

Cultura *batch* de *Chlamydomonas reinhardtii*: determinação da curva de crescimento e parâmetros associados

João Vidigal¹, Nuno Domingues² e Nuno Gonçalves³

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed.C2, 1749-016 Lisboa, Portugal

¹ n°33167: trabalho prático 30%; pesquisa bibliográfica 36%; preparação do manuscrito 33,3%.

² n°39483: trabalho prático 35%; pesquisa bibliográfica 32%; preparação do manuscrito 33,3%.

³ n°29098: trabalho prático 35%; pesquisa bibliográfica 32%; preparação do manuscrito 33,3%.

Entregue a 20 de Janeiro de 2010

Chlamydomonas reinhardtii é uma microalga modelo muito estudada e de fácil cultura. Estas características tornam-na numa espécie com potencialidades para variadas aplicações, que vão desde a cultura para alimentação em aquacultura, a produção de biocombustíveis e potencialidades de transformação genética para melhoramento ou produção de outros compostos de interesse. A sua cultura, bem como de um modo geral a cultura de todas as microalgas, tem no entanto certas limitações que tornam a produção em larga escala pouco eficiente. Neste trabalho cultivou-se *C. reinhardtii* em fotobioreactores atendendo a dois diferentes regimes de luz. A luz é dos factores mais limitantes a um crescimento eficiente das culturas, sendo outro factor de peso os nutrientes disponíveis, que poderão afectar a capacidade ou padrão de divisão e provocar outros fenómenos indesejáveis. De modo a evitar problemas na cultura deve-se controlar todos os parâmetros que afectam o seu crescimento e multiplicação, de outro modo as algas não se aclimatarão e o seu crescimento não será o desejado. Através dos dois regimes de irradiação usados neste trabalho, obtiveram-se respostas diferentes no crescimento de *C. reinhardtii*. De um modo geral, não foi observada a curva típica de crescimento com fase exponencial seguida de fase estacionária e consequente declínio por exaustão de nutrientes, embora tenha havido um aumento da biomassa a dado momento para as culturas do regime I e para a cultura mais densa do regime II. Houve também formação de colónias palmelóides indicativa de mecanismos de defesa a condições adversas. Estes resultados embora pareçam mostrar que as culturas do regime I tenham crescido mais, revelam que em todas as culturas a alga nunca se aclimatou, revelando que seria necessário um melhor controlo dos vários parâmetros necessários ao aumento de biomassa esperado.

INTRODUÇÃO

Por vezes chamada de “levedura verde” (Goodenough, 1992; Rochaix, 1995), *Chlamydomonas reinhardtii* é uma alga clorófita unicelular que alcançou o reconhecimento como um sistema modelo para o estudo da fotossíntese, biogénese de organelos e muitos outros aspectos da biologia celular. Por ter um ciclo de vida simples, que é facilmente manipulado em laboratório, um crescimento com exigências mínimas nutricionais e um rápido crescimento favoreceram esta alga como organismo modelo.

A nível anatómico as células de *C. reinhardtii* tem uma forma esférica ovóide, variando entre 8 e 22 µm em comprimento ao longo do seu ciclo celular vegetativo. Tem um par de flagelos apicais que se estendem através de uma região colarinho especializada na parede celular, e são tipicamente 1,5 a 2 vezes o comprimento do corpo celular. Dois vacúolos contrácteis são geralmente vistos entre

os corpos basais e o núcleo (Harris, 2009). O núcleo está parcialmente envolto pelo cloroplasto em forma de chávena em *C. reinhardtii* enquanto em outras espécies pode estar disposto lateralmente, na zona distal do cloroplasto para o núcleo observa-se um pirenóide proeminente. Estas células estão cercadas por uma complexa parede celular composta de glicoproteínas com elevado conteúdo em hidroxiprolina (Harris, 2009).

As células vegetativas de *C. reinhardtii* são haplóides e crescem logaritmicamente num ciclo luz-escuro de 12:12. Habitualmente estas dividem-se sincronicamente durante o período escuro através de duas divisões mitóticas numa sucessão muito rápida, libertando quatro células filhas (Spessert e Waffenschmidt, 1990).

Inúmeros processos biológicos em *Chlamydomonas* são controlados por ritmos circadianos., e Goto e Johnson (1995) propuseram que o ciclo de divisão celular, fosse mesmo controlado por um relógio circadiano. Na natureza, o ciclo sexual é uma resposta a condições adversas. No laboratório, a gametogénese é controlado por escassez de azoto e por uma via de transdução de sinais em resposta à luz azul (Pan *et al.*, 1997). Dentro das primeiras 24h após o emparelhamento entre os dois tipos, mt^+ e mt^- , uma parede dura e impermeável é secretada, criando um zigósporo que é resistente à dessecação e a outras agressões ambientais. Quando induzido o processo de germinação, a meiose ocorre, seguida de uma divisão mitótica e a parede do zigósporo rebenta para libertar 4 ou 8 descendentes haplóides (Woessner e Goodenough, 1992).

Do ponto de vista biotecnológico, a produção de proteínas recombinantes têm-se tornado cada vez mais importante para a indústria química e farmacêutica. Apesar de vários sistemas de expressão de proteína já terem sido desenvolvidos, há uma crescente procura de métodos baratos e de grande escala. As algas eucarióticas poderiam servir como uma nova opção para o fabrico dessas mesmas proteínas recombinantes, visto elas poderem ser cultivadas de uma maneira fácil e económica e crescerem com elevadas densidades celulares. Sendo um organismo modelo, a alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* tem sido estudado intensamente nas últimas décadas e agora oferece um completo conjunto de ferramentas para a manipulação genética. Recentemente, a expressão bem-sucedida de várias proteínas relevantes para a indústria farmacêutica demonstra a sua capacidade para aplicações biotecnológicas (Griesbeck *et al.*, 2006)

Com este trabalho pretendeu-se determinar a curva de crescimento de várias culturas *batch* de *C. reinhardtii* em 2 condições de irradiação diferentes, havendo ainda análise do crescimento de culturas mais e menos concentradas em cada um dos regimes de luz. Para além disso pretendeu-se averiguar de diferentes métodos de determinação da biomassa durante as várias fases do crescimento, nomeadamente a contagem directa, medição de absorvância da clorofila e determinação do peso seco.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Preparação do meio

Para a inoculação inicial utilizou-se uma variação do meio Bold para culturas xénicas de água doce, o meio Bold1NV. As quantidades de macronutrientes e micronutrientes foram medidas, com pipetas de vidro graduadas e pompetes, consoante a descrita pela Universidade de Austin (Texas) para 400 mL de água destilada pura. O meio foi autoclavado num erlenmeyer. Para a segunda inoculação e repicagens utilizou-se Bold's Basal Medium (BBM), não autoclavado, cujas quantidades de nutrientes estão representadas na tabela 4.

B. Inoculação e repicagem das culturas

O inóculo inicial utilizado na experiência foi disponibilizado pelo Instituto de Oceanografia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e correspondia à estirpe IO-105-01 de *Chlamydomonas reinhardtii*, mantida em fitoclimas com fotoperíodo 14/10 (luz/escuro) a 19°C. Foram então inoculadas as culturas, em câmara de fluxo laminar horizontal, em erlenmeyers contendo 150 mL de meio Bold1NV com 50 mL de inóculo. Passado uma semana foi feita nova inoculação em erlenmeyers de 500 mL com cerca de 200 mL de volume total obedecendo a uma diluição 1:3 em meio BBM. Posteriormente foram feitas 5 repicagens em erlenmeyers de 2L com meio BBM, utilizando-se diferentes quantidades de inóculo, originando assim as nomenclaturas CR+ (cultura de *C. reinhardtii* mais concentrada) e CR- (cultura de *C. reinhardtii* menos concentrada).

C. Crescimento das culturas

As culturas foram mantidas numa sala de crescimento de temperatura ambiente controlada, oscilando entre os 17°C de temperatura mínima e os 24°C de temperatura máxima, com luz irradiada por uma lâmpada Philips TLD 36w/865 (França) com medidas de radiação entre os 12 e os 18 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (regime I). No regime II as condições foram as mesmas, mas a radiação foi feita com lâmpada Sylvania Gro-Lux F36/GRO (Alemanha), com radiação entre os 16 e os 19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medida com umadiómetro Li-Cor 250^a equipado com sensor Li-Cor LI-192.

D. Análises de crescimento

a) Contagens

As contagens foram efectuadas três vezes por semana em amostras de cada uma das culturas imobilizadas em Lugol, num hemacitómetro Neubauer Improved (Marienfield) a microscópio

óptico Leitz HM-Lux3 (Portugal). Contaram-se individualmente os quadrados médios ($0,1 \text{ mm}^3$) de forma sistemática até serem numeradas mais de 100 células. Foram então feitas as médias por quadrado médio e a partir destas a quantidade de células presentes por 1 cm^3 .

b) Medição de absorvâncias e recta de calibração

Foi utilizado um espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240 (UV-4i Spectrophotometer; Japão). As cuvetes de 2mL com 1 mL de amostra das 2 culturas eram lidas a um comprimento de onda de 540nm. Para a recta de calibração foram feitas diluições da cultura mãe de 1:32, 1:16, 1:10, 1:8, 1:6, 1:3, 1:2, 2:3 e 3:4.

c) Medição de pesos secos

Na medição do peso seco inicial foram utilizadas amostras de 5 mL das culturas CR+ e CR- e por acção de uma bomba de vácuo manual fizeram-se passar as culturas por rodela de papel de filtro esterilizado, recolhendo e desprezando a água resultante. Os filtros, com poro de 0,7 μm (Fisher Scientific, U.E.) eram então pesados numa balança de precisão Kern ABS 120-4 (capacidade mínima e máxima de 1 mg e 120g; Alemanha) e colocados numa estufa Memmert U25 (temperatura máxima 220°C; Alemanha) a 70°C. No dia seguinte retiravam-se os filtros da estufa e voltavam-se a pesar na mesma balança. Para a medição do peso seco final o procedimento foi similar com duas adendas: em lugar de uma bomba de vácuo manual utilizou-se uma bomba de vácuo eléctrica Gast Model DOA-P104-BN (E.U.A.) e os volumes de amostra utilizados foram de 71mL e 73mL para CR- e CR+, respectivamente.

RESULTADOS

Os resultados são apresentados separadamente para os 2 regimes luminosos estudados: o regime I em que as culturas Cr+ e Cr- foram irradiadas com níveis de PAR (radiação fotossinteticamente activa) entre os 12 e os 18 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o regime II em que 2 culturas Cr- (a e b) e uma Cr+ foram irradiadas com níveis de PAR entre os 16 e os 19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As curvas de crescimento obtidas para o regime 1 estão representadas na figura 1. Foram registadas fases de crescimento exponencial dos dias 9 a 19 na cultura com inóculo inicial mais concentrado Cr+ I, de onde foram calculados os parâmetros de crescimento da tabela 1 (r, taxa específica de crescimento; k, duplicações por dia; e T2, o tempo de duplicação). No regime 2 obtiveram-se as curvas de crescimento observadas na figura 2. Neste regime apenas a cultura Cr+, com inóculo inicial mais

denso, revelou uma fase exponencial bem demarcada. As culturas Cr- mantiveram-se relativamente constantes ao longo de todo o período da cultura.

Relacionou-se ainda a absorvância a 540 nm em diferentes fases do crescimento das culturas de *C. reinhardtii*. Para isso utilizou-se a recta de calibração da figura 3, que relaciona a densidade celular com a absorvância, a partir da cultura-mãe de onde se retirou os inóculos. A partir da equação desta recta calcularam-se os valores de densidade celular nas diferentes fases de crescimento em que se mediu a absorvância nas várias culturas em crescimento. Estes dados podem ser observados na tabela 3.

Foram ainda registados os dados relativos ao peso seco em 1mL de amostra das várias culturas, valores estes determinados para usar em conjunção com os valores determinados pelos métodos da contagem e da medição da absorvância. Deste modo averiguou-se se os diferentes métodos estariam em concordância para a determinação da biomassa de cada cultura (tabela 2 e figura 4).

De um modo geral não se observaram as diferenças comuns no crescimento de uma cultura: uma fase inicial (fase Lag) em que a densidade celular se mantém relativamente inalterada pois as algas encontram-se em aclimação, seguida da fase exponencial (fase Log). Não foi observada uma fase estacionária, passando as culturas em que houve algum crescimento exponencial directamente para a fase de declínio. Apesar de nenhuma delas ter entrado numa verdadeira fase de aclimação, as culturas CR- do regime II foram discrepantes em relação às restantes, tendo-se mantido sempre na mesma densidade. O logaritmo neperiano da densidade celular revela que não houve de facto crescimento exponencial em nenhuma das culturas (figuras 5 e 6).

DISCUSSÃO

O objectivo do trabalho efectuado foi averiguar as discrepâncias entre o crescimento das culturas de *C. reinhardtii* consoante as condições de luminescência aplicadas nos diferentes regimes e em diferentes concentrações na mesma quantidade de meio. Para tal foram aplicados vários métodos de observação da proliferação das microalgas.

Estirpes wild type de *C. reinhardtii* podem ser cultivadas em meio mínimo, ou com acetato adicionado, como uma fonte alternativa de carbono. O meio utilizado, o meio basal de Bold é um meio generalista para todo o tipo de algas com base na solução de Bristol e é utilizado em alguns trabalhos com *Chlamydomonas*, embora não seja normalmente para *C. reinhardtii* (Harris, 2009). Nas culturas iniciais utilizou-se este meio com micronutrientes adicionais (Tabela 1).

A disponibilidade de alguns nutrientes afecta alguns dos nossos resultados, pois o ciclo e o desenvolvimento celular estão intimamente ligados a esses nutrientes como o carbono, o fósforo, o azoto, entre outros. O carbono no meio encontra-se como CO_2 , HCO_3^- , e CO_3^{2-} , e flutua no

ambiente dependendo do pH, sendo também afectado pelo *output* respiratório e fotossintético dos organismos. Como organismo que pode alternar entre o solo e os habitats aquáticos, *Chlamydomonas reinhardtii* tem um complexo sistema para a utilização de qualquer carbono inorgânico disponível e principalmente a capacidade de concentrá-lo internamente. Esses processos, conhecidos colectivamente como mecanismos de concentração de carbono (CCM), têm sido amplamente estudados (Spalding, 2008).

A maioria das espécies do género *Chlamydomonas*, são capazes de assimilar nitrato, nitrito e amónia como única fonte de azoto, bem como uma série de outros compostos de nitrato, e é estimulada pela falta de azoto e reprimida por amónio ou nitrito, sendo um processo que requer energia. O nitrato é levado para dentro das células por sistemas de transporte específicos, e reduzido a nitrito pela nitrato redutase no compartimento citosólico. Transportadores, em seguida, fornecem o nitrito ao cloroplasto, onde é reduzido a amónia pela nitrito redutase. O excesso de azoto inorgânico é excretado (Fernandez e Galvan, 2007).

Já o enxofre ambiental entra nas células de *Chlamydomonas* predominantemente como íão sulfato, que é transportado por um processo dependente de energia. A falta de enxofre limita severamente o transporte de electrões da fotossíntese (Greenbaum e Melis, 2000).

Como no caso do enxofre, o fósforo ambiental é recuperado a partir de compostos orgânicos por enzimas extracelulares e, em seguida, captada pelas células *Chlamydomonas* como anião inorgânico. A desintegração da parede celular da mãe após a divisão liberta no meio de cultura fosfatases. Após a captação, a fosfato inorgânico é armazenado dentro da célula na forma de polifosfato, principalmente complexado com cálcio, magnésio e zinco em grânulos citosólico e na parede celular (Harris, 2009). As estirpes wild type de *C. reinhardtii* não necessitam de adição de vitaminas para o crescimento, em contraste com inúmeras outras algas no entanto como um meio generalista para a cultura de algas este tinha algumas essências (Harris, 2009).

O método essencial para este estudo quantitativo foi o da contagem com hemacitómetro efectuada ao longo do tempo o que resultou nas curvas de crescimento observadas nas figuras 1 e 2 para os diferentes regimes e verificou-se que *C. reinhardtii* nunca passou a uma fase distinta de aclimação, apesar de se ter observado uma fase de crescimento distinta no regime I e no regime II em CR+. Adicionalmente considerou-se existir uma fase exponencial ainda que na análise das curvas de crescimento em logaritmo neperiano (Figura 5 e Figura 6) não se tenha conseguido aferir tais asserções. No regime I, e ao longo do tempo, o crescimento foi semelhante em CR+ e CR- apesar desta última ter sempre uma densidade celular ligeiramente inferior. Observou-se um segundo pico de crescimento em CR+ que coincidiu com o período final da experiência em que se observou alteração das condições de iluminação das culturas – muitas vezes e sem conhecimento

nosso, a lâmpada encontrava-se desligada em períodos onde deveria estar ligada, o que pode explicar este fenómeno de crescimento que se observou em CR+ mas não em CR-.

Pela medição da absorvância na mesma altura em que se filtrou as amostras da cultura para determinação da biomassa (g PS.ml^{-1}) calculou-se a densidade celular aplicando a fórmula obtida pela recta de calibração, de modo a verificar se este método de determinação da biomassa coincidiria com as contagens em hemacitómetro. Observou-se que existe uma discrepância entre estes resultados, visto que pelas contagens no dia 7 em CR+ se observavam $1,4 \times 10^5$ enquanto que no dia seguinte a partir da biomassa das amostras filtradas obteve-se $6,8 \times 10^4$. Verificou-se uma situação semelhante para CR- ($1,04 \times 10^5$ e $5,02 \times 10^4$, respectivamente). No último dia de cultura, utilizando o mesmo procedimento, obteve-se $2,07 \times 10^5$ e $3,25 \times 10^5$ para CR+ e 9×10^4 e $2,28 \times 10^5$ para CR-, respectivamente. Para o regime II $1,01 \times 10^5$ e $5,84 \times 10^5$ para CR+ CR-A, respectivamente.

Nestes estudos verificou-se também a formação de colónias palmelóides, normalmente associadas a deficiências nutritivas e presença de ácidos orgânicos no meio de cultura (Nakamura 1974). Estas encontravam-se presentes desde as primeiras repicagens. Em algumas das contagens feitas para a aferição da densidade celular observaram-se alguns protozoários parasitários de espécie não identificada o que poderá resultar também num aumento de formação destas colónias palmelóides, como sugerido anteriormente por uma subida dos seus números em presença de predadores rotíferos do fitoplâncton (Lurling e Beekman, 2006).

CONCLUSÕES

Com o estudo efectuado seria expectável obtermos uma curva típica de crescimento desta espécie de microalga, mal tal não foi possível possivelmente por inadequação do meio que pelo facto de não ser esterilizado propiciou a invasão de parasitas. Também por ser meio líquido estático, sem agitação, provocou uma morte acrescida das células.

Ainda assim conseguimos comprovar um crescimento das algas, ainda que anómalo, provando que *C. reinhardtii* não se trata de uma espécie de microalga muito exigente, visto que mesmo em condições sub-óptimas conseguimos obter um aumento da biomassa. Nas condições adequadas provavelmente teríamos uma considerável percentagem acrescida de crescimento, reflexo de que tais organismos são propensos a serem utilizados em diversas indústrias e aplicações biotecnológicas pela facilidade de cultura a baixo custo.

Iluminação contínua produz rapidamente um crescimento logarítmico em cultura líquida, numa gama de densidade celular de aproximadamente 10^5 para 10^7 células / ml, com tempos de

duplicação da ordem de 5-8 horas, dependendo da estirpe, da intensidade da luz, da temperatura e da composição do meio. Para atingir a densidade celular final, também depende desses factores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fernandez, E. e Galvan, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*, *Journal of Experimental Botany*, 58: 2279-2287.

Goodenough, U.W. (1992). Green yeast, *Cell*, 70: 533-538.

Goto, K. e Johnson, C.H. (1995). Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of Cell Biology*, 129: 1061-1069.

Greenbaum, E. e Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂, *Trends in Biotechnology*, 18: 506 – 511.

Griesbeck, C., Kobl, I. e Heitzer, M. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*: a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins, *Molecular Biotechnology*, 34: 213-223.

Grossman, A. (2000). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment, *Protist*, 151: 201-224.

Harris, E.H. (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, San Diego: Academic Press.

Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C. e Grossman, A.R. (2007). Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(35): 25475-25486.

Pan, J.M., Having, M.A. e Beck, C.F. (1997). Characterization of blue light signal transduction chains that control development and maintenance of sexual competence in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, 115: 1241-1249.

Rochaix J. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast, *Annual Review of Genetics*, 29: 209-230.

Sack, L., Zeyl, C., Bell, G., Sharbel, T., Reboud, X., Bernhardt, T. e Koelewyn, H. (1994). Isolation of four new strains of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) from soil samples, *Journal of Phycology*, 30: 770-773.

Savard, F., Richard, C. e Guertin, M. (1996). The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the cabI/II genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination, *Plant Molecular Biology*, 32: 461-473.

Spalding, M.H. (2008). Microalgal carbon dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters, *Journal of Experimental Botany*, 59: 1463–1473.

Spessert, R. e Waffenschmidt, S. (1990). Studies on the vegetative autolysin during the vegetative life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*, *European Journal of Cell Biology*, 51: 17–22.

Woessner, J.P. e Goodenough, U.W. (1992). Zygote and vegetative cell wall proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* share a common epitope, *Plant Science*, 83: 65–76.

FIGURAS E TABELAS

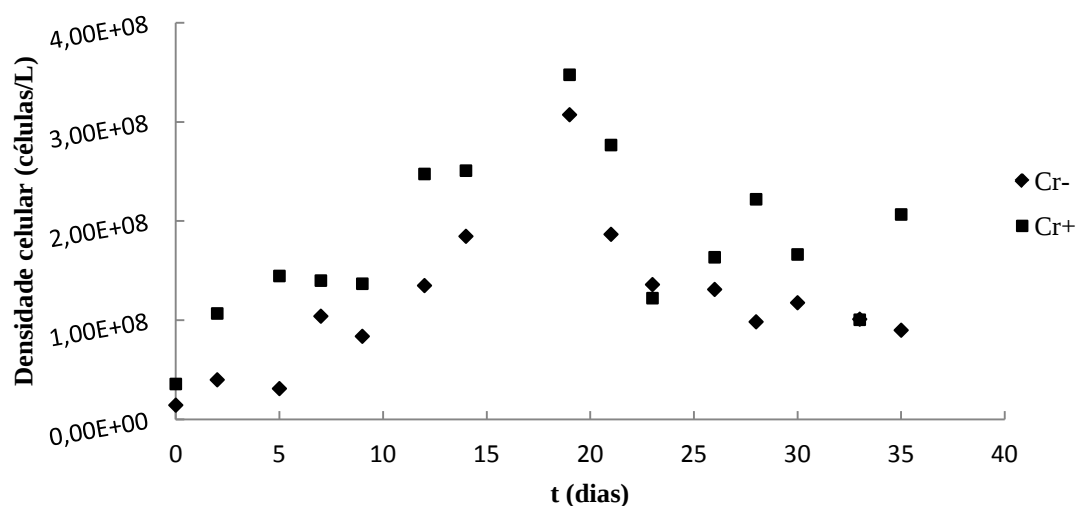


Figura 1 – Curva de crescimento das cultura *C. Reinhardtii* com inóculo mais denso (Cr+) e menos denso (Cr-) no regime I (radiação PAR=12-18 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

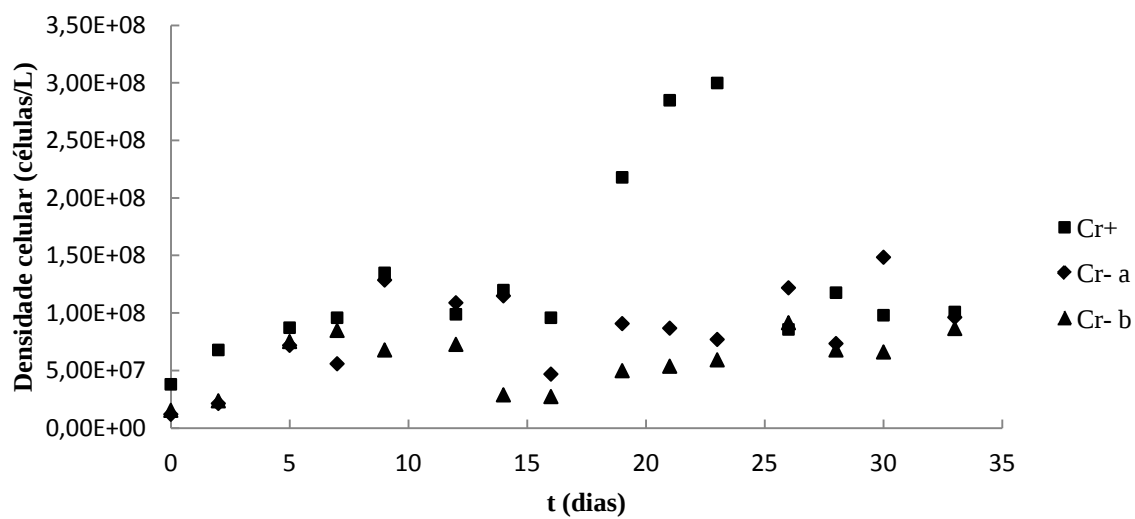


Figura 2 – Curva de crescimento das cultura *C. Reinhardtii* com inóculo mais denso (Cr+) e menos denso (Cr-) no regime II (radiação PAR=16 e os 19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

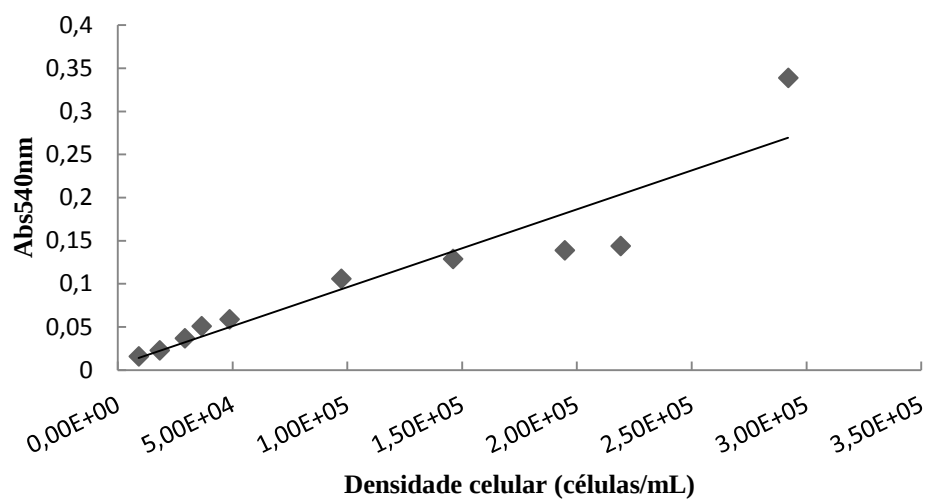


Figura 3 – Recta de calibração determinada através da medição da absorvância a 540 nm a partir da cultura-mãe ($y=9.10^{-7}x+0,0058$).

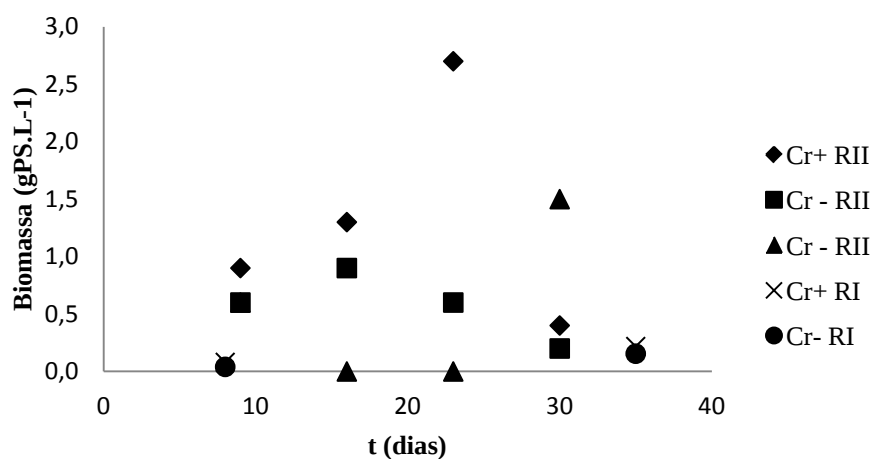


Figura 4 – Biomassa em g PS.L⁻¹ medida ao longo das culturas no regime II.

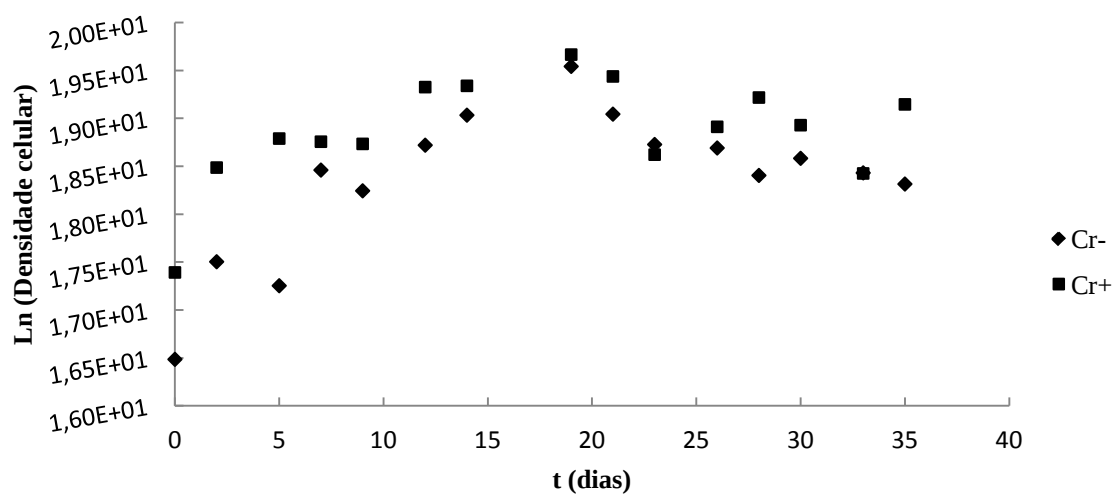


Figura 5 – Curva de crescimento das cultura *C. Reinhardtii* com inóculo mais denso (Cr+) e menos denso (Cr-) no regime I (radiação PAR=16 e os 19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em escala logarítmica.

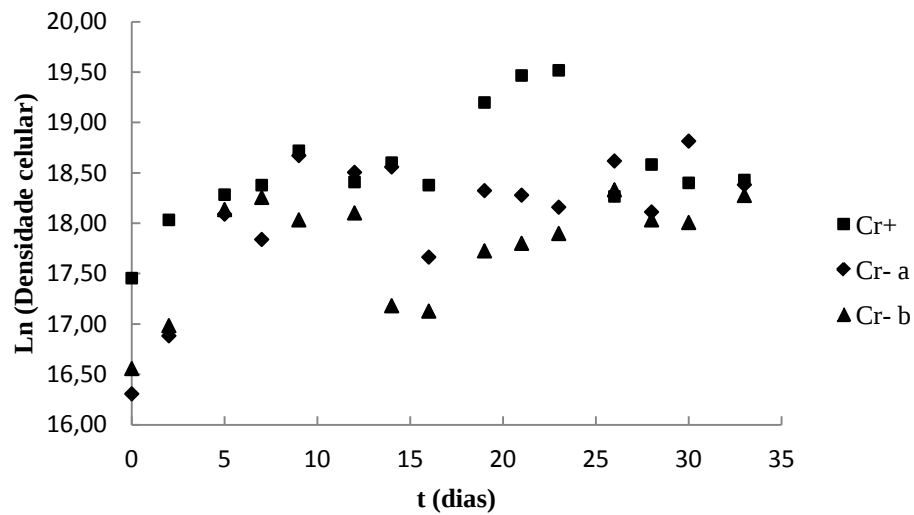


Figura 6 – Curva de crescimento das cultura *C. Reinhardtii* com inóculo mais denso (Cr+) e menos denso (Cr-) no regime II (radiação PAR=16 e os 19 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em escala logarítmica.

Tabela 1 – Macronutrientes e micronutrientes do meio Bold 1NV.

Componente	Quantidade	Concentração da solução stock	Concentração final
MACRONUTRIENTES			
NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	10 g/400mL dH2O	2.94 mM
CaCl ₂ .2H2O (Sigma C-3881)	10 mL/L	1 g/400mL dH2O	0.17 mM
MgSO ₄ .7H2O (Sigma P 230391)	10 mL/L	3 g/400mL dH2O	0.3 mM
K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	3 g/400mL dH2O	0.43 mM
KH ₂ PO ₄ (Sigma P 0662)	10 mL/L	7 g/400mL dH2O	1.29 mM
NaCl (Fisher S271-500)	10 mL/L	1 g/400mL dH2O	0.43 mM
MICRONUTRIENTES			
P-IV Metal Solution	6 mL/L		
Vitamina B12	1 mL/L		
Solução vitamínica Biotin	1 mL/L		
Solução vitamínica Thiamine	1 mL/L		

Tabela 2 – Parâmetros de crescimento (r, taxa específica de crescimento; k, duplicações por dia; e T2, o tempo de duplicação).

	Cr-			Cr+		
	r	k	T2	r	k	T2
Regime I	0,13	0,19	5,34	0,07	0,09	10,63
Regime II	-*	-*	-*	0,45	0,64	1,55

*No regime II não se observou crescimento exponencial em ambas as culturas menos densa

Tabela 3 – Biomassa determinada em diferentes tempos de cultura.

t (dias)	Biomassa (g PS.mL ⁻¹)				
	Regime I		Regime II		
	Cr+	Cr-	Cr+	Cr- a	Cr- b
8	8,00x10 ⁵	4,00x10 ⁵	-	-	-
9	-	-	1,80x10 ⁴	1,20x10 ⁴	1,20x10 ⁴
16	-	-	2,60x10 ⁴	1,80x10 ⁴	0,00
23	-	-	5,40x10 ⁴	1,20x10 ⁴	0,00
30	-	-	8,00x10 ⁵	4,00x10 ⁵	3,00x10 ⁴
35	2,18x10 ⁴	1,55x10 ⁴	3,04x10 ⁴	1,56x10 ⁴	1,68x10 ⁴

Tabela 4 – Densidade celular calculada através dos valores obtidos pela medição da absorvância para o regime I e II.

Densidade celular (células.mL ⁻¹)			
t (dias)		8	35
Regime I	Cr+	6,80x10 ⁴	3,25x10 ⁵
	Cr-	5,02x10 ⁴	2,28x10 ⁵
Regime II	Cr+	-	5,84x10 ⁵
	Cr- a	-	5,05x10 ⁵
	Cr- b	-	3,27x10 ⁵