

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.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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 ( $\text{pg Cl}a/\text{cel}$ ). 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 (Chl*a*/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 Chl*a*/cell relationship ( $4,73 \pm 1,99 \text{ pg Chl}a/\text{cell}$ ). 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>. Segundo a mesma autora, estas microalgas, potencialmente, poderão vir a ser empregadas em cultivo de larga escala para captura de CO<sub>2</sub> 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 *Coccolithophyceae*, 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 peralvar 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).

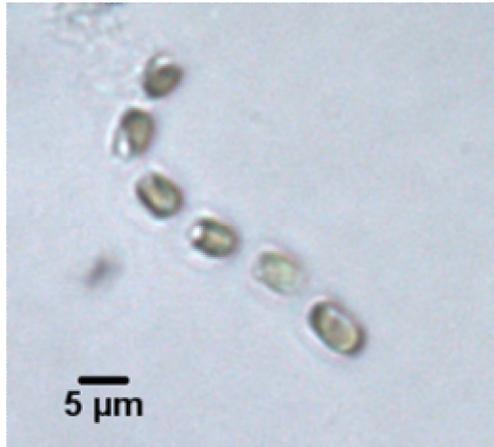


**Figura 1** - *Thalassiosira weissflogii*, observada ao microscópio ótico, com aumento de 400x.

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  $\mu\text{m}$  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).

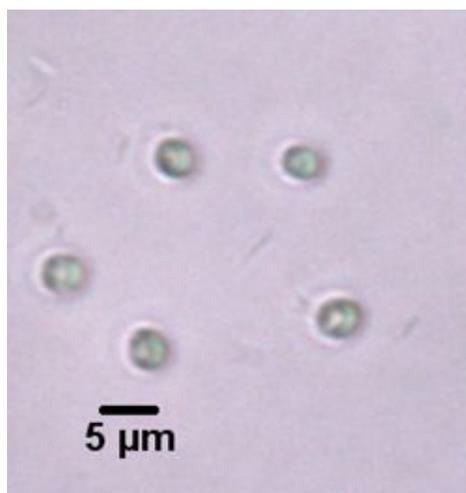
A espécie *Skeletonema costatum* (Greville 1866) Cleve 1873 (Figura 2) é a mais empregada em aqüicultura (Borowitzka 1997; Duerr *et al.* 1998; Wikfors & Ohno 2001; Brown 2002). Esta espécie tem boa qualidade nutricional (Borowitzka 1997; Brown 2002), apresenta propriedade antibacteriana (Metting & Pyne 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 aquícultura 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 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  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  $\mu\text{m}$  (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 3x3x3, 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

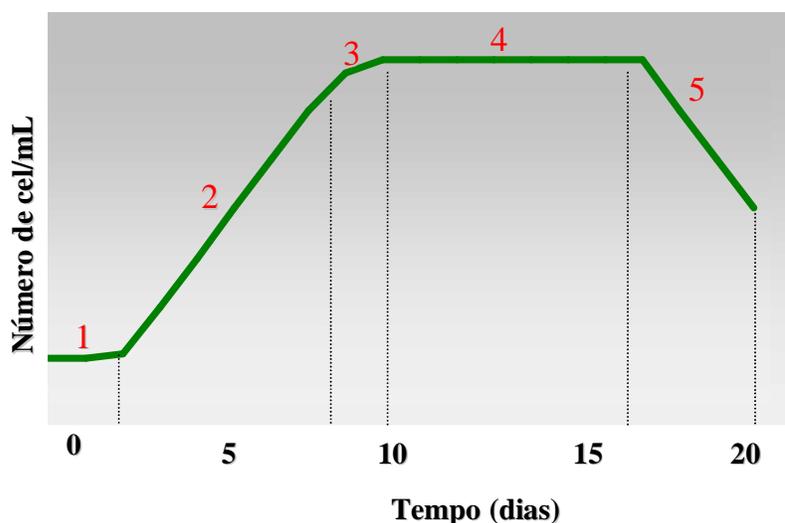
Assim os tratamentos para cada espécie foram:

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 ( $n^{\circ}$  cel $\times 10^4$ /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 ( $\mu$ ):

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

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  $\mu$  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.

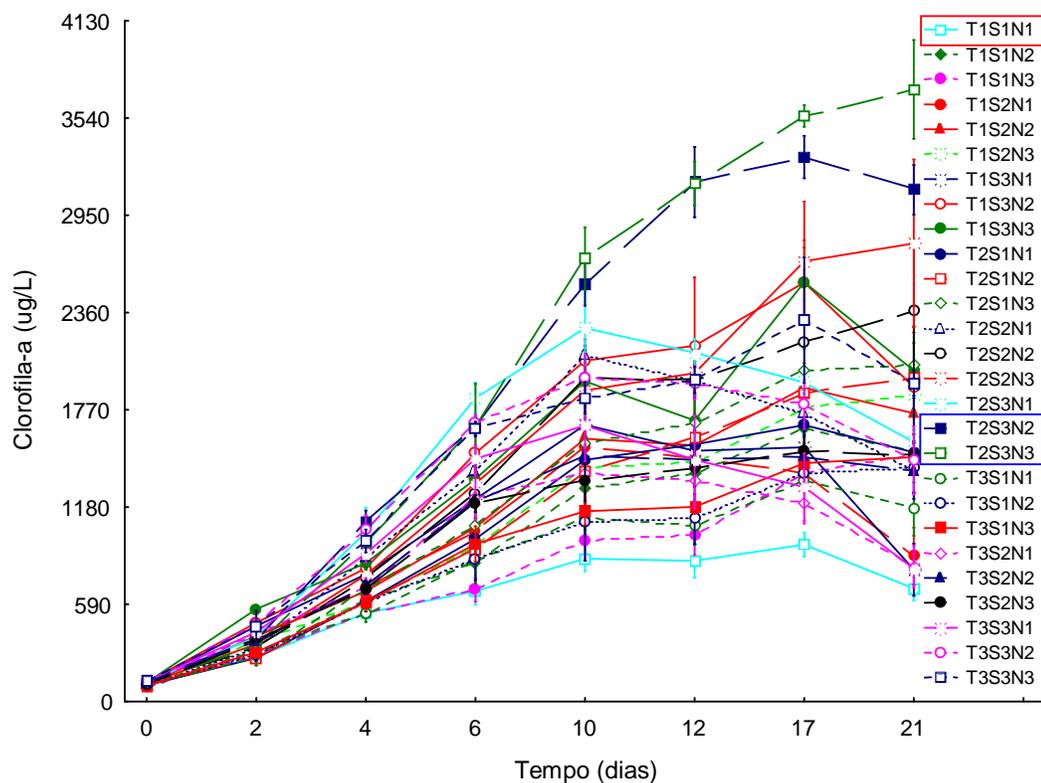
Para verificar se ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos, foi realizado um teste de significância, o qual apresentou valores de  $F = 1,544$  e  $p = 0,009$ , evidenciando que houve interação entre os fatores temperatura (T), salinidade (S) e relação N:P (N), aplicados no experimento.

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

Continuação Tabela 2.

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

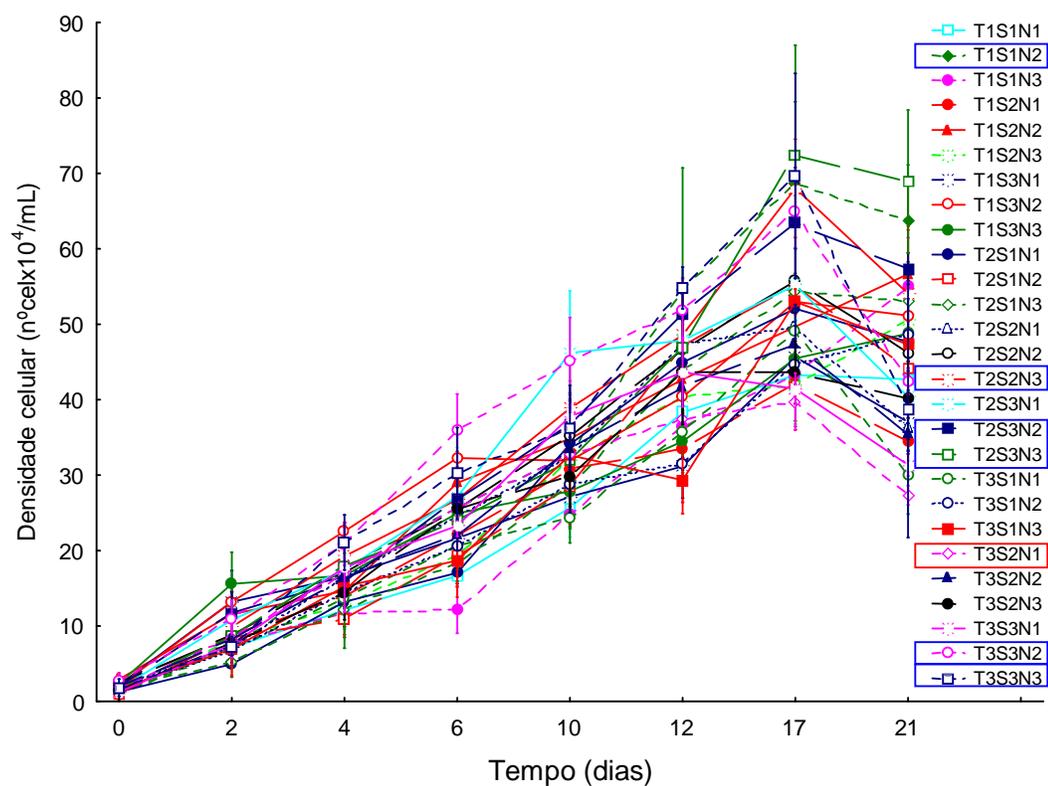
Verifica-se na Figura 11 a formação de dois agrupamentos de tratamentos distintos: os tratamentos T1S1N2, T2S2N3, T2S3N2, T2S3N3, T3S3N2, T3S3N3 formaram um grupo com os maiores valores de densidade celular, enquanto que os demais tratamentos formaram outro agrupamento distinto.

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	<b>0,001167</b>	<b>0,010805</b>	0,132455	0,471578	<b>0,001801</b>	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	<b>0,001167</b>	0,992391	0,998815		1,000000	0,995373	0,840121	1,000000	0,140192	<b>0,019900</b>	0,384619	0,916022	0,976356	<b>0,044378</b>	0,359150	0,528569	0,096648	0,389423
6	T1S2N3	0,954803	<b>0,010805</b>	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	<b>0,001801</b>	0,997778	0,999771	1,000000	1,000000	0,998784	0,905740		0,194210	<b>0,030371</b>	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	<b>0,019900</b>	0,136854	0,666188	0,968624	<b>0,030371</b>	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	<b>0,044378</b>	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	<b>0,019285</b>	0,985402	<b>0,000895</b>	<b>0,000525</b>	<b>0,000203</b>	<b>0,000218</b>	<b>0,000757</b>	<b>0,005419</b>	<b>0,000204</b>	0,147274	0,560519	<b>0,041127</b>	<b>0,003147</b>	<b>0,001463</b>	0,367018	<b>0,045931</b>	<b>0,022663</b>	0,207281	<b>0,040291</b>
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	<b>0,019285</b>	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	<b>0,000895</b>	1,000000	0,932526
1,000000	0,999430	1,000000	1,000000	0,999927	<b>0,000525</b>	1,000000	0,846889
0,892040	0,425988	0,908057	0,906772	0,541178	<b>0,000203</b>	0,926877	0,067931
0,999154	0,889882	0,999457	0,999436	0,945573	<b>0,000218</b>	0,999710	0,339943
1,000000	0,999909	1,000000	1,000000	0,999993	<b>0,000757</b>	1,000000	0,911611
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,005419</b>	1,000000	0,998970
0,942025	0,527963	0,952451	0,951630	0,645868	<b>0,000204</b>	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	<b>0,041127</b>	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,003147</b>	1,000000	0,994875
1,000000	0,999998	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,001463</b>	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	<b>0,045931</b>	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,022663</b>	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	<b>0,040291</b>	1,000000	1,000000
	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,003829</b>	1,000000	0,996990
1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,034511</b>	1,000000	1,000000
1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	<b>0,003369</b>	1,000000	0,995727
1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	<b>0,003406</b>	1,000000	0,995847
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		<b>0,021530</b>	1,000000	0,999999
<b>0,003829</b>	<b>0,034511</b>	<b>0,003369</b>	<b>0,003406</b>	<b>0,021530</b>		<b>0,002846</b>	0,274377
1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	<b>0,002846</b>		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  $\mu$  (taxa de crescimento exponencial) e Td (tempo de duplicação).

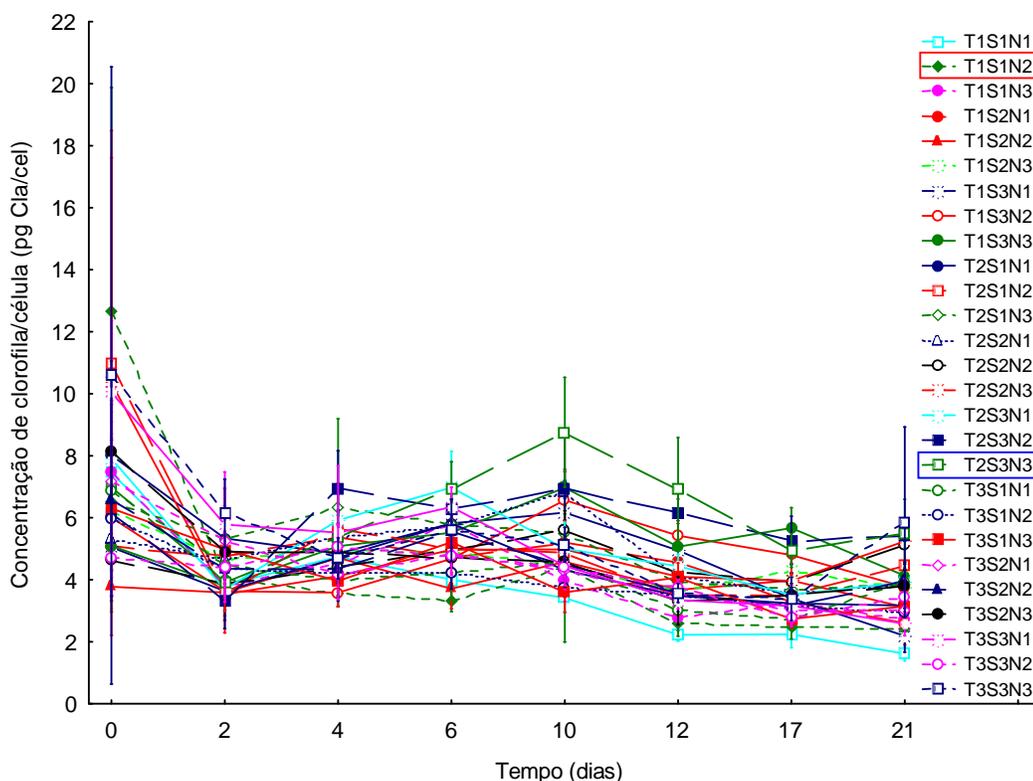
<b>Tratamento</b>	<b>Rendimento (<math>\times 10^4</math> cel/mL <math>\pm</math> DP)</b>	<b>(<math>\mu \pm</math> DP)</b>	<b>Td <math>\pm</math> DP (dias)</b>
<b>T1S1N1</b>	41,80 $\pm$ 6,66	0,20 $\pm$ 0,02	3,46 $\pm$ 0,40
<b>T1S1N2</b>	67,65 $\pm$ 18,82	0,25 $\pm$ 0,05	2,81 $\pm$ 0,71
<b>T1S1N3</b>	53,71 $\pm$ 6,25	0,17 $\pm$ 0,00	3,86 $\pm$ 0,17
<b>T1S2N1</b>	39,96 $\pm$ 1,38	0,17 $\pm$ 0,01	3,98 $\pm$ 0,33
<b>T1S2N2</b>	53,71 $\pm$ 6,18	0,14 $\pm$ 0,01	4,90 $\pm$ 0,45
<b>T1S2N3</b>	48,58 $\pm$ 6,83	0,15 $\pm$ 0,02	4,44 $\pm$ 0,62
<b>T1S3N1</b>	43,45 $\pm$ 3,96	0,17 $\pm$ 0,00	3,89 $\pm$ 0,10
<b>T1S3N2</b>	50,96 $\pm$ 3,02	0,19 $\pm$ 0,00	3,59 $\pm$ 0,12
<b>T1S3N3</b>	46,38 $\pm$ 7,50	0,14 $\pm$ 0,01	4,80 $\pm$ 0,53
<b>T2S1N1</b>	50,78 $\pm$ 4,16	0,21 $\pm$ 0,01	3,18 $\pm$ 0,25
<b>T2S1N2</b>	53,90 $\pm$ 10,0	0,23 $\pm$ 0,03	2,99 $\pm$ 0,42
<b>T2S1N3</b>	52,61 $\pm$ 2,22	0,20 $\pm$ 0,01	3,35 $\pm$ 0,30
<b>T2S2N1</b>	47,66 $\pm$ 3,73	0,18 $\pm$ 0,00	3,67 $\pm$ 0,09
<b>T2S2N2</b>	53,16 $\pm$ 5,11	0,18 $\pm$ 0,02	3,82 $\pm$ 0,50
<b>T2S2N3</b>	66,0 $\pm$ 8,57	0,22 $\pm$ 0,06	3,24 $\pm$ 1,10
<b>T2S3N1</b>	53,53 $\pm$ 4,16	0,20 $\pm$ 0,01	3,33 $\pm$ 0,25
<b>T2S3N2</b>	61,41 $\pm$ 7,62	0,20 $\pm$ 0,01	3,42 $\pm$ 0,26
<b>T2S3N3</b>	70,76 $\pm$ 7,07	0,22 $\pm$ 0,00	3,12 $\pm$ 0,08
<b>T3S1N1</b>	47,66 $\pm$ 0,63	0,20 $\pm$ 0,01	3,34 $\pm$ 0,21
<b>T3S1N2</b>	42,71 $\pm$ 5,61	0,19 $\pm$ 0,02	3,69 $\pm$ 0,51
<b>T3S1N3</b>	51,33 $\pm$ 1,38	0,20 $\pm$ 0,01	3,37 $\pm$ 0,31
<b>T3S2N1</b>	38,13 $\pm$ 3,90	0,18 $\pm$ 0,02	3,69 $\pm$ 0,44
<b>T3S2N2</b>	45,28 $\pm$ 4,57	0,18 $\pm$ 0,02	3,69 $\pm$ 0,41
<b>T3S2N3</b>	42,16 $\pm$ 4,67	0,20 $\pm$ 0,02	3,46 $\pm$ 0,52
<b>T3S3N1</b>	42,35 $\pm$ 4,88	0,29 $\pm$ 0,02	2,36 $\pm$ 0,24
<b>T3S3N2</b>	62,33 $\pm$ 4,99	0,18 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,39
<b>T3S3N3</b>	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 ( $74,01 \pm 65,45 \mu\text{g/L}$ ).

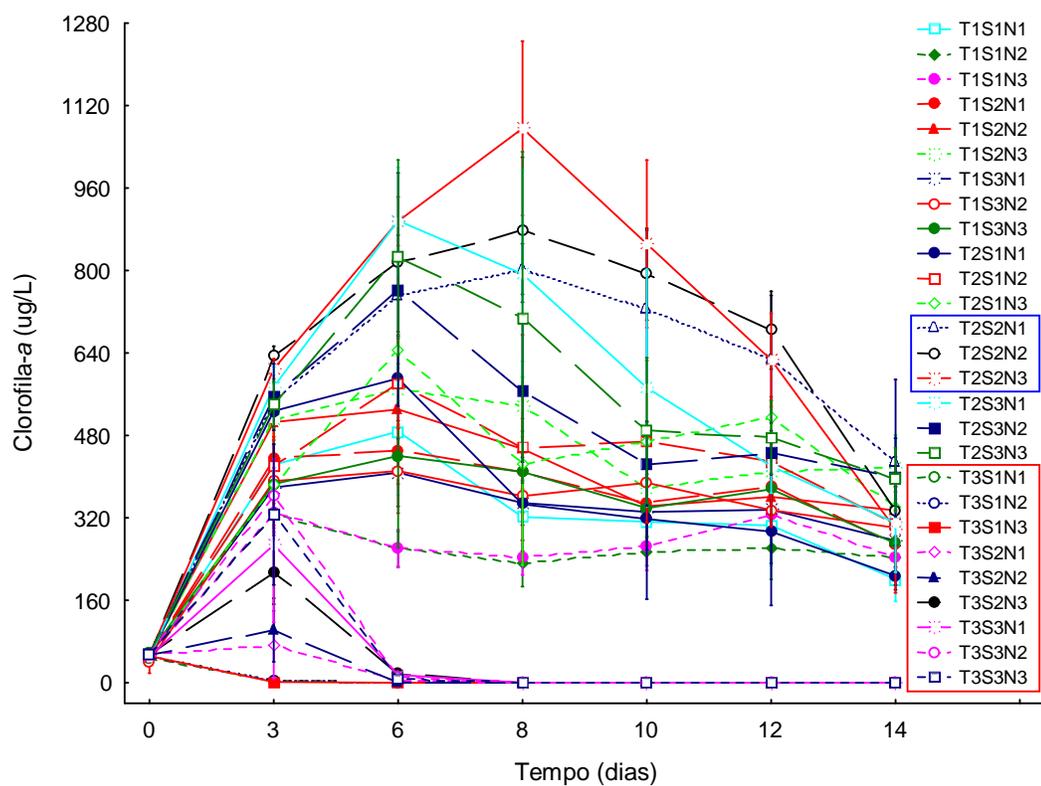
Os tratamentos T3S1N1, T3S1N2 e T3S1N3 não exibiram um incremento celular em momento algum do experimento, com morte celular já a partir da inoculação da cultura, ou seja, a partir do tempo 0 (zero).

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)