



# TAXAS DE CRESCIMENTO E DE REMOÇÃO DE AMÔNIO DISSOLVIDO POR DUAS MICROALGAS VERDES DULCÍCOLAS SUBTROPICAIS: *CHLAMYDOMONAS* SP. (CHLAMYDOMONADALES) E *SPONDYLIUM PYGMAEUM* (DESMIDIALES).

Pablo Santos Guimarães

Danilo Giroldo

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Av. Italia, Km 8, Rio Grande, RS, Brasil, 96201 - 900  
pablo\_s\_guimaraes@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Dentre a grande variedade de organismos encontrada no plâncton, as microalgas são os principais produtores primários e, entre elas, a Divisão Chlorophyta, especialmente as Ordens Volvocales e Desmidiáles, são bastante representativas nas águas continentais (Van Den Hoek 1995).

A quantidade e qualidade de nutrientes dissolvidos no meio, assim como fatores ambientais diversos como o pH e a irradiância influenciam fortemente a fisiologia e a ocorrência das microalgas (Giroldo & Vieira 2005). O pH influencia principalmente a fotossíntese e, conseqüentemente, quase todos os processos fisiológicos do organismo, como crescimento e captura de nutrientes. A influência do pH está relacionada à disponibilidade de carbono inorgânico e às adaptações da microalga para realização da fotossíntese com a fonte disponível. No entanto, estudos recentes apontam para uma influência independente do carbono inorgânico, relacionada diretamente com o pH, embora este mecanismo fisiológico ainda não esteja totalmente esclarecido (Spijkerman *et al.*, 2004).

Um ambiente eutrofizado, ou seja, com elevada concentração de compostos ricos em nitrogênio e fósforo, pode gerar o crescimento descontrolado de uma ou mais espécies do fitoplâncton, evento conhecido como “bloom” ou floração (Maguer *et al.*, 2007). O nitrogênio tem papel de destaque nestes eventos pois é um dos elementos mais importantes no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, principalmente devido a sua participação na formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. As principais fontes de nitrogênio para o fitoplâncton são fontes inorgânicas (nitrato, nitrito e amônio), orgânicas (uréia, aminoácidos livres e peptídeos) e, para cianobactérias, dinitrogênio atmosférico (Padisák 2004). O amônio é, em geral, a forma preferida na captação e assimilação pelo fitoplâncton por envolver menor gasto de energia.

Para o nitrogênio entrar na célula, deve ultrapassar a barreira permeável da membrana citoplasmática. Em baixas

concentrações, o nitrato é captado por um transportador de grande afinidade, enquanto que em altas concentrações ocorre difusão passiva. Já as baixas concentrações de amônio são captadas por uma permease que catalisa um transporte ativo potencial - dependente da membrana. No entanto, este sistema é inibido em altas concentrações, passando a ocorrer por difusão passiva. Todo nitrogênio assimilado é convertido em amônio celular (Kolodny *et al.*, 2006).

Informações sobre características fisiológicas das microalgas, como tolerância e sensibilidade a fatores ambientais, podem ser utilizados para incrementar classificações funcionais, como a proposta por Reynolds *et al.*, (2002), que permite descrever com mais precisão a variação na composição fitoplanctônica dos lagos em função dos fatores ambientais.

## OBJETIVOS

Este trabalho visa determinar as taxas de crescimento e remoção de amônio de duas espécies de microalgas verdes dulcícolas subtropicais (*Spondyliosium pygmaeum* e *Chlamydomonas sp.*) em duas concentrações de amônio (50 e 500  $\mu\text{M}$ ), assim como o efeito da variação do pH do meio sobre estes parâmetros. Os dados aqui apresentados visam contribuir para a identificação de espécies potencialmente formadoras de florações em ambientes eutrofizados. Além disso, este trabalho objetiva acrescentar informações sobre as microalgas mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas Dulcícolas do ICB/FURG (CCMD - FURG) contribuindo com informações para subsidiar futuras classificações morfo - funcionais do fitoplâncton.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Organismos e Condições de Cultivo

Foram utilizadas duas diferentes espécies de microalgas verdes dulcícolas subtropicais. *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae) e *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadales), isoladas por micro - manipulação ao microscópio e provenientes de dois lagos localizados no Campus Carreiros da FURG, um tipicamente mesotrófico (Centro Esportivo) e outro oligo - mesotrófico (Polegar), respectivamente. Estas cepas estão sendo mantidas na coleção de culturas de microalgas dulcícolas do ICB/FURG (CCMD/ FURG) em meio WC (Guillard e Lorenzen 1972) e em uma incubadora tipo BOD com temperatura e irradiância controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) em um fotoperíodo de 14h:10h de luz: escuro.

### Experimentos

O meio de cultivo utilizado para os experimentos foi o WC (pH 7,0) modificado pela adição de amônio no lugar do nitrato (WC/amônio) na concentração equivalente. Os inóculos foram aclimatados ao amônio durante trinta dias antes dos experimentos (Lourenço 2006). Para que a reserva de nutrientes das microalgas não mascarasse o crescimento em baixa disponibilidade de amônio, foi realizado um processo denominado esgotamento ("starvation"), que visa exaurir as reservas dos inóculos. As células aclimatadas foram centrifugadas, lavadas com meio sem nitrogênio e ressuspensas também em meio WC sem nitrogênio. Os inóculos foram mantidos durante sete dias em incubadora até que a densidade celular ficasse constante (Baldia *et al.*, 2007), conforme indicado em testes preliminares.

Foram inoculados 30 mL do frasco que passou pelo esgotamento em quatro frascos Erlenmeyers de 1 L com 600 mL de meio WC/amônio, sendo dois com  $50 \mu\text{M}$  de amônio, e os outros dois com  $500 \mu\text{M}$  de amônio (duplicatas). Foram realizados três experimentos, dois com *S. pygmaeum* (Experimentos 1 e 2) e um com *Chlamydomonas* sp. (Experimento 3). Durante o primeiro experimento com *S. pygmaeum* (Experimento 1) foi constatada uma diminuição significativa do pH do meio durante o crescimento, o que motivou a sua repetição (Experimento 2) com a adição de um tampão de pH (TRIS, 400 mg L<sup>-1</sup>), bem como o monitoramento dos valores de pH durante o crescimento. Desta forma foi possível verificar o efeito do controle do pH sobre o crescimento e a remoção de amônio por *S. pygmaeum*. Também o experimento com *Chlamydomonas* sp. (Experimento 3) foi realizado com monitoramento e controle do pH. O pH foi verificado a cada amostragem com um HL8314 "membrane pHmeter".

### Análises

A cada 72 horas foram retiradas amostras em duplicata de 30 mL de cada cultura, até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento, dos quais 5 ml foram destinados à análise de crescimento por contagem celular. Os outros 20 mL foram centrifugados (1.000 rpm/15min.), sendo que o precipitado foi utilizado na análise da clorofila (como indicador do crescimento), e o sobrenadante para a análise de amônio extracelular.

### Contagem Celular

Para determinar as taxas de crescimento, foi realizada a contagem das células ao microscópio óptico, utilizando um hemocitômetro do tipo "improved Neubauer". A técnica é bastante conhecida e aplicada, e consiste numa lâmina com

volume conhecido com duas áreas quadriculadas utilizada para quantificar o número de células em um determinado volume. O cálculo do tempo para duplicação da biomassa (T2) e taxa de crescimento (r) foi realizado a partir das fórmulas descritas em Lourenço (2006).

### Análise de Clorofila

Para a análise da clorofila, utilizou-se o precipitado da amostra centrifugada, no qual foram adicionados 10 mL de metanol, para extração da clorofila, sendo o mesmo mantido no freezer e no escuro por pelo menos 24 horas. Após este período a amostra foi novamente centrifugada (1.000 rpm por 15min.) e o sobrenadante analisado no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 665 nm e 750 nm. A concentração de clorofila - a foi determinada após conversão dos valores de absorvância pela equação descrita por Mackinney (1941).

### Amônio Extracelular

Para esta análise foram adicionados subsequentemente três reagentes ao sobrenadante da amostra (20 mL): (1) fenol - álcool (0,8 mL); (2) nitropussiato (0,8 mL) e; (3) solução alcalina oxidante (2 mL). Quanto maior é a concentração de amônio dissolvido no meio, maior é a reação, e maior será a formação de azul de indofenol, que após 3 horas de reação é analisado em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 640nm. (Strickland & Parsons 1972, Baumgarten *et al.*, 1996). Os resultados de absorvância foram convertidos em concentração de amônio com base em uma reta padrão com nove concentrações (0, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 50  $\mu\text{M}$ ).

As taxas de remoção de amônio extracelular foram estimadas segundo descrito em Giroldo *et al.*, 2005. Para descrever a cinética do decaimento do amônio, foi adotado um modelo matemático. 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>. Com a parametrização dessa equação, foi possível determinar os coeficientes de remoção do amônio. A equação é mostrada a seguir:

$$A_t = A_0 e^{-k.t} \dots \dots \dots$$

Onde:  $A_t$  = concentração do reagente (quantidade do reagente remanescente);  $A_0$  = concentração inicial do reagente; k = constante da reação; e = base do logaritmo natural; t = tempo (Giroldo *et al.*, 2005).

## RESULTADOS

A densidade celular de *Spondylosium pygmaeum* foi maior no Experimento 2 com o pH tamponado em ambas as concentrações de amônio, embora os teores de clorofila - a não tenham acompanhado esta tendência, ficando próximos tanto com o pH tamponado como não tamponado. Além disso, o tamponamento do pH nas culturas de *S. pygmaeum* gerou uma fase exponencial mais longa tanto quando o crescimento foi monitorado pela densidade celular como pela clorofila - a em ambas as disponibilidades de amônio. No Experimento 1 (pH não tamponado) foi observado um crescimento mais lento com maior tempo de duplicação de biomassa na menor disponibilidade (7,85 dias para  $50 \mu\text{M}$  e 5,77 dias para  $500 \mu\text{M}$ ), ao contrário do observado em Piedras (2007), que encontrou uma taxa de crescimento

mais rápida na disponibilidade mais baixa de amônio. Por outro lado, no Experimento 2 (pH tamponado) não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento das duas disponibilidades de amônio (5,7 e 5,9 dias para duplicação da biomassa respectivamente em 50 e 500  $\mu\text{M}$ ).

*Chlamydomonas* sp., apresentou crescimento significativamente maior em relação à *S. pygmaeum* nas duas disponibilidades tanto em densidade celular como em clorofila - a. Além disso, as taxas de crescimento mostradas por *Chlamydomonas* sp. foram também mais rápidas que *S. pygmaeum* em ambas as disponibilidades (1,98 e 3,79 dias para duplicação da biomassa respectivamente em 50 e 500  $\mu\text{M}$ ), evidenciando ainda o crescimento mais acelerado nas disponibilidades nutricionais mais baixas, conforme observado por Piedras (2007) e Campos (2008).

Em um estudo sobre a liberação de carboidratos durante o crescimento de três microalgas dulcícolas, Giroldo e Vieira (2005) observaram que *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae) apresentou uma duplicação de biomassa semelhante à *S. pygmaeum*, de 5 a 7 dias, e *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae) dados semelhantes ao de *Chlamydomonas* sp, de 1 a 3 dias. Para *Staurastrum orbiculare* (Zygnematomyceae) foi encontrado um tempo 11,1 dias para duplicar a biomassa, velocidade bem mais lenta do que os resultados mostrados neste trabalho. No entanto, somente *Thalassiosira* sp. apresentou densidade celular comparável a *S. pygmaeum*, e todas bastante abaixo de *Chlamydomonas* sp.. Esta comparação mostra a importância da classificação morfo - funcional, já que *S. pygmaeum*, apesar de ser da mesma classe taxonômica de *Staurastrum orbiculare* (Zygnematomyceae), se assemelha mais em termos de crescimento à *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae).

Sob déficit de amônio, *Chlamydomonas* sp. em ambas as concentrações e *S. pygmaeum* em 50  $\mu\text{M}$ , apresentaram uma estratégia relacionada à degradação da clorofila para manter a densidade celular, comportamento já também observado em estudos anteriores (Piedras 2007 e Campos 2008).

Tanto em *S. pygmaeum* como em *Chlamydomonas* sp, a remoção de amônio foi maior na menor disponibilidade de amônio. Isto ocorre pois, segundo Kolodny *et al.*, (2006), nas baixas concentrações o mecanismo de transporte ativo é utilizado, enquanto nas altas este mecanismo é inibido, passando a ser realizado de forma passiva, e portanto mais lenta. Estes resultados para decaimento são bastante semelhantes aos encontrados por Piedras (2007).

Com 500  $\mu\text{M}$  de amônio, *Chlamydomonas* sp. apresentou melhor capacidade de remover amônio dissolvido, esgotando as reservas de amônio ao fim do experimento. Já *S. pygmaeum*, nesta mesma concentração, apresentou capacidade de remoção bastante limitada, chegando ao fim do experimento com pouco menos que a concentração inicial de amônio no meio (93% e 75% do amônio inicial nos Experimentos 1 e 2, respectivamente). Possivelmente existe algum fator impedindo que esta cepa remova mais amônio do meio, limitando também seu crescimento. Este comportamento já havia sido observado até mesmo em concentrações de 150  $\mu\text{M}$ , com uma taxa de decaimento bastante lenta ( $P_2 = 0,013$ ), e uma grande quantidade de amônio dissolvido ao fim do experimento (Piedras 2007). Segundo Spijkerman (2004) o pH pode ser um destes fatores, mas com o moni-

toramento do mesmo durante o Experimento 2, foi possível observar que o pH teve pouca influência tanto em relação ao crescimento como à remoção de amônio.

O fato mais intrigante deste trabalho, já apontado em um estudo anterior (Piedras 2007), relaciona - se ao marcante crescimento de *S. pygmaeum* sem utilização correspondente de amônio na disponibilidade de 500  $\mu\text{M}$ . Este trabalho mostrou que a variação de pH provocada pelo crescimento em amônio não está relacionado com a baixa utilização deste nutriente por *S. pygmaeum*. Esta baixa remoção de amônio, aliada a um crescimento significativo, pode ser explicada por uma alta capacidade de estoque de nitrogênio desta cepa em baixas disponibilidades de amônio. Provavelmente *S. pygmaeum* requer baixas concentrações de nitrogênio para o crescimento e a remoção mais acentuada em baixas disponibilidades pode ser um mecanismo adaptativo para garantir o estoque deste nutriente durante momentos de depleção nutricional em ambientes naturais. Em altas concentrações de nitrogênio, este mecanismo seria inibido e a captação seria mantida apenas no nível requerido para o crescimento. Esta explicação é ainda especulativa e que deve ser comprovada futuramente com a realização de experimentos envolvendo a utilização de amônio marcado (Maguer *et al.*, 2007).

O controle do pH nem sempre foi eficaz, como *Chlamydomonas* sp. que mesmo com adição de TRIS teve um significativo decaimento após o 10<sup>o</sup> dia, chegando próximo a 3 ao final do experimento. Provavelmente a quantidade de TRIS não foi suficiente para tamponar o pH com tanta densidade populacional, mas segundo Lourenço (2006) este tampão pode ser tóxico se ministrado em grandes quantidades. A diminuição do pH é esperada, embora raramente mencionada na literatura, uma vez que a dissociação do cloreto de amônio em água produz um ácido forte (HCl) e uma base fraca (NH<sub>4</sub>OH), reduzindo o pH. Quanto mais amônio é removido do meio pela microalga, mais a dissociação é acentuada e o pH gradativamente diminuído. Se a remoção produzir uma quantidade de ácido maior que a capacidade de tamponamento do TRIS, o pH diminui independentemente da presença do tampão, como foi observado em *Chlamydomonas* sp. na concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

## CONCLUSÃO

*Chlamydomonas* sp. apresentou maior adaptação ao amônio que *S. pygmaeum*, tanto na capacidade de remoção quanto no crescimento. Embora a utilização de amônio tenha diminuído o pH do meio, o seu controle não mostrou avanço significativo no crescimento e remoção de amônio por *S. pygmaeum*. Outros fatores parecem limitar a remoção de amônio e o crescimento de *S. pygmaeum* em altas concentrações de amônio. Estes resultados contribuíram para a composição de futuras classificações morfo - funcionais no que toca a adaptação ao amônio, bem como para o conhecimento do comportamento fisiológico destas espécies no fitoplâncton.

Agradeço à FURG pela disponibilização de uma bolsa trabalho, e ao Prof. Dr. Cleber Palma Silva por toda logística de trabalho no Laboratório de Limnologia.

## REFERÊNCIAS

- Baldia, S.F., Evangelista, A.D., Aralar, E.V. & Santiago, A.E. Nitrogen and Phosphorus Utilization in the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Isolated From Laguna de Bay, Philippines. *Journal of Applied Phycology*, 19: 607 - 613, 2007.
- Campos, A.C.S. Influência da Disponibilidade de Fosfato no Crescimento, na Produção de Compostos Orgânicos e na Morfologia de *Chloromonas* sp. (Chlorophyceae). Instituto de Ciências Biológicas, Rio Grande, RS, FURG. 2008, 50p.
- Giroldo, D. & Vieira, A.A.H. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research*, 27(7): 695 - 750, 2005.
- Giroldo, D., Vieira, A. A. H. & Paulsen, B. S. Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnemato-phyceae). *Phycologia*, 6: 671 - 677, 2005.
- Kolodny, N.H., Bauer, D., Bryce, K., Klucsevsek, K., Lane, A., Medeiros, L., Mercer, W., Moin, S., Park, D., Petersen, J., Wright, J., Yuen, C., Wolfson, A.J. & Alle, M. Effect of Nitrogen Source on Cyanophycin Synthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6308. *Journal of Bacteriology*, 188(3): 934 - 940, 2006.
- Lourenço, S.O. *Cultivo de Microalgas Marinhas-Princípios e Aplicações*. RIMA, São Carlos, 2006, 588p.
- Mackinney, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140: 315 - 322, 1941.
- Maguer, J.F., L'Helguem, S. & Madec, C. Nitrogen Uptake and Assimilation Kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): Effect of N - Limited Growth Rate on Nitrate and Ammonium Interactions. *Journal of Phycology*, 43: 295 - 303, 2007.
- Padisák, J. Phytoplankton in: Reynolds, C.S.; O'Sullivan, P.E. (eds.) *The Lakes Handbook*. Oxford Blackwell publishing, Oxford, 2004, p.251 - 298.
- Piedras, F. R. Produção de polissacarídeos extracelulares por *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae) em função do crescimento em diferentes fontes de Nitrogênio. Instituto de Ciências Biológicas, Rio Grande, RS, FURG. 2007, 38p.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli - Flores, L. & Melo, S. Towards a Functional Classification of the Freshwater Phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24(5): 417 - 428, 2002.
- Spijkerman, E., Garcia - Mendoza, E., Matthijs, H.C.P. & Coesel, P.F.M. Negative Effects of P - buffering and pH on Photosynthetic Activity of Planktonic Desmid Species. *Photosynthetica*, 42(1): 49 - 57, 2004.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. *A Practical Handbook of Seawater Analysis: Fisheries Research Board of Canada*. Ed. Ottawa, Ottawa, 1972, 311p.
- Van de Hoek, C.; Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, New York, 1995, 623p.