

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-graduação em Aqüicultura

LISANDRA ISABEL MEINERZ

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, SALINIDADE E
NUTRIENTES DISSOLVIDOS (N e P) NO CULTIVO DE
MICROALGAS DE ÁGUA ESTUARINA E COSTEIRA.

Rio Grande - RS
Fevereiro, 2007.

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-graduação em Aqüicultura

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, SALINIDADE
E NUTRIENTES DISSOLVIDOS (N e P) NO
CULTIVO DE MICROALGAS DE ÁGUA
ESTUARINA E COSTEIRA.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura, no Programa de Pós Graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Autor: Lisandra Isabel Meinerz

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu

Rio Grande - RS.

Fevereiro, 2007.

ÍNDICE

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	01
2. Obietivos.....	08
3. Material e Métodos.....	09
3.1 - Inóculo inicial.....	11
3.2 - Inoculação dos tratamentos.....	11
3.3 - Delineamento experimental.....	12
3.4 - Estimativas de Crescimento.....	14
3.4.1 - Clorofila <i>a</i>	14
3.4.2 - Densidade celular.....	15
3.5 - Análise Estatística.....	16
4. Resultados.....	17
4.1 - <i>Thalassiosira weissflogii</i>	17
4.1.1 - Clorofila <i>a</i>	17
4.1.2 - Densidade celular.....	21
4.1.3 - Razão entre Clorofila <i>a</i> e Densidade celular.....	26
4.2 - <i>Skeletonema</i> sp.....	27
4.2.1 - Clorofila <i>a</i>	27
4.2.2 - Densidade celular.....	31
4.2.3 - Razão entre Clorofila <i>a</i> e Densidade celular.....	36
4.3 - <i>Nannochloropsis oculata</i>	37

4.3.1 - Clorofila <i>a</i>	37
4.3.2 - Densidade celular.....	41
4.3.3 - Razão entre Clorofila <i>a</i> e Densidade celular.....	45
5. Discussão.....	47
5.1 - Densidade celular x Clorofila <i>a</i>	47
5.1.1 - <i>Thalassiosira weissflogii</i>	49
5.1.2 - <i>Skeletonema</i> sp.....	50
5.1.3 - <i>Nannochloropsis oculata</i>	52
5.2 - Crescimento celular.....	53
6. Conclusões.....	57
7. Perspectivas Futuras.....	58
8. Referências Bibliográficas.....	59
9. Anexos.....	66

DEDICATÓRIA

“Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais, Laura e Celito, aos meus amigos Dayse K. Mariano, Luiz Vantini Jr. e em especial ao Luiz Carlos O. Santos pela cumplicidade, apoio, amizade e presença constante em minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Paulo C. Abreu pela dedicação, paciência, conselhos e confiança. Obrigada por acreditar no meu potencial e por me ajudar a crescer a cada dia.

Aos participantes da banca examinadora, Dra. Clarisse Odebrecht, Dr. Sérgio O. Lourenço e Dr. Leonardo Mendes pelas correções e sugestões muito importantes.

Aos professores e colegas do PPGAq, em especial aos amigos Ângela Milach, Alessandro Cardozo, Carol Canary, Cristina, Shei, Janaína Bannwart e João Sampaio.

A equipe da EMA, Ronaldo Cavalli e Luiz Poersch, e demais professores. Em especial ao Eduardo Ballester pela importante ajuda, contribuição e amizade. Ao amigo “orientador” Wilson Wasielesky Jr (Mano), dispensa-se comentários!

As professoras Virgínia Garcia e Marli Bergesch, e aos amigos do laboratório de Fitoplâncton, pelo apoio constante. Em especial a Bia e Maria Luiza, pela amizade conquistada.

Aos meus pais, pela luta incansável, enorme apoio, incentivo e tanto esforço para eu estar aqui. Aos meus irmãos Loiva e Airton. A minha grande amiga-irmã Dayse.

Aos meus incríveis amigos Vivian Hackbart, Fábio Dias, Carol Rocha, Marlize Cravo, Thais Baságua, Manoela e Bruna Boffo, e Guilherme Campos (Mineiro), pela amizade, apoio, compreensão, ajuda incondicional e claro pelas festas (porque ninguém é de ferro!!). A minha querida amiga Fabiane M. Furlan, pela ajuda incontestável na época dos experimentos e apoio constante na vida pessoal. Por sempre deixar o dia mais leve com sua forma despojada de ver a vida, e sua capacidade incondicional e imensurável de ser amiga até nas piores horas e nos piores ânimos. Obrigada “miga”!!!

Ao amigo Luiz Vantini Jr. Obrigada por você existir na minha vida, por torcer e vibrar com minhas conquistas, e querer tanto meu sucesso.

Ao querido Luiz C. O. Santos, que sempre me ajudou e mostrou caminhos e soluções pro meu dia-a-dia, para que eu estivesse mais serena e tranqüila. Obrigada pela presença constante ao meu lado, pelo apoio, companheirismo, carinho, amizade, ensinamentos e os ótimos momentos juntos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos que passaram em minha vida durante esta etapa, que me auxiliaram, elogiaram e me apoiaram e que aqui não citei, deixo aqui meu MUITO OBRIGADO!!!!

Resumo

Embora o advento dos alimentos comerciais microparticulados tenha colaborado para o melhor manejo alimentar de larvas de crustáceos, moluscos e peixes, as microalgas *in natura* continuam tendo um importante papel, sendo imprescindíveis para uma produção de organismos cultivados de boa qualidade. As microalgas têm sido empregadas não só na alimentação direta, mas também de forma indireta, como na produção de zooplâncton e na manutenção da qualidade da água em sistemas de *água verde*. Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de microalgas se estende desde a produção de substâncias químicas e farmacêuticas até a indústria de alimentos, além de estudos desenvolvidos para converter lipídios extraídos das microalgas em biocombustíveis. Apesar dos altos custos envolvidos na produção, as microalgas possuem um rápido crescimento e apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos, possibilitando o cultivo intensivo em pequenas áreas e com a utilização de água salgada ou salobra. Entretanto, para diminuir os custos de produção, são necessárias pesquisas que resultem na utilização de espécies mais produtivas, com boa qualidade nutricional ou maior taxa de crescimento. No presente estudo, foi avaliado o crescimento das microalgas *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle 1977 e *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1955, em diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes (relação N:P). Estas espécies são apontadas como altamente produtivas e amplamente empregadas em larviculturas. Além destas, foi testada uma nova espécie de *Skeletonema* isolada na região costeira do estado do Rio Grande do Sul, denominada no presente trabalho como *Skeletonema* sp. Os experimentos foram realizados com o tempo máximo necessário para a determinação da curva de crescimento, utilizando frascos tipo Erlenmeyer de 200 mL, sob três condições distintas de temperatura (20, 25 e 30°C), salinidade (10, 20 e 30) e relação N:P (meio Guillard f/2 - 8:1, 16:1 e 24:1). Para o delineamento experimental foi aplicado um experimento fatorial 3x3x3, resultando em 9 tratamentos, com 3 repetições cada. Estas 27 unidades amostrais, foram dispostas aleatoriamente em estufas, com fotoperíodo 12C/12E e, irradiância ótima para cada espécie. As respostas das microalgas testadas foram avaliadas a partir da estimativa da clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$) e da densidade celular ($\text{n}^\circ\text{cel}\times 10^4/\text{mL}$), da qual foram calculados a taxa de crescimento celular, tempo de duplicação, rendimento e relação clorofila/célula (pg Cla/cel). Considerando-se os

resultados de crescimento celular obtidos, *T. weissflogii* cresceu em todas as temperaturas testadas, com melhor crescimento e concentração de clorofila em 25°C e 30°C, respectivamente, com boa relação Cla/cel ($4,73 \pm 1,99$ pg Cla/cel). Porém, apresentou o menor rendimento e crescimento celular, e um tempo de duplicação alto quando comparada às demais espécies. Em função dos resultados obtidos, sugere-se que esta alga seja cultivada principalmente na primavera e no verão. *N. oculata*, foi a espécie que atingiu maior crescimento celular e rendimento no menor tempo, sendo indicada para estudos de cultivos em larga escala. Além disso, esta espécie não apresentou grandes restrições quanto à variabilidade de temperatura, salinidade e nutrientes, podendo ser cultivada ao longo de todo o ano, em uma ampla gama de temperatura, salinidade e nutrientes. Em contrapartida, *Skeletonema* sp., também possui grande potencial de crescimento por apresentar uma alta taxa de crescimento e tempo de duplicação curto, apesar de não atingir os mesmos valores em densidade celular como *N. oculata*. Entretanto, *Skeletonema* sp., apresentou um potencial de crescimento restrito em alta temperatura (30°C), o que permite sua produção em larga escala apenas na primavera, outono e início do inverno.

Abstract

The development of commercial microencapsulated food has contributed to the feeding management of crustacean, mussel and fish larvae. However, the use of microalgae *in natura* is still essential for the high quality production of cultivated organisms. Microalgae have been employed not only in direct feeding but also indirectly, as for zooplankton production and water quality maintenance in green water systems. From a biotechnological perspective, the use of microalgae varies from the production of chemical and pharmaceutical substances to food industry. Besides, some research has been conducted aiming the conversion of lipids extracted from microalgae in biofuel. Despite the high production costs, microalgae shows high growth rates and tolerates a wide range of extreme environmental conditions, thus allowing intensive production in small facilities using either salt or brackish water. Nevertheless, in order to minimize production costs, research is needed in order to select more productive species, with high nutritional quality and better growth rates. In the present study the growth of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle 1977 and *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1955 were assessed under various conditions of temperature, salinity and nutrients (N:P ratios). These species are considered as highly productive and are widely employed in some larvicultures. Additionally, a non-identified species of *Skeletonema*, isolated from the South Brazilian coastal area (Rio Grande do Sul State) and called here as *Skeletonema* sp., was also subject to testing. The experiments were performed on the maximum necessary time for determination of the growth curve, using 200 mL Erlenmeyer flasks under three distinct temperatures (20°C, 25°C and 30°C), salinity (10, 20 and 30) and N:P ratios (Guillard culture medium f/2 - 8:1, 16:1 and 24:1). The experimental design employed was a factorial 3x3x3, resulting in 9 treatments, with 3 replicates each. These 27 sample units were randomly distributed in DBO chamber, under 12C/12D photoperiod and optimal irradiance for each species. The microalgae responses were evaluated by estimation of chlorophyll a ($\mu\text{g/L}$) and cellular density ($10^4 \text{ cell.ml}^{-1}$) from which the rates of cellular growth, doubling time, performance and chlorophyll/cell relation (Chla/cell) were calculated. Considering the cellular growth, *T. weissflogii* grew under all tested temperatures with best growth rate and highest chlorophyll a concentration at 25°C and 30°C, respectively, and a good Chla/cell relationship ($4,73 \pm 1,99 \text{ pg Chla/cell}$). Nevertheless this species exhibited

lower yield and cellular growth rate, and high doubling time in comparison to the other species, meaning that its massive culture potential is restricted. Thus, according to our results, mass production of *T. weissflogii* is suggested to be conducted during spring and summer. *N. oculata* was the species with highest cellular growth and smallest doubling time, showing higher potential for massive production. Further, this species did not exhibit restrictions regarding temperature, salinity and nutrient conditions. On the other hand, *Skeletonema* sp., also exhibit high growth potential because of its high growth rate and short doubling time, however it does not reach the same cellular density values of *N. oculata*. Moreover, *Skeletonema* sp., exhibited a restricted growth potential under high (30°C) temperature, therefore allowing its massive production only during spring, autumn and early winter.

1. Introdução

As pesquisas para a manutenção de microalgas em meio controlado datam do final do século XIX e se fortaleceram através de estudos dos mecanismos fotossintéticos dos vegetais (Gomes 1986).

Embora o advento dos alimentos comerciais microparticulados tenha colaborado para o manejo alimentar em larviculturas de crustáceos, moluscos e peixes, as microalgas “*in natura*” cultivadas no próprio laboratório continuam sendo importantes e imprescindíveis para uma produção de boa qualidade desses organismos (Barbieri & Ostrensky 2001). Mesmo existindo outras opções, como o alimento artificial, para se proporcionar os nutrientes necessários, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), as microalgas cultivadas, empregadas vivas, continuam sendo a base alimentar em larviculturas comerciais e experimentais (De Pauw & Persoone 1988; Brown *et al.* 1997).

Contudo, nos laboratórios de produção, as microalgas têm sido empregadas não só na alimentação direta, mas também indiretamente, como na produção de zooplâncton, e na manutenção da qualidade da água em sistemas de “água verde” ou mesocosmos (Amjad & Jones 1994; Reitan *et al.* 1997), pois têm papel fundamental no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados, sobretudo a amônia (Gomes 1986; Lavens & Sorgeloos 1996). São também importantes no balanço do pH de sistemas aquáticos por removerem o excesso de dióxido de carbono (Hoff & Snell 1987), possuem função bacteriostática (Bruland 1983), e podem combater bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (Reitan *et al.* 1997).

As microalgas são fontes de macronutrientes, vitaminas e elementos-traço que influenciam o valor nutricional de herbívoros aquáticos, pois são ricas fontes de proteínas, carboidratos e especialmente ácidos graxos essenciais (Hoff & Snell 1987; Whyte *et al.* 1989; De Pauw & Persoone 1988; Valenzuela-Espinoza *et al.* 2002; Rocha 2003). Também fornecem pigmentos que aumentam a coloração em peixes e invertebrados.

No entanto, a produção das microalgas, em geral, é a parte mais dispendiosa associada ao cultivo de larvas, pois requer disponibilidade de espaço, trabalho intensivo e assepsia rigorosa (Palmer *et al.* 1975; Shaw 1979; Coutteau & Sorgeloos 1992). Além disso, o alto custo de produção dos cultivos de microalgas afeta a rentabilidade dos

produtores. Assim, para aumentar o rendimento e reduzir os custos são necessárias pesquisas que resultem na utilização de espécies mais produtivas (Borowitzka 1997).

Para algumas aplicações particulares ou setores desta indústria, seria interessante a utilização de novas espécies com uma melhor qualidade nutricional ou rápido crescimento, que poderiam melhorar a taxa produtiva dos organismos alimentados com as microalgas (Brown 2002). Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de microalgas não é restrita à indústria da aquicultura, pois se estende desde a industrialização de substâncias químicas e farmacêuticas, até a indústria de alimentação humana com a produção de vitaminas, carotenóides, géis e suplementos alimentares diversos (Borowitzka & Borowitzka 1988; Barbosa *et al.* 2003; Olaizola 2003) muito embora a tecnologia de produção ainda necessite de maiores aprimoramentos (Gomes 1986).

Por outro lado, estudos estão sendo desenvolvidos no intuito de converter lipídios, extraídos das microalgas em biocombustíveis, substitutos ao combustível fóssil derivado do petróleo (Brown & Zeiler 1993). Sendo assim, o cultivo de microalgas em larga escala sob condições semi-controladas, surge como uma alternativa que, além de permitir uma maior absorção de CO₂ da atmosfera, poderia ainda gerar produtos de interesse comercial como corantes, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas, entre outros, que viriam a beneficiar a economia local. Além do rápido crescimento, as microalgas apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos e a possibilidade de serem cultivadas de maneira intensiva, o que pode representar uma contribuição para a diminuição do "efeito estufa", mesmo em condições adversas (Kurano *et al.* 1995).

Nas últimas décadas mais de 100 espécies de microalgas foram testadas e avaliadas para uso na aquicultura, mas dentre estas, apenas aproximadamente 20 tiveram seu uso amplamente difundido (Brown *et al.* 1997; Olaizola 2003), pois apresentam atributos fundamentais para o seu sucesso na aquicultura (Laing 1991). Entre estes atributos destacam-se o tamanho apropriado para ingestão, boa digestibilidade, alto valor nutricional, ausência de toxinas, altas taxas de crescimento e de divisão celular, e facilidade de manutenção (Kawamura *et al.* 1988; Brown *et al.* 1997).

Dentre as diversas espécies de microalgas planctônicas cultiváveis, os gêneros *Thalassiosira*, *Skeletonema* e *Nannochloropsis*, têm sido amplamente usados na

aqüicultura devido ao seu bom crescimento em diferentes condições físico-químicas, suportando variações de temperatura, pH, salinidade e intensidade luminosa (Lourenço *et al.* 1997). Estes gêneros também são conhecidos por se adequarem à necessidade nutricional de larvas e pós-larvas de camarões peneídeos e de moluscos bivalves, assim como de alevinos, artêmia e rotíferos (Lavens & Sorgeloos 1996), por possuírem um alto teor protéico, de ácidos graxos polinsaturados e de clorofila *a* (Zhukova & Aizdaicher 1995).

Borges (2005) identificou as microalgas *Thalassiosira fluviatilis*, *Skeletonema costatum* e *Nannochloropsis oculata* largamente utilizadas na aqüicultura, como sendo as espécies que apresentam maior potencial de absorção de CO₂. Segundo a mesma autora, estas microalgas, potencialmente, poderão vir a ser empregadas em cultivo de larga escala para captura de CO₂ e produção de biodiesel, gerando um Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), de acordo com as especificações do Tratado de Kioto.

No gênero *Thalassiosira*, destacam-se as espécies *T. weissflogii* e *T. pseudonana*. Segundo Bérard-Therriault *et al.* (1999), o gênero *Thalassiosira* pertence à divisão *Bacillariophyta*, classe *Coscinodiscophyceae*, ordem *Thalassionales* e família *Thalassiosiraceae*. A espécie *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle 1977 (Figura 1), antes denominada *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt 1926, caracteriza-se por ter células retangulares, de 12 a 14 µm de diâmetro, com eixo perivalvar usualmente menor que o diâmetro, com valvas achatadas no centro e conectadas ao centro por filamento único para formar cadeias (Tomas 1996). É considerada uma microalga de característica mesohalina (água moderadamente salobra, com salinidade entre 5 a 18) e polihalina (água altamente salobra, com salinidade ente 18 a 30) (Tomas 1996). *T. weissflogii* é uma das espécies mais empregadas na larvicultura de camarões peneídeos (Brown 2002), devido a sua alta qualidade nutricional e digestibilidade, alta taxa de crescimento e estabilidade em ambientes de cultivo, tolerando flutuações na temperatura, luz e nutrientes (Alfonso & Leal 1995).



Figura 1 - *Thalassiosira weissflogii*, observada ao microscópio ótico, com aumento de 400x.

Algumas diatomáceas do gênero *Skeletonema* destacam-se pela sua utilização em larviculturas devido à sua alta qualidade nutricional e estabilidade em ambientes de cultivo. Segundo Bérard-Therriault *et al.* (1999), o gênero pertence à divisão *Bacillariophyta*, classe *Coscinodiscophyceae*, ordem *Thalassionales* e família *Skelenetonemaceae*. A espécie *Skeletonema costatum* possui células cilíndricas, 2 – 21 µm de diâmetro, unidas em longas cadeias por tubos externos arranjados em um anel marginal. Dois cloroplastos por célula. Cosmopolita em regiões costeiras ao redor do mundo exceto em mares polares. Pode formar extensivas florações na primavera (Horner 2002). Considerada uma espécie oligohalina (baixa salinidade, ou água salobra de 0,5 a 5) e mesohalina (água moderadamente salobra, com salinidade entre 5 a 18) (Tomas 1996). Abundante em águas costeiras próximas a desembocadura do Estuário da Lagoa dos Patos (Odebrecht & Garcia 1998) e na primavera e verão é comum a sua floração com a entrada de águas marinhas no estuário (Odebrecht & Abreu 1998).

A espécie *Skeletonema costatum* (Greville 1866) Cleve 1873 (Figura 2) é a mais empregada em aqüicultura (Borowitzka 1997; Duerr *et al.* 1998; Wikfors & Ohno 2001; Brown 2002). Esta espécie tem boa qualidade nutricional (Borowitzka 1997; Brown 2002), apresenta propriedade antibacteriana (Metting & Pyne 1986) e é usada na aqüicultura como alimento para larvas de crustáceos e moluscos bivalves, principalmente *Crassostrea gigas* (Muller-Feuga 2000). Neste trabalho foi estudada uma nova espécie de *Skeletonema*, a qual foi recentemente isolada da região costeira do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Organismos Marinhos

do Departamento de Oceanografia da FURG. Como esta espécie ainda está sendo descrita, esta será denominada neste trabalho como *Skeletonema* sp. (comunicação pessoal - Bergesch, em preparação).

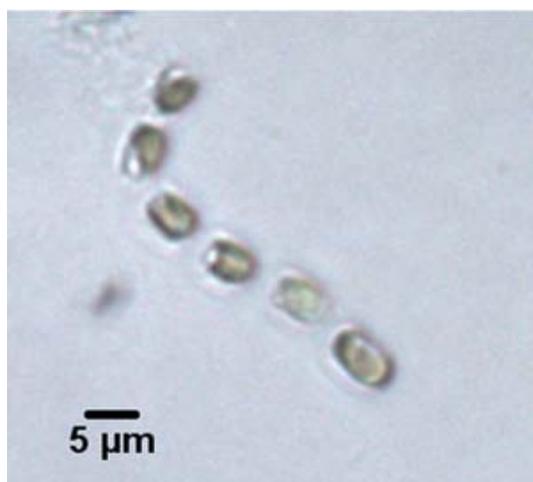


Figura 2 - *Skeletonema costatum*, observada ao microscópio ótico, com aumento de 400x.

Com relação ao gênero *Nannochloropsis*, a espécie *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1955 (Figura 3) é muito apreciada em larviculturas de peixes e na alimentação de rotíferos, além de servir como base para o ambiente de “água verde” (Fulks & Main 1991; Lubzens *et al.* 1995; Lubián *et al.* 2000). Esta espécie é conhecida por suas fontes de pigmentos, como clorofila *a*, zeaxantina, cantaxantina e astaxantina (Lubián *et al.* 2000) e por seu alto conteúdo de ácido eicosapentaenóico (EPA C20:5n3) (Chini Zittelli *et al.* 1999; Sukenik 1999). Devido a isso, também é reconhecida como uma grande fonte alternativa e potencial deste ácido graxo polinsaturado essencial para o consumo humano na prevenção de muitas doenças (Sukenik 1999; Chini Zittelli *et al.* 1999). Segundo Chrétiennot-Dinet *et al.* (1993), o gênero pertence à divisão *Eustigmatophyta*, classe *Eustigmatophyceae*, ordem *Eustigmatales* e família *Monopsidaceae*. *N. oculata* (Hibberd 1990) faz parte do picoplâncton marinho e é amplamente distribuída nos oceanos. Possui células esféricas a levemente ovóides, com 2 – 4 μm de diâmetro, unicelular, com apenas um cloroplasto por célula. Contém clorofila *a* e seu principal pigmento acessório é a violaxantina. (Van Den Hoek *et al.* 1995).

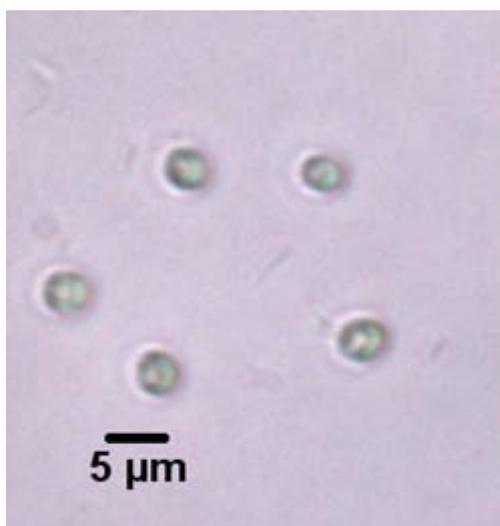


Figura 3 - *Nannochloropsis oculata*, observada ao microscópio ótico, com aumento de 400x.

Apesar do fato de que estas espécies de microalgas terem sido apontadas como altamente produtivas (Borges 2005), é necessário uma melhor caracterização de sua tolerância a variações ambientais como temperatura e salinidade que ocorrem em ambientes de cultivo (Brown *et al.* 1997).

Durante a produção de microalgas, as condições ambientais afetam diretamente a densidade e a qualidade nutricional das mesmas (Brown *et al.* 1997), ou seja, a composição bioquímica das microalgas pode variar em função da taxa de crescimento e/ou condições de desenvolvimento, bem como nas diferentes fases do seu ciclo de vida (Richmond 1986).

Portanto, é necessário conhecer as condições em que o crescimento é otimizado, para que a produção atinja o máximo potencial no menor tempo possível especialmente no que se refere aos principais fatores que controlam o crescimento das microalgas e sua composição bioquímica como luz, nutrientes, temperatura e pH (Tzovenis *et al.* 1997; Zhu *et al.* 1997), mas outros fatores podem ser importantes para algumas espécies, tais como a salinidade (Chu *et al.* 1996).

Desta forma, este estudo objetiva determinar as respostas de crescimento das três espécies de microalgas citadas anteriormente, sob diferentes condições de temperatura, salinidade e nutrientes (razão N:P). A partir dos experimentos será possível se determinar os intervalos de variação destes parâmetros que permitem o melhor crescimento de cada espécie. Estes resultados servirão no futuro para um melhor

gerenciamento dos cultivos de microalgas em larga escala, onde se utilizará água costeira, cujas características físico-químicas variam bastante ao longo do tempo.

2. Objetivos

Geral

O objetivo geral deste trabalho é determinar a taxa de crescimento das espécies de microalgas Bacillariophyceae: *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle 1977 e *Skeletonema* sp. e Eustigmathophyceae: *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1955; submetidas a diferentes condições físico-químicas do meio de cultivo.

Específicos

1) Determinar as curvas de crescimento das três espécies de microalgas, submetidas a diferentes condições de temperatura, salinidade e concentrações de nutrientes.

2) Obter os intervalos de maior taxa de crescimento das três espécies de microalgas em condições variáveis de temperatura, salinidade e concentrações de nutrientes.

3. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com três espécies de microalgas utilizadas na aquíicultura e que fazem parte da coleção de cultivo do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos: Eustigmastophyceae: *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd 1955; Bacillariophyceae: *Skeletonema* sp. (espécie nova), *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle 1977.

Para cada espécie testada, o cultivo foi mantido em câmara de germinação (modelo 347-CDG, Fanem) sob condições controladas de temperatura, com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (Figura 4) proporcionado por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia. A irradiância ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou PAR = 400 – 700 nm) foi selecionada de acordo com o valor ótimo para o crescimento de cada espécie (Tabela 1), obtido de Borges (2005), e medida através de um aparelho Li-Cor com sensor esférico de luz. As medições de temperatura foram obtidas de forma direta em cada estufa com auxílio de termômetro ao longo do experimento.



Figura 4 - Foto ilustrativa da câmara ambiente para germinação (modelo 347-CDG, Fanem).

As mesmas condições de temperatura, salinidade e relação na concentração N:P foram empregadas em todos os experimentos para as 3 microalgas (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de temperatura, salinidade, relação da concentração de nutrientes N:P e irradiância aplicados para as três espécies de microalgas nos experimentos de crescimento.

Espécie	T °C	Salinidade	Relação N:P	Irradiância ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	20	10	8:1	163
	25	20	16:1	
	30	30	24:1	
<i>Skeletonema</i> sp.	20	10	8:1	245
	25	20	16:1	
	30	30	24:1	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20	10	8:1	369
	25	20	16:1	
	30	30	24:1	

O meio de cultura utilizado para o cultivo das 3 microalgas foi o meio *f/2* (Guillard 1975), modificado quanto à concentração da relação de nutrientes N:P exposta acima, a qual foi calculada a partir do meio *f/2* original (Anexo 1), cuja relação N:P é de 24:1. As relações N:P 8:1 e 16:1 foram obtidas reduzindo-se a concentração de N do meio *f/2* original. O meio de cultura foi preparado com água do mar, previamente filtrada em filtro de fibra de vidro GF/F 0,45 μm (47 mm, Whatman), com auxílio de bomba a vácuo, e diluída com água destilada quando necessário para se obter a salinidade desejada para desenvolver o experimento, e posteriormente autoclavado a 120°C por 30 minutos, em frascos com volume de 10 L. A salinidade foi aferida com refratômetro calibrado.

Para a limpeza prévia, toda a vidraria envolvida com o cultivo foi enxaguada em água doce encanada (clorada), com agitação e escovação usando-se detergente neutro. Em seguida, o frasco era mantido imerso em solução de ácido clorídrico a 3% por no mínimo 2 horas. Após este período era feito novo enxágüe com água doce encanada

(clorada) e só então a vidraria era seca em estufa, para posterior autoclavagem com o meio de cultura.

Na execução dos experimentos, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, com volume útil de 200 mL. Estes frascos foram autoclavados separadamente do meio de cultura para evitar que a salinidade do meio fosse afetada durante a autoclavagem devido à evaporação da água do meio utilizado.

3.1 Inóculo inicial

Para obter o volume de cultura necessário para o início dos experimentos, foi realizado um cultivo inicial com base no sistema batelada ("batch"), sob temperatura de 22°C, salinidade 27 e fotoperíodo 12h claro/12h escuro. Condições as quais foram empregadas para todas as espécies.

Foram inicialmente utilizados dois frascos de 250 mL contendo 200 mL de meio de cultivo f/2, nos quais foram inoculados 20 mL da cepa da microalga a ser utilizada. Os frascos foram homogeneizados manualmente duas vezes ao dia. Ao final de 3 dias, este inóculo foi repicado para um frasco Erlenmeyer de 2 L, contendo 1500 mL de meio de cultivo f/2, totalizando 1900 mL de cultura final, a qual permaneceu 3 dias, sob aeração constante e sob as condições de cultivo das culturas iniciais, até chegar à fase exponencial de crescimento (fase LOG da curva de crescimento).

Não houve necessidade de se fazer repicagens sucessivas para a manutenção do crescimento exponencial das culturas neste período, pois o experimento foi aplicado apenas em volumes reduzidos.

3.2 Inoculação dos tratamentos

Da cultura contendo 1900 mL, foram retiradas alíquotas homogêneas de 10 mL para *T. weissflogii*, *Skeletonema* sp. e *N. oculata* (Figura 5), as quais foram inoculadas nos respectivos frascos de 250 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo f/2 modificado conforme as variáveis aplicadas para a relação N:P (8:1, 16:1 e 24:1), salinidade (10, 20 e 30), e temperatura (20°, 25° e 30°C).



Figura 5 - Inoculação de *Nannochloropsis oculata* nos respectivos frascos Erlenmeyer de 250 mL, a partir de alíquotas retiradas do inoculo inicial.

3.3 Delineamento experimental

Para o delineamento experimental foi aplicado o modelo fatorial $3 \times 3 \times 3$, resultando em 27 tratamentos, cada qual com 3 repetições, totalizando 81 unidades experimentais para cada espécie (Figura 6). Estes 27 tratamentos foram subdivididos nas 3 incubadoras com temperatura distinta, resultando em 9 tratamentos por temperatura. Em todos os experimentos, os frascos foram dispostos, aleatoriamente, nas prateleiras das incubadoras (Figura 7).



Figura 6 - Figura ilustrando o conjunto de 81 unidades amostrais para cada espécie, subdivididas posteriormente em 27 unidades para cada temperatura.



Figura 7 - Frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo os distintos tratamentos durante o cultivo de *Thalassiosira weissflogii*, dispostos aleatoriamente nas prateleiras das incubadoras.

Para facilitar a leitura e entendimento do texto adotou-se a seguinte nomenclatura:

Em relação à temperatura:

T1 – Temperatura 20°C

T2 – Temperatura 25°C

T3 – Temperatura 30°C

Em relação à salinidade:

S1 – Salinidade 10

S2 – Salinidade 20

S3 – Salinidade 30

Em relação à concentração de nutrientes N:P:

N1 – Relação N:P 8:1

N2 - Relação N:P 16:1

N3 – Relação N:P 24:1

Assim os tratamentos para cada espécie foram:

T1S1N1, T1S1N2, T1S1N3, T1S2N1, T1S2N2, T1S2N3, T1S3N1, T1S3N2, T1S3N3;

T2S1N1, T2S1N2, T2S1N3, T2S2N1, T2S2N2, T2S2N3, T2S3N1, T2S3N2, T2S3N3;

T3S1N1, T3S1N2, T3S1N3, T3S2N1, T3S2N2, T3S2N3, T2S3N1, T2S3N2, T2S3N3.

Cada tratamento foi realizado com duração necessária até o declínio do crescimento da microalga, cuja etapa foi precedida de fase LAG, fase LOG ou exponencial, fase de estabilização e fase de declínio ou senescência, com o intuito de se construir a curva de crescimento das microalgas (Figura 8).

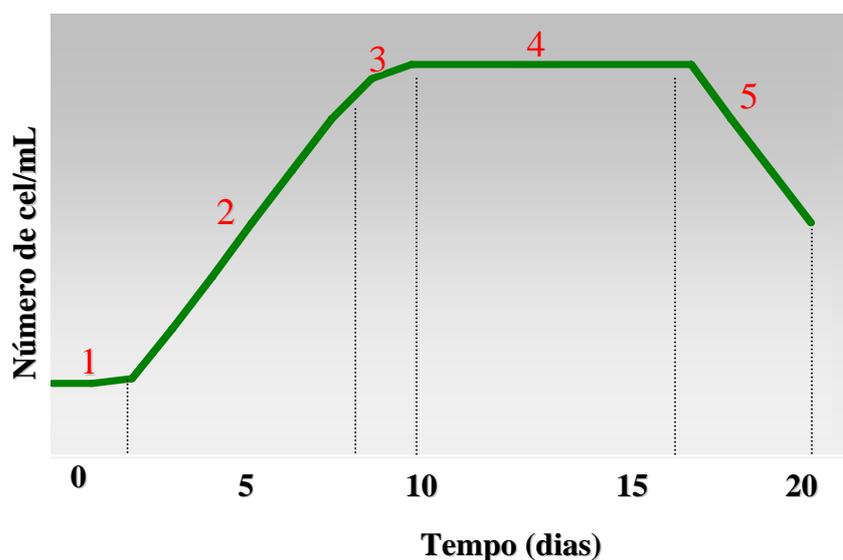


Figura 8 - Figura ilustrativa de uma curva de crescimento celular com suas respectivas fases: fase LAG (1), fase LOG ou exponencial (2-3), fase de estabilização (4) e fase de declínio (5).

3.4 Estimativas de Crescimento

As respostas das 3 espécies de microalgas nas condições testadas de temperatura, salinidade e concentração de nutrientes N:P foram avaliadas a partir da estimativa da concentração de clorofila *a* e da densidade celular nos cultivos, calculando-se a respectiva taxa de crescimento.

3.4.1 Clorofila *a*

A determinação da clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$) contida nas culturas foi realizada “*in vivo*” com base no método de Welschmeyer (1994), sem acidificação. Alíquotas de 9 ml eram retiradas do cultivo, periodicamente e aproximadamente no mesmo horário, inclusive no tempo inicial ou tempo zero do experimento, armazenadas em vidros (“vials”) com volume útil de 20 mL e levadas para a leitura em fluorímetro calibrado Turner modelo TD-700, com auxílio de cubeta cilíndrica de cristal, com volume de 10 mL.

As medidas de fluorescência “*in vivo*” foram posteriormente convertidas em clorofila *a* extraída, através de curvas de correlação entre clorofila extraída e clorofila “*in vivo*”, as quais foram obtidas em experimentos piloto para cada espécie .

As equações de correlação encontradas para as respectivas espécies foram:

1) *Thalassiosira weissflogii*: $y = 2,2827x + 2,4584$; $R^2 = 0,9829$

2) *Skeletonema* sp.: $y = 1,4538x - 0,9484$; $R^2 = 0,9799$

3) *Nannochloropsis oculata*: $y = 1,8304x - 49,699$; $R^2 = 0,9971$

Onde: *x* é a leitura de clorofila “*in vivo*” e *y* é o valor de clorofila extraída.

Após as leituras no fluorímetro, as alíquotas de 9 mL das culturas eram devolvidas aos seus respectivos “*vials*”, nos quais era adicionado 1 mL de formalina a 37%, resultando em uma solução fixadora de formol de aproximadamente 4%.

3.4.2 Densidade celular

A densidade celular das culturas (n° celx 10^4 /ml) foi determinada nas amostras coletadas para as leituras de clorofila “*in vivo*”, a partir da contagem de células usando um hemocitômetro do tipo Neubauer Improved (Figura 9) e com auxílio de microscópio ótico de luz transmitida, binocular Nikon, com magnificação final de 100x para *Thalassiosira weissflogii* e de 200x para *Skeletonema* sp. e *Nannochloropsis oculata*. Para cada repetição de cultura, a estimativa da densidade celular foi feita duas vezes, a partir das quais se calculou a média aritmética.



Figura 9 - Câmara de Neubauer (hemocitômetro) usada na contagem celular durante a realização dos experimentos.

O crescimento celular foi acompanhado até atingir a fase de declínio da curva de crescimento.

A taxa de crescimento foi determinada a partir do incremento do número de células por unidade de tempo, durante a fase exponencial de crescimento (Stein 1984). Assim, de acordo com Schlegel (1986), foram calculados:

- Rendimento: $X = X_{\text{máx}} - X_0$

Onde: $X_{\text{máx}}$ é a densidade máxima e X_0 a densidade mínima.

- Taxa de crescimento exponencial (μ):

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_0}{\log e (T-T_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(T-T_0)}$$

Onde: X_0 e X_t são as concentrações nos tempos inicial (T_0) e final (T), respectivamente; e $\log e = 0,43429$.

- Tempo de duplicação (T_d):

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Onde: $\ln 2$ é o logaritmo neperiano de 2 e μ é a taxa de crescimento exponencial.

3.5 Análise Estatística

Depois de constatado o cumprimento das premissas básicas, as médias das variáveis de densidade celular, e clorofila a , obtidas nos 27 tratamentos para cada espécie foram comparadas entre si estabelecendo-se grupos de tratamentos que apresentaram maior ou menor crescimento (hipótese nula). A existência destes grupos foi testada estatisticamente a partir da Análise de Variância Unidirecional (ANOVA-ONEWAY) dos dados e, quando havia diferença significativa ($p \leq 0,05$), aplicou-se o teste 'a posteriori' de Tukey. Nos casos em que os dados não satisfizeram as premissas para aplicação da ANOVA, foi utilizada a transformação das variáveis através de um fator constante (Log) ($\alpha=0,05$) (Wonnacott & Wonnacott 1980).

4. Resultados

Os resultados da análise de variância mostraram haver diferenças significativas entre os tratamentos tanto para clorofila *a* quanto para densidade celular de todas as espécies ao longo de todo o período de cultivo e que também houve interação entre os fatores temperatura, salinidade e concentração de nutrientes (relação N:P).

4.1 *Thalassiosira weissflogii*

4.1.1 Clorofila *a*

Para *T. weissflogii*, o período experimental foi de 21 dias, no qual o valor inicial de clorofila *a* nos tratamentos foi de $107,82 \pm 10,57 \mu\text{g/L}$. O valor máximo de clorofila *a* encontrado durante o cultivo experimental ($3713,97 \pm 299,28 \mu\text{g/L}$) foi no tratamento T2S3N3 e o mínimo ($951,83 \pm 72,84 \mu\text{g/L}$) em T1S1N1. Os outros tratamentos exibiram valores máximos de clorofila intermediários aos citados anteriormente.

Conforme mostra a Figura 10, nota-se a formação de pelo menos três agrupamentos distintos. Os tratamentos T2S3N2 e T2S3N3 formaram um grupo com os maiores valores de clorofila *a*, enquanto que o tratamento T1S1N1 aparece de forma isolada, com os menores valores deste pigmento. Os demais tratamentos formaram um agrupamento com valores intermediários entre os valores máximo e mínimo.

Para verificar se ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos, foi realizado um teste de significância, o qual apresentou valores de $F = 1,544$ e $p = 0,009$, evidenciando que houve interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento.

A análise de variância indicou haver diferenças entre os tratamentos e os resultados do teste '*a posteriori*' confirmam a hipótese de que o grupo formado pelos tratamentos que apresentaram os maiores valores de clorofila *a* (T2S3N2 e T2S3N3) ao longo do período de cultivo foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Isto é, os tratamentos sob condições de 25°C (T2), salinidade 30 (S3) e relação N:P de 16:1 (N2) e 24:1 (N3) foram estatisticamente semelhantes entre si, mas significativamente diferentes dos demais, formando um grupo em separado (Tabela 2).

Por outro lado, o teste de Tukey não confirmou a hipótese de que o tratamento T1S1N1 seja um tratamento isolado, apesar de aparentemente apresentar o menor valor de clorofila *a* do período. Este tratamento foi estatisticamente semelhante quando

comparado com T1S1N3, T1S2N1, T3S1N1, T3S1N2 e T3S1N3 formando assim, um grupo homogêneo e diferente dos demais.

Além disso, os demais tratamentos também apresentaram diferença entre si, rejeitando a hipótese de ocorrer um agrupamento intermediário homogêneo.

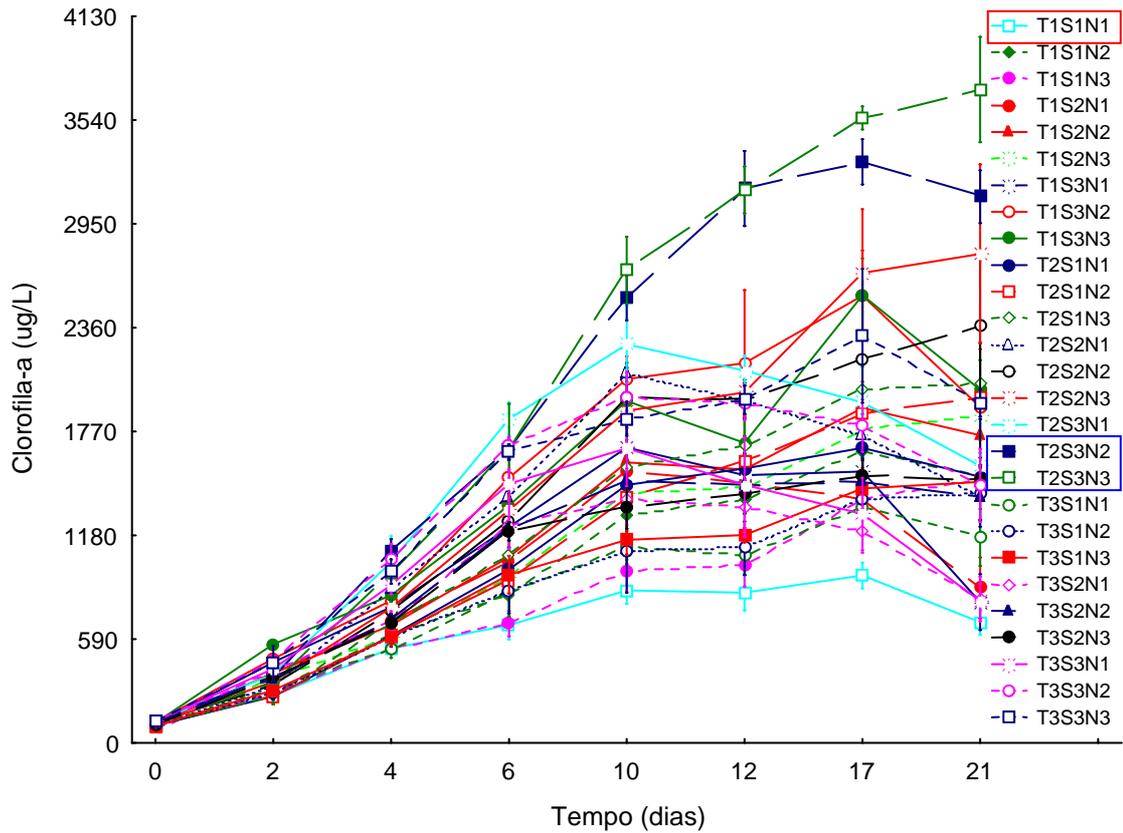


Figura 10 - Valores médios de clorofila *a* (\pm DP) da microalga *Thalassiosira weissflogii* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 2 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) para teor de clorofila *a* de *Thalassiosira weissflogii*. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 1004E2, gl = 54. Os valores em negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	
1	T1S1N1		0,039682	0,945188	0,088404	0,000028	0,000338	0,004111	0,000021	0,000021	0,002834	0,000090	0,000022	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,002976	
2	T1S1N2	0,039682		0,996964	1,000000	0,988491	0,999998	1,000000	0,000050	0,001229	1,000000	0,999805	0,826913	0,345797	0,002736	0,000024	0,000322	0,000021	0,000021	1,000000	
3	T1S1N3	0,945188	0,996964		0,999774	0,090572	0,492548	0,882696	0,000021	0,000021	0,837525	0,278356	0,014707	0,001000	0,000022	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,843865	
4	T1S2N1	0,088404	1,000000	0,999774		0,947392	0,999893	1,000000	0,000028	0,000383	1,000000	0,997275	0,653086	0,196568	0,000920	0,000022	0,000105	0,000021	0,000021	1,000000	
5	T1S2N2	0,000028	0,988491	0,090572	0,947392		1,000000	0,999980	0,094004	0,507799	0,999995	1,000000	1,000000	0,999996	0,654743	0,025409	0,296619	0,000021	0,000021	0,999994	
6	T1S2N3	0,000338	0,999998	0,492548	0,999893	1,000000		1,000000	0,007266	0,095889	1,000000	1,000000	0,999986	0,986017	0,160615	0,001346	0,038313	0,000021	0,000021	1,000000	
7	T1S3N1	0,004111	1,000000	0,882696	1,000000	0,999980	1,000000		0,000669	0,014472	1,000000	1,000000	0,992677	0,795706	0,028423	0,000105	0,004603	0,000021	0,000021	1,000000	
8	T1S3N2	0,000021	0,000050	0,000021	0,000028	0,094004	0,007266	0,000669		1,000000	0,000983	0,022709	0,356092	0,835360	1,000000	1,000000	1,000000	0,000111	0,000021	0,000935	
9	T1S3N3	0,000021	0,001229	0,000021	0,000383	0,507799	0,095889	0,014472	1,000000		0,020088	0,214162	0,880711	0,998020	1,000000	0,999998	1,000000	0,000023	0,000021	0,019264	
10	T2S1N1	0,002834	1,000000	0,837525	1,000000	0,999995	1,000000	1,000000	0,000983	0,020088		1,000000	0,996430	0,847589	0,038578	0,000154	0,006602	0,000021	0,000021	1,000000	
11	T2S1N2	0,000090	0,999805	0,278356	0,997275	1,000000	1,000000	1,000000	0,022709	0,214162	1,000000		1,000000	0,998847	0,324443	0,004815	0,098729	0,000021	0,000021	1,000000	
12	T2S1N3	0,000022	0,826913	0,014707	0,653086	1,000000	0,999986	0,992677	0,356092	0,880711	0,996430	1,000000		1,000000	0,947961	0,138574	0,702384	0,000021	0,000021	0,996064	
13	T2S2N1	0,000021	0,345797	0,001000	0,196568	0,999996	0,986017	0,795706	0,835360	0,998020	0,847589	0,998847	1,000000		0,999716	0,546708	0,981016	0,000021	0,000021	0,841334	
14	T2S2N2	0,000021	0,002736	0,000022	0,000920	0,654743	0,160615	0,028423	1,000000	1,000000	0,038578	0,324443	0,947961	0,999716		0,999968	1,000000	0,000022	0,000021	0,037108	
15	T2S2N3	0,000021	0,000024	0,000021	0,000022	0,025409	0,001346	0,000105	1,000000	0,999998	0,000154	0,004815	0,138574	0,546708	0,999968		1,000000	0,000709	0,000022	0,000147	
16	T2S3N1	0,000021	0,000322	0,000021	0,000105	0,296619	0,038313	0,004603	1,000000	1,000000	0,006602	0,098729	0,702384	0,981016	1,000000	1,000000		0,000029	0,000021	0,006304	
17	T2S3N2	0,000021	0,000111	0,000023	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000022	0,000709	0,000029		0,999997							
18	T2S3N3	0,000021	0,000022	0,000021	0,000021		0,000021														
19	T3S3N1	0,002976	1,000000	0,843865	1,000000	0,999994	1,000000	1,000000	0,000935	0,019264	1,000000	1,000000	0,996064	0,841334	0,037108	0,000147	0,006304	0,000021	0,000021		
20	T3S1N1	0,941328	0,997311	1,000000	0,999809	0,094331	0,503385	0,888908	0,000021	0,000021	0,845093	0,286833	0,015483	0,001061	0,000022	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,851262
21	T3S1N2	0,650265	0,999996	1,000000	1,000000	0,344244	0,869317	0,994713	0,000021	0,000023	0,989599	0,677073	0,089369	0,009385	0,000028	0,000021	0,000022	0,000021	0,000021	0,990431	
22	T3S1N3	0,257335	1,000000	1,000000	1,000000	0,750782	0,993404	0,999988	0,000022	0,000067	0,999957	0,954237	0,341295	0,062377	0,000141	0,000021	0,000030	0,000021	0,000021	0,999963	
23	T3S2N1	0,268873	1,000000	1,000000	1,000000	0,737143	0,992334	0,999984	0,000022	0,000062	0,999944	0,949364	0,328036	0,058629	0,000130	0,000021	0,000029	0,000021	0,000021	0,999952	
24	T3S2N2	0,002002	1,000000	0,788612	1,000000	0,999999	1,000000	1,000000	0,001402	0,026899	1,000000	1,000000	0,998288	0,887760	0,050546	0,000222	0,009120	0,000021	0,000021	1,000000	
25	T3S2N3	0,003449	1,000000	0,862348	1,000000	0,999989	1,000000	1,000000	0,000803	0,016930	1,000000	1,000000	0,994741	0,821343	0,032900	0,000126	0,005468	0,000021	0,000021	1,000000	
26	T3S3N2	0,000021	0,031491	0,000032	0,012577	0,968133	0,573145	0,190724	0,999435	1,000000	0,236278	0,794418	0,999633	1,000000	1,000000	0,982549	0,999999	0,000021	0,000021	0,230001	
27	T3S3N3	0,000021	0,000407	0,000021	0,000130	0,329840	0,045398	0,005665	1,000000	1,000000	0,008083	0,114235	0,739034	0,986452	1,000000	1,000000	1,000000	0,000027	0,000021	0,007723	

Continuação Tabela 2.

{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	{25}	{26}	{27}
0,941328	0,650265	0,257335	0,268873	0,002002	0,003449	0,000021	0,000021
0,997311	0,999996	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,031491	0,000407
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,788612	0,862348	0,000032	0,000021
0,999809	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,012577	0,000130
0,094331	0,344244	0,750782	0,737143	0,999999	0,999989	0,968133	0,329840
0,503385	0,869317	0,993404	0,992334	1,000000	1,000000	0,573145	0,045398
0,888908	0,994713	0,999988	0,999984	1,000000	1,000000	0,190724	0,005665
0,000021	0,000021	0,000022	0,000022	0,001402	0,000803	0,999435	1,000000
0,000021	0,000023	0,000067	0,000062	0,026899	0,016930	1,000000	1,000000
0,845093	0,989599	0,999957	0,999944	1,000000	1,000000	0,236278	0,008083
0,286833	0,677073	0,954237	0,949364	1,000000	1,000000	0,794418	0,114235
0,015483	0,089369	0,341295	0,328036	0,998288	0,994741	0,999633	0,739034
0,001061	0,009385	0,062377	0,058629	0,887760	0,821343	1,000000	0,986452
0,000022	0,000028	0,000141	0,000130	0,050546	0,032900	1,000000	1,000000
0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000222	0,000126	0,982549	1,000000
0,000021	0,000022	0,000030	0,000029	0,009120	0,005468	0,999999	1,000000
0,000021	0,000027						
0,000021							
0,851262	0,990431	0,999963	0,999952	1,000000	1,000000	0,230001	0,007723
	1,000000	1,000000	1,000000	0,797326	0,869211	0,000033	0,000021
1,000000		1,000000	1,000000	0,981840	0,992641	0,000216	0,000022
1,000000	1,000000		1,000000	0,999872	0,999978	0,002420	0,000033
1,000000	1,000000	1,000000		0,999837	0,999971	0,002227	0,000032
0,797326	0,981840	0,999872	0,999837		1,000000	0,283969	0,011121
0,869211	0,992641	0,999978	0,999971	1,000000		0,211514	0,006714
0,000033	0,000216	0,002420	0,002227	0,283969	0,211514		1,000000
0,000021	0,000022	0,000033	0,000032	0,011121	0,006714	1,000000	

4.1.2 Densidade celular

Em relação à estimativa da densidade celular, *T. weissflogii* apresentou uma densidade celular média inicial de $1,83 \pm 0,77 \times 10^4$ cel/mL em todos os tratamentos (Figura 11).

O valor máximo na densidade celular encontrado durante o cultivo foi de $72,41 \pm 7,07 \times 10^4$ cel/mL para o tratamento T2S3N3 e atingido no 17º dia de cultivo.

Por outro lado, o tratamento T3S2N1 apresentou o menor valor de densidade celular, alcançando apenas $39,78 \pm 3,74 \times 10^4$ cel/mL.

Os demais tratamentos alcançaram valores máximos de densidade celular intermediários entre os valores citados anteriormente.

Verifica-se na Figura 11 a formação de dois agrupamentos de tratamentos distintos: os tratamentos T1S1N2, T2S2N3, T2S3N2, T2S3N3, T3S3N2, T3S3N3 formaram um grupo com os maiores valores de densidade celular, enquanto que os demais tratamentos formaram outro agrupamento distinto.

Para verificar se ocorreram diferenças estatísticas realmente entre os agrupamentos ou entre os tratamentos, foi realizado um teste de significância, o qual apresentou valores de $F = 2,175$ e $p = 0,04$, que evidenciou haver interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento.

A análise de variância mostrou diferença estatística, mas o teste Tukey não confirmou a hipótese de separação de grupos como proposto anteriormente, ou seja, o grupo formado pelos tratamentos que alcançaram os maiores valores de densidade celular não foi significativamente diferente de todos os tratamentos, mas sim de alguns como mostra a Tabela 3.

Além disso, o tratamento T3S2N1 foi significativamente diferente e inferior apenas a T3S3N1. Em contrapartida, pode-se dizer que T3S3N1 foi o tratamento que mais se diferenciou dos demais, sendo estatisticamente semelhante apenas quando comparado com T1S1N2, T2S1N1, T2S1N2, T2S2N3, T2S3N3 e T3S3N3.

Os demais tratamentos apresentaram diferença entre si, rejeitando a hipótese de ocorrer a formação de um grupo intermediário (Tabela 3).

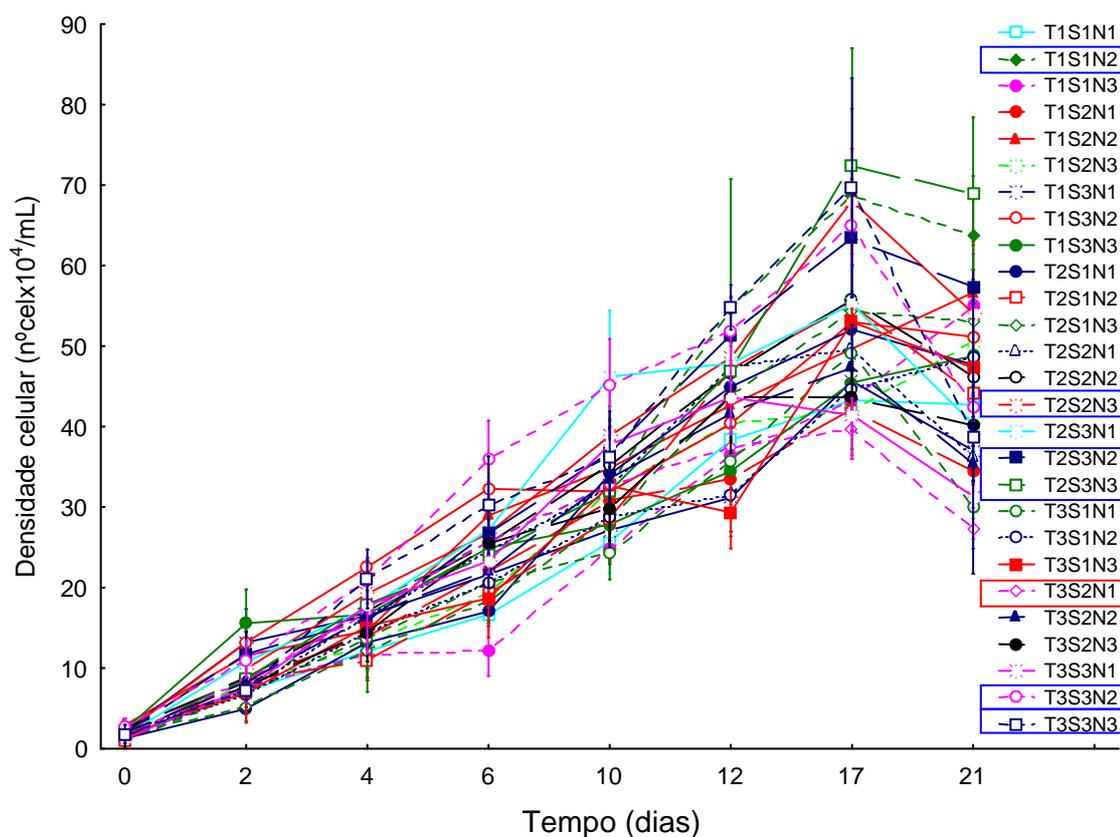


Figura 11 - Valores médios de densidade celular (\pm DP) da microalga *Thalassiosira weissflogii* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 3 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) para densidade celular de *Thalassiosira weissflogii*. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 0,00073, gl = 54. Os valores em negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}
1	T1S1N1		0,762068	0,999999	0,999957	0,568214	0,954803	0,999996	1,000000	0,672270	1,000000	0,998674	1,000000	1,000000	1,000000	0,999957	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
2	T1S1N2	0,762068		0,153031	0,092482	0,001167	0,010805	0,132455	0,471578	0,001801	0,994353	1,000000	0,899194	0,356237	0,220484	0,999963	0,914357	0,795546	0,998586	0,896221
3	T1S1N3	0,999999	0,153031		1,000000	0,992391	0,999999	1,000000	1,000000	0,997778	0,986966	0,709275	0,999908	1,000000	1,000000	0,871856	0,999844	0,999997	0,966232	0,999917
4	T1S2N1	0,999957	0,092482	1,000000		0,998815	1,000000	1,000000	1,000000	0,999771	0,954599	0,560094	0,998882	1,000000	1,000000	0,755501	0,998327	0,999906	0,908038	0,998964
5	T1S2N2	0,568214	0,001167	0,992391	0,998815		1,000000	0,995373	0,840121	1,000000	0,140192	0,019900	0,384619	0,916022	0,976356	0,044378	0,359150	0,528569	0,096648	0,389423
6	T1S2N3	0,954803	0,010805	0,999999	1,000000	1,000000		1,000000	0,997451	1,000000	0,537643	0,136854	0,861703	0,999576	0,999987	0,251706	0,841672	0,940826	0,428871	0,865238
7	T1S3N1	0,999996	0,132455	1,000000	1,000000	0,995373	1,000000		1,000000	0,998784	0,980365	0,666188	0,999792	1,000000	1,000000	0,841325	0,999661	0,999990	0,953047	0,999811
8	T1S3N2	1,000000	0,471578	1,000000	1,000000	0,840121	0,997451	1,000000		0,905740	0,999976	0,968624	1,000000	1,000000	1,000000	0,995460	1,000000	1,000000	0,999788	1,000000
9	T1S3N3	0,672270	0,001801	0,997778	0,999771	1,000000	1,000000	0,998784	0,905740		0,194210	0,030371	0,483387	0,957471	0,991036	0,065582	0,455148	0,633382	0,137223	0,488619
10	T2S1N1	1,000000	0,994353	0,986966	0,954599	0,140192	0,537643	0,980365	0,999976	0,194210		1,000000	1,000000	0,999732	0,996416	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
11	T2S1N2	0,998674	1,000000	0,709275	0,560094	0,019900	0,136854	0,666188	0,968624	0,030371	1,000000		0,999946	0,925628	0,813722	1,000000	0,999970	0,999257	1,000000	0,999939
12	T2S1N3	1,000000	0,899194	0,999908	0,998882	0,384619	0,861703	0,999792	1,000000	0,483387	1,000000	0,999946		1,000000	0,999993	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
13	T2S2N1	1,000000	0,356237	1,000000	1,000000	0,916022	0,999576	1,000000	1,000000	0,957471	0,999732	0,925628	1,000000		1,000000	0,983638	1,000000	1,000000	0,998526	1,000000
14	T2S2N2	1,000000	0,220484	1,000000	1,000000	0,976356	0,999987	1,000000	1,000000	0,991036	0,996416	0,813722	0,999993	1,000000		0,935081	0,999986	1,000000	0,988059	0,999994
15	T2S2N3	0,999957	0,999963	0,871856	0,755501	0,044378	0,251706	0,841325	0,995460	0,065582	1,000000	1,000000	1,000000	0,983638	0,935081		1,000000	0,999982	1,000000	1,000000
16	T2S3N1	1,000000	0,914357	0,999844	0,998327	0,359150	0,841672	0,999661	1,000000	0,455148	1,000000	0,999970	1,000000	1,000000	0,999986	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
17	T2S3N2	1,000000	0,795546	0,999997	0,999906	0,528569	0,940826	0,999990	1,000000	0,633382	1,000000	0,999257	1,000000	1,000000	1,000000	0,999982	1,000000		1,000000	1,000000
18	T2S3N3	1,000000	0,998586	0,966232	0,908038	0,096648	0,428871	0,953047	0,999788	0,137223	1,000000	1,000000	1,000000	0,998526	0,988059	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
19	T3S3N1	1,000000	0,896221	0,999917	0,998964	0,389423	0,865238	0,999811	1,000000	0,488619	1,000000	0,999939	1,000000	1,000000	0,999994	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
20	T3S1N1	1,000000	0,396080	1,000000	1,000000	0,892040	0,999154	1,000000	1,000000	0,942025	0,999879	0,944150	1,000000	1,000000	1,000000	0,989312	1,000000	1,000000	0,999232	1,000000
21	T3S1N2	1,000000	0,872405	0,999963	0,999430	0,425988	0,889882	0,999909	1,000000	0,527963	1,000000	0,999871	1,000000	1,000000	0,999998	0,999999	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
22	T3S1N3	1,000000	0,369943	1,000000	1,000000	0,908057	0,999457	1,000000	1,000000	0,952451	0,999796	0,932526	1,000000	1,000000	1,000000	0,985849	1,000000	1,000000	0,998814	1,000000
23	T3S2N1	1,000000	0,372107	1,000000	1,000000	0,906772	0,999436	1,000000	1,000000	0,951630	0,999804	0,933563	1,000000	1,000000	1,000000	0,986170	1,000000	1,000000	0,998861	1,000000
24	T3S2N2	1,000000	0,785116	0,999998	0,999927	0,541178	0,945573	0,999993	1,000000	0,645868	1,000000	0,999105	1,000000	1,000000	1,000000	0,999976	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
25	T3S2N3	0,019285	0,985402	0,000895	0,000525	0,000203	0,000218	0,000757	0,005419	0,000204	0,147274	0,560519	0,041127	0,003147	0,001463	0,367018	0,045931	0,022663	0,207281	0,040291
26	T3S3N2	1,000000	0,336598	1,000000	1,000000	0,926877	0,999710	1,000000	1,000000	0,964147	0,999607	0,914654	1,000000	1,000000	1,000000	0,979902	1,000000	1,000000	0,997993	1,000000
27	T3S3N3	0,999997	0,999690	0,932526	0,846889	0,067931	0,339943	0,911611	0,998970	0,098360	1,000000	1,000000	1,000000	0,994875	0,971306	1,000000	1,000000	0,999999	1,000000	1,000000

Continuação Tabela 3.

{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	{25}	{26}	{27}
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,019285	1,000000	0,999997
0,396080	0,872405	0,369943	0,372107	0,785116	0,985402	0,336598	0,999690
1,000000	0,999963	1,000000	1,000000	0,999998	0,000895	1,000000	0,932526
1,000000	0,999430	1,000000	1,000000	0,999927	0,000525	1,000000	0,846889
0,892040	0,425988	0,908057	0,906772	0,541178	0,000203	0,926877	0,067931
0,999154	0,889882	0,999457	0,999436	0,945573	0,000218	0,999710	0,339943
1,000000	0,999909	1,000000	1,000000	0,999993	0,000757	1,000000	0,911611
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,005419	1,000000	0,998970
0,942025	0,527963	0,952451	0,951630	0,645868	0,000204	0,964147	0,098360
0,999879	1,000000	0,999796	0,999804	1,000000	0,147274	0,999607	1,000000
0,944150	0,999871	0,932526	0,933563	0,999105	0,560519	0,914654	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,041127	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,003147	1,000000	0,994875
1,000000	0,999998	1,000000	1,000000	1,000000	0,001463	1,000000	0,971306
0,989312	0,999999	0,985849	0,986170	0,999976	0,367018	0,979902	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,045931	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,022663	1,000000	0,999999
0,999232	1,000000	0,998814	0,998861	1,000000	0,207281	0,997993	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,040291	1,000000	1,000000
	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,003829	1,000000	0,996990
1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,034511	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,003369	1,000000	0,995727
1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,003406	1,000000	0,995847
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,021530	1,000000	0,999999
0,003829	0,034511	0,003369	0,003406	0,021530		0,002846	0,274377
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,002846		0,993373
0,996990	1,000000	0,995727	0,995847	0,999999	0,274377	0,993373	

Quanto aos parâmetros da curva de crescimento de *Thalassiosira weissflogii*, o tratamento T2S3N3 apresentou o maior rendimento ($70,76 \pm 7,07 \times 10^4$ cel/mL), enquanto que o menor rendimento alcançado ($38,13 \pm 3,90 \times 10^4$ cel/mL) ocorreu no tratamento T3S2N1 (Tabela 4).

Já a maior taxa de crescimento exponencial ($0,29 \pm 0,02$ /dia) e o menor tempo de duplicação ($2,36 \pm 0,24$ dias), ocorreram no tratamento T3S3N1. Enquanto que o tratamento T1S2N2 apresentou a menor taxa de crescimento exponencial ($0,14 \pm 0,01$ /dia) e o maior tempo de duplicação ($4,90 \pm 0,45$ dias).

Tabela 4 – Valores médios (\pm DP) dos parâmetros das curvas de crescimento da microalga *Thalassiosira weissflogii*, onde μ (taxa de crescimento exponencial) e Td (tempo de duplicação).

Tratamento	Rendimento ($\times 10^4$ cel/mL \pm DP)	($\mu \pm$ DP)	Td \pm DP (dias)
T1S1N1	41,80 \pm 6,66	0,20 \pm 0,02	3,46 \pm 0,40
T1S1N2	67,65 \pm 18,82	0,25 \pm 0,05	2,81 \pm 0,71
T1S1N3	53,71 \pm 6,25	0,17 \pm 0,00	3,86 \pm 0,17
T1S2N1	39,96 \pm 1,38	0,17 \pm 0,01	3,98 \pm 0,33
T1S2N2	53,71 \pm 6,18	0,14 \pm 0,01	4,90 \pm 0,45
T1S2N3	48,58 \pm 6,83	0,15 \pm 0,02	4,44 \pm 0,62
T1S3N1	43,45 \pm 3,96	0,17 \pm 0,00	3,89 \pm 0,10
T1S3N2	50,96 \pm 3,02	0,19 \pm 0,00	3,59 \pm 0,12
T1S3N3	46,38 \pm 7,50	0,14 \pm 0,01	4,80 \pm 0,53
T2S1N1	50,78 \pm 4,16	0,21 \pm 0,01	3,18 \pm 0,25
T2S1N2	53,90 \pm 10,0	0,23 \pm 0,03	2,99 \pm 0,42
T2S1N3	52,61 \pm 2,22	0,20 \pm 0,01	3,35 \pm 0,30
T2S2N1	47,66 \pm 3,73	0,18 \pm 0,00	3,67 \pm 0,09
T2S2N2	53,16 \pm 5,11	0,18 \pm 0,02	3,82 \pm 0,50
T2S2N3	66,0 \pm 8,57	0,22 \pm 0,06	3,24 \pm 1,10
T2S3N1	53,53 \pm 4,16	0,20 \pm 0,01	3,33 \pm 0,25
T2S3N2	61,41 \pm 7,62	0,20 \pm 0,01	3,42 \pm 0,26
T2S3N3	70,76 \pm 7,07	0,22 \pm 0,00	3,12 \pm 0,08
T3S1N1	47,66 \pm 0,63	0,20 \pm 0,01	3,34 \pm 0,21
T3S1N2	42,71 \pm 5,61	0,19 \pm 0,02	3,69 \pm 0,51
T3S1N3	51,33 \pm 1,38	0,20 \pm 0,01	3,37 \pm 0,31
T3S2N1	38,13 \pm 3,90	0,18 \pm 0,02	3,69 \pm 0,44
T3S2N2	45,28 \pm 4,57	0,18 \pm 0,02	3,69 \pm 0,41
T3S2N3	42,16 \pm 4,67	0,20 \pm 0,02	3,46 \pm 0,52
T3S3N1	42,35 \pm 4,88	0,29 \pm 0,02	2,36 \pm 0,24
T3S3N2	62,33 \pm 4,99	0,18 \pm 0,01	3,71 \pm 0,39
T3S3N3	67,83 \pm 13,21	0,22 \pm 0,05	3,16 \pm 0,63

4.1.3 Razão entre clorofila *a* e densidade celular

A Figura 12 mostra a concentração de clorofila *a* por célula (pg Cla/cel) para todos os tratamentos. De maneira geral o conteúdo de clorofila *a* foi estável, variando em torno de $4,73 \pm 1,99$ pg Cla/cel, com os tratamentos mostrando um comportamento homogêneo quanto à razão calculada.

O maior valor de clorofila *a* por célula foi encontrado no tratamento T2S3N3 ($8,75 \pm 1,76$ pg Cla/cel), coincidindo com os tratamentos com os maiores valores de clorofila *a* e de densidade celular.

Já o menor valor foi encontrado no tratamento T1S1N2 ($4,38 \pm 2,4$ pg Cla/cel), não coincidindo com os tratamentos que alcançaram os menores valores de clorofila *a* (T1S1N1) e de densidade celular (T3S2N1).

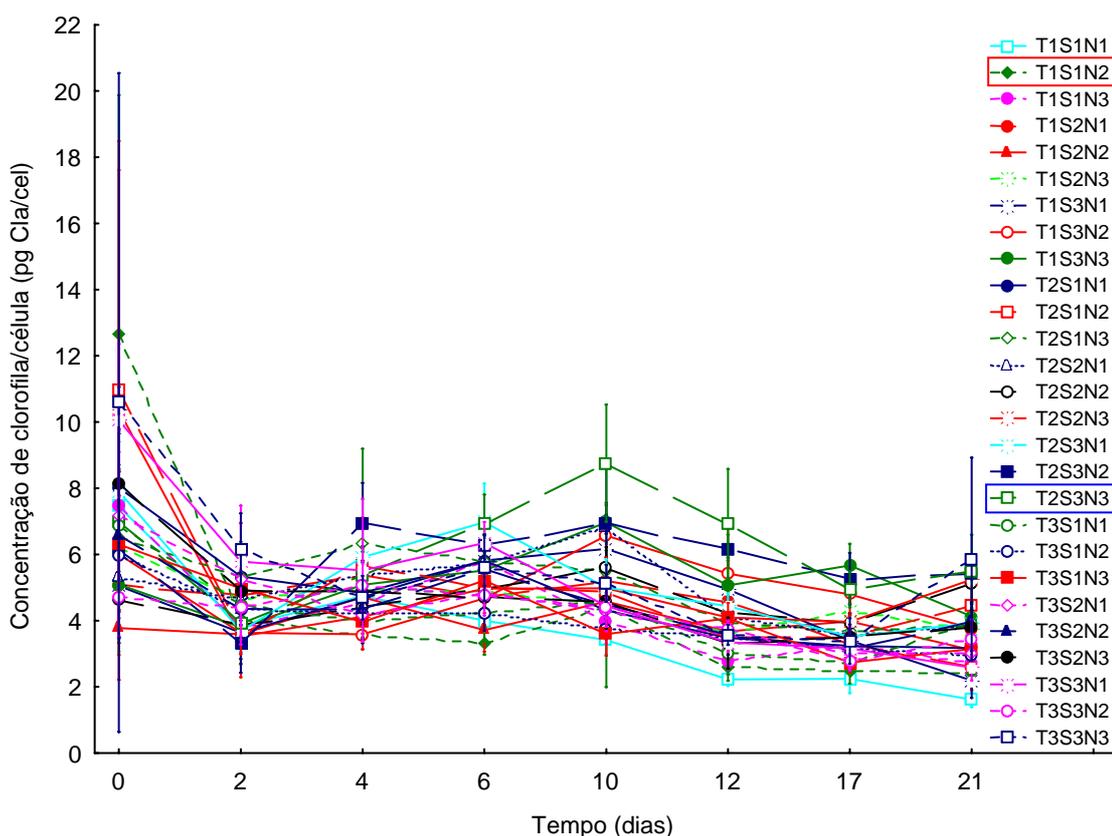


Figura 12 - Valores médios da razão entre clorofila *a* e densidade celular (\pm DP) da microalga *Thalassiosira weissflogii* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

4.2 *Skeletonema* sp.

4.2.1 Clorofila *a*

Para *Skeletonema* sp., o período experimental foi de 14 dias, onde o valor inicial de clorofila *a* nos tratamentos foi de $52,66 \pm 4,93 \mu\text{g/L}$.

O valor máximo de clorofila *a* encontrado durante o cultivo experimental foi de $1075,88 \pm 169,08 \mu\text{g/L}$ no tratamento T2S2N3, e o menor valor no tratamento T3S2N1 ($74,01 \pm 65,45 \mu\text{g/L}$).

Os tratamentos T3S1N1, T3S1N2 e T3S1N3 não exibiram um incremento celular em momento algum do experimento, com morte celular já a partir da inoculação da cultura, ou seja, a partir do tempo 0 (zero).

Os demais tratamentos mostraram valores máximos de clorofila intermediários aos citados anteriormente.

De acordo com a Figura 13, observa-se a formação de agrupamentos de tratamentos da seguinte forma: os tratamentos T2S2N1, T2S2N2, T2S2N3, T2S3N1, T2S3N2, T2S3N3 formaram um agrupamento com os maiores valores de clorofila *a* obtidos no período. Por outro lado, os tratamentos T3S1N1, T3S1N2, T3S1N3, T3S2N1, T3S2N2, T3S2N3, T3S3N1, T3S3N2 e T3S3N3 formaram outro grupo distinto, apresentando os menores valores de clorofila *a* e morte celular. Os demais tratamentos formaram um grupo intermediário ao longo do período.

O teste de significância evidenciou haver interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento ($F = 5,87$ e $p = 0,04$), confirmando-se a hipótese de que o grupo formado pelos tratamentos com os menores valores de clorofila *a* (todos com T3) foi estatisticamente diferente dos demais. No entanto, o teste de Tukey não confirmou a hipótese do agrupamento formado pelos tratamentos que alcançaram os maiores valores de clorofila. Isto é, apenas os tratamentos T2S2N1, T2S2N2 e T2S2N3 formaram um grupo distinto e significativamente diferente dos demais (Tabela 5), com os valores máximos no 8º dia de cultivo.

Os demais tratamentos com valores intermediários apresentaram diferença significativa entre si, não formando um grupo homogêneo.

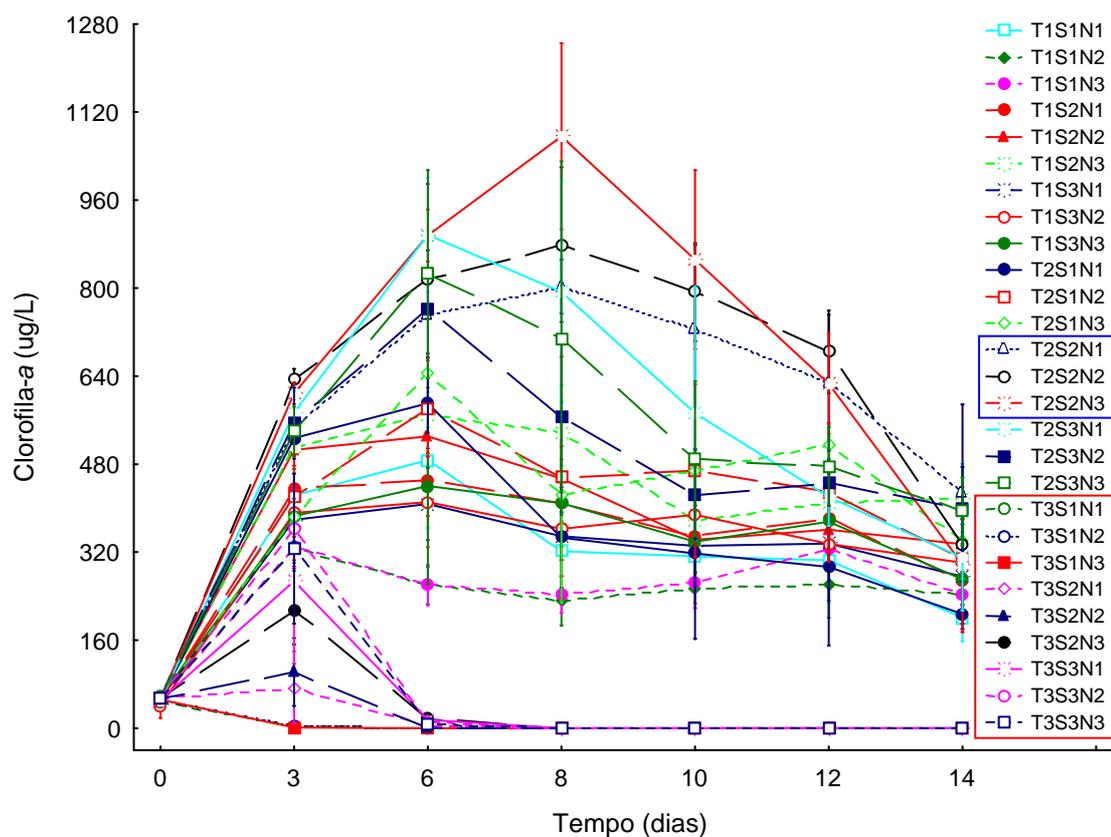


Figura 13 - Valores médios de clorofila *a* (\pm DP) da microalga *Skeletonema* sp. cultivada ao longo de 14 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 5 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) para teor de Clorofila a de *Skeletonema* sp. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 0,18036 , gl = 54. Os valores em negrito indicam diferença significativa (p < 0,05).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	
1	T1S1N1		0,998075	0,999944	1,000000	0,997498	0,602460	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,939699	0,724648	0,000021	0,000021	0,000021	0,000077	0,032006	0,000564	0,000022	
2	T1S1N2	0,998075		1,000000	0,752320	0,176159	0,005161	0,995230	0,951642	0,894718	0,784906	0,044017	0,009804	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000036	0,000021	0,002414	
3	T1S1N3	0,999944	1,000000		0,918149	0,356164	0,017339	0,999788	0,993406	0,978496	0,934592	0,114657	0,030806	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000103	0,000022	0,000628	
4	T1S2N1	1,000000	0,752320	0,918149		1,000000	0,989989	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,999978	0,997246	0,000034	0,000021	0,000021	0,003672	0,356405	0,021454	0,000021	
5	T1S2N2	0,997498	0,176159	0,356164	1,000000		1,000000	0,999076	0,999990	0,999999	1,000000	1,000000	1,000000	0,000979	0,000030	0,000021	0,076197	0,918274	0,255019	0,000021	
6	T1S2N3	0,602460	0,005161	0,017339	0,989989	1,000000		0,682841	0,896265	0,952541	0,985890	1,000000	1,000000	0,057161	0,001767	0,000059	0,693058	0,999996	0,937494	0,000021	
7	T1S3N1	1,000000	0,995230	0,999788	1,000000	0,999076	0,682841		1,000000	1,000000	1,000000	0,964938	0,794819	0,000021	0,000021	0,000021	0,000117	0,045447	0,000927	0,000021	
8	T1S3N2	1,000000	0,951642	0,993406	1,000000	0,999990	0,896265	1,000000		1,000000	1,000000	0,997130	0,950423	0,000022	0,000021	0,000021	0,000601	0,131864	0,004178	0,000021	
9	T1S3N3	1,000000	0,894718	0,978496	1,000000	0,999999	0,952541	1,000000	1,000000		1,000000	0,999454	0,981289	0,000024	0,000021	0,000021	0,001250	0,204404	0,008273	0,000021	
10	T2S1N1	1,000000	0,784906	0,934592	1,000000	1,000000	0,985890	1,000000	1,000000	1,000000		0,999956	0,995806	0,000031	0,000021	0,000021	0,002991	0,323055	0,017956	0,000021	
11	T2S1N2	0,939699	0,044017	0,114657	0,999978	1,000000	1,000000	0,964938	0,997130	0,999454	0,999956		1,000000	0,007136	0,000130	0,000023	0,266051	0,995596	0,596586	0,000021	
12	T2S1N3	0,724648	0,009804	0,030806	0,997246	1,000000	1,000000	0,794819	0,950423	0,981289	0,995806	1,000000		0,033565	0,000880	0,000037	0,568201	0,999952	0,875245	0,000021	
13	T2S2N1	0,000021	0,000021	0,000021	0,000034	0,000979	0,057161	0,000021	0,000022	0,000024	0,000031	0,007136	0,033565		1,000000	0,997902	0,999998	0,734490	0,999189	0,000021	
14	T2S2N2	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000030	0,001767	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000130	0,000880	1,000000		1,000000	0,969386	0,133242	0,787240	0,000021	
15	T2S2N3	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000059	0,000021	0,000021	0,000021	0,000021	0,000023	0,000037	0,997902	1,000000		0,544699	0,009976	0,229059	0,000021	
16	T2S3N1	0,000077	0,000021	0,000021	0,003672	0,076197	0,693058	0,000117	0,000601	0,001250	0,002991	0,266051	0,568201	0,999998	0,969386	0,544699		0,999854	1,000000	0,000021	
17	T2S3N2	0,032006	0,000036	0,000103	0,356405	0,918274	0,999996	0,045447	0,131864	0,204404	0,323055	0,995596	0,999952	0,734490	0,133242	0,009976	0,999854		1,000000	0,000021	
18	T2S3N3	0,000564	0,000021	0,000022	0,021454	0,255019	0,937494	0,000927	0,004178	0,008273	0,017956	0,596586	0,875245	0,999189	0,787240	0,229059	1,000000	1,000000		0,000021	
19	T3S3N1	0,000022	0,002414	0,000628	0,000021																
20	T3S1N1	0,000021	0,000037	0,000024	0,000021	1,000000															
21	T3S1N2	0,000021	0,000037	0,000024	0,000021	1,000000															
22	T3S1N3	0,000021	0,000038	0,000024	0,000021	1,000000															
23	T3S2N1	0,000021	0,000095	0,000035	0,000021	1,000000															
24	T3S2N2	0,000021	0,000142	0,000044	0,000021	1,000000															
25	T3S2N3	0,000021	0,001120	0,000266	0,000021	1,000000															
26	T3S3N2	0,000024	0,009676	0,002717	0,000021	0,000021	0,000021	0,000023	0,000021	1,000000											
27	T3S3N3	0,000022	0,005577	0,001502	0,000021	0,000021	0,000021	0,000022	0,000021	1,000000											

4.2.2 Densidade celular

O experimento com *Skeletonema* sp. foi iniciado a partir de uma densidade celular média de $17,0 \pm 2,71 \times 10^4$ cel/mL (Figura 14).

O valor máximo ($336,23 \pm 27,42 \times 10^4$ cel/mL) foi atingido no 6º dia de cultivo pelo tratamento T1S2N2, enquanto que o tratamento T3S1N3 apresentou o menor valor de densidade celular ($1,46 \pm 0,31 \times 10^4$ cel/mL) ao longo do período.

Os demais tratamentos alcançaram valores máximos de densidade celular intermediários entre os valores citados anteriormente.

Conforme a Figura 14 observou-se a formação de três agrupamentos distintos. Os tratamentos T1S2N1, T1S2N2 e T1S2N3 formaram um grupo que atingiu a maior densidade celular. Outro grupo, formado pelos tratamentos T3S1N1, T3S1N2, T3S1N3, T3S2N1, T3S2N2, T3S2N3, T3S3N1, T3S3N2 e T3S3N3 apresentou o menor crescimento celular, ou morte celular. Já o terceiro grupo foi formado pelos demais tratamentos.

Novamente o teste de significância, indicou haver interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento ($F = 3,782$ e $p = 0,001$), confirmando-se a hipótese de que o grupo formado pelos tratamentos que alcançaram as menores densidades celulares foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Ou seja, os tratamentos sob 30°C (T3), independente da salinidade 20 (S1, S2 ou S3) e da relação N:P (N1, N2 ou N3) empregadas, apresentaram valores de densidade celular significativamente inferiores aos demais tratamentos ao longo do tempo de cultivo (Tabela 6).

Além disso, todos os tratamentos com 30°C (T3) não suportaram as condições experimentais empregadas e sucumbiram a partir da inoculação das cepas (T3S1N1, T3S1N2, T3S1N3, T3S2N1 e T3S2N2), ou a partir do 3º dia de cultivo (T3S2N3, T3S3N1, T3S3N2, T3S3N3).

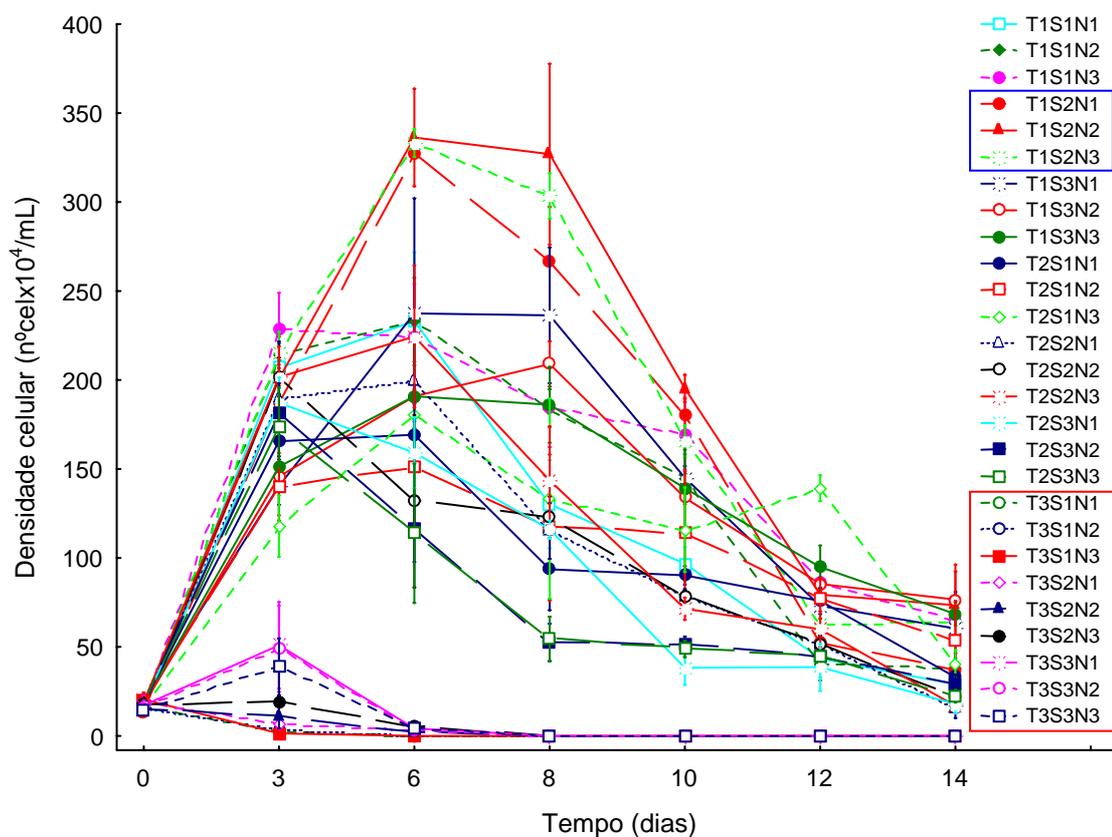


Figura 14 - Valores médios de densidade celular (\pm DP) da microalga *Skeletonema* sp. cultivada ao longo de 14 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 6 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) para densidade celular de *Skeletonema* sp. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 0,00587, gl = 54. Os valores em negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}
1	T1S1N1		1,000000	1,000000	0,999783	0,999988	0,999994	1,000000	0,884499	1,000000	0,999953	0,998158	1,000000	1,000000	0,000210	0,000527	0,000451	0,001150	0,004072	0,000202
2	T1S1N2	1,000000		1,000000	0,999970	0,999999	1,000000	1,000000	0,812698	0,999997	0,999687	0,993563	1,000000	1,000000	0,000217	0,000753	0,000626	0,001763	0,006384	0,000202
3	T1S1N3	1,000000	1,000000		0,999705	0,999982	0,999990	1,000000	0,895035	1,000000	0,999968	0,998555	1,000000	1,000000	0,000209	0,000499	0,000429	0,001071	0,003761	0,000203
4	T1S2N1	0,999783	0,999970	0,999705		1,000000	1,000000	0,956744	0,120810	0,855981	0,671370	0,451198	0,918704	0,927716	0,001614	0,027506	0,022227	0,062067	0,170569	0,000202
5	T1S2N2	0,999988	0,999999	0,999982	1,000000		1,000000	0,986980	0,190995	0,935203	0,801587	0,594827	0,969851	0,974218	0,000893	0,015213	0,012202	0,035854	0,106668	0,000202
6	T1S2N3	0,999994	1,000000	0,999990	1,000000	1,000000		0,989982	0,206987	0,945651	0,822693	0,621736	0,975742	0,979436	0,000807	0,013596	0,010891	0,032271	0,097240	0,000202
7	T1S3N1	1,000000	1,000000	1,000000	0,956744	0,986980	0,989982		0,997610	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000203	0,000229	0,000222	0,000289	0,000629	0,000207
8	T1S3N2	0,884499	0,812698	0,895035	0,120810	0,190995	0,206987	0,997610		0,999903	0,999999	1,000000	0,999390	0,999182	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000203	0,002188
9	T1S3N3	1,000000	0,999997	1,000000	0,855981	0,935203	0,945651	1,000000	0,999903		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000202	0,000210	0,000208	0,000230	0,000346	0,000218
10	T2S1N1	0,999953	0,999687	0,999968	0,671370	0,801587	0,822693	1,000000	0,999999	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000202	0,000204	0,000204	0,000210	0,000246	0,000256
11	T2S1N2	0,998158	0,993563	0,998555	0,451198	0,594827	0,621736	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000202	0,000203	0,000203	0,000204	0,000215	0,000382
12	T2S1N3	1,000000	1,000000	1,000000	0,918704	0,969851	0,975742	1,000000	0,999390	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000202	0,000218	0,000214	0,000254	0,000461	0,000211
13	T2S2N1	1,000000	1,000000	1,000000	0,927716	0,974218	0,979436	1,000000	0,999182	1,000000	1,000000	1,000000			0,000202	0,000220	0,000215	0,000259	0,000488	0,000210
14	T2S2N2	0,000210	0,000217	0,000209	0,001614	0,000893	0,000807	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202		1,000000	1,000000	0,999954	0,995309	0,000202
15	T2S2N3	0,000527	0,000753	0,000499	0,027506	0,015213	0,013596	0,000229	0,000202	0,000210	0,000204	0,000203	0,000218	0,000220	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000202
16	T2S3N1	0,000451	0,000626	0,000429	0,022227	0,012202	0,010891	0,000222	0,000202	0,000208	0,000204	0,000203	0,000214	0,000215	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000202
17	T2S3N2	0,001150	0,001763	0,001071	0,062067	0,035854	0,032271	0,000289	0,000202	0,000230	0,000210	0,000204	0,000254	0,000259	0,999954	1,000000	1,000000		1,000000	0,000202
18	T2S3N3	0,004072	0,006384	0,003761	0,170569	0,106668	0,097240	0,000629	0,000203	0,000346	0,000246	0,000215	0,000461	0,000488	0,995309	1,000000	1,000000	1,000000		0,000202
19	T3S3N1	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	
20	T3S1N1	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	1,000000
21	T3S1N2	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	1,000000
22	T3S1N3	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	1,000000
23	T3S2N1	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	1,000000
24	T3S2N2	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	1,000000
25	T3S2N3	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000203	1,000000
26	T3S3N2	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000203	0,000202	0,000203	0,000210	1,000000
27	T3S3N3	0,000202	0,000202	0,000203	0,000202	0,000202	0,000202	0,000207	0,002188	0,000218	0,000256	0,000382	0,000211	0,000210	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000203	1,000000

Quanto aos parâmetros da curva de crescimento de *Skeletonema* sp., conforme a Tabela 7, observou-se que o tratamento T1S2N2 apresentou o maior rendimento, correspondendo a $321,2 \pm 27,64 \times 10^4$ cel/mL e o tratamento T3S2N3 exibiu o menor rendimento ($1,46 \pm 5,42 \times 10^4$ cel/mL).

A maior taxa de crescimento exponencial ($0,84 \pm 0,05$ /dia) e o menor tempo de duplicação ($0,82 \pm 0,05$ dias) ocorreram no tratamento T2S2N2. Por outro lado, o tratamento T3S2N3 obteve a menor taxa de crescimento exponencial ($0,04 \pm 0,08$ /dia), enquanto que o tratamento T3S3N2 apresentou o maior tempo de duplicação ($3,40 \pm 3,31$ dias).

Tabela 7 – Valores médios (\pm DP) dos parâmetros das curvas de crescimento da microalga *Skeletonema* sp., onde μ (taxa de crescimento exponencial) e Td (tempo de duplicação).

Tratamento	Rendimento		
	($\times 10^4$ cel/mL \pm DP)	($\mu \pm$ DP)	Td \pm DP (dias)
T1S1N1	217,25 \pm 38,60	0,44 \pm 0,02	1,55 \pm 0,09
T1S1N2	217,80 \pm 23,70	0,45 \pm 0,01	1,51 \pm 0,04
T1S1N3	209,0 \pm 28,45	0,44 \pm 0,01	1,55 \pm 0,03
T1S2N1	313,86 \pm 0,84	0,53 \pm 0,01	1,30 \pm 0,04
T1S2N2	321,20 \pm 27,64	0,51 \pm 0,02	1,33 \pm 0,07
T1S2N3	318,08 \pm 7,72	0,51 \pm 0,00	1,34 \pm 0,01
T1S3N1	217,25 \pm 66,86	0,40 \pm 0,06	1,73 \pm 0,32
T1S3N2	191,40 \pm 13,78	0,30 \pm 0,01	2,24 \pm 0,11
T1S3N3	172,51 \pm 32,64	0,38 \pm 0,04	1,79 \pm 0,17
T2S1N1	150,51 \pm 16,09	0,37 \pm 0,03	1,88 \pm 0,21
T2S1N2	133,46 \pm 38,56	0,35 \pm 0,04	1,99 \pm 0,26
T2S1N3	163,90 \pm 44,29	0,39 \pm 0,04	1,75 \pm 0,18
T2S2N1	181,13 \pm 21,26	0,40 \pm 0,01	1,73 \pm 0,05
T2S2N2	185,71 \pm 12,10	0,84 \pm 0,05	0,82 \pm 0,05
T2S2N3	182,60 \pm 18,23	0,78 \pm 0,07	0,88 \pm 0,07
T2S3N1	169,76 \pm 11,59	0,79 \pm 0,02	0,87 \pm 0,02
T2S3N2	163,16 \pm 18,32	0,77 \pm 0,05	0,90 \pm 0,07
T2S3N3	155,10 \pm 23,18	0,74 \pm 0,08	0,93 \pm 0,10
T3S1N1	0	0	0
T3S1N2	0	0	0
T3S1N3	0	0	0
T3S2N1	0	0	0
T3S2N2	0	0	0
T3S2N3	1,46 \pm 5,42	0,04 \pm 0,08	1,60 \pm 2,78
T3S3N1	33,73 \pm 25,85	0,33 \pm 0,21	3,02 \pm 2,37
T3S3N2	33,0 \pm 25,68	0,34 \pm 0,22	3,40 \pm 3,31
T3S3N3	24,93 \pm 17,36	0,32 \pm 0,17	2,82 \pm 2,00

4.2.3 Razão entre clorofila *a* e densidade celular

Similar ao observado para clorofila e densidade celular, o conteúdo de clorofila *a* por célula (pg Cla/cel) apresentou-se formando três grupos (Figura 15). A maioria dos tratamentos T2 apresentou um aumento na concentração do pigmento fotossintético ao longo do experimento, atingindo um máximo de $2,64 \pm 0,04$ pg Cla/cel no tratamento T2S2N1.

Por outro lado, as células nos tratamentos T3 apresentaram um decréscimo da clorofila *a*, como consequência da morte celular. O tratamento T3S1N3 atingiu apenas $0,25 \pm 0,04$ pg Cla/cel, apresentando o menor valor encontrado no período.

Houve ainda um grupo intermediário, com predomínio de tratamentos T1, onde a razão se manteve relativamente constante ao redor de $0,34 \pm 0,17$ pg Cla/cel, apresentando um acréscimo ao final do experimento.

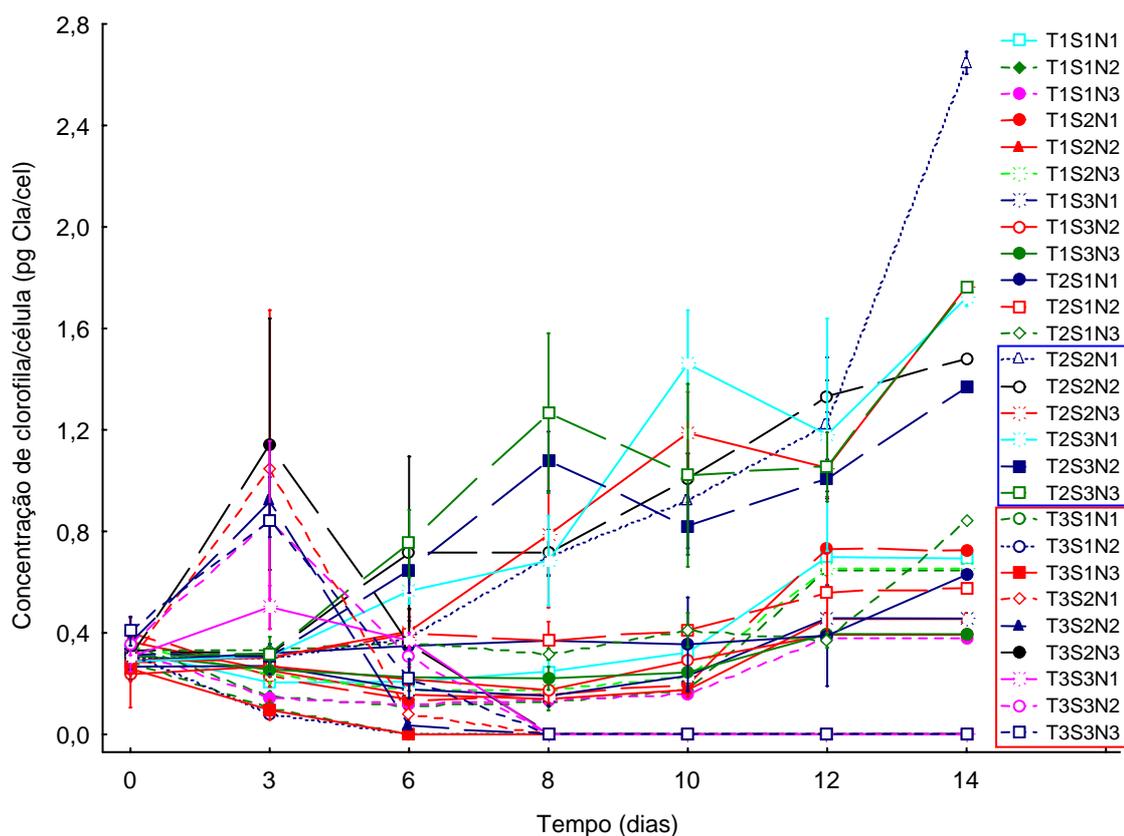


Figura 15 - Valores médios da razão entre clorofila *a* e densidade celular (\pm DP) da microalga *Skeletonema* sp., cultivada ao longo de 14 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

4.3 *Nannochloropsis oculata*

4.3.1 Clorofila *a*

Para *N. oculata*, o período experimental foi de 21 dias, no qual o valor médio inicial de clorofila *a* nos tratamentos foi de $78,72 \pm 6,13 \mu\text{g/L}$.

O valor máximo de clorofila *a* encontrado durante o experimento foi de $4817,51 \pm 442,30 \mu\text{g/L}$, no tratamento T2S3N1, e o menor valor ($1033,28 \pm 211,98 \mu\text{g/L}$) no tratamento T3S1N2.

Os demais tratamentos apresentaram valores máximos de clorofila intermediários aos citados anteriormente.

Conforme mostra a Figura 16, nota-se a formação dos seguintes agrupamentos: os tratamentos T1S2N1, T1S2N2, T1S2N3, T2S3N1, T2S3N2, T2S2N1 e T2S2N2 com os valores mais altos de clorofila *a*, e os tratamentos T3S1N1, T3S1N2 e T3S1N3 com os menores valores de clorofila.

Os demais tratamentos formaram grupos intermediários ao longo do período.

O teste de significância indicou que houve interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento ($F = 2,37$ e $p = 0,00,$), mas não foi confirmada a hipótese de que o grupo formado pelos tratamentos com os maiores e menores valores de clorofila *a* foi estatisticamente diferente dos demais (Tabela 8). Portanto, não foi possível caracterizar grupamentos distintos de tratamentos em relação à clorofila *a*.

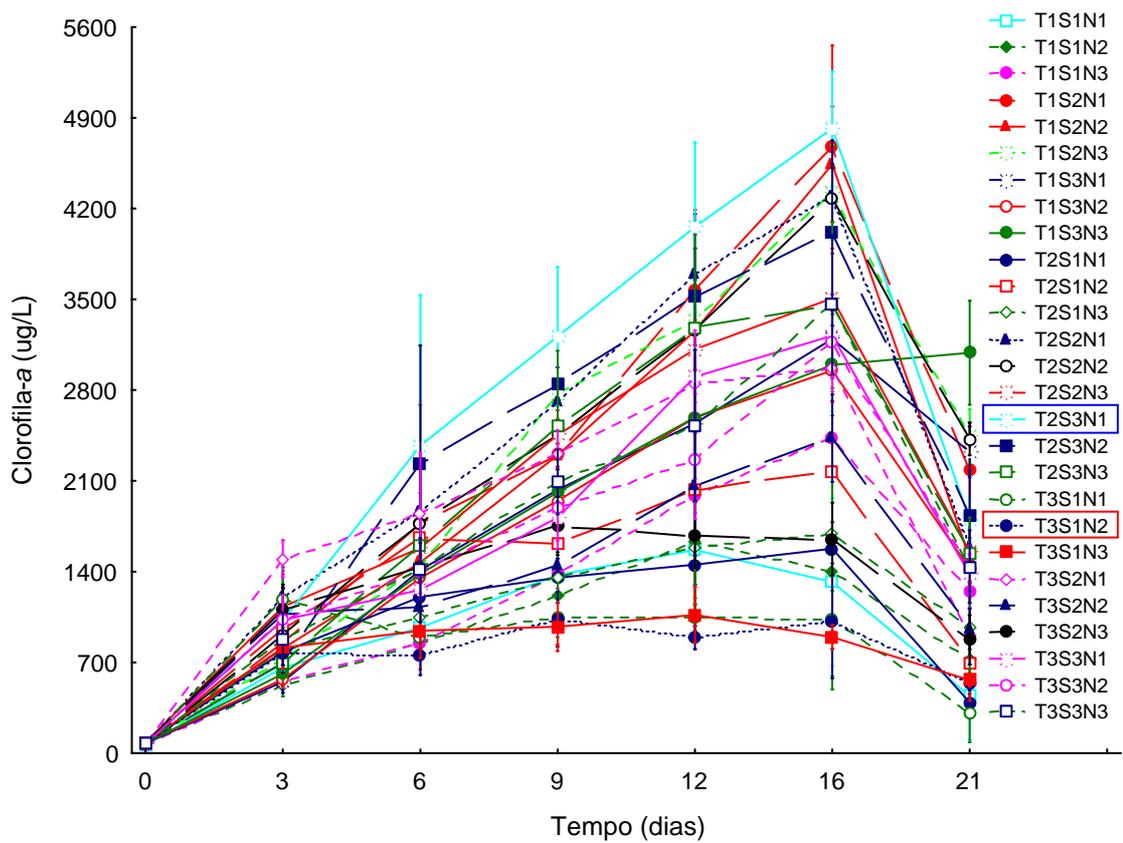


Figura 16 - Valores médios de clorofila *a* (\pm DP) da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 8 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) de teor de clorofila *a* para *Nannochloropsis oculata*. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 3082E2, gl = 534. Os valores em negrito indicam diferença significativa (p < 0,05).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	
1	T1S1N1		1,000000	0,993882	0,000021	0,000021	0,000021	0,000565	0,039790	0,000056	1,000000	0,829586	1,000000	0,000021	0,000021	0,000023	0,000021	0,000021	0,000026	0,003195	
2	T1S1N2	1,000000		0,994581	0,000021	0,000021	0,000021	0,000634	0,041873	0,000059	1,000000	0,838191	1,000000	0,000021	0,000021	0,000023	0,000021	0,000021	0,000026	0,003406	
3	T1S1N3	0,993882	0,994581		0,000023	0,001717	0,000032	0,321279	0,965082	0,081073	0,999873	1,000000	1,000000	0,000024	0,000028	0,011221	0,000021	0,000028	0,024862	0,617441	
4	T1S2N1	0,000021	0,000021	0,000023		0,999984	1,000000	0,526121	0,037677	0,890503	0,000021	0,000088	0,000021	1,000000	1,000000	0,996695	0,998397	1,000000	0,983139	0,250167	
5	T1S2N2	0,000021	0,000021	0,001717	0,999984		1,000000	0,999362	0,705227	1,000000	0,000022	0,020605	0,000045	0,999989	1,000000	1,000000	0,454646	0,999999	1,000000	0,982590	
6	T1S2N3	0,000021	0,000021	0,000032	1,000000	1,000000		0,748407	0,094412	0,974047	0,000021	0,000315	0,000021	1,000000	1,000000	0,999839	0,983629	1,000000	0,998327	0,447450	
7	T1S3N1	0,000565	0,000634	0,321279	0,526121	0,999362	0,748407		1,000000	1,000000	0,003105	0,784395	0,029022	0,547067	0,689351	0,999999	0,003762	0,678239	1,000000	1,000000	
8	T1S3N2	0,039790	0,041873	0,965082	0,037677	0,705227	0,094412	1,000000		0,999193	0,129076	0,999828	0,466483	0,041166	0,073839	0,943631	0,000043	0,070554	0,983657	1,000000	
9	T1S3N3	0,000056	0,000059	0,081073	0,890503	1,000000	0,974047	1,000000	0,999193		0,000279	0,377618	0,003655	0,901696	0,958665	1,000000	0,029733	0,955280	1,000000	1,000000	
10	T2S1N1	1,000000	1,000000	0,999873	0,000021	0,000022	0,000021	0,003105	0,129076	0,000279		0,969654	1,000000	0,000021	0,000021	0,000034	0,000021	0,000021	0,000062	0,014777	
11	T2S1N2	0,829586	0,838191	1,000000	0,000088	0,020605	0,000315	0,784395	0,999828	0,377618	0,969654		0,999786	0,000098	0,000217	0,092898	0,000021	0,000203	0,168476	0,955934	
12	T2S1N3	1,000000	1,000000	1,000000	0,000021	0,000045	0,000021	0,029022	0,466483	0,003655	1,000000	0,999786		0,000021	0,000021	0,000283	0,000021	0,000021	0,000782	0,101452	
13	T2S2N1	0,000021	0,000021	0,000024	1,000000	0,999989	1,000000	0,547067	0,041166	0,901696	0,000021	0,000098	0,000021		1,000000	0,997378	0,997946	1,000000	0,985863	0,265508	
14	T2S2N2	0,000021	0,000021	0,000028	1,000000	1,000000	1,000000	0,689351	0,073839	0,958665	0,000021	0,000217	0,000021	1,000000		0,999578	0,990747	1,000000	0,996497	0,386276	
15	T2S2N3	0,000023	0,000023	0,011221	0,996695	1,000000	0,999839	0,999999	0,943631	1,000000	0,000034	0,092898	0,000283	0,997378	0,999578		0,170751	0,999503	1,000000	0,999694	
16	T2S3N1	0,000021	0,000021	0,000021	0,998397	0,454646	0,983629	0,003762	0,000043	0,029733	0,000021	0,000021	0,000021	0,997946	0,990747	0,170751		0,991708	0,094339	0,000702	
17	T2S3N2	0,000021	0,000021	0,000028	1,000000	0,999999	1,000000	0,678239	0,070554	0,955280	0,000021	0,000203	0,000021	1,000000	1,000000	0,999503	0,991708		0,996029	0,375618	
18	T2S3N3	0,000026	0,000026	0,024862	0,983139	1,000000	0,998327	1,000000	0,983657	1,000000	0,000062	0,168476	0,000782	0,985863	0,996497	1,000000	0,094339	0,996029		0,999982	
19	T3S3N1	0,003195	0,003406	0,617441	0,250167	0,982590	0,447450	1,000000	1,000000	1,000000	0,014777	0,955934	0,101452	0,265508	0,386276	0,999694	0,000702	0,375618	0,999982		
20	T3S1N1	1,000000	1,000000	0,781909	0,000021	0,000021	0,000021	0,000036	0,002753	0,000022	1,000000	0,318739	0,998420	0,000021	0,000141						
21	T3S1N2	0,999999	0,999998	0,457120	0,000021	0,000021	0,000021	0,000023	0,000405	0,000021	0,999670	0,110768	0,962652	0,000021	0,000033						
22	T3S1N3	1,000000	1,000000	0,630017	0,000021	0,000021	0,000021	0,000026	0,001119	0,000022	0,999982	0,198266	0,990808	0,000021	0,000061						
23	T3S2N1	0,000166	0,000178	0,172279	0,733339	0,999979	0,899393	1,000000	0,999971	1,000000	0,000977	0,585972	0,010812	0,751746	0,861564	1,000000	0,011072	0,853934	1,000000	1,000000	
24	T3S2N2	0,845324	0,853465	1,000000	0,000079	0,018590	0,000277	0,765796	0,999758	0,357580	0,974316	1,000000	0,999848	0,000087	0,000191	0,085427	0,000021	0,000179	0,156526	0,948975	
25	T3S2N3	0,989666	0,990751	1,000000	0,000024	0,002315	0,000038	0,369123	0,976801	0,099642	0,999705	1,000000	1,000000	0,000025	0,000032	0,014606	0,000021	0,000031	0,031728	0,671340	
26	T3S3N2	0,014934	0,015809	0,873733	0,090407	0,875470	0,198935	1,000000	1,000000	0,999973	0,056765	0,996949	0,273282	0,097693	0,161653	0,989215	0,000118	0,155511	0,998162	1,000000	
27	T3S3N3	0,001471	0,001571	0,473885	0,366808	0,995415	0,590437	1,000000	1,000000	1,000000	0,007326	0,897033	0,058427	0,385704	0,525370	0,999971	0,001543	0,513657	0,999999	1,000000	

Continuação Tabela 8.

{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	{25}	{26}	{27}
1,000000	0,999999	1,000000	0,000166	0,845324	0,989666	0,014934	0,001471
1,000000	0,999998	1,000000	0,000178	0,853465	0,990751	0,015809	0,001571
0,781909	0,457120	0,630017	0,172279	1,000000	1,000000	0,873733	0,473885
0,000021	0,000021	0,000021	0,733339	0,000079	0,000024	0,090407	0,366808
0,000021	0,000021	0,000021	0,999979	0,018590	0,002315	0,875470	0,995415
0,000021	0,000021	0,000021	0,899393	0,000277	0,000038	0,198935	0,590437
0,000036	0,000023	0,000026	1,000000	0,765796	0,369123	1,000000	1,000000
0,002753	0,000405	0,001119	0,999971	0,999758	0,976801	1,000000	1,000000
0,000022	0,000021	0,000022	1,000000	0,357580	0,099642	0,999973	1,000000
1,000000	0,999670	0,999982	0,000977	0,974316	0,999705	0,056765	0,007326
0,318739	0,110768	0,198266	0,585972	1,000000	1,000000	0,996949	0,897033
0,998420	0,962652	0,990808	0,010812	0,999848	1,000000	0,273282	0,058427
0,000021	0,000021	0,000021	0,751746	0,000087	0,000025	0,097693	0,385704
0,000021	0,000021	0,000021	0,861564	0,000191	0,000032	0,161653	0,525370
0,000021	0,000021	0,000021	1,000000	0,085427	0,014606	0,989215	0,999971
0,000021	0,000021	0,000021	0,011072	0,000021	0,000021	0,000118	0,001543
0,000021	0,000021	0,000021	0,853934	0,000179	0,000031	0,155511	0,513657
0,000021	0,000021	0,000021	1,000000	0,156526	0,031728	0,998162	0,999999
0,000141	0,000033	0,000061	1,000000	0,948975	0,671340	1,000000	1,000000
	1,000000	1,000000	0,000024	0,337673	0,734642	0,000838	0,000067
1,000000		1,000000	0,000022	0,119955	0,404468	0,000118	0,000025
1,000000	1,000000		0,000022	0,212401	0,575067	0,000313	0,000036
0,000024	0,000022	0,000022		0,563519	0,205052	1,000000	1,000000
0,337673	0,119955	0,212401	0,563519		1,000000	0,996111	0,884650
0,734642	0,404468	0,575067	0,205052	1,000000		0,904452	0,528710
0,000838	0,000118	0,000313	1,000000	0,996111	0,904452		1,000000
0,000067	0,000025	0,000036	1,000000	0,884650	0,528710	1,000000	

4.3.2 Densidade celular

N. oculata apresentou uma densidade celular média inicial de $57,98 \pm 5,62 \times 10^4$ cel/mL nos tratamentos aplicados (Figura 17), com valor máximo de $2943,23 \pm 1272,56 \times 10^4$ cel/mL no tratamento T2S2N1, atingido no 16º dia de cultivo.

Já o tratamento T3S1N2 apresentou o menor valor de densidade celular, alcançando $837,83 \pm 303,33 \times 10^4$ cel/mL.

Os demais tratamentos alcançaram valores máximos de densidade celular intermediários entre os valores citados anteriormente.

Conforme a Figura 17, não é possível identificar claramente a formação de agrupamentos. Porém, pode-se dizer que o tratamento T2S2N1 e T3S1N2 se distinguem dos demais tratamentos.

O teste de significância evidenciou que houve interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento ($F = 52,73$ e $p = 0,00$), mas de acordo com os resultados do teste de Tukey (Tabela 9), não foi confirmada a hipótese de que o tratamento T2S2N1 foi estatisticamente diferente de todos os demais tratamentos, mas sim de alguns. Ou seja, não apresentou densidade celular significativamente diferente quando comparado com alguns dos tratamentos.

Por outro lado, confirmou-se a hipótese de que o tratamento T3S1N2 foi significativamente diferente e inferior dos demais, formando assim um tratamento isolado.

Os demais tratamentos não tiveram comportamento semelhante entre si, ocorrendo diferenças estatísticas entre os mesmos e, portanto, não formando agrupamentos distintos.

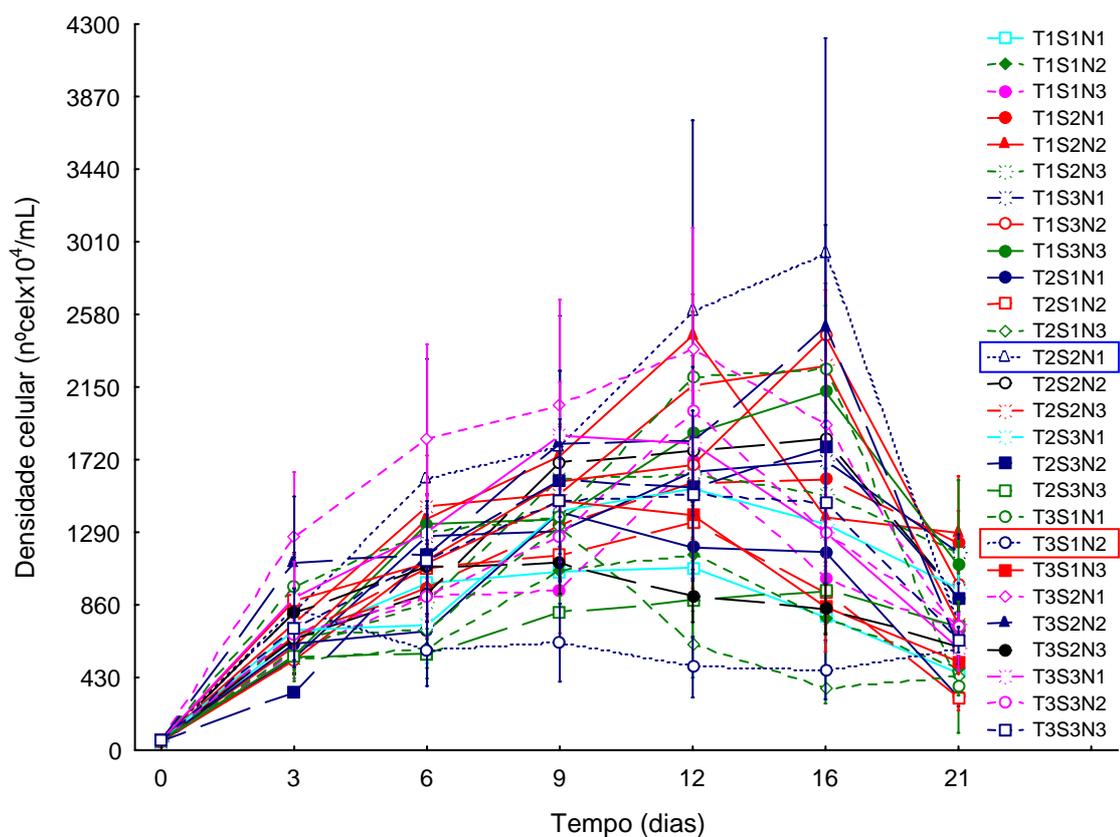


Figura 17 - Valores médios de densidade celular (\pm DP) da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

Tabela 9 - Resultados do teste de Tukey (Anova OneWay) para densidade celular de *Nannochloropsis oculata*. Probabilidades para o teste Post Hoc. Entre Erro MS = 0,00078, gl = 54. Os valores em negrito indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

	Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	
1	T1S1N1		1,000000	0,988299	0,988176	0,536991	0,995635	0,997072	1,000000	0,999999	1,000000	1,000000	0,005387	1,000000	0,993808	0,999991	1,000000	0,999671	0,112503	0,999998	
2	T1S1N2	1,000000		0,997180	0,964311	0,665361	0,999209	0,987967	1,000000	0,999971	1,000000	1,000000	0,009401	1,000000	0,978420	0,999873	1,000000	0,997815	0,071800	0,999957	
3	T1S1N3	0,988299	0,997180		0,126181	0,999999	1,000000	0,188309	0,857366	0,520849	0,997687	0,999387	0,447593	0,855541	0,154446	0,448259	0,999981	0,289181	0,000690	0,502999	
4	T1S2N1	0,988176	0,964311	0,126181		0,007958	0,169535	1,000000	0,999922	1,000000	0,959941	0,925025	0,000209	0,999926	1,000000	1,000000	0,805891	1,000000	0,983816	1,000000	
5	T1S2N2	0,536991	0,665361	0,999999	0,007958		0,999991	0,013637	0,228802	0,068137	0,680442	0,766810	0,973690	0,227055	0,010401	0,051846	0,901598	0,025410	0,000212	0,063808	
6	T1S2N3	0,995635	0,999209	1,000000	0,169535	0,999991		0,246447	0,912178	0,613542	0,999374	0,999870	0,362869	0,910817	0,204977	0,539295	0,999998	0,365168	0,000976	0,595523	
7	T1S3N1	0,997072	0,987967	0,188309	1,000000	0,013637	0,246447		0,999995	1,000000	0,986053	0,968804	0,000217	0,999995	1,000000	1,000000	0,893215	1,000000	0,955013	1,000000	
8	T1S3N2	1,000000	1,000000	0,857366	0,999922	0,228802	0,912178	0,999995		1,000000	1,000000	1,000000	0,001167	1,000000	0,999978	1,000000	0,999994	1,000000	0,325510	1,000000	
9	T1S3N3	0,999999	0,999971	0,520849	1,000000	0,068137	0,613542	1,000000	1,000000		0,999959	0,999761	0,000344	1,000000	1,000000	1,000000	0,996332	1,000000	0,679424	1,000000	
10	T2S1N1	1,000000	1,000000	0,997687	0,959941	0,680442	0,999374	0,986053	1,000000	0,999959		1,000000	0,010043	1,000000	0,975414	0,999831	1,000000	0,997324	0,067877	0,999941	
11	T2S1N2	1,000000	1,000000	0,999387	0,925025	0,766810	0,999870	0,968804	1,000000	0,999761	1,000000		0,014912	1,000000	0,950014	0,999220	1,000000	0,992114	0,047925	0,999677	
12	T2S1N3	0,005387	0,009401	0,447593	0,000209	0,973690	0,362869	0,000217	0,001167	0,000344	0,010043	0,014912		0,001154	0,000212	0,000298	0,032144	0,000237	0,000202	0,000331	
13	T2S2N1	1,000000	1,000000	0,855541	0,999926	0,227055	0,910817	0,999995	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,001154		0,999980	1,000000	0,999994	1,000000	0,327711	1,000000	
14	T2S2N2	0,993808	0,978420	0,154446	1,000000	0,010401	0,204977	1,000000	0,999978	1,000000	0,975414	0,950014	0,000212	0,999980		1,000000	0,852628	1,000000	0,972318	1,000000	
15	T2S2N3	0,999991	0,999873	0,448259	1,000000	0,051846	0,539295	1,000000	1,000000	1,000000	0,999831	0,999220	0,000298	1,000000	1,000000		0,991620	1,000000	0,748441	1,000000	
16	T2S3N1	1,000000	1,000000	0,999981	0,805891	0,901598	0,999998	0,893215	0,999994	0,996332	1,000000	1,000000	0,032144	0,999994	0,852628	0,991620		0,958613	0,022811	0,995472	
17	T2S3N2	0,999671	0,997815	0,289181	1,000000	0,025410	0,365168	1,000000	1,000000	1,000000	0,997324	0,992114	0,000237	1,000000	1,000000	1,000000	0,958613		0,886431	1,000000	
18	T2S3N3	0,112503	0,071800	0,000690	0,983816	0,000212	0,000976	0,955013	0,325510	0,679424	0,067877	0,047925	0,000202	0,327711	0,972318	0,748441	0,022811	0,886431		0,696676	
19	T3S3N1	0,999998	0,999957	0,502999	1,000000	0,063808	0,595523	1,000000	1,000000	1,000000	0,999941	0,999677	0,000331	1,000000	1,000000	1,000000	0,995472	1,000000	0,696676		
20	T3S1N1	0,000202																			
21	T3S1N2	0,006878	0,011924	0,502364	0,000212	0,983772	0,413302	0,000222	0,001472	0,000399	0,012731	0,018811	1,000000	0,001456	0,000216	0,000331	0,040017	0,000250	0,000202	0,000376	
22	T3S1N3	0,755570	0,856918	1,000000	0,020492	1,000000	1,000000	0,034093	0,407882	0,147203	0,867255	0,920127	0,884415	0,405417	0,026415	0,115571	0,979555	0,060645	0,000238	0,138940	
23	T3S2N1	1,000000	0,999990	0,570724	1,000000	0,081459	0,662847	1,000000	1,000000	1,000000	0,999986	0,999903	0,000387	1,000000	1,000000	1,000000	0,998047	1,000000	0,630545	1,000000	
24	T3S2N2	0,380712	0,502731	0,999957	0,003916	1,000000	0,999756	0,006801	0,139114	0,036892	0,518130	0,612156	0,994498	0,137913	0,005144	0,027543	0,788616	0,012979	0,000206	0,034369	
25	T3S2N3	0,000343	0,000484	0,048302	0,000202	0,430405	0,033810	0,000202	0,000222	0,000204	0,000507	0,000695	0,999999	0,000221	0,000202	0,000204	0,001460	0,000203	0,000202	0,000204	
26	T3S3N2	0,992760	0,998480	1,000000	0,147036	0,999997	1,000000	0,216619	0,887337	0,568088	0,998772	0,999713	0,403385	0,885740	0,178823	0,494276	0,999994	0,326756	0,000818	0,550026	
27	T3S3N3	1,000000	1,000000	0,999997	0,737409	0,939102	1,000000	0,841453	0,999965	0,991084	1,000000	1,000000	0,043873	0,999963	0,791792	0,981924	1,000000	0,929194	0,016428	0,989313	

Continuação Tabela 9.

{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	{25}	{26}	{27}
0,000202	0,006878	0,755570	1,000000	0,380712	0,000343	0,992760	1,000000
0,000202	0,011924	0,856918	0,999990	0,502731	0,000484	0,998480	1,000000
0,000202	0,502364	1,000000	0,570724	0,999957	0,048302	1,000000	0,999997
0,000202	0,000212	0,020492	1,000000	0,003916	0,000202	0,147036	0,737409
0,000202	0,983772	1,000000	0,081459	1,000000	0,430405	0,999997	0,939102
0,000202	0,413302	1,000000	0,662847	0,999756	0,033810	1,000000	1,000000
0,000202	0,000222	0,034093	1,000000	0,006801	0,000202	0,216619	0,841453
0,000202	0,001472	0,407882	1,000000	0,139114	0,000222	0,887337	0,999965
0,000202	0,000399	0,147203	1,000000	0,036892	0,000204	0,568088	0,991084
0,000202	0,012731	0,867255	0,999986	0,518130	0,000507	0,998772	1,000000
0,000202	0,018811	0,920127	0,999903	0,612156	0,000695	0,999713	1,000000
0,000202	1,000000	0,884415	0,000387	0,994498	0,999999	0,403385	0,043873
0,000202	0,001456	0,405417	1,000000	0,137913	0,000221	0,885740	0,999963
0,000202	0,000216	0,026415	1,000000	0,005144	0,000202	0,178823	0,791792
0,000202	0,000331	0,115571	1,000000	0,027543	0,000204	0,494276	0,981924
0,000202	0,040017	0,979555	0,998047	0,788616	0,001460	0,999994	1,000000
0,000202	0,000250	0,060645	1,000000	0,012979	0,000203	0,326756	0,929194
0,000202	0,000202	0,000238	0,630545	0,000206	0,000202	0,000818	0,016428
0,000202	0,000376	0,138940	1,000000	0,034369	0,000204	0,550026	0,989313
	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202	0,000202
0,000202		0,915112	0,000455	0,997167	0,999994	0,456128	0,054216
0,000202	0,915112		0,172091	1,000000	0,244981	1,000000	0,990322
0,000202	0,000455	0,172091		0,044685	0,000205	0,618028	0,994786
0,000202	0,997167	1,000000	0,044685		0,591324	0,999891	0,849961
0,000202	0,999994	0,244981	0,000205	0,591324		0,040344	0,002040
0,000202	0,456128	1,000000	0,618028	0,999891	0,040344		0,999999
0,000202	0,054216	0,990322	0,994786	0,849961	0,002040	0,999999	

Quanto aos parâmetros da curva de crescimento de *Nannochloropsis oculata* (Tabela 10), o maior rendimento alcançado foi de $2882,55 \pm 1273,79 \times 10^4$ cel/mL no tratamento T2S2N1. O menor rendimento ($774,58 \pm 301,63 \times 10^4$ cel/mL) ocorreu em T3S1N2, que também alcançou o maior crescimento exponencial ($0,84 \pm 0,10$ /dia) e o menor tempo de duplicação ($0,82 \pm 0,09$ dias). Já o tratamento T2S3N3 obteve o menor crescimento exponencial ($0,16 \pm 0,01$ /dia) e o maior tempo de duplicação ($4,12 \pm 0,39$ dias).

Tabela 10 – Valores médios (\pm DP) dos parâmetros das curvas de crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*, onde μ (taxa de crescimento exponencial) e Td (tempo de duplicação).

Tratamento	Rendimento ($\times 10^4$ cel/mL \pm DP)	($\mu \pm$ DP)	Td \pm DP (dias)
T1S1N1	1027,40 \pm 117,28	0,25 \pm 0,01	2,77 \pm 0,19
T1S1N2	1101,28 \pm 100,91	0,25 \pm 0,00	2,72 \pm 0,04
T1S1N3	1657,51 \pm 472,57	0,29 \pm 0,04	2,42 \pm 0,35
T1S2N1	1546,41 \pm 254,18	0,21 \pm 0,01	3,30 \pm 0,26
T1S2N2	2399,28 \pm 244,77	0,31 \pm 0,00	2,21 \pm 0,06
T1S2N3	1581,61 \pm 154,97	0,28 \pm 0,01	2,41 \pm 0,09
T1S3N1	1658,80 \pm 151,79	0,21 \pm 0,00	3,23 \pm 0,06
T1S3N2	2398,55 \pm 307,59	0,23 \pm 0,00	2,89 \pm 0,06
T1S3N3	2065,43 \pm 124,24	0,22 \pm 0,00	3,04 \pm 0,06
T2S1N1	1144,0 \pm 196,24	0,25 \pm 0,01	2,72 \pm 0,15
T2S1N2	1288,46 \pm 97,19	0,25 \pm 0,00	2,68 \pm 0,02
T2S1N3	1275,45 \pm 409,69	0,35 \pm 0,03	1,95 \pm 0,18
T2S2N1	2882,55 \pm 1273,79	0,23 \pm 0,02	2,92 \pm 0,30
T2S2N2	1785,85 \pm 580,79	0,21 \pm 0,01	3,27 \pm 0,25
T2S2N3	2213,20 \pm 450,49	0,22 \pm 0,01	3,08 \pm 0,20
T2S3N1	1485,55 \pm 503,68	0,26 \pm 0,02	2,63 \pm 0,23
T2S3N2	1737,81 \pm 11,22	0,21 \pm 0,00	3,16 \pm 0,03
T2S3N3	878,53 \pm 243,26	0,16 \pm 0,01	4,12 \pm 0,39
T3S1N1	2194,31 \pm 380,96	0,22 \pm 0,01	3,06 \pm 0,16
T3S1N2	774,58 \pm 301,63	0,84 \pm 0,10	0,82 \pm 0,09
T3S1N3	1416,61 \pm 453,40	0,35 \pm 0,03	1,96 \pm 0,19
T3S2N1	2316,05 \pm 717,43	0,30 \pm 0,02	2,27 \pm 0,16
T3S2N2	2446,58 \pm 601,44	0,22 \pm 0,01	3,03 \pm 0,20
T3S2N3	1049,03 \pm 186,50	0,31 \pm 0,02	2,18 \pm 0,13
T3S3N1	1801,43 \pm 316,09	0,37 \pm 0,02	1,82 \pm 0,09
T3S3N2	1944,25 \pm 237,69	0,28 \pm 0,00	2,39 \pm 0,05
T3S3N3	1454,01 \pm 498,41	0,26 \pm 0,02	2,61 \pm 0,27

4.3.3 Razão entre clorofila *a* e densidade celular

A concentração de clorofila *a* por célula (pg Cla/cel) foi relativamente constante na maioria dos tratamentos até a metade do experimento, ou seja, até o 12º dia

mantendo-se em torno de $0,14 \pm 0,06$ pg Cla/cel, cujo valor não se distanciou do valor médio geral para o período ($0,16 \pm 0,08$ pg Cla/cel), conforme mostra Figura 18.

Entretanto, após este período, muitos tratamentos apresentaram um aumento do conteúdo de clorofila em suas células.

Os tratamentos T2S1N3 ($0,53 \pm 0,49$ pg Cla/cel), T2S3N3 ($0,38 \pm 0,09$ pg Cla/cel) e T2S3N1 ($0,39 \pm 0,14$ pg Cla/cel) apresentaram as maiores concentrações de Clorofila *a* por célula. O tratamento T2S3N1, quando analisado apenas para o parâmetro de clorofila apresenta também o maior valor.

Já a menor razão entre clorofila e densidade celular foi apresentada pelo tratamento T3S1N1 ($0,08 \pm 0,0$ pg Cla/cel), o qual não coincide com o tratamento T3S1N2 cujos valores foram máximos em relação à clorofila e densidade celular encontrados para o período.

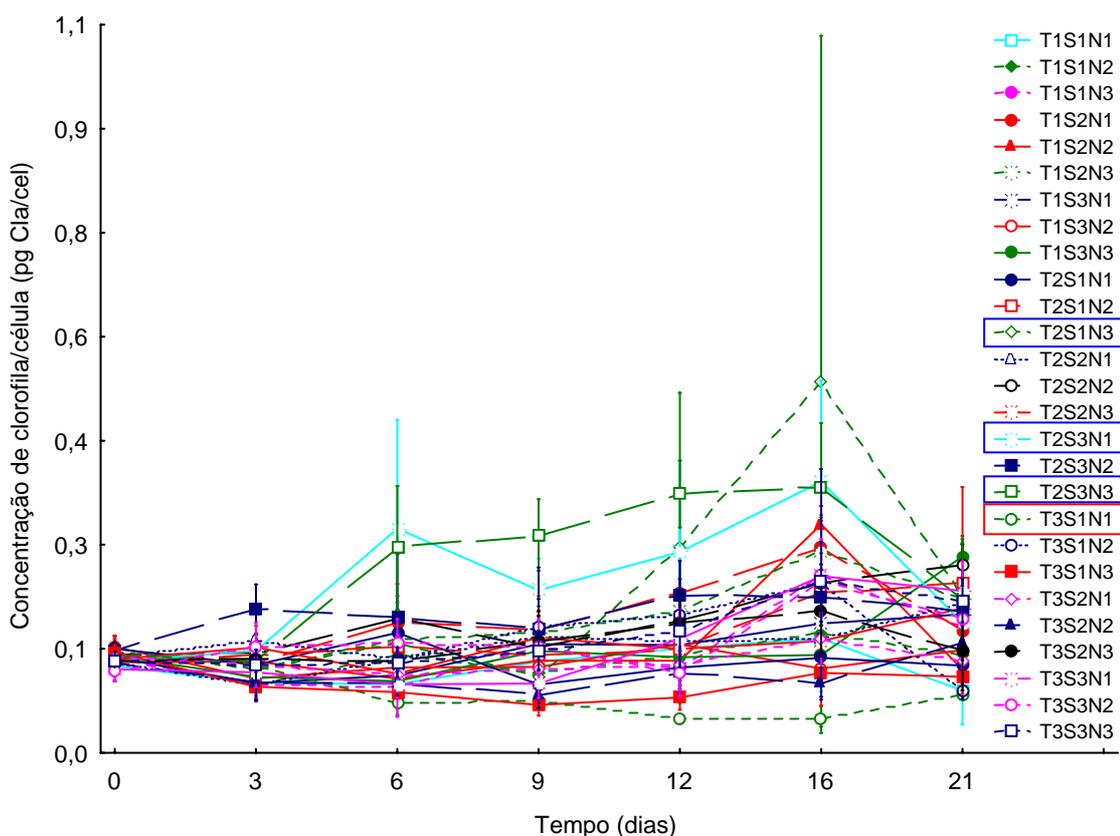


Figura 18 - Valores médios da razão entre clorofila *a* e densidade celular (\pm DP) da microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada ao longo de 21 dias sob diferentes condições de temperatura, salinidade e relação N:P. Tratamentos marcados em azul e vermelho referem-se aos maiores e menores valores, respectivamente.

5. Discussão

5.1 Densidade celular x clorofila *a*

Acompanhar o crescimento celular, direta ou indiretamente, é sempre difícil, pois a estimativa da densidade celular, ou de sua biomassa (clorofila *a*), pode ser afetada pela forma de coleta e pelo estado fisiológico das células (Rocha *et al.* 2003). Segundo estes mesmos autores, problemas de determinação de abundância celular e biomassa aumentam em culturas diluídas, ou com células de tamanho muito pequeno.

A contagem direta das células é um método relativamente mais preciso, mas que consome bastante tempo. Por outro lado, os métodos que usam densidade óptica, ou fluorescência, para estimativa da concentração de clorofila são muito mais práticos e de fácil manuseio e aplicação (Rocha *et al.* 2003), além de produzirem resultados em tempo real (Lefebvre *et al.* 2007). Entretanto, a absorvância da clorofila *a* como uma representação da biomassa depende do tamanho, forma e brilho das partículas em suspensão, comprimento de onda da luz incidente, entre outros fatores. Uma proporcionalidade linear entre densidade celular e clorofila pode ser encontrada apenas na fase exponencial do crescimento celular (Rocha *et al.* 2003). Para o método de fluorimetria, além dos mesmos problemas citados para absorvância, o estado fisiológico da célula, a forma e distribuição dos cloroplastos e exposição à intensidade luminosa podem afetar as medidas (Sosik *et al.* 1989).

Como a fluorimetria é um processo de alta sensibilidade, somente filtros de fibra de vidro podem ser usados para filtrar amostras, pois outros filtros podem liberar substâncias fluorescentes na amostra. No entanto, o maior problema deste método se refere à calibração, que deve ser feita com extratos puros de clorofila padronizados, o que é difícil de obter (Strickland & Parsons 1972). Porém, poucos estudos abordam os problemas de calibração nos métodos de fluorescência em detalhes suficientes para explicar os mecanismos fisiológicos que acontecem nas células para uma interpretação correta dos resultados obtidos (Sosik *et al.* 1989).

Além disso, a fluorescência da clorofila varia com a temperatura das amostras. Assim, quando as amostras estão sendo lidas, a melhor técnica é manter amostras e o líquido padrão em mesma temperatura, a fim de anular a diferença entre a temperatura da substância medida e o padrão (Turner Designs 1995).

No presente trabalho, as três espécies de microalga testadas apresentaram respostas diferentes ao uso dos dois métodos. De maneira geral, houve boa coincidência para medidas de crescimento celular por abundância e clorofila *a* para as espécies *Thalassiosira weissflogii* e *Nannochloropsis oculata*. A melhor concordância foi observada para *T. weissflogii*, onde as duas medidas indicaram os mesmos grupos com respostas similares de crescimento. No caso de *N. oculata* não houve uma caracterização clara de grupos com maior ou menor crescimento por qualquer um dos métodos.

Por outro lado, *Skeletonema* sp. apresentou grande disparidade, especialmente com relação aos tratamentos que apresentaram maior crescimento. Enquanto que medidas de clorofila *a* indicavam os tratamentos T2 como os que apresentaram maior aumento de biomassa, as contagens celulares mostraram que na verdade os tratamentos T1 tiveram maior incremento de abundância celular.

Esta discrepância deveu-se, principalmente, ao maior conteúdo de clorofila *a* por célula ocorrido nos tratamentos T2. Existem muitos fatores que podem afetar o conteúdo de clorofila *a* celular como, por exemplo, a disponibilidade de luz e concentração de nutrientes (Eker-Develi *et al.* 2006). Segundo Cullen (1982), a relação Cla/cel decresce sob condições de saturação por luz. Além disso, Eker-Develi *et al.* (2006), encontraram que a relação Cla/cel muda durante as fases de crescimento das espécies, sendo que a relação Cla/cel é alta na fase exponencial de crescimento sob alta concentração de nutrientes, ou também sob condições limitadas de nutrientes.

Resultados similares foram encontrados por outros autores com diferentes espécies (Young & Beardall 2003a; b). Entretanto não foi encontrada na literatura qualquer informação que pudesse justificar o aumento do conteúdo de clorofila *a* por célula para uma faixa específica de temperatura (T2 = 25°C).

Estes resultados mostram que, apesar de ser um método mais rápido, estudos de curva de crescimento de microalgas devem ser, sempre que possível, checados com medidas de contagem celular.

5.1.1 *Thalassiosira weissflogii*

Os parâmetros que mais influenciaram a variação de clorofila *a* ao longo do tempo foram temperatura e salinidade, tanto para os maiores quanto para os menores valores de clorofila encontrados.

No entanto, ocorre uma distinção em especial entre as temperaturas, uma vez que os maiores valores de clorofila foram obtidos em condição de 25°C (T2), salinidade 30 (S3), mas independente da relação N:P 16:1 (N2) ou 24:1 (N3). Por outro lado, os menores valores foram obtidos em 20°C (T1), salinidade 10 (S1) e relação N:P 8:1 (N1) e 24:1 (N3), ou salinidade 20 (S2) e N:P 8:1. Além disso, a condição de 30°C (T3), salinidade 10 (S1) e independente da relação N:P, também proporcionou baixa concentração de clorofila *a*. Isso indica que *T. weissflogii* apresentou melhores resultados em incremento de clorofila quando submetida a temperatura média (25°C) e salinidade alta (30), enquanto que em menor temperatura (20°C), a salinidade e a concentração de nutrientes ainda podem afetar a concentração de clorofila *a*.

No caso da densidade celular, também foi observada uma influência da temperatura e salinidade. Apesar disso, nem todos os tratamentos com os maiores e menores valores de densidade celular foram significativamente diferentes dos demais. No entanto, o maior valor de densidade celular obtido foi no cultivo sob condição 25°C (T2), salinidade 30 (S3) e relação N:P 24:1 (N3), e o menor valor ocorreu sob 30°C (T3), salinidade 20 (S2) e N:P 8:1. Por outro lado, observou-se que, independente da temperatura e salinidade empregada, os maiores valores de densidade celular foram obtidos nos tratamentos com a relação N:P 16:1 e 24:1, indicando uma maior necessidade de elementos nitrogenados por esta espécie. No entanto, com o aumento da temperatura nestes tratamentos, ocorreram as melhores respostas, que coincidiram também com o aumento da salinidade empregada, indicando que a salinidade exerce um papel secundário na produção de *T. weissflogii*.

Segundo Radchenko & Il'yash (2006), *T. weissflogii* cresce rapidamente em salinidades entre 30 a 35. Por outro lado, quando em locais de baixa salinidade não ocorre crescimento e tampouco morte celular. Este crescimento ativo numa ampla faixa de salinidade e a capacidade de adaptação a mudanças de salinidade indica ser uma espécie eurihalina.

Com relação à temperatura, alguns estudos relatam que uma grande parte de espécies do gênero *Thalassiosira* cresce relativamente bem em baixa temperatura e em baixa intensidade luminosa como, por exemplo, *T. nordenskioldii*. Também foi demonstrado que a temperatura mínima que permite o crescimento de *T. pseudonana* é de 4°C (Guillard & Ryther 1962) e que *T. rotula* cresce bem em baixa intensidade luminosa e temperatura moderada (Krawiec 1982). Já a faixa de temperatura na qual *T. curviseriata* cresce é de 5-20°C, no entanto o seu crescimento ótimo ocorre aos 20°C (Popovich & Gayoso 1999), o que caracteriza esta espécie como euritérmica.

Os resultados do presente experimento demonstraram que *T. weissflogii* cresceu em todas as temperaturas empregadas (20, 25 e 30°C), com uma densidade celular máxima atingida em 25°C, entretanto, a 30°C resultou numa maior taxa de crescimento exponencial e num menor tempo de duplicação (TD), ou seja, em 25°C atingiu uma densidade alta, mas não cresceu tão rápido como em 30°C.

Portanto, comparando os resultados deste trabalho com estudos citados anteriormente, infere-se que *T. weissflogii* cresce em temperaturas mais elevadas que as reportadas para outras espécies do mesmo gênero, demonstrando possuir uma faixa de tolerância ampla para as variáveis analisadas. Desta forma, existe a possibilidade de *T. weissflogii* possa ser usada em diferentes épocas do ano, com maior produção na primavera e início do verão.

Além disso, *T. weissflogii* cresceu bem em salinidade mais elevada (entre 20 a 30) e em condição de nutrientes também mais elevada (N:P entre 16:1 a 24:1), e portanto poderá ser cultivada em ambientes salobros a marinhos, desde que a concentração de nutrientes, especialmente nitrogenados, esteja nas proporções mais elevadas.

5.1.2 *Skeletonema* sp.

O principal parâmetro que influenciou no incremento de clorofila *a* e de densidade celular de *Skeletonema* sp., foi a temperatura, tanto para os maiores quanto para os menores valores de clorofila e densidade encontrados no período. A salinidade influenciou de forma secundária, assim como a relação N:P empregada.

Nota-se uma separação bastante distinta em função da temperatura, onde os maiores valores de clorofila foram obtidos em condições de 25°C, salinidade 20 e

independente da relação N:P (T2S2N1, T2S2N2 e T2S2N3). Enquanto que para densidade celular, o tratamento T1S2N2 (20°C, salinidade 20 e N:P 16:1) exibiu o maior valor encontrado. Isto sugere não haver novamente uma relação direta entre densidade celular e concentração de clorofila *a*.

Essa condição evidencia que, independente das condições experimentais submetidas neste trabalho, não existe uma linearidade ou proporção entre a quantidade de clorofila *a* e a densidade celular, e que o potencial de incremento de clorofila *a* em *Skeletonema* sp., está relacionado fundamentalmente com temperaturas mais amenas (20°C e 25°C), sob condição de salinidade 20 e independente da relação N:P empregada (8:1, 16:1 ou 24:1). Enquanto que o aumento da densidade e o rendimento celular são basicamente favorecidos por temperatura a 20°C, salinidade 20 e relação N:P 16:1.

Já no cultivo à 30°C (T3), não houve crescimento celular satisfatório, tão pouco incremento de clorofila. Isto evidencia que o cultivo de *Skeletonema* sp., acima de 25°C provoca um efeito deletério nas células, causando a morte da população.

Este comportamento, por exemplo, não ocorre para a espécie *Skeletonema costatum*, a qual é adaptada a alta intensidade luminosa, apresenta temperatura ótima de 27 °C, sendo considerada uma microalga eurihalina, ou seja, aceita grande variação de salinidade (Kaplan *et al.* 1986).

Segundo Fogg & Thake (1987), a maioria das microalgas cultivadas desenvolve-se entre 10 e 35°C, com crescimento ótimo entre 20 e 25°C. Baixa temperatura geralmente não mata as microalgas, mas reduz a taxa de crescimento e divisão celular. Já em temperaturas acima de 27°C, muitas microalgas apresentam queda na taxa de fotossíntese, perda no seu valor nutricional, podendo ocorrer elevada mortalidade devido ao comprometimento do metabolismo celular (Laing 1991).

No cultivo de microalgas, um dos principais objetivos é a maximização da eficiência fotossintética. Segundo Uribe (1989), a temperatura tem seu principal efeito sobre os processos enzimáticos na célula. A fotossíntese e outros processos vitais são regulados por enzimas e, apesar da taxa de fotossíntese aumentar com a temperatura, um aumento acima do valor ideal de temperatura para cada espécie pode causar denaturação protéica, prejudicando a ação das enzimas. Assim, não só a fotossíntese, mas os demais processos vitais que dependem da atividade enzimática, podem cessar ou serem reduzidos.

Portanto, infere-se que *Skeletonema* sp. deverá ser cultivada em condições de temperatura média (20°C a 25°C), com maior produção na primavera, outono e início do inverno. Além disso, cresce melhor em salinidade média, e que, portanto, deverá ser cultivada em ambientes com salinidade em torno de 20, independente da concentração de nutrientes.

5.1.3 *Nannochloropsis oculata*

Para *N. oculata*, os parâmetros que mais influenciaram no incremento de clorofila *a* também foram temperatura e salinidade, com os maiores valores obtidos em condições de 20°C (T1), salinidade 20 (S2), independente da relação N:P ou em condição de 25°C (T2), salinidade 20 (S2) ou 30 (S3) e relação N:P 8:1 e 16:1. Já os menores valores de clorofila foram encontrados em condição de 30°C (T3), salinidade 10 (S1), independente da relação N:P.

Desta forma pode-se dizer que a alta temperatura é limitante ao incremento de clorofila *a* ao longo do tempo, apesar dos testes estatísticos terem mostrado não haver diferença significativa entre todos os tratamentos. E que sob temperatura média (20°C e 25°C) e salinidade média a alta (20 a 30) esta espécie tem um bom poder de incremento de clorofila *a*.

Segundo Sukenik *et al.* (1989), o metabolismo de pigmentos, particularmente de clorofila, é muito dinâmico em *Nannochloropsis*. Existem evidências de que as rápidas mudanças no conteúdo dos pigmentos (eventualmente outros componentes) podem ser uma resposta adaptativa das células em função das mudanças de aspectos físicos do cultivo.

Para densidade celular, aparentemente não ocorre uma influência clara dos parâmetros aplicados. Isto é, os maiores valores de densidade celular encontram-se em condição de 20°C (T1), salinidade 20 ou 30 (S2 ou S3) e relação N:P 16:1 (N2), mostrando uma interação mais forte entre temperatura e nutrientes. Por outro lado, o cultivo também resultou em valores altos de densidade em 30°C (T3), quando em salinidade 20 (S2) e relação N:P 8:1 ou 16:1, evidenciando neste caso, que o crescimento celular é regido pela interação entre temperatura e salinidade.

De maneira geral pode-se dizer que para *N. oculata* não foi possível identificar quais dos parâmetros analisados são mais importantes para o seu crescimento. Isto

indica que esta microalga é extremamente flexível adaptando-se a várias situações ambientais tendo, por isso, grande potencial para sua produção. Assim, *N. oculata* tem o potencial de ser cultivada ao longo de todo o ano, em uma ampla gama de temperatura, salinidade e nutrientes.

5.2 Crescimento celular

O comportamento das espécies estudadas em função das curvas de crescimento celular apresentou um padrão similar ao estabelecido para cultivos de fitoplâncton do tipo “batelada”.

Segundo Fogg & Thake (1987), as fases de crescimento são: 1) Fase LAG, ou de indução. Fase inicial na qual não há aumento celular aparente; 2) Fase LOG, ou Logarítmica. Observada após a fase LAG, na qual a divisão celular é rápida e onde há um aumento acentuado no número de células; 3) Fase Estacionária, posterior a fase LOG. Onde o crescimento atinge um equilíbrio e 4) Declínio, ou Senescência, subsequente a fase Estacionária, onde ocorre a morte da maioria das células devido a algum fator limitante.

Neste estudo, nenhuma das microalgas testadas apresentou uma fase LAG, mesmo quando os dados foram convertidos em gráficos com escala logarítmica. Isto se deveu provavelmente ao fato de as espécies já estarem adaptadas às condições de cultivo a que foram submetidas, especialmente no que se refere ao fotoperíodo e intensidade luminosa. Outro fator que influencia diretamente no tempo da fase LAG é o tamanho inicial do inóculo, onde uma densidade inicial alta reduz ou até mesmo extingue o tempo da fase de adaptação das células, como ocorrido neste trabalho.

Entretanto, verifica-se que as espécies de microalgas estudadas apresentaram tempos de duração diferentes em algumas das fases, além de tempos de cultivo diferentes. Isto é, enquanto que, para *T. weissflogii* e *N. oculata*, o período experimental para a construção da curva de crescimento foi de 21 dias, para *Skeletonema* sp., o período foi de 14 dias.

Além disso, nem todos os tratamentos dentre as 3 espécies estudadas atingiram as fases estacionária e de declínio durante o período de cultivo. Possivelmente os fatores empregados de temperatura, salinidade, e relação N:P e mesmo a disponibilidade de

nutrientes afetaram o crescimento destas algas de maneira diferente, conforme discutido anteriormente para cada espécie.

Contudo, as respostas das espécies submetidas aos diferentes fatores aplicados podem ser avaliadas também através dos parâmetros da taxa de crescimento exponencial e tempo de duplicação da população (TD), os quais avaliam o comportamento da espécie de forma direta, assim como a densidade celular.

Considerando-se as 3 (três) espécies testadas, e comparando os valores máximos obtidos de cada microalga, *T. weissflogii* apresentou o menor rendimento e densidade celular, enquanto que *N. oculata* atingiu os maiores valores. Isto está provavelmente relacionado ao fato de que *N. oculata*, por apresentar células menores, apresenta uma maior superfície celular em relação ao seu volume, o que influencia positivamente a fotossíntese. A maior razão área/volume da célula permite uma maior absorção de luz e entrada de nutrientes, acelerando o processo de divisão e crescimento (Andrews 1991).

O mesmo comportamento ocorre quando a taxa de crescimento exponencial é comparada entre as 3 espécies, na qual novamente *T. weissflogii* apresenta a menor taxa de crescimento (0,29/dia), enquanto que as demais espécies alcançaram o mesmo valor para este parâmetro (0,84/dia). Isto evidencia que *T. weissflogii* tem um poder de crescimento inferior se comparada a *Skeletonema* sp. e *N. oculata*. Da mesma forma, o tempo de duplicação da população (TD) também demonstra que *T. weissflogii* cresce de maneira mais lenta (2,36 dias), comparado à *Skeletonema* sp. (0,82 dia) e *N. oculata* (0,82 dia).

Nestes casos, parece ter havido uma relação inversa entre o tamanho das células e a máxima abundância alcançada, isto é, *N. oculata*, que foi a menor espécie estudada (2 – 3 μm) atingiu a maior densidade celular, enquanto que *T. weissflogii*, com diâmetro de 12 – 14 μm , apresentou o menor crescimento no mesmo tempo de cultivo (21 dias). Sabe-se que em condições ótimas de cultivo o crescimento celular do fitoplâncton é inversamente proporcional ao tamanho das células (Morris 1980).

Por outro lado, quando o conteúdo de clorofila *a* por célula é comparado, *T. weissflogii* apresenta a maior relação ($8,75 \pm 1,76$ pg Cla/cel), enquanto que *Skeletonema* sp., ($2,64 \pm 0,04$ pg Cla/cel) e *N. oculata* ($0,53 \pm 0,49$ pg Cla/cel) apresentaram relações menores. No entanto, esta menor relação clorofila *a* por célula em *N. oculata* é compensada pela alta densidade celular obtida, resultando num

conteúdo de clorofila total 2,3 e 1,75 vezes superior ao encontrado para *T. weissflogii* e para *Skeletonema* sp., respectivamente.

Considerando-se os resultados de crescimento celular obtidos, pode-se dizer que *T. weissflogii*, foi a espécie de menor rendimento e crescimento celular. Apesar de ter apresentado boa relação Cla/cel e ter crescido em todas as temperaturas, apresentou algumas restrições quando analisada em relação à taxa de crescimento exponencial e ao tempo de duplicação ao longo do período testado, o que indica não ser uma espécie com grande potencial de crescimento num curto espaço de tempo.

Por outro lado, *T. weissflogii* é bastante utilizada em aquicultura, principalmente como alimento em larviculturas de camarões peneídeos, apresentando bons resultados na qualidade nutricional assim como as demais espécies aqui testadas (Brown 2002). Como esta espécie cresceu em todas as temperaturas testadas, com maior êxito em 25°C e 30°C, o seu cultivo em larga escala poderá ocorrer em estações do ano cujas temperaturas são mais elevadas e nas quais ocorra maior radiação solar, ou seja, nas estações de primavera e verão.

Nannochloropsis oculata, foi a espécie que atingiu maior crescimento celular e rendimento em menos tempo sendo, por isso, indicada para estudos posteriores de cultivos em larga escala. Além disso, não parece ter grandes restrições quanto à variabilidade de temperatura, salinidade e nutrientes. Esta espécie é amplamente utilizada em aquicultura, principalmente como alimento para o zooplâncton que é fornecido a peixes e crustáceos cultivados. Apresenta uma boa qualidade nutricional (Rocha *et al.* 2003), como fonte de importantes ácidos graxos polinsaturados (Brown 2002) e de pigmentos (Lubián *et al.* 2000). Sua produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (Tonon *et al.* 2002) indica a potencialidade desta alga para a produção de produtos para consumo humano de interesse nutricional e terapêutico, uma vez que estes estão associados com uma menor incidência de problemas do coração (Metting & Pyne 1986). Mostra também, uma adaptação à sombra, o que indica o seu cultivo em estações do ano em que há menor radiação solar e temperaturas amenas, já que a temperatura ótima para esta espécie é 20°C (Borges 2005), bem como uma temperatura de 25°C encontrada neste trabalho.

Por último, pode-se dizer que a espécie nova *Skeletonema* sp., isolada na região costeira do Rio Grande do Sul (Bergesch, em preparação), também possui grande

potencial de crescimento quando analisada sob o ponto de vista de taxa de crescimento exponencial e tempo de duplicação, apesar de não atingir os mesmos valores em densidade celular como *N. oculata*. No entanto, esta apresenta limitações de crescimento em alta temperatura (30°C), o que dificulta sua produção em larga escala no verão, mas que poderia ser cultivada em larga escala em estações do ano mais amenas, como primavera, outono e talvez inverno. Desta forma, sugerem-se estudos futuros aplicando temperaturas inferiores à testada neste trabalho a fim de identificar a faixa de tolerância para o seu crescimento, já que a temperatura superior já foi identificada.

6. Conclusões

Apesar dos métodos que usam densidade óptica e fluorimetria para estimativa da concentração de clorofila serem muito mais práticos e de fácil manuseio e aplicação, este trabalho mostra que a contagem direta das células é um método relativamente mais preciso, devendo sempre ser empregado em estudos de crescimento celular.

Confirma-se a importância de considerar melhor a leitura de clorofila “*in vivo*” e a contagem da densidade celular para estimar o comportamento das espécies a serem estudadas, já que a grande variação dos tratamentos neste trabalho se deve às diferenças observadas entre os dois métodos (clorofila e densidade).

As espécies *N. oculata*, *T. fluviatilis*, *Skeletonema* sp., responderam de forma diferente à influência dos parâmetros aplicados.

T. weissflogii cresceu em todas as temperaturas testadas, com melhor crescimento entre 25°C e 30°C, com boa relação Cla/cel. Porém, apresentou o menor rendimento e crescimento celular, e um tempo de duplicação alto quando comparada às demais espécies. Seu potencial de cultivo em larga escala é restrito em função da baixa densidade alcançada e que deverá ocorrer na primavera e no verão.

N. oculata, atingiu maior crescimento celular e rendimento no menor tempo, sendo indicada para estudos de cultivos em larga escala. Além disso, esta espécie não apresentou grande restrição quanto à variabilidade de temperatura, salinidade e nutrientes, podendo ser cultivada ao longo de todo o ano, em uma ampla faixa de temperatura, salinidade e nutrientes.

Skeletonema sp., também possui grande potencial de crescimento por apresentar uma alta taxa de crescimento e tempo de duplicação baixo, apesar de não atingir os mesmos valores em densidade celular como *N. oculata*. Por outro lado, quanto a versatilidade de cultivo, *Skeletonema* sp., perde em potencial uma vez que não cresce em alta temperatura (30°C), permitindo sua produção em larga escala apenas na primavera, outono e início do inverno.

7. Perspectivas futuras

É necessário testar estas espécies em cultivos de média e larga escala para averiguar seu comportamento frente as diferentes condições aplicadas neste trabalho, em ambiente aberto.

Avaliar a composição bioquímica de *T. weissflogii* e *N. oculata*, frente às diferentes condições físico-químicas aplicadas neste trabalho em cultivo de larga escala.

Avaliar *Skeletonema* sp., do ponto de vista quali-quantitativo para que possa ser utilizada como fonte de alimentação em larviculturas de organismos aquáticos, e para uma possível fonte de matéria-prima para produção de biodiesel ou de outros produtos com interesse econômico. E identificar a faixa de tolerância para o crescimento desta espécie aplicando temperatura inferior à 20°C.

8. Referências Bibliográficas

- ANDREWS, JH. 1991. Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms. Springer-Verlag. 302p.
- ALFONSO, E & S LEAL. 1995. Tópicos básicos para a criação e manutenção de um cepário de microalgas. São Paulo: UNESP, 17p.
- AMJAD, S & DA JONES. 1994. Role of microalgae in conditioning water in penaeid larval culture. *Pakistan Journal of Marine Sciences*, 3(1): 41-51.
- BARBIERI, C Jr. & A OSTRENYK. 2001. Camarões Marinhos, reprodução, maturação e larvicultura. Vol. 1. Aprenda Fácil Editora. Viçosa, MG. 243p.
- BARBOSA, MJ, J HOOGAKKER & RH WIJFFELS. 2003. Optimisation of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomolecular Engineering* 20: 115-123.
- BÉRARD-TERRIAULT, L, M POULIN & L BOSSÉ. 1999. Guide d'Identification du Phytoplancton Marin de l'Estuaire et du Golfe du Saint-Laurent. Ottawa, Conseil National de recherches du Canada. 387p.
- BORGES, LV. 2005. Caracterização do potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL). Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Rio Grande. 59p.
- BOROWITZKA, MA & LJ BOROWITZKA. 1988. Microalgal Biotechnology. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, U. K. pp. 197-221.
- BOROWITZKA, MA. 1997. Microalgae for aquaculture: oportunities and constrains. *J. appl. Phycol.* 9: 393-401.
- BROWN, LM & KG ZEILER. 1993. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Convers. Mgmt. Vol. 34, n° 9-11: 1005-1013.*
- BROWN, MR, SW JEFREY, JK VOLKMAN & GA DUNSTAN. 1997. Nutricional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- BROWN, MR. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: CRUZ-SUÁRES, LE, D RICQUE-MARIE, M TAPIA-SALAZAR, MG GASCIOLA-CORTÉS & N SIMOES (Eds.) Avances in nutrición acuícola. VI

- Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. Cancun, Quintana Roo, México.
- BRULAND, KW. 1983. Trace elements in sea-water. In: RILEY, JP & R CHESTER (Eds) Chemical Oceanography. Academic Press, London, UK. Vol. 8: 157-220.
- CHINI ZITTELLI G, F LAVISTA, A BASTIANINI, L RODOLFI, M VINCENZINI, MR TREDICI. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotechnol* 70: 299-312.
- CHRÉTIENNOT-DINET, MJ, A SOURNIA, M RICARD & C BILLARD. 1993. A classification of the marine phytoplankton of the world from class to genus. *Phycologia*: 32(3), 159 – 179.
- CHU WL, SM PHANG & SH GOH. 1996. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *J. Appl. Phycol.* 8: 389-396.
- COUTTEAU, P & P SORGELOOS. 1992. The requirement for live algae and their replacement by artificial diets in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey. *J.Shellfish Res.*, 11(2): 467-476.
- CULLEN, JJ. 1982. The deep chlorophyll maximum: comparing vertical profiles of chlorophyll *a*. *Can. J. Fish. Aquatic. Seit.*, 39: 791-803.
- DE PAUW, N & G PERSOONE. 1988. Micro-algae for aquaculture. In: BOROWITZKA, MA & LJ BOROWITZKA (Eds), Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 197-221.
- DUERR, EO, A MOLNAR & V SATO. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.* 7: 65-70.
- EKER-DEVELI E, AE KIDEYS & S TUGRUL. 2006. Effect of nutrients on culture dynamic of marine phytoplankton. *Aquat. Sci.*, 68: 28-39.
- FOGG, GE & B THAKE. 1987. Algae cultures ans phytoplankton ecology. 3^oed. Londres, The University of Wisconsin Press. 269p
- FULKS, W & KL MAIN. 1991. Rotifer and microalgae culture systems. Proceeding of a US-Asia Workshop. Honolulu, Hawaii: The Oceanic Institute, p.1-364.
- GOMES, LAO. 1986. O cultivo de crustáceos e moluscos. Ed. Nobel.Brasil, 226p., 1986.

- GUILLARD, RRL & JH RYTHER. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. L. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- GUILLARD, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum, New York, pp. 29-60.
- HIBBERD, DJ. 1990. In: MARGULIS L, JO CORLISS, M MELKONIAN & DJ CHAPMAN (Eds). Handbook of Protoctista. Boston: Jones and Bartlett Publishers, pp. 326-333.
- HOFF, FH & TW SNELL. 1987. Plankton Culture Manual. Published by Florida Aqua Farms, Inc. Florida, 126 p.
- HORNER, R. 2002. A Taxonomic Guide to Some Common Marine Phytoplankton. England, Biopress Ltd. 195p.
- KAPLAN, D, Z COHEN & A ABELIOVICH. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* (9), 37-48.
- KAWAMURA, T, RD ROBERTS & CM NICHOLSON. 1988. Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*. *Aquaculture*, 160: 81-88.
- KRAWIEC, RW. 1982. Autoecology and clonal variability of marine centric diatom *Thalassiosira rotula* (Bacillariophyceae) in response to light, temperature and salinity. *Mar. Biol.*, 69, 79-89.
- KURANO, N, H IKEMOTO, H MIYASHITA, T HASEGAWA, H HATA & S MIYACHI. 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt. Vol. 36, n° 6-9: 689-692.*
- LAING, I. 1991. Cultivation of marine unicellular algae. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of fisheries research. Laboratory leaflet, n°67. Lowestoft, UK. 31p.
- LAVENS, P & P SORGELOOS. 1996. Manual on the production and use of live food for aquacultures. FAO Fisheries Technical Paper. N° 361. Rome, FAO. 295p.
- LEFEBVRE S, JL MOUGET, P LORET, P ROSA & G TREMBLIN. 2007. Comparison between fluorimetry and oximetry techniques to measure

- photosynthesis in the diatom *Skeletonema costatum* cultivated under simulated seasonal conditions. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 86: 131-139.
- LOURENÇO, SO, UML MARQUEZ, JFº MANCINI, E BARBARINO & E AIDAR. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture* 148: 153-168.
- LUBIÁN, LM, O MONTERO, I MORENO-GARRIDO, IE HUERTAS, C SOBRINO, M GONZÁLEZ-del VALLE & G PARES. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. Appl. Phycol.* 12: 249-255.
- LUBZENS E, O GIBSON, O ZMORA & A SUKENIK. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133: 295-310.
- METTING, B & JW PYNE. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.8: 386 – 394.
- MORRIS, I. 1980. The physiological ecology of phytoplankton. California. U.S.A. University of California Press. 625p.
- MULLER-FEUGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. appl. Phycol.* 12: 527 – 534.
- ODEBRECHT, C & PC ABREU. 1998. Microalgas. In SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (Eds.) Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, Ecoscientia. 36 – 40.
- ODEBRECHT, C & VMT GARCIA. 1998. Fitoplâncton. In SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (Eds.) Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, Ecoscientia. 117 – 122.
- OLAIZOLA, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20: 459-466.
- PALMER, FE, KA BALLARD & FBA TAUB. 1975. Continuous culture apparatus for the mass production of algae. *Aquaculture*, 6:319-331.
- POPOVICH, CA & M GAYOSO. 1999. Effect of irradiance and temperature on growth rate of *Thalassiosira curviseriata* Takano (Bacillariophyceae), a bloom diatom

- in Bahía Blanca estuary (Argentina). *Journal of Plankton Research*, 21(6): 1104-1110.
- RADCHENKO, IG & LV IL'YASH. 2006. Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *Plant Physiology* 33(3):242-247.
- REITAN, KI, JRG Rainuzzo & Y OLSEN. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155: 207-221.
- RICHMOND, A. 1986. Cell response to environmental factors. In: RICHMOND, A (Ed). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton, pp. 69-99.
- ROCHA, JMS, JEC GARCIA & MHF HENRIQUES. 2003. Growth aspects of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20: 237-242.
- SCHLEGEL, HG. 1986. General microbiology. U.S.A. Cambridge University Press. 655p.
- SHAW, WN. 1979. The use of phytoplankton for aquaculture needs - a status report. -: 19-24.
- SOSIK HM, SW CHISHOLM & RJ OLSON. 1989. Chlorophyll fluorescence from single cells: Interpretation of flow cytometric signals. *Limnol. Oceanogr.*, 34(8): 1749-1761.
- STEIN, JR. 1984. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. 2^a. ed. cambridge Univ. Press. 448p.
- STRICKLAND, JDH & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board Canada*, Ottawa. 310 pp.
- SUKENIK, A, Y CARMELI & T BERNER. 1989. Regulation of fatty-acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25(4): 686-692.
- SUKENIK A. 1999. In: COHEN Z, (Ed). Chemicals from Microalgae. London: Taylor & Francis, pp. 41-56.
- TOMAS, CR. 1996. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. California. U.S.A Academis Press, INC. 598p.

- TONON T, D HARVEY, TR LARSON & IA GRAHAM. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61(1):15 – 24.
- TURNER DESIGNS. 1995. Fluorometric facts: Chlorophyll and pheophytin. Bulletin 101. 19p.
- TZOVENIS, L, N DE PAUW & P SORGELLOOS. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-ISO). *Aquaculture Int.* 5: 489-507.
- URIBE, E. 1989. Cultivo de microalgas. In: Curso Internacional sobre Cultivo de Microalgas, 2, Coquimbo: Universidad Católica del Norte, 1989, p. 39-84.
- VALENZUELA-ESPINOZA, E, R MILLÁN-NUÑEZ & F NÚÑEZ-CEBRERO. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering* 25: 207-216.
- VAN DEN HOEK, C, DG MANN & HM JAHNS. 1995. Algae: An Introduction to Phycology. New York, Cambridge University Press. 627p.
- WELSCHMEYER, NA. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and phaeopigments. *Limnol. and Ocean.* 39 (8): 1985-1992.
- WHYTE, JNC, N BOURNE & CA HODGSON. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*, 78: 333-347.
- WIKFORS, GH & M OHNO. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol.* 37: 968-974.
- WONNACOTT, TH & RJ WONNACOTT. 1980. Introdução à estatística. Ed. Livros Técnicos e Científicos. Rio de Janeiro. 589p.
- YOUNG, EB & J BEARDALL. 2003a. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J. Phycol.* 39: 897-905.
- YOUNG, EB & J BEARDALL. 2003b. Rapid ammonium- and nitrate-induced perturbations to Chl *a* fluorescence in nitrogen-stressed *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 39: 332-342.

- ZHU, CJ, YK LEE & TM CHAO. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.* 9: 451-457.
- ZHUKOVA, NV & NA AIZDAICHER. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39 (2): 351-356.

9. Anexos

Anexo 1 – Composição e modo de preparo do Meio Guillard f/2, segundo Guillard (1975):

Para cada litro:

- Água do mar filtrada.....1 litro
- NaNO₃.....1 ml
- NaH₂PO₄ . H₂O.....1 ml
- Na₂SiO₃ . 9H₂O.....1 ml
- Metais traços.....1 ml
- Vitaminas.....0,5 ml (depois de autoclavado e frio)
- Tris.....1 ml

Soluções estoque:

- NaNO₃ = 15g em 200ml de água destilada.
- NaH₂PO₄ . H₂O = 1g em 200ml de água destilada.
- Na₂SiO₃ . 9H₂O = 15g em 500ml de água destilada.

Metais traços:

Solução primária:

- CuSO₄ . 5H₂O.....980mg em 100ml de água destilada.
- ZnSO₄ . 7H₂O.....2,2g em 100ml de água destilada.
- CoCl₂ . 6H₂O.....1g em 100ml de água destilada.
- MnCl₂ . 4H₂O.....18g em 100ml de água destilada.
- Na₂MoO₄ . 2H₂O.....630 mg em 100ml de água destilada.

Solução secundária:

- Dissolver 4,36g de Na₂EDTA e 3,15g de FeCl₃ . 6H₂O em 900ml de água destilada. Adicionar 1ml de cada solução primária de metal traço e completar 1 litro.

Vitaminas:

Solução primária:

- Biotina.....10 mg em 10ml de água destilada.
- B₁₂..... 10 mg em 10ml de água destilada.

Solução secundária:

- adicionar 1ml de solução primária de biotina e 1ml da de B₁₂ em 900ml de água destilada. Adicionar 200mg de Tiamina HCl e completar 1 litro. Colocar em recipientes de 10ml e congelar. Estocar em freezer e descongelar somente na hora de usar.

- Tris.....50g.

Adicionar 20-30ml de HCl para dissolver o tris em pH 7,1 - 7,3 completar ate 200ml de água destilada..