacturônico	0,0344*	0,1555	0,2008	0,2782
Ác. Glucurônico	0,0446*	0,321	0,189	0,5862

A Figura 16 demonstra a porcentagem dos monossacarídeos liberados no início e no final do experimento, correspondendo ao estabelecimento da fase exponencial e da fase estacionária do cultivo das amostras. Em ambas disponibilidades (Fig. 16 A e B) verifica-se novamente que os monossacarídeos mais significativos são Ramnose, Arabinose, Galactose, Glicose e Manose/Xilose. Na Figura 16 A observa-se que os monossacarídeos apresentaram pouca variação entre a fase inicial e a fase final de crescimento, exceto Glicose e Ácido Galacturônico que mostraram médias bastante diferentes, mas não estatisticamente significativas (Tabela 4). Já na Figura 16 B ocorreu uma variação significativa entre as fases (início e fim) (Tabela 4), principalmente com os Ácidos Galacturônico e Glucurônico, que aumentaram na fase estacionária e a Galactose e Manose e/ou Xilose que diminuíram em proporção na fase estacionária de crescimento. Nota-se também que na maior disponibilidade de fosfato ocorreu uma maior presença de monossacarídeos que são componentes típicos das glicoproteínas de parede (“pherophorins”), como Arabinose e Ramnose.

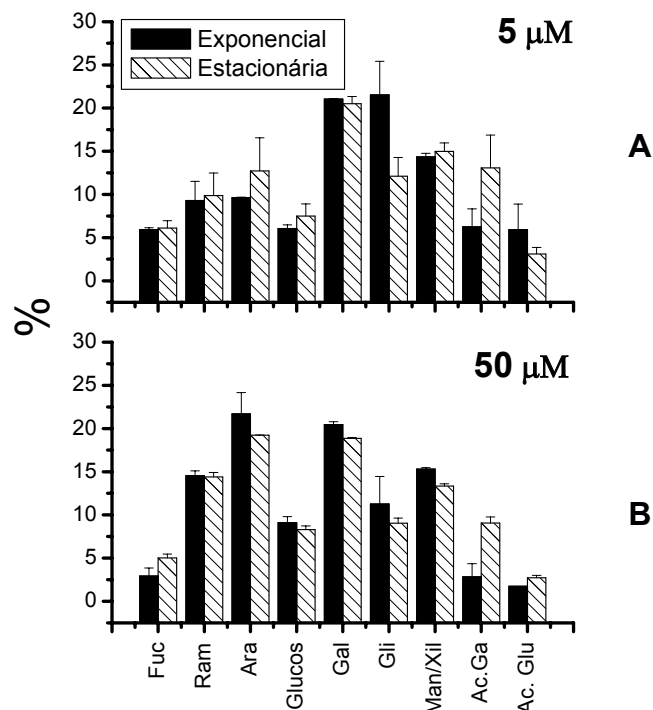


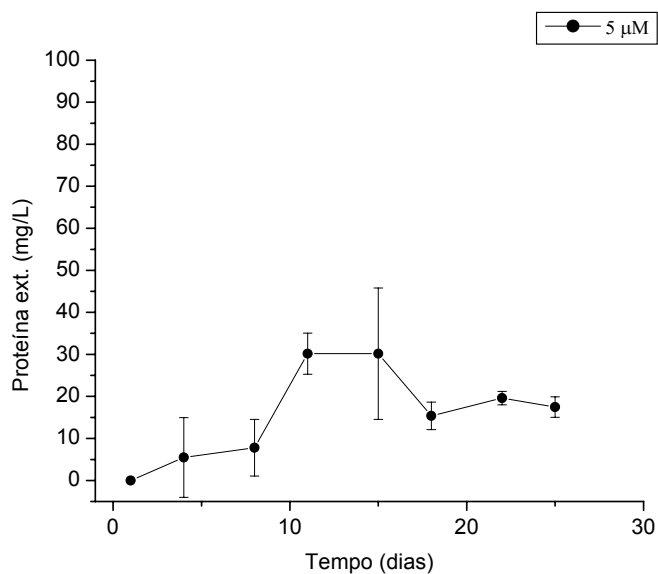
Figura 16 – Composição dos monossacarídeos liberados em duas disponibilidades de fosfato e em fases diferentes de crescimento de *Chloromonas* sp.: crescimento exponencial (LOG, 14 dias em 50 µM e 7 dias em 5 µM) e fase estacionária (EST, 25 dias em 50 µM e 14 dias em 5 µM). Abreviações: Fuc (fucose), Ram (Ramnose), Ara (Arabinose), Glucos (Glucosamina), Gli (Glicose), Man/Xil (Manose/Xilose), Ác. Ga (Ácido Galacturônico), Ác. Glu (Ácido Glucorônico). As barras correspondem ao desvio padrão.

#### 4.2.4) Excreção de proteínas extracelulares totais:

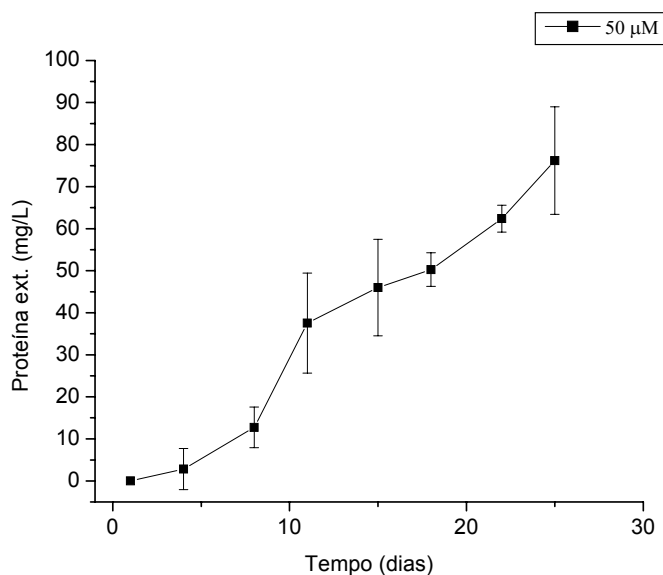
A Figura 17 mostra que a excreção de proteínas extracelulares totais por *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato (5µM e 50 µM) ocorreu de forma diferente em ambas concentrações. Em baixa concentração (Fig. 17 A) do 1º ao 11º dia do cultivo houve um aumento gradual na liberação de proteínas extracelulares, com valores variando entre zero e 30,1 mg/L, coincidindo com o período em que o crescimento está na fase exponencial e o início do estabelecimento da fase estacionária. No período compreendido entre o 11º e o 15º dia, ocorreu uma estabilização na excreção das proteínas extracelulares, por outro lado a partir deste período os valores obtidos se reduzem a aproximadamente 15,3 e 19,6 mg/L, se mantendo em média até o final do cultivo, evidenciando a correlação com o crescimento.

Em alta concentração de fosfato (Fig. 17 B), também ocorre um aumento na liberação de proteínas extracelulares nos primeiros 11 dias de cultivo, com valores de

zero à 37,5 mg/L, relacionados com as fases iniciais do crescimento. Já no período posterior, entre 15º ao 25º, ocorre um aumento nos valores obtidos anteriormente, porém com pouca variação, as concentrações foram de 46 à 76,2 mg/L, novamente correlacionando-se com o crescimento.



(A)

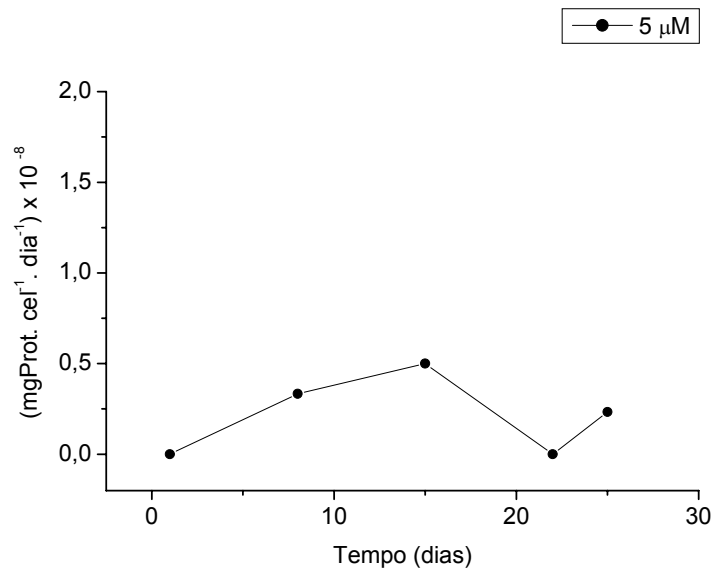


(B)

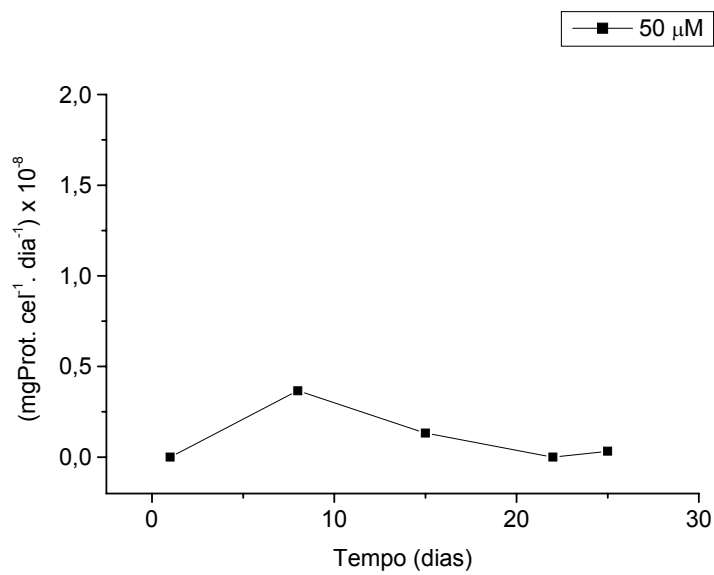
Figura 17 – Concentração absoluta de proteínas extracelulares totais de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato em função do tempo de cultivo: (A) meio dephletado, (B) meio completo. As barras correspondem ao desvio padrão.

A Figura 18 mostra a taxa de liberação de proteínas extracelulares totais dissolvidas por célula, por dia, nas duas disponibilidades de fosfato (5 e 50  $\mu\text{M}$ ). Nos primeiros 7 dias de cultivo observa-se que nas duas disponibilidades de fosfato ocorreu um aumento na taxa de liberação de proteínas, além disso verificou-se que este aumento na taxa permanece até o 15º dia de cultivo nas amostras submetidas a baixa concentração de fosfato (Fig. 18 A). Na alta concentração de fosfato (Fig. 18 B), no período compreendido entre 8º ao 25º dia de cultivo ocorre uma diminuição na taxa de liberação de proteínas com valores se aproximando de zero. A taxa de liberação de proteínas não teve o mesmo padrão observado em relação aos carboidratos, ou seja, na menor disponibilidade de fosfato não foi observado um aumento na taxa de excreção em função da estabilização do crescimento.





(A)



(B)

Figura 18 – Taxa de excreção de proteínas extracelulares totais de *Chloromonas* sp. por célula por dia em função do tempo de cultivo em duas disponibilidades de fosfato: (A) meio depletado, (B) meio completo.

## 5) DISCUSSÃO

São poucos os trabalhos que dão ênfase a morfologia celular de *Chloromonas* sp. O presente estudo possibilitou observar algumas características da espécie quando submetida a diferentes disponibilidades de fosfato como: células globosas a elipsóides com dois flagelos apicais, parede celular delgada a um pouco ampla, cloroplasto único em forma de copo e parietal e a presença de vários pirenóides. Morita *et al.* (1998) mostraram que as células de *Chloromonas* têm o núcleo localizado no centro e vários ou muitos contornos de cloroplastos exatamente abaixo da membrana celular. Além disso, foi observada a ausência de pirenóides nos cloroplastos de algumas espécies como: *Chloromonas rosae*, *Chloromonas serbinowii*, *Chloromonas clathrata* e *Chloromonas palmelloides*.

A espécie estudada neste trabalho apresentou o núcleo central, cloroplastos logo abaixo da membrana celular, porém observou-se a presença de vários pirenóides, que variaram em quantidade durante as diferentes fases de crescimento, sugerindo que seja uma espécie diferente das descritas acima. A ausência de pirenóides só foi observada na fase estacionária de crescimento, quando as células aumentaram sua taxa de excreção de carboidratos. A destruição dos pirenóides em *Chloromonas* sp. pode ser correlacionada com o processo de fotoassimilação de carbono e, conseqüentemente, com a produção e excreção de compostos orgânicos. A matriz dos pirenóides de *Chloromonas insignis* e *Chlamydomonas bipapillata* exibe uma maior concentração de moléculas de Rubisco do que na região dos tilacóides (tilacóide e estroma) dos cloroplastos, entretanto, a densidade de moléculas de Rubisco nestas matrizes de pirenóides foi baixa quando comparada com outras quatro amostras de *Chlamydomonas* examinadas e *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. (Morita *et al.*, 1999).

A morfologia celular de *Chloromonas* sp. mostrou que as espécies nas duas disponibilidades de fosfato, apresentaram pirenóides, cloroplasto em forma de copo e parietal. Embora a definição tradicional do caráter taxonômico do gênero *Chloromonas* pela ausência do pirenóide tenha sido rejeitada, uma vez que linhagens sem pirenóides não podem ser distinguidas filogeneticamente das que apresentam pirenóides, o gênero é monofilético e deve ser reconhecido a partir da morfologia do cloroplasto (Pröschold *et al.*, 2001). As linhagens com um ou vários pirenóides, bem como as sem pirenóides, foram reorganizadas e redefinidas com base nas características dos

cloroplastos (cloroplasto parietal asteróide ou em forma de copo, com perfurações irregularmente ramificadas).

Hoham *et al.* (2006) em um trabalho com duas espécies de algas verdes da neve, *Chloromonas chenongoensis* e *Chloromonas tughillensis* (Volvocales, Chlorophyceae) fez uma breve descrição taxonômica destas espécies e relatou em ambas a presença de células oblongas, cloroplastídeos parietais, pirenóides ausentes, núcleo localizado centralmente, dois vacúolos contrácteis apicais, células raramente com flagelos. No presente estudo as células de *Chloromonas* sp. se diferenciam em alguns aspectos da morfologia celular das espécies citadas pelo fato de que observou-se a presença de pirenóides e dois flagelos apicais evidentes, características estas que podem estar relacionadas com a diferença de habitat em que foram isoladas.

O crescimento celular de *Chloromonas* sp. em cultivo, como foi esperado, apresentou valores distintos nas duas disponibilidades de fosfato. Na cultura com 5  $\mu\text{M}$  de fosfato, as densidades celulares foram baixas, porém houve um acréscimo no número de células quando as culturas foram submetidas a concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Este comportamento também foi observado nos resultados obtidos para clorofila-a, embora em ambas as disponibilidades a quantidade de clorofila por célula tenha diminuído significativamente com o envelhecimento da cultura, corroborando degradação dos cloroplastos observada no primeiro experimento. Analisando as taxas de crescimento de ambas as culturas, verificou-se uma variação na taxa intrínseca de crescimento ( $r$ ), na taxa de crescimento convertida para duplicação por dia ( $K$ ) e no tempo de duplicação da biomassa ( $G$ ), sendo que em baixa disponibilidade de fosfato ocorre um maior tempo de duplicação, ao contrário da alta disponibilidade, em que o tempo de duplicação das células foi menor, indicando um crescimento mais acelerado.

Em um trabalho sobre a influência da disponibilidade de fósforo na alocação de carbono em *Scenedesmus subspicatus*, foi demonstrado que as curvas de crescimento desta espécie são distintas para cada concentração de fósforo porém cada tratamento mostrou uma duração similar de fases de crescimento. As culturas em baixa disponibilidade de fosfato alcançaram  $2,4 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$ , enquanto em níveis elevados de fósforo a densidade celular alcançou valores de  $5,2 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  para média concentração, e  $4,6 \times 10^6$  cel.  $\text{mL}^{-1}$  para a alta concentração. Este comportamento foi similar para a relação de clorofila-a/célula; com valores elevados para a concentração média e alta de fósforo e valores baixos foram obtidos para a baixa concentração deste nutriente (Sigeo *et al.*, 2007). Silveira (2007) em um cultivo com *Raphidiopsis brookii* em diferentes disponibilidades de nitrato, demonstrou que o crescimento celular foi

menor na cultura de 500  $\mu\text{M}$  do que nas culturas de 1000 e 1500  $\mu\text{M}$ , evidenciando que o empobrecimento de nitrato provocou uma limitação de crescimento já esperada, conduzindo a uma estabilização da biomassa, que foi demonstrada pelos valores obtidos para clorofila-a e biovolume.

A disponibilidade de nutrientes é um fator que limita a população fitoplanctônica, fazendo com que as espécies diminuam o crescimento, o que ficou evidente no cultivo de *Chloromonas* sp. principalmente quando foram submetidas a uma baixa disponibilidade de fosfato. Em um cultivo com *Spondylosium pygmaeum*, verificou-se a variação do crescimento em disponibilidades diferentes de duas fontes de nitrogênio (nitrato e amônio). Neste estudo foi observado que as máximas densidades celulares estavam relacionadas com as mais altas concentrações de nitrogênio oferecidas nos diferentes meios de cultura (Piedras, 2007).

A excreção de carboidratos extracelulares totais de *Chloromonas* sp. em duas disponibilidades de fosfato ocorreu de forma distinta, com valores baixos na menor e mais altos na maior concentração, sendo, portanto, correlacionada com o crescimento. Diversos trabalhos têm abordado a excreção de carboidratos pelas células fitoplanctônicas e a sua importância ecológica. Um estudo com *Isochrysis galbana* mostrou que no início do crescimento houve uma maior liberação destes compostos orgânicos, mantendo-se até o estabelecimento da fase estacionária (Marker, 1965). Segundo Vieira & Myklestad (1986), analisando a produção de carboidratos extracelulares de *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae), a liberação destes compostos não ocorre somente na fase estacionária, mostrando uma produção elevada também na fase exponencial.

Um experimento que analisou a taxa de liberação de carboidratos totais dissolvidos em três espécies fitoplanctônicas de um reservatório eutrófico tropical, demonstrou que *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp. apresentaram claramente uma elevada produção destes compostos na fase estacionária do crescimento (Giroldo & Vieira, 2005), assim como para *Raphidiopsis brookii* (Silveira, 2007). Piedras (2007) verificou que *Spondylosium pygmaeum* cresce na mesma proporção que produz carboidratos extracelulares, demonstrando que o estado fisiológico não alterou a taxa de excreção de carboidratos por célula, em ambos os tratamentos com nitrato e amônio.

Os resultados obtidos no experimento do presente trabalho mostraram que em ambas as disponibilidades de fosfato verificou-se que, nos primeiros 10 dias de cultivo, a taxa de excreção de carboidratos foi igual a zero, mostrando que as células se

multiplicaram e a excreção de carboidratos ocorreu na mesma proporção. A partir do 21º dia de cultivo ocorre uma diferença significativa na taxa de liberação de carboidratos entre as duas disponibilidades, sendo que na baixa disponibilidade, a taxa aumenta devido o estabelecimento da fase estacionária do crescimento e a diminuição da densidade celular. A diminuição do crescimento devido à limitação nutricional (nitrogênio ou fósforo) reforça a hipótese do excesso de fotoassimilação do carbono (Fogg, 1983), na qual as espécies diminuem o crescimento, enquanto a fotossíntese é ativa. Já na alta disponibilidade ocorre uma menor variação na taxa de liberação de carboidratos por célula, pois o crescimento continua a ocorrer na mesma proporção que a excreção de carboidratos, até que, mais tardiamente, ocorre a entrada da cultura na fase estacionária de crescimento.

Silveira (2007) ressaltou que a liberação de proteína extracelular por *Raphidiopsis brookii* está correlacionada com a estabilização da fase estacionária de crescimento e com a produção de carboidratos extracelulares. O cultivo com *Chloromonas* sp. mostrou que a excreção de proteínas está também relacionada com o crescimento principalmente devido a presença de glicoproteínas na parede (“pherophorins”). Os valores baixos para taxa de liberação de proteína são explicados pelo fato das células, quando estão em crescimento, investirem na produção de parede celular, que neste caso é rica em proteínas. Como não houve aumento na taxa de excreção de proteínas com a entrada da cultura na fase estacionária, fica evidente que esses compostos são produzidos exclusivamente para o crescimento e quando este cessa, cessa também a produção de proteínas extracelulares, ao contrário dos carboidratos que, quando cessa o crescimento, há uma tendência a aumentar a taxa de excreção destes compostos por célula.

Na caracterização dos carboidratos extracelulares excretados, verificou-se que em ambas as disponibilidades, os monossacarídeos constituintes dos polissacarídeos que apresentaram maiores concentrações foram: ramnose, arabinose, galactose, glicose, man/xil e ácido galacturônico. Destes monossacarídeos citados, a arabinose e a galactose foram os principais carboidratos excretados por *Chloromonas* sp. em alta disponibilidade de fosfato. Já em baixa disponibilidade, a arabinose e a ramnose, tiveram suas proporções diminuídas em relação à maior disponibilidade. Este resultado reflete o significado das glicoproteínas de parede típicas das Volvocales (“pherophorins”) que são compostos ricos em hidroxiprolina, arabinose e galactose principalmente e podem representar de 10 à 20% do seu peso seco. As “pherophorins” desempenham um papel fundamental para a evolução da multicelularidade e o

desenvolvimento de um complexo denominado de matriz extracelular multifuncional. Em *Volvox*, a partir da análise da sequência do DNA obteve-se as “pherophorins” V1, V2, V3 e V4, sendo que em *Chlamydomonas reinhardtii* foram identificadas as “pherophorins” C1, C2, C3, C4, C5 e C6 (Kieliszewski & Shpak, 2001; Hallmann, 2006). A origem destes compostos no meio extracelular de *Chloromonas* sp. está ligada aos processos de divisão celular típicos da Ordem, nos quais ocorre o rompimento e liberação das paredes celulares e, conseqüentemente estes compostos se tornam parte dos carboidratos extracelulares presentes na cultura. Provavelmente por esta razão a taxa de excreção de proteínas não aumenta na fase estacionária de crescimento, uma vez que não há mais divisão celular nesta fase. A composição destas glicoproteínas está ligada a hipótese da contigüidade da hidroxiprolina, em que a arabinolização aumenta quando resíduos de hidroxiprolina estão adjacentes, enquanto a não adjacência destes implica na ligação de galactose ou outros monossacarídeos (Kieliszewski & Shpak, 2001). As diferenças significativas entre as fases exponencial e estacionária indicam que pelo menos dois tipos de polissacarídeos foram produzidos. Um deles estaria ligado à constituição da parede celular (“pherophorins”, rico em arabinose principalmente) e o outro seria excretado livremente para o meio (rico em ácido galacturônico principalmente). Na cultura com menor disponibilidade de fosfato, ocorreu um crescimento exponencial muito curto (14 dias) em comparação com a maior disponibilidade, por isso não ficaram evidentes as diferenças entre os polissacarídeos típicos do crescimento exponencial (“pherophorins”) e os da fase estacionária (excretados), uma vez que a fase estacionária foi muito mais longa que a exponencial. A liberação de dois tipos de compostos fica ainda mais evidente quando não se encontra diferença significativa entre os polissacarídeos da fase estacionária das duas disponibilidades, e sim nos produzidos durante a fase exponencial, em que se observou uma proporção maior de arabinose e ramnose na cultura com maior disponibilidade de fosfato e, portanto, na cultura em que ocorreu maior crescimento.

Vieira & Myklestad (1986), caracterizando os carboidratos extracelulares produzidos por *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae), determinaram que a galactose foi o mais importante monossacarídeo componente dos polissacarídeos excretados. Também foram encontrados em grandes concentrações a manose, glicose, xilose e arabinose, porém a concentração de ramnose foi muito baixa. Outro trabalho com a mesma espécie citada mostrou que em uma fração dos polissacarídeos, a fucose e a 3-0-metilgalactose foram os carboidratos principais, sendo que a galactose,

glicose, manose e ramnose foram presentes em menor quantidade. Em outra fração, a manose foi o principal monossacarídeo componente do polissacarídeo excretado, representando 60 % dos carboidratos presentes, sendo o restante composto por ramnose, fucose, xilose e glicose e, em menor concentração, 3-O-metilgalactose e galactose (Paulsen *et al.*, 1998). As referências acima confirmam que os carboidratos encontrados em *Chloromonas* sp. são comuns nas Chlorophyceae, mas sua concentração e composição é dependente da espécie.

Girollo *et al.* (2003), trabalhando com a degradação de polissacarídeos de *Thalassiosira* sp. em um ambiente aquático tropical, obteve os seguintes monossacarídeos componentes do polissacarídeos: ramnose, fucose, xilose, manose, galactose, glicose, ácido glucorônico, ácido galacturônico, N-acetil-galactosamina e N-acetil-glucosamina; destes compostos liberados, o que mais contribuiu foi a manose. Outro trabalho do mesmo autor confirma a idéia de que a excreção de compostos ricos em energia é um processo espécie-específico. Experimentos com três espécies fitoplanctônicas diferentes *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae), *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae) e *Thalassiosira* (Bacillariophyceae) demonstraram que a composição de carboidratos difere entre as espécies (Girollo & Vieira, 2005).

Em *Raphidiopsis brookii* foram identificados os seguintes constituintes dos polissacarídeos extracelulares: fucose, ramnose, arabinose, N-acetil-glucosamina, galactose, glicose, manose e/ou xilose. Destes compostos verificou-se que não apresentaram variação significativa entre as disponibilidades de nutrientes e as fases de crescimento, com exceção da glicose que apresentou uma variação significativa entre as diferentes concentrações na fase estacionária e entre as diferentes fases de crescimento na concentração de 500  $\mu$ M de nitrato (Silveira, 2007).

A importância ecológica da excreção de carboidratos para os ecossistemas aquáticos tem sido enfatizada em diversos trabalhos. Na maioria das vezes se estabelece uma relação entre o crescimento fitoplanctônico e a liberação de compostos ricos em energia, frequentemente dependente de fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes, incrementando o crescimento bacteriano (Paerl, 1978; Lancelot, 1984; Girollo *et al.*, 2007). Nas últimas duas décadas a cadeia trófica planctônica tem sido interpretada não como uma seqüência linear, mas sim considerando a “alça microbiana” em que existe uma participação efetiva das bactérias na heterotrofia e na remineralização dos nutrientes, acarretando numa importância fundamental para o crescimento da população fitoplanctônica (Azam *et al.*, 1983;

Pomeroy & Wiebe, 1988; Sherr & Sherr, 2000). No caso de *Chloromonas* sp., os experimentos mostraram que ocorre um vigoroso crescimento aliado a uma alta produção de carboidratos, permitindo afirmar que a espécie desempenha uma importante função ecológica no sistema aquático, pois estes compostos produzidos podem ser remineralizados e utilizados pelas bactérias, aumentando a população bacteriana que serve de fonte nutricional para outros organismos heterotróficos.

No presente estudo com *Chloromonas* sp., cabe destacar que a espécie apresentou uma variação morfológica nas células devido a disponibilidade de nutriente, ficando evidente que o envelhecimento das culturas afeta diretamente a estrutura dos cloroplastos e pirenóides. No que tange o crescimento celular, a excreção dos carboidratos e proteínas extracelulares, observou-se que existe uma correlação direta com a disponibilidade de fosfato. A análise da composição dos carboidratos mostrou que a arabinose e galactose são os monossacarídeos mais importantes na constituição de *Chloromonas* sp. e que provavelmente estes compostos fazem parte da parede celular. A alta proporção de ramnose, manose e ácido galacturônico, aliada ao aumento na taxa de excreção de carboidratos na ausência de divisão celular (fase estacionária), indica que há outros polissacarídeos sendo excretados por *Chloromonas* sp.

Estudos futuros poderiam enfatizar a morfologia de *Chloromonas* sp., a fim de definir taxonomicamente a espécie e permitir a comparação com outras espécies do mesmo gênero. Além disso, é necessário um aprofundamento no estudo da composição dos polissacarídeos e da função dos pirenóides na excreção de carboidratos na fase estacionária, principalmente devido a concentração de moléculas de Rubisco que proporcionam a carboxilação e conseqüentemente contribuem para a fotoassimilação de carbono.

O fato de *Chloromonas* sp. ter apresentado um crescimento exponencial significativo e valores consideráveis na excreção de compostos orgânicos ricos em energia, mostra que a espécie poderia ser utilizada em estudos na área da aquicultura, principalmente como fonte nutricional para outros organismos.

Um estudo bioquímico dos compostos produzidos e excretados por *Chloromonas* sp. se faz necessário como forma de viabilizar suas aplicações industriais e farmacêuticas, uma vez que glicoproteínas como as produzidas por este gênero podem possuir propriedades bioativas, principalmente imunoestimulatórias e anti-inflamatórias (Paulsen, 2001).



## 6) CONCLUSÕES

- A limitação de fosfato alterou a morfologia dos cloroplastos de *Chloromonas* sp. e diminuiu significativamente a quantidade de clorofila-a por célula.
- A excreção de carboidratos e proteínas extracelulares acompanhou o crescimento de *Chloromonas* sp.
- A limitação de fósforo aumentou a taxa de excreção de carboidratos por célula na fase estacionária, ao contrário das proteínas que foram excretadas exclusivamente em função do crescimento.
- Os polissacarídeos extracelulares produzidos por *Chloromonas* sp. foram compostos principalmente por: Arabinose, Galactose, Ramnose, Manose/Xilose, Glicose e Ácido Galacturônico.
- A variação na proporção dos monossacarídeos componentes dos polissacarídeos extracelulares, observada entre as fases de crescimento, indica a excreção de, pelo menos, dois tipos de carboidratos dissolvidos: um típico do crescimento exponencial, rico em Arabinose e Galactose principalmente, e outro típico da fase estacionária, rico em Ácido Galacturônico principalmente.

## 7) BIBLIOGRAFIA

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

AZAM, F. & SMITH, D. C. 1991. Bacterial influence on the variability in the ocean biochemical state: a mechanistic view. In: *Particle analysis in oceanography*. NATO ASI Series G27 (Ed. By S. Demers), pp. 213 – 233. Springer Verlag, Berlin, Germany.

BAUMGARTEN, M. G. Z., ROCHA, J. M. B. & NIENCHESKI, L. F. H. 1996. Manual de análises em oceanografia química. FURG, Rio Grande. 132p.

BELL, W. H. & MITCHELL, R. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *The Biological Bulletin*, 143, 265 – 277.

BELL, W. H. & SAKSHAUG, E. 1980. Bacterial utilization of algae products. 2. A Kinetic study of natural population. *Limnology and Oceanography*, 19, 833 – 839.

BIDDANDA, B. & BENNER, R. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 42, 506 – 518.

BJØRNSEN, P. K. 1988. Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it. *Limnology and Oceanography*, 33, 151 – 154.

DOMOZYCH, D. S. & DOMOZYCH, C. R. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. II. Ultrastructure and immunocytochemistry. *Journal of Phycology*, 29, 659 – 667.

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

- DUBOIS, M.; GUILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITHS, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 – 356.
- ESTEVEZ, F. A. 1998. Fundamentos de Limnologia. (2ª ed.). Rio de Janeiro. Interciência. 135p.
- FOGG, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina*, 26, 3 – 14.
- FURLANETTO, L. M. 2006. Variações nictemerais e sazonais das principais variáveis limnológicas de um pequeno lago oligotrófico raso do extremo sul do Brasil. *Monografia de conclusão de graduação*. Departamento de Ciências Morfo-biológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 20p.
- GIROLDO, D. & VIEIRA, A. A. H. 2002. An extracellular sulphated fucose-rich polysaccharides produced by a tropical strain of *C. obovata* (Cryptophyceae). *Journal Applied Phycology*, 14, 185 – 191.
- 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). *Journal of Phycology*, 39, 1109 – 1115.
- GIROLDO, D. & VIEIRA, A. A. H. 2005. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from freshwater tropical eutrophic reservoir. *Journal Plankton Research*, 27: 695-705.
- GIROLDO, D.; ORTOLANO, P. I. C. & VIEIRA, A. A. H. 2007. Bacteria-algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater Biology*, 52, 1281 – 1289.
- GREMM, T. J. & KAPLAN, T. J. 1997. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC-PAD and pulse amperometric detection. *Limnology and Oceanography*, 42, 385-393.

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

HALLMANN, A. 2006. The pherophorins: common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales. *The Plant Journal*, 45, 292 – 307.

HOHAM, R. W.; BERMAN, J. D.; ROGERS, H. S.; FELIO, J. H.; RYBA, J. B. & MILLER, P. R. 2006. Two new species of green snow algae from Upstate New York, *Chloromonas chenangoensis* sp. nov. and *Chloromonas tughillensis* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) and the effects of light on their life cycle development. *Phycologia*, 45 (3), 319 – 330.

HOHAM, R. W.; FILBIN, R. W.; FREY, F. M.; PUSAK, T. J.; RYBA, J. B.; MCDERMOTT, P. D. & FIELDS, R. A. 2007. The optimum pH of the green snow algae, *Chloromonas tughillensis* and *Chloromonas chenangoensis*, from upstate New York. *Artic, Antarctic and Alpine Research*, 39 (1), 65 – 73.

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

KIELISZEWSKI, M. J. & SHPAK, E. 2001. Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1386 – 1398.

LANCELOT, C. 1984. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern Bight of the North Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18, 65 – 77.

LEHMAN, J. T. 1976. Ecological and nutritional studies on *Dinobryon* Ehrenb.: Seasonal periodicity and the phosphate toxicity problem. *Limnology and Oceanography*, 21 (5), 646 – 658.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. H.; FARR, A. L. & RANDAL, R. J. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265 – 275.

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

MARKER, A. F. H. 1965. Extracellular carbohydrate liberation in the flagellates *Isochrysis galbana* and *Prymnesium parvum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 45, 755 – 772.

MAYZAUD, P.; CHANUT, J. P. & ACKMAN, R. R. 1989. Seasonal changes of the biochemical composition marine particulate matter with special reference to fatty acids and sterols. *Marine Ecology Progress Series*, 56, 189 – 204.

MEINERZ, L. I. 2004. Efeitos do tampão tris no cultivo da microalga *Tetraselmis tetrahele* (Prasinophyceae) em condições controladas de laboratório. *Monografia de conclusão de graduação*. Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 40p.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C. A.; CHEVOLOT, L.; GERMAIN, C.; REVUELTA, R. & DAWSON, R. 1992. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. *Environmental Science and Technology*, 26, 133-138.

MORITA, E.; ABE, T.; TSUZUKI, M.; FUJIWARA, S.; SATO, N.; HIRATA, A.; SONOIKE, K. & NOZAKI, H. 1998. Presence of the CO<sub>2</sub> – concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free living algal genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyta). *Planta*, 204, 269 – 276.

MORITA, E.; ABE, T.; TSUZUKI, M.; FUJIWARA, S.; SATO, N.; HIRATA, A.; SONOIKE, K. & NOZAKI, H. 1999. Role of pyrenoids in the CO<sub>2</sub> – concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). *Planta*, 208, 365 – 372.

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

OBERNOSTERER, I. & HERNLD, G. J. 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Marine Ecology Progress Series*, 116, 247 – 257.

PAERL, H. W. 1978. Role of bacteria in promoting N<sub>2</sub> fixation by *Anabaena sp* in aquatic habitats. *Microbial Ecology*, 4, 215 – 231.

PASSOW, U.; ALLDREDGE, A. L. & LOGAN, B. E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Research I*. 41, 335-357.

PAULSEN, B. S.; ASLAKSEN, T.; FREIRE-NORDI, C. S. & VIEIRA, A. A. H. 1998. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 34, 638 – 641.

PAULSEN, B. S. 2001. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current Organic Chemistry*, 5, 939 – 950.

PIEDRAS, F. R. 2007. Liberação de polissacarídeos extracelulares por *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae) em função do crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 37p.

POMEROY, L. R. & WIEBE, W. J. 1988. Energetics of microbial food webs. *Hydrobiologia*, 159, 7 – 18.

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

RICKLEFS, R. E. 2003. A economia da natureza. (5ª ed.) Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan S. A.* 503p.

SHEN, H. & SONG, L. 2007. Comparative studies on physiological responses to phosphorus in two phenotypes of bloom-forming *Microcystis*. *Hydrobiologia*, 592, 475 – 486.

SHERR, E. & SHERR, B. 2000. Marine microbes an overview. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. KIRCHMAN, D. L. (Ed.), Wiley-Liss, 14 – 41.

SIGEE, D. C.; BAHRAMI, F.; ESTRADA, B.; WEBSTER, R. E. & DEAN, A. P. 2007. The influence of phosphorus availability on carbon allocation and P quota in *Scenedesmus subspicatus*: A synchrotron-based FTIR analysis. *Phycologia*, 46 (5), 583 – 592.

SILVEIRA, S. B. 2007. Crescimento, produção de cianotoxinas e compostos orgânicos extracelulares por *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) em três concentrações de nitrato. *Monografia de conclusão de graduação*. Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 41p.

STENUITE, S.; PIRLOT, S.; HARDY, M.; SARMENTO, H.; TARBE, A.; LEPORCQ, B. & DESCY, J. 2007. Phytoplankton production and growth rate in Lake Tanganyika: evidence of a decline in primary productivity in recent decades. *Freshwater Biology*, 52, 2226 – 2239.

VAN DE HOEK, C.; MANN, D. G. & JAHNS, H. M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press. 627p.

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

WETZEL, R. G. 1981. *Limnologia*. Ediciones Omega, S. A. 679p.

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

WOOD, A. M. & VAN VALEN, L. M. 1990. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine Microbial Foods Webs*, 4, 103 – 116.