

## Variação da composição química do meio de cultura e da bioquímica celular de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), em cultivos estanques

Elizabeth AIDAR; Roberto EHRlich; Cristina Sayuri ASANO & Teresa Cristina Siqueira SIGAUD

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo  
(Caixa Postal 9075, 01065-970 São Paulo, SP, Brasil)

- **Abstract:** *P. tricornutum* was grown in batch cultures under 21°C temperature and continuous irradiance of  $183 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , provided by fluorescent light tubes. Cultures growth were followed by cell countings, "in vivo" fluorescence and cellular protein, carbohydrate and chlorophyll-*a* content. The maximum value of protein/carbohydrate ratio was found at the exponential phase and the minimum value at the stationary phase. This ratio characterizes the physiological stage of the culture. Cell uptake rates for nitrate, ammonium and phosphate from the media were higher during the lag-phase. Nitrite excretion by the cells were detected following nitrate uptake.
- **Descriptors:** *Phaeodactylum tricornutum*, Algae culture, Chlorophylls, Proteins, Nutrients (mineral), Carbohydrates.
- **Descritores:** *Phaeodactylum tricornutum*, Cultivo de algas, Clorofila-*a*, Proteínas, Nutrientes inorgânicos, Carboidratos.

### Introdução

Os cultivos tipo "batch" ou estanques (Stemann-Nielsen, 1978; Pribil & Marvan, 1979) têm sido amplamente utilizados para o estudo da fisiologia das espécies de microalgas marinhas em relação aos fatores ambientais. Grande quantidade de informação, de considerável importância ecológica, sobre diferentes espécies tem resultado desses experimentos, desde a década de 1930 no exterior (Harvey, 1939; Kain & Fogg, 1958; Droop, 1958; Braarud, 1961; Guillard & Ryther, 1962; Laing, 1985; Fabregas *et al.*, 1984; entre outros) até mais recentemente no Brasil, quando esses trabalhos foram iniciados (Vieira, 1975; Aidar-Aragão, 1980; Gaeta, 1987; Sassi *et al.* 1988; Sigaud, 1990).

No entanto, não deve ser esquecido que devido à interação dos organismos com o meio de cultura, um cultivo estanque se encontra sob contínua alteração. As modificações na composição química do meio se refletem no metabolismo das células e, conseqüentemente, na sua bioquímica celular.

No presente trabalho os conteúdos de clorofila-*a*, proteína e carboidrato celulares foram analisados durante o desenvolvimento de uma cultura de *Phaeodactylum tricornutum*, com o objetivo de constatar possíveis

mudanças na sua composição bioquímica com a idade da cultura. Outro objetivo foi determinar a velocidade de absorção dos sais nutrientes pelas células, através do decréscimo de suas concentrações no meio de cultura, durante as diferentes fases de desenvolvimento da biomassa algal.

### Material e métodos

Células de uma cultura estanque axênica da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin), clone Ub-3, pré-cultivada em meio de cultura ASP2 (Provasoli *et al.*, 1957), foram usadas como inóculo. A cultura permaneceu por algumas semanas em fase estacionária de crescimento e, portanto, pode-se assumir que as células se encontravam exauridas de sais nutrientes. Um certo volume dessa cultura foi adicionado a três balões de borossilicato (Pyrex) de 6 litros de capacidade, contendo cada um 4 litros de meio de cultura Guillard f/8 (Guillard & Ryther, 1962), de modo a se obter uma densidade inicial de  $1,0 \times 10^4$  células. $\text{ml}^{-1}$ . Os balões foram colocados em um banho termostatizado à  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , recebendo uma radiação luminosa constante de  $183 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia. A homogeneização

do meio foi contínua, obtida através de agitadores magnéticos, sob baixa rotação.

O crescimento das culturas foi seguido através de medidas de fluorescência "in vivo" em um fluorímetro Turner, mod.111, e por contagens do número de células em sub-amostras preservadas com lugol, em câmaras tipo hemocitômetros. As taxas de crescimento ( $\mu$ ), expressas em número de divisões celulares.dia<sup>-1</sup>, foram calculadas segundo a equação  $\mu = (\log_2 N_t - \log_2 N_{t-1}) / t$ , onde  $N_t$  é o número de células no tempo  $t$ ,  $N_{t-1}$  é o número de células no tempo  $t-1$ , dado em dias. O maior valor da taxa de crescimento, obtido em dias sucessivos, durante a fase exponencial, foi aqui considerado.

A clorofila-*a* de cada amostra filtrada através de filtros de fibra de vidro Whatman tipo GF/F, foi extraída em acetona 90% e determinada por fluorimetria (Strickland & Parsons, 1968).

Para a determinação de carboidratos e proteínas totais, alíquotas de 10 a 50 ml de cada frasco experimental, em duplicatas ou não, foram filtradas em membranas de fibra de vidro (GF/F Whatman, de 2,5 cm de diâmetro), previamente incineradas em mufla à 400°C, durante 4 horas. Os filtros foram mantidos em frascos contendo sílica-gel, no congelador, até o momento da análise.

Para a extração de carboidratos totais seguiu-se o procedimento descrito por Myklestad & Haug (1972), que consiste na adição de 1 ml de ácido sulfúrico a 80% ao filtro seco contendo a amostra, mantido em um frasco fechado no interior de um recipiente com gelo. Após cerca de 20 horas, a mistura foi diluída com 7 ml de água destilada e a quantidade de carboidrato em solução determinada através do método baseado na reação em ácido sulfúrico e fenol, empregando-se a glicose como padrão (Dubois *et al.*, 1956).

A determinação de proteínas totais das células retidas pelos filtros GF/F (tratados como acima) foi feita de acordo com a técnica descrita por Lowry *et al.* (1951), baseada na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu fenol, utilizando o comprimento de onda de 660 nm para as leituras espectrofotométricas.

O meio de cultura filtrado foi utilizado para análise do nitrato e nitrito (Strickland & Parsons, 1968) seguindo as modificações sugeridas por Aminot & Chaussepied (1983), do amônio (Aminot & Chaussepied, *op.cit.*) e do fosfato (Grasshoff *et al.*, 1983) dissolvidos.

Para todos os valores médios relativos às análises de concentração de nutrientes no meio de cultura, assim como para aqueles referentes às variações do conteúdo de clorofila-*a*, proteínas e carboidratos celulares, foram calculados os intervalos de confiança, a nível de 5% de significância.

As velocidades de absorção dos sais nutrientes, normalizadas para o número de células presentes, foram calculadas segundo a equação:

$$V(t) = -dS/dt \cdot 1/X + \mu(S/X) \quad (1)$$

onde  $V(t)$  é a velocidade de absorção instantânea dos nutrientes;  $-dS/dt$  é a inclinação da curva de concentração do substrato (em  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) em função do tempo (em dias);  $X$  é o número de células por litro;  $\mu$  é a taxa de crescimento, para o tempo  $t$  e  $S$  é a concentração de cada nutriente ou substrato, para o tempo  $t$ .

A equação (1) foi desenvolvida a partir de

$$V(t) = -d(S/X) / dt \quad (2)$$

onde se considera que a velocidade instantânea de absorção de nutrientes,  $V(t)$ , é igual à taxa de variação da concentração do substrato, pela densidade celular.

A equação (1) pode ser considerada análoga à equação

$$dQ/dt = v - \mu Q \quad (3) \text{ Droop (1975)}$$

onde  $Q$  é o "Cell Quota" para uma dada taxa de crescimento  $\mu$  e  $v$  é a velocidade específica de absorção. Esta equação modela o crescimento de culturas em equilíbrio ("steady-state"), mantidas em quemostatos (Droop, *op.cit.*).

Comparando a equação (1) com a equação (3) verifica-se que na primeira, a variação na concentração de substrato ( $-dS/dt \cdot 1/X$ ) representa a taxa de desaparecimento do nutriente no meio de cultura enquanto que na segunda ( $dQ/dt$ ) representa a taxa de formação do estoque intracelular do nutriente limitante. Esta última equação (3) aplica-se exclusivamente às condições de equilíbrio, enquanto que a equação (1), pode ser aplicada aos estados transientes ou de perturbação nutricional do meio.

## Resultados e discussão

### Curvas de crescimento de *P. tricornutum*

Através da Figura 1 pode-se distinguir claramente as fases de indução, exponencial e estacionária de crescimento. A taxa máxima de crescimento foi observada entre o segundo e terceiro dias de experimento ( $2,08 \pm 0,18$  divisões.dia<sup>-1</sup>). Este valor é próximo daquele encontrado por diversos autores, com diferentes meios de cultura sob aproximadamente, as mesmas condições experimentais de temperatura e salinidade utilizadas neste trabalho (Ben-Amotz & Gilboa, 1980; Fawley, 1984; Gaeta, 1985). O rendimento máximo obtido foi de  $(1,96 \pm 0,09) \cdot 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>.

### Composição química do meio de cultura

As curvas relativas às concentrações de fosfato (Fig. 2a), nitrato (Fig. 3a) e amônio (Fig. 4a) dissolvidos apresentaram o mesmo padrão de comportamento. Os altos valores iniciais ( $286 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de N-NO<sub>3</sub> e  $9,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$  de P-PO<sub>4</sub>) mostraram um rápido decréscimo chegando a níveis indetectáveis, no caso de nitrato, e a níveis bastante baixos no caso do fosfato (cerca de  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ), no 6º dia de experimento. O amônio inicialmente presente ( $4,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) estava contido na água do mar usada no preparo do meio de cultura. No segundo dia do experimento a concentração caiu para cerca de  $1,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , mantendo-se neste nível até o último dia de amostragem.

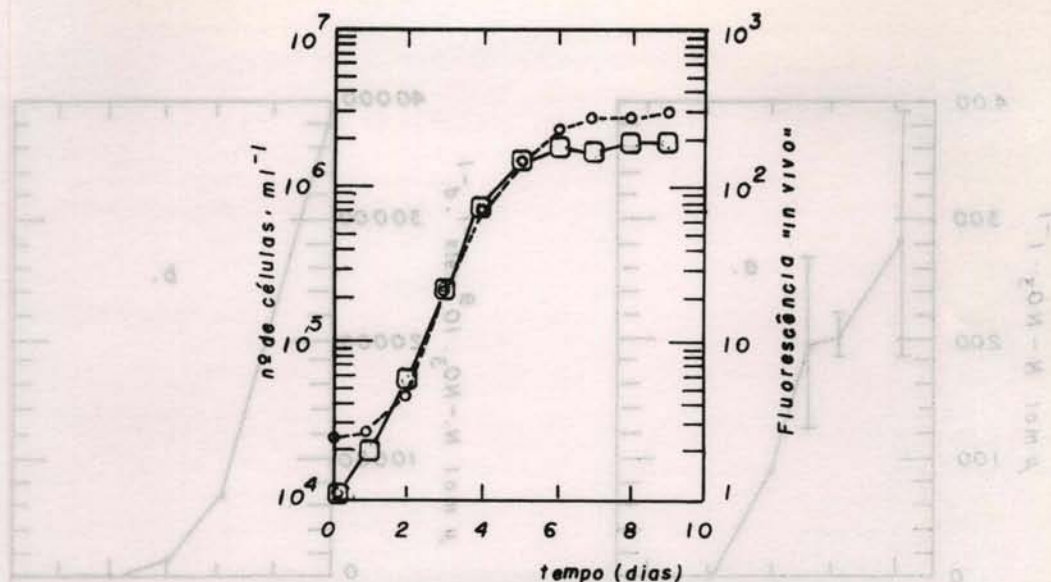


Fig. 1. Curvas de crescimento de *P. tricomutum* baseadas na variação da (O) densidade celular (cels.ml<sup>-1</sup>) e da (□) fluorescência "in vivo" (unidades arbitrárias), ao longo do tempo.

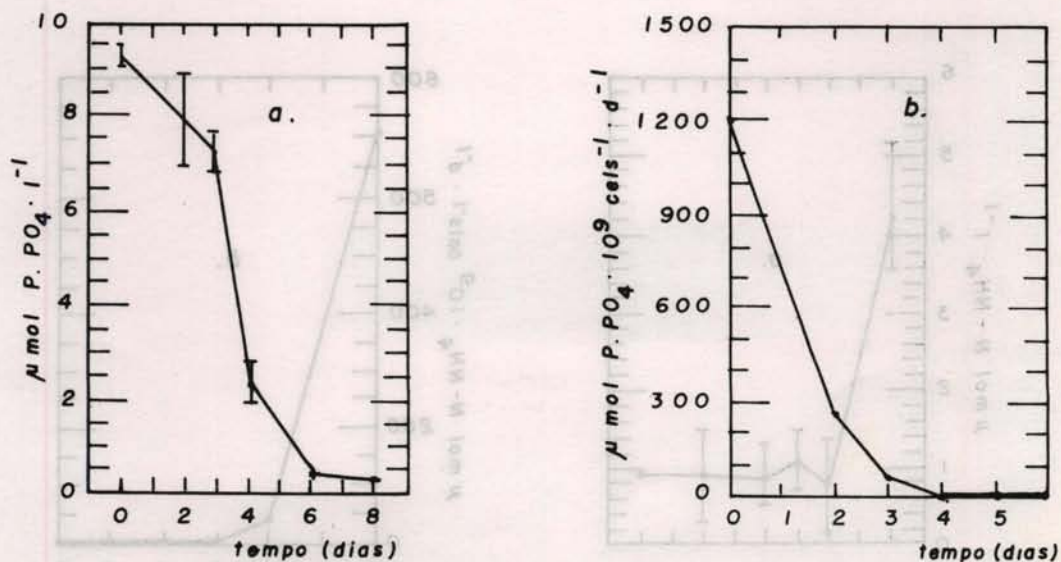


Fig. 2. Variação da (a) concentração de fosfato no meio de cultura ( $\mu\text{mol P-PO}_4\cdot\text{l}^{-1}$ ) e das (b) velocidades específicas de absorção de fosfato ( $\mu\text{mol}\cdot 10^9\text{ cels}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

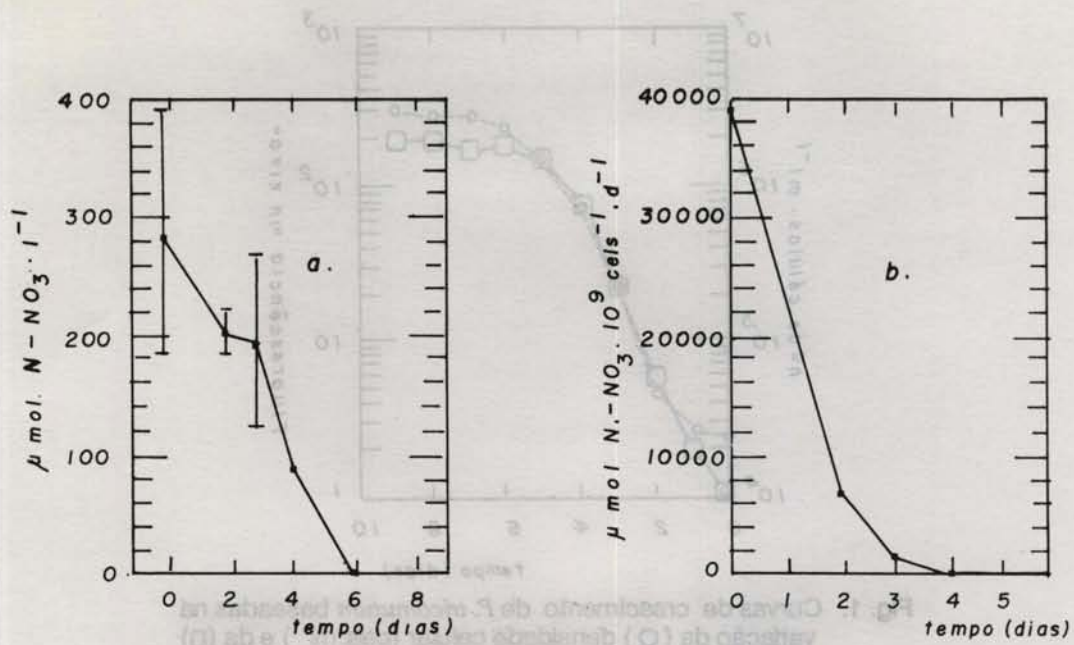


Fig. 3. Variação da (a) concentração de nitrato no meio de cultura ( $\mu\text{mol N-NO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$ ) e das (b) velocidades específicas de absorção de nitrato ( $\mu\text{mol} \cdot 10^9 \text{ cels}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

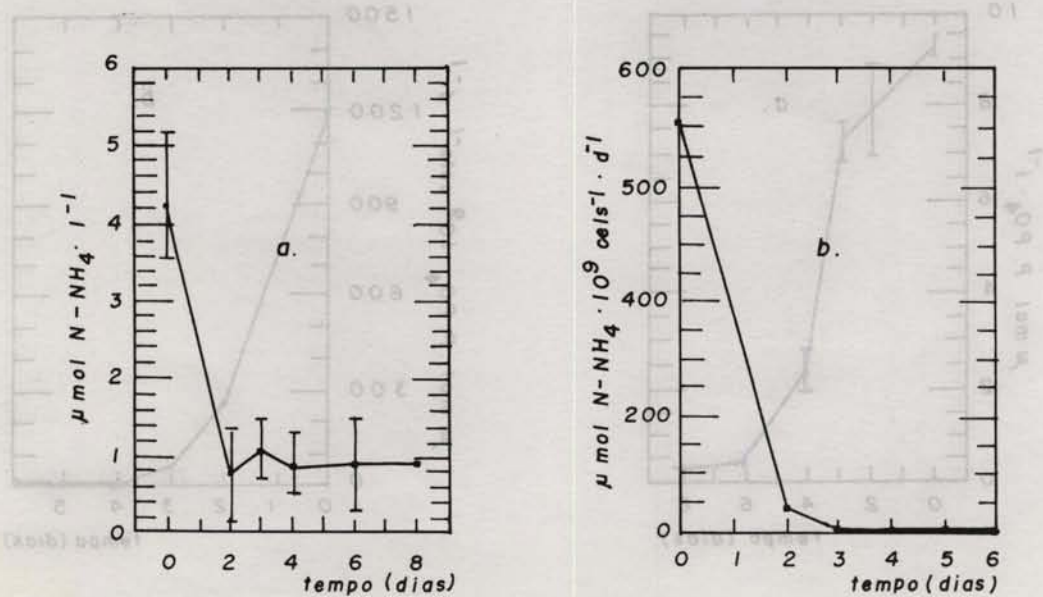


Fig. 4. Variação da (a) concentração de amônio no meio de cultura ( $\mu\text{mol N-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1}$ ) e das (b) velocidades específicas de absorção de amônio ( $\mu\text{mol} \cdot 10^9 \text{ cels}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

Os valores das velocidades instantâneas de absorção dos diferentes nutrientes analisados (Tab. 1; Fig. 2b, 4b) mostram que as maiores velocidades de absorção ocorreram nos primeiros dias do experimento, isto é, durante a fase de indução do crescimento da cultura. Assim, os nutrientes foram prontamente e simultaneamente absorvidos pelas células, porém, o aumento significativo de biomassa só ocorreu a partir do 2º dia, ou início da fase exponencial. Isto demonstra que os processos de absorção e de assimilação dos nutrientes são distintos e que os valores máximos de seus indicadores (taxa de decréscimo da concentração de nutrientes no meio, ou absorção, e taxa de divisão celular e síntese de proteínas ou assimilação) são defasados no tempo (Goldman & Glibert, 1983; Collos, 1986).

As variações da concentração de nitrito no meio de cultura (Fig. 5a) e sua velocidade de absorção (Fig. 5b; Tab. 1) mostram um comportamento totalmente diverso daquele encontrado para os demais nutrientes. Inicialmente este íon não foi detectado no meio de cultura (Fig. 5a) e a sua concentração atingiu o valor máximo de  $4,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$  no 4º dia do experimento, diminuindo a partir de então. Considerando que o cultivo era axênico, pode-se atribuir esse fenômeno unicamente à excreção de nitrito pelas células. Este é um processo acoplado à absorção de nitrato seguida pela sua redução intracelular, mediada pela nitrato-redutase (Raimbault, 1986). O nitrito passa a ser absorvido pelas células, o que é demonstrado na Figura 5b e na Tabela 1, a partir do quarto dia, quando a concentração de nitrato no meio de cultura tende à exaustão (Fig. 3a).

### Composição celular

As curvas de crescimento determinadas através da análise de clorofila-*a* total (Fig. 6a), proteína (Fig. 7a) e carboidrato celular total (Fig. 8a) seguem o mesmo padrão das curvas de crescimento baseadas em densidade celular e fluorescência "in vivo" (Fig. 1). Seus valores máximos foram de  $2,44 \pm 0,46 \mu\text{g}$  de clorofila-*a* total. $\text{ml}^{-1}$ ,

$3,29 \pm 0,66 \mu\text{g}$  de proteína. $\text{ml}^{-1}$  e  $18,83 \pm 0,98 \mu\text{g}$  de carboidrato. $\text{ml}^{-1}$ . No entanto, quando os dados acima foram normalizados para o número de células (Figs 6b, 7b e 8b), observaram-se diferentes padrões de comportamento.

O conteúdo de clorofila-*a* total por célula variou de 1,10 a  $7,88 \text{ pg.cel}^{-1}$ , apresentando uma diminuição drástica a partir do início do experimento até o 3º dia (Fig. 6b). Na análise deste resultado deve-se considerar que as células do inóculo foram provenientes de uma cultura bastante densa (aproximadamente  $5.10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$ ) e que vinha sendo mantida sob uma radiação luminosa de  $23 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Desta forma, encontrando-se as células adaptadas à baixa intensidade de luz, intensificada pelo auto-sombreamento, apresentaram uma alta concentração de clorofila-*a*. Este dado corrobora o modelo clássico da fotoadaptação, quanto à síntese de clorofila-*a* pelas células (Prézelin, 1981). Em condições de radiação luminosa mais alta e maior disponibilidade de nutrientes, no decorrer do experimento, ocorreu adaptação às novas condições o que levou a uma redução na concentração de clorofila-*a* intracelular.

O conteúdo de proteína celular (Fig. 7b) aumentou significativamente do dia zero ao dia dois ( $0,00$  a  $3,50 \text{ pg.cel}^{-1}$ ). Isto pode ser explicado, tanto pela síntese de enzimas envolvidas nos processos de absorção e assimilação dos nutrientes, como também pela produção dos demais compostos nitrogenados estruturais. A partir do 4º dia de experimento, isto é, no final da fase exponencial, o decréscimo na concentração de proteína celular foi evidente, atingindo níveis comparáveis ao das células do inóculo, em fase estacionária, no último dia de amostragem.

O carboidrato celular (Fig. 8b) apresentou uma variação de  $4,96$  a  $49,20 \text{ pg.cel}^{-1}$ , com um decréscimo conspícuo de concentração a partir do inóculo até o 4º dia de experimento, seguido de um ligeiro aumento nos dias posteriores. Os resultados da razão proteína/carboidrato se encontram na Tabela 2.

Tabela 1. Velocidades instantâneas ( $V_t$ ) de absorção de amônio, fosfato, nitrato e nitrito.  $V_t$  é expressa em  $\mu\text{mol.10}^9\text{cels}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , calculada segundo a equação (1). Os valores negativos correspondem à excreção celular.

IDADE DA CULTURA	$\text{NH}_4^+$	$\text{PO}_4^-$	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$
0	709,48	1202,38	39137,20	-11,00
2	44,77	263,57	6982,73	1,14
3	8,36	69,48	1774,16	-0,86
4	1,62	6,79	239,52	7,58
6	0,02	0,29	12,70	0,47

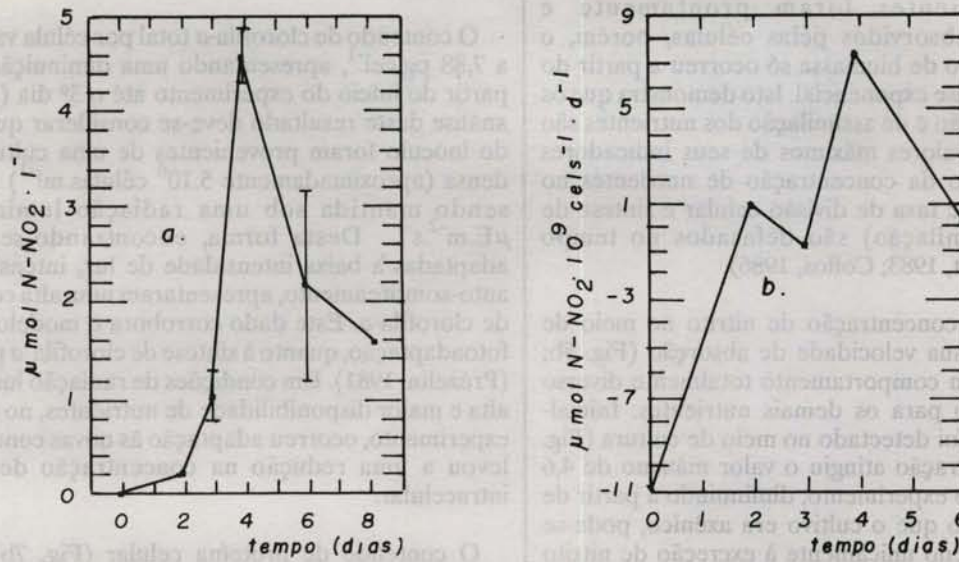


Fig. 5. Variação da (a) concentração de nitrito no meio de cultura ( $\mu\text{mol N-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ ) e das (b) velocidades específicas de absorção de nitrito ( $\mu\text{mol} \cdot 10^9 \text{ cells}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

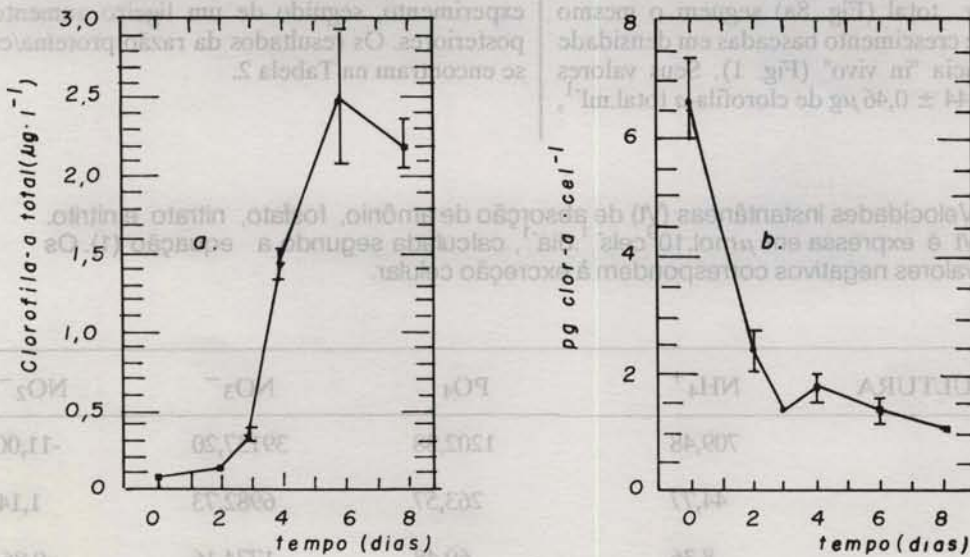


Fig. 6. Conteúdo de (a) clorofila-a total ( $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) e de (b) clorofila-a por célula ( $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

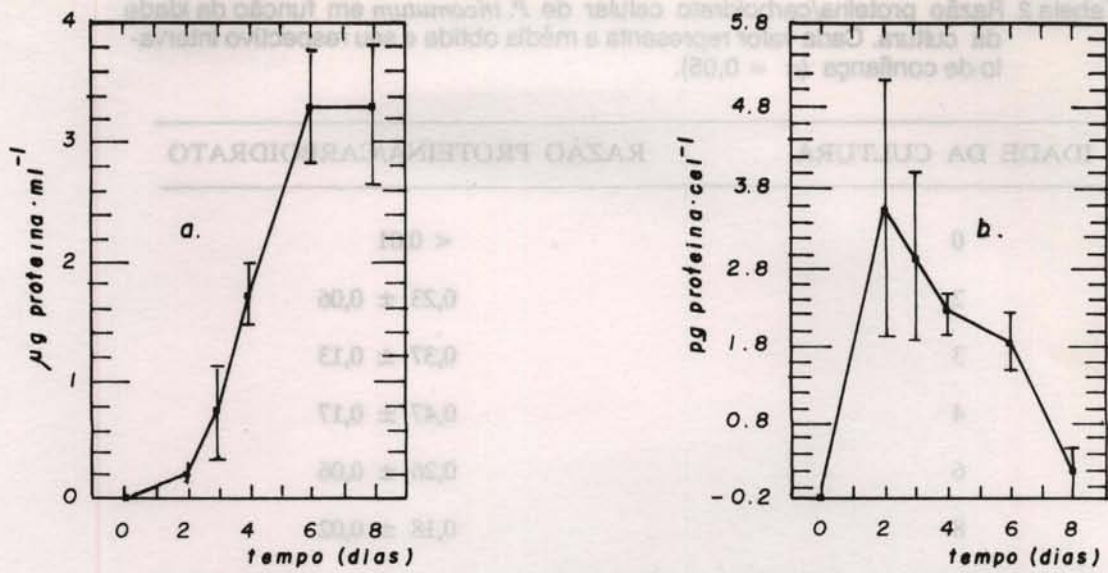


Fig. 7. Conteúdo de (a) proteína total ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e de (b) proteína por célula ( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

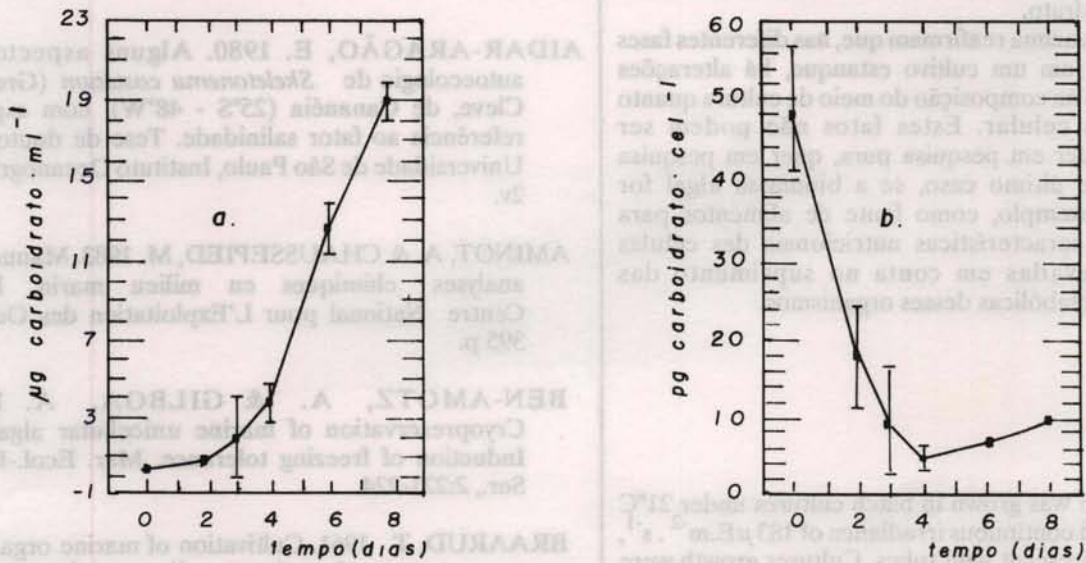


Fig. 8. Conteúdo de (a) carboidrato total ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e de (b) carboidrato por célula ( $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ), em função da idade da cultura.

Tabela 2. Razão proteína/carboidrato celular de *P. tricornutum* em função da idade da cultura. Cada valor representa a média obtida e seu respectivo intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

IDADE DA CULTURA	RAZÃO PROTEÍNA/CARBOIDRATO
0	< 0,01
2	0,23 ± 0,06
3	0,37 ± 0,13
4	0,47 ± 0,17
6	0,26 ± 0,06
8	0,18 ± 0,02

Como observado por Myklestad & Haug (1972) a composição química celular é fortemente influenciada pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. No início da fase exponencial, a síntese de proteínas é favorecida pelas condições nutricionais do meio de cultura. Isto determinou um aumento nos valores da razão proteína/carboidrato, até o 4º dia do experimento. A partir de então, o meio de cultura, bastante deficiente em nutrientes, especialmente nitrogênio, favoreceu um incremento na síntese de carboidratos em relação à síntese proteica, resultando na diminuição da razão proteína/carboidrato.

Os resultados acima reafirmam que, nas diferentes fases de crescimento em um cultivo estanque, há alterações marcantes tanto na composição do meio de cultura quanto na bioquímica celular. Estes fatos não podem ser desprezados, quer em pesquisa pura, quer em pesquisa aplicada. Neste último caso, se a biomassa algal for utilizada, por exemplo, como fonte de alimentos para herbívoros, as características nutricionais das células deverão ser levadas em conta no suprimento das necessidades metabólicas desses organismos.

## Resumo

*P. tricornutum* was grown in batch cultures under 21°C temperature and continuous irradiance of 183  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , provided by fluorescent light tubes. Cultures growth were followed by cell countings, "in vivo" fluorescence and cellular protein, carbohydrate and chlorophyll-*a* content. The maximum value of protein/carbohydrate was found at the exponential phase and the minimum value at the stationary phase. This ratio characterizes the physiological stage of the culture. Cell uptake rates for nitrate, ammonium and phosphate from the media were higher during the lag-phase. Nitrite excretion by the cells were detected following nitrate uptake.

## Agradecimentos

Os autores agradecem às facilidades de laboratório oferecidas pelo Instituto Oceanográfico, bem como o apoio financeiro do CNPq a um dos autores (E. Aidar).

## Referências bibliográficas

- AIDAR-ARAGÃO, E. 1980. Alguns aspectos da autoecologia de *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, de Cananéia (25°S - 48°W), com especial referência ao fator salinidade. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 2v.
- AMINOT, A. & CHAUSSEPIED, M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, Centre National pour L'Exploitation des Océans. 395 p.
- BEN-AMOTZ, A. & GILBOA, A. 1980. Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. Mar. Ecol.-Progr. Ser., 2:221-224.
- BRAARUD, T. 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. In: Sears, M., ed. Oceanography. Washington, DC.: American Association for Advancement of Science Publication, 67:271-298.
- COLLOS, Y. 1986. Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. Mar. Ecol.-Prog. Ser., 33:193-206.



- DROOP, M. R. 1958. Optimum relative and actual ionic concentrations for growth of some euryhaline algae. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 13:722-730.
- \_\_\_\_\_ 1975. The nutrient status of algal cells in batch culture. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 55:541-555.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, 18:350-356.
- FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B. & VEIGA, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42:207-215.
- FAWLEY, M. W. 1984. Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 20:67-72.
- GAETA, S. A. 1985. Comparação das respostas de crescimento e fotossíntese de três clones de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 106p.
- \_\_\_\_\_ 1987. Efeitos do mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre o crescimento e fotossíntese de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 234 p.
- GOLDMAN, J. C. & GLIBERT, P. M. 1983. Kinetics of inorganic nitrogen uptake by phytoplankton. In: Carpenter, E. J. & Capone, D. G., eds Nitrogen in the marine environment. New York, Academic Press. p.233-274.
- GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M. & KREMLING, K. 1983. Methods of seawater analysis. 2nd revised and extended ed. Weinheim, Verlag Chemie. 419 p.
- GUILLARD, R. R. L. & RYTHER, J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8:229-239.
- HARVEY, H. W. 1939. Substances controlling the growth of a diatom. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 23:499-520.
- KAIN, J. M. & FOGG, G. E. 1958. Studies on the growth of marine phytoplankton. I. *Asterionella japonica* Gran. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 37:397-413.
- LAING, I. 1985. Growth response of *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) in batch culture to a range of initial silica concentrations. *Mar. Biol.*, 85:37-41.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-275.
- MYKLESTAD, S. & HAUG, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine *Chaetoceros affinis* var. Willei (Gran.) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. exp mar. Biol. Ecol.*, 9:125-136.
- PRÉZELIN, B. B. 1981. Light reactions in photosynthesis. In: Platt, T. ed. Physiological bases of phytoplankton ecology. *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, (210):1-43.
- PRIBIL, S. & MARVAN, P. 1979. Batch cultivation. In: Marvan, P., Přibil, S. & Lhotsy, O. eds Algal assays and monitoring eutrophication. Stuttgart, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller). p.175-180.
- PROVASOLI, L.; McLAUGHLIN, J. J. A. & DROOP, M. R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 25:392-428.
- RAIMBAULT, P. 1986. Effect of temperature on nitrite excretion by three marine diatoms during nitrate uptake. *Mar. Biol.*, 92 (2):149-155.
- SASSI, R.; KUTNER, M. B. B. & MOURA, G. F. 1988. Studies on the decomposition of drift seaweed from the northeast Brazilian coastal reefs. *Hydrobiologia*, 157:187-192.
- SIGAUD, T. C. S. 1990. Efeitos de temperatura e salinidade sobre as respostas de crescimento e o conteúdo de clorofila-*a* de algumas espécies de algas planctônicas, em cultura. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 352 p.
- STEMMANN-NIELSEN, E. 1978. Principal aspects concerning the batch technique in algal assays. *Mitt. int. Verein. Theor. angew. Limnol.*, 21:81-87.
- STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. 1968. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, (167):p.1-311.
- VIEIRA, A. A. H. 1975. Estudos experimentais em fitoplâncton marinho. Culturas e aspectos ecofisiológicos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 162 p.