

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO DA
CIANOBACTÉRIA *Aphanothece stagnina***

JULIANA FABRÍCIO TISCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Dr. João Sarkis Yunes

RIO GRANDE

Agosto, 2014.

*Aos meus pais, ao Ricardo e a
minha família de quatro patas.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Solange e Gilberto, por todo o amor, dedicação e compreensão frente a todas as dificuldades impostas pela vida acadêmica. Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e nas minhas escolhas.

Ao Ricardo, por todo o carinho, paciência, companheirismo e ajuda, seja na vida pessoal, seja na vida acadêmica. Sobre as “ajudas acadêmicas” cabe ressaltar todas as vezes (e foram quase todas), que me fez companhia, me ajudando nos procedimentos laboratoriais, assim como, nas valorosas ajudas estatísticas e na correção final da dissertação.

À Universidade Federal do Rio Grande, ao Instituto de Oceanografia e ao Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas, pelo espaço de trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Oceanografia Biológica. À secretária do PPGOB, Vera Regina Oliveira Santos, por todo o carinho e auxílio nas dúvidas recorrentes.

Ao meu orientador João Sarkis Yunes, por todo o auxílio, acolhimento e discussões durante o decorrer do mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas, pelas conversas, conselhos e por todos os “mates” em boa companhia. Além disso, agradeço pela disponibilidade e atenção do Edi e do Felipe por também corrigirem minha dissertação.

À professora Vera Werner (Fundação Zoobotânica de Porto Alegre), pela identificação taxonômica da espécie e por todo o material bibliográfico fornecido.

Ao Jiri Komárek (University of South Bohemia- República Tcheca) pela atenção e auxílio em relação as minhas dúvidas quanto às diferenças ecológicas da minha espécie.

Ao professor Guilherme Lanzi Sasaki (UFPR) pela análise dos solutos osmóticos, pela dedicação e por todo o auxílio às dúvidas recorrentes.

Aos colegas de graduação, que mesmo perto ou longe, fizeram parte dessa nova jornada, em especial: Karine, Vanessa, Luciana, Matias e Roberto.

À Banca Examinadora: Prof.^a Dr.^a Virgínia Maria Tavano (IO-FURG), Prof.^o Dr.^o Paul Gerhard Kinas (IO-FURG) e Prof.^o Dr.^o Paulo Sergio Salomon (UFRJ), pelas valiosas contribuições.

Ao CNPq pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Cianobactérias	11
1.2 Fatores limitantes ao crescimento de cianobactérias	13
1.2.1 Salinidade	14
1.2.1.1 Solutos orgânicos	15
1.2.1.1.1 Sacarose e trealose	16
1.2.1.1.2 Glicosilglicerol	17
1.2.1.1.3 Glicina Betaína	18
1.2.2 Temperatura	19
1.2.3 Razão N:P (Nitrogênio: Fósforo)	20
1.3. Cianobactéria <i>Aphanothece stagnina</i>	22
1.4 Justificativa e Hipóteses	24
1.5 Objetivo geral	26
1.5.1 Objetivos específicos:	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Isolamento, purificação e identificação	27
2.2 Efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento de <i>Aphanothece stagnina</i>	28
2.4 Solutos osmóticos orgânicos	30
2.3 Métodos analíticos de crescimento.....	31
2.5 Análises gráficas e estatísticas.....	33
3. RESULTADOS	35
3.1 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C	35
3.2 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C	37
3.3 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C	40
3.4 Crescimento celular nas diferentes razões N:P	43
3.5 Taxa de crescimento, taxa de divisões por dia e tempo de duplicação ..	45

3.6 Solutos osmóticos orgânicos: sacarose, trealose, glicosilglicerol e glicina-betaína.....	49
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE I (Classificação para os organismos referentes às concentrações de salinidade).....	86
APÊNDICE II (Tabela com os meios de cultivo utilizados em todos os experimentos).....	88
APÊNDICE III (Imagens das florações e dos experimentos com <i>Aphanothece stagnina</i>).....	90
APÊNDICE IV (Tabelas do experimento a temperatura 12°C).....	93
APÊNDICE V (Tabelas do experimento a temperatura 20°C).....	96
APÊNDICE VI (Tabelas do experimento a temperatura 28°C).....	99
APÊNDICE VII (Tabelas do experimento em diferentes razões N:P).....	102

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Estrutura molecular da sacarose (A) e estrutura molecular da trehalose (B).....	17
Fig. 2: Estrutura molecular do α -glicosilglicerol.....	18
Fig. 3: Estrutura molecular da glicina betaína.....	19
Fig. 4: Curva esquemática do crescimento sigmoidal.....	33
Fig. 5: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C.....	35
Fig. 6: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C.....	36
Fig. 7: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes salinidades a 12°C.....	36
Fig. 8: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C.....	38
Fig. 9: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C.....	38
Fig. 10: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes salinidades a 20°C.....	39
Fig. 11: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C.....	40
Fig. 12: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C.....	41
Fig.13: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes salinidades a 28°C.....	41
Fig. 14: Crescimento celular nas diferentes razões N:P.....	43
Fig. 15: Crescimento celular nas diferentes razões N:P.....	44
Fig.16: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes razões N:P.....	44
Fig. 17: Taxa de crescimento (A), taxa de divisões por dia (B) e tempo de duplicação (C) nas diferentes salinidades e temperaturas.....	47
Fig. 18: Taxa de crescimento (A); taxa de divisões por dia (B) tempo de duplicação (C) nas diferentes razões N:P.....	48
Fig. 19: Espectros de ^1H -RMN em resposta ao estresse osmótico. Trealose (Tre), sacarose (Suc), glicosilglicerol (GG) e glicina betaína (GB).....	49

Fig. 20: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 0.....	50
Fig. 21: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 25.....	50
Fig. 22: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 55.....	51

RESUMO

As florações da cianobactéria *Aphanothece stagnina*, ocasionam um excessivo acúmulo celular nas margens do estuário da Lagoa dos Patos. Sendo assim, esse trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da salinidade, temperatura e razão N:P sobre o crescimento de *A. stagnina*. Para isso, foram coletadas amostras dessa cianobactéria e isoladas em meio BG11 modificado. Um Planejamento Fatorial Multiníveis foi utilizado para testar as salinidades (0, 8, 16, 24 e 32) e temperaturas (12°C, 20°C e 28°C), resultando em 15 combinações. Para o experimento da razão N: P (5:1, 20:1, 40:1, 100:1), o meio BG11 modificado foi novamente alterado para satisfazer as razões testadas. Foi observado crescimento celular desde a salinidade 0 até 32, sendo que com o aumento da salinidade houve um decréscimo no crescimento. Além dessas salinidades, foi observado crescimento até a salinidade 55. Foram analisados os solutos osmóticos acumulados nas salinidades 0, 25 e 55 e verificou-se que em menores salinidades há o acúmulo de sacarose e em altas salinidades de glicosilglicerol. Com a elevação da temperatura, foi verificado um aumento no crescimento celular e ao comparar os efeitos da salinidade e temperatura, pôde-se verificar que a temperatura influenciou mais o crescimento celular. Adicionalmente, se observou que, conforme houve um aumento da razão N:P, o crescimento celular decresceu, indicando que *A. stagnina* está mais adaptada a viver em ambientes com baixas concentrações de nitrogênio. O tratamento que mais influenciou negativamente o crescimento foi o de temperatura 12°C e salinidade de 32 e o tratamento que mais influenciou positivamente foi o de temperatura 28°C e salinidade 0. Ao comparar os três parâmetros pode-se afirmar que a temperatura exerce maior influência sobre o crescimento de *A. stagnina*. Além disso, constatou-se que a *A. stagnina* possui alta plasticidade quanto aos parâmetros analisados, o que pode proporcionar uma vantagem ecológica.

Palavras-chave: *Aphanothece stagnina*, salinidade, temperatura, razão N:P

ABSTRACT

The blooms of cyanobacteria *Aphanothece stagnina* cause an extensive cell accumulation in the edges of the Patos Lagoon estuary. Thus, this study aimed to evaluate the effect of salinity, temperature and N:P ratio on the growth of *A. stagnina*. For this, samples of cyanobacteria were collected and isolated in modified BG11 medium. A Factorial Planning for testing was applied to salinities (0, 8, 16, 24 and 32) and temperatures (12°C, 20°C and 28°C), resulting in 15 combinations. For the N:P ratio experiment (5:1, 20:1, 40:1, 100:1), the BG11 medium was again changed to meet the ratios tested. Cell growth was observed from the salinities 0 to 32, and with the increase in salinity, there was a reduction in growth. In addition to these salinities, growth was observed up to the salinity 55. Osmotic solutes accumulated under the salinities 0, 25 and 55 were analyzed and it was found that at lower salinities there was an accumulation of sucrose, and at high salinities of glicosilglicerol. With the rise in temperature, it was verified an increase in the cell growth and by comparing to salinity and temperature, it was demonstrated that temperature influenced more the cell growth. It was also observed that with increasing N:P ratio, the cell growth decreased, indicating that *A. stagnina* is more adapted to live in environments with low nitrogen concentrations. The treatment that most negatively influenced growth was in the 12°C temperature and salinity 32 and the treatment that most positively influenced the growth was 28°C temperature and salinity 0. Comparing the three parameters may be stated that the temperature has more influence on the growth of *A. stagnina*. Furthermore, it was found that *A. stagnina* has high plasticity regarding the parameters analyzed, which may provide an ecological advantage.

Keywords: *Aphanothece stagnina*, salinity, temperature, N:P ratio.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são microorganismos procariotos e fotossintetizantes, pertencentes à classe das bactérias gram negativas, com morfologia e ecologia bem diversificada, estando presentes em praticamente todos os ambientes (Madigan et al. 2010). Por serem organismos fotossintetizantes, as cianobactérias possuem pigmentos responsáveis pela absorção de luz e transformação em energia química em seus dois centros de reação (PSI e PSII) (Chakdar & Pabbi 2012).

Todas as cianobactérias sintetizam a clorofila a e geralmente utilizam a água como doador de elétrons durante a fotossíntese, liberando o oxigênio (Whitton & Potts 2012). Evidências moleculares e químicas sugerem que as cianobactérias sejam os primeiros organismos produtores de oxigênio, o que resultou na transformação da atmosfera terrestre anóxica para óxica (Berman-Frank et al. 2003, Madigan et al. 2010). Além disso, outra importante contribuição das cianobactérias aos processos evolutivos está relacionada à teoria da endossimbiose. Segundo essa teoria, os cloroplastos dos organismos fotossintetizantes atuais seriam oriundos dos processos de fagocitose de cianobactérias por outros organismos primitivos (McFadden 2001, Raven & Allen 2003).

Em relação aos pigmentos fotossintetizantes, além da clorofila-a, as cianobactérias possuem como pigmentos acessórios as ficobiliproteínas. As

ficobiliproteínas podem ser classificadas conforme sua coloração e picos de absorção em: ficoeretrina ($\lambda = 540 - 570 \text{ nm}$), ficocianina ($\lambda = 610 - 620 \text{ nm}$) e aloficocianina ($\lambda = 650 - 655 \text{ nm}$) (Viskari & Colyer 2003). Com a presença desses pigmentos acessórios, as cianobactérias são aptas a absorver a energia luminosa de forma mais eficiente, ampliando seu espectro de absorção (Mur et al. 1999). Não obstante, mesmo em ambientes sem energia luminosa, algumas cianobactérias podem ser encontradas. Isto é possível devido ao mecanismo de respiração, onde elas geram energia através dos estoques de carboidratos endógenos (Stal & Moezelaar 1997, Queiroz et al. 2007).

Com essas vantagens adaptativas, as cianobactérias podem ocupar ambientes com baixa luminosidade ou períodos sem iluminação, sendo um fator importante na ocupação e competição pelos ambientes. Além disso, algumas cianobactérias possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, através da enzima nitrogenase (Berman-Frank et al. 2003). Em síntese, quando os compostos nitrogenados estão em baixas concentrações, as cianobactérias utilizam esse mecanismo bioquímico em estruturas específicas (heterocitos) e, com isso, conseguem explorar uma variedade de ambientes (Stal 2012).

Diversas são as características que conferem vantagens adaptativas às cianobactérias, o que as possibilitam habitar diferentes ambientes e em grandes concentrações. Em termos quantitativos, as cianobactérias podem ser consideradas os organismos mais importantes do planeta, com uma estimativa de biomassa global de milhões de toneladas de peso úmido (Garcia-Pichel et al. 2003). Não obstante, em determinadas condições, a biomassa pode

aumentar substancialmente, dominando o ambiente e formando densos aglomerados. Esses eventos são denominados florações nocivas de cianobactérias (“*Harmful cyanobacterial blooms*”) e podem representar potenciais riscos à saúde humana e sustentabilidade do ecossistema. O termo floração nociva é utilizado para configurar todos os impactos negativos ao ecossistema, seja pela depleção do oxigênio na coluna d’água, pela produção de toxinas ou por impactos físicos, tal como danos às brânquias dos peixes (James et al. 2010). Nas últimas décadas, diversas evidências mundiais alertam para o aumento dessas incidências de florações, seja em termos temporais ou espaciais (Hallegraeff 1993, Chorus & Bartram 1999, Carmichael 2001, Anderson 2005, Hudnell et al. 2008, O’Neil et al. 2012). No entanto, definir os fatores responsáveis pelo desenvolvimento e proliferação dessas florações é algo complexo, já que esses eventos são oriundos da interação entre os processos físicos, químicos e ecológicos (Perovich et al. 2008).

1.2 Fatores limitantes ao crescimento de cianobactérias

Dentre os fatores limitantes mais relevantes ao crescimento das cianobactérias, estão os macro e micronutrientes, o pH, a matéria orgânica dissolvida, a salinidade, a temperatura, a luminosidade, a turbulência, a camada de mistura, o tempo de residência da água e a interação com microorganismos, competidores e consumidores. Além dos fatores químicos, físicos e ecológicos, ainda há os fatores antropogênicos, como a eutrofização artificial, a dispersão de espécies e as mudanças climáticas (Paerl et al. 2001).

Entretanto, apesar da dificuldade de estabelecer o fator responsável pelo evento de floração, sabe-se que os fatores salinidade, temperatura e nutrientes de um ambiente são extremamente determinantes para estes eventos (Paerl & Fulton 2006, O'Neil et al. 2012).

1.2.1 Salinidade

A salinidade é um importante fator limitante que determina a distribuição dos diversos organismos, seja no ambiente marinho ou estuarino, em marismas ou em áreas costeiras (Senthilkumar & Jeyachandran 2006). As cianobactérias podem ser encontradas em ambientes dulcícolas, estuarinos, marinhos e, ainda assim, algumas são encontradas em ambientes com salinidade superior a dos oceanos (Oren 2012).

Devido à variedade dos ambientes onde as cianobactérias são encontradas, diferentes classificações são utilizadas. Os termos que serão adotados para caracterizar o crescimento de *Aphanothece stagnina* são oriundos das classificações propostas por Golubic (1980) e por Oren (2012). Estas classificações dividem as cianobactérias em esteno e eurialina; em oligo, meso e polihalina; em halofílica e halotolerante, dentre outros termos (Apêndice I).

Os estudos iniciais em cianobactérias halofílicas sugeriam altas concentrações intracelulares de sal nesses organismos (Miller et al. 1976, Yopp et al. 1978). Entretanto, atualmente, sabe-se que tal afirmação é um equívoco, já que o aumento na concentração intracelular de sal é prejudicial aos

processos bioquímicos e fisiológicos (Oren 2012). O estresse salino em cianobactérias pode estimular mudanças no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, assim como, no conteúdo dos lipídios, dos carboidratos e de outros metabólitos. Além disso, pode alterar a atividade dos fotossistemas, dos antioxidantes e das enzimas nitrogenase e fosfatase, assim como, aumentar o consumo de oxigênio (Lu & Vonshak 2002, Mosainder et al. 2002, Fu & Bell 2003, Senthilkumar & Jeyachandran 2006, Abed et al. 2007, Zhang et al. 2013).

De uma forma geral, as cianobactérias são consideradas organismos halotolerantes, já que possuem mecanismos intracelulares específicos que ajustam o estresse osmótico (Apse & Blumwald 2002). Esse ajuste osmótico é obtido através do acúmulo intracelular de pequenas quantidades de moléculas orgânicas, os solutos osmóticos orgânicos (Melo 2008).

1.2.1.1 Solutos orgânicos

As cianobactérias podem acumular e concentrar transitoriamente solutos orgânicos para alcançar o equilíbrio osmótico, estabilizando ou mantendo a pressão de turgor (Hagemann 2011). Estes solutos osmóticos são compostos de baixo peso molecular e altamente hidrofílicos, podendo ser acumulados em concentrações elevadas, sem interferir no metabolismo celular (Brown 1976). A proteção celular ao estresse osmótico ocorre através do aumento dessas moléculas dissolvidas, que elevará a pressão interna e forçará a reentrada de água na célula, restaurando o turgor e volume celular (Erdmann & Hagemann 2001).

As cianobactérias podem ser divididas em três grupos, conforme o soluto osmótico acumulado e a tolerância ao estresse salino. O primeiro grupo inclui as cianobactérias de água doce, que acumulam sacarose e/ou trealose, enquanto que, o segundo grupo inclui as espécies marinhas, que acumulam o glicosilglicerol. Por fim, o terceiro grupo inclui as cianobactérias halofílicas, que acumulam glicina betaína (Mackay et al. 1984, Reed et al. 1986). Entretanto, essa classificação pode variar de organismo para organismo e, além destes solutos, outros já foram encontrados em cianobactérias, tais como, o glutamato betaína, o DMSP (dimetilsulfoniopropionato), o TMAO (Trimetilamina-N-óxido), o glicosilglicerato, a prolina, dentre outros (Erdmann & Hagemann 2001, Goh et al. 2010).

1.2.1.1.1 Sacarose e trealose

A sacarose (Figura 1A) e a trealose (Figura 1B) são dissacarídeos conhecidos como solutos osmóticos de plantas, fungos e bactérias (Hagemann 2011). Geralmente, cianobactérias de água doce, com baixa halotolerância, acumulam sacarose e/ ou trealose como seu principal soluto osmótico. Estes solutos se diferenciam dos demais, devido à interação direta com macromoléculas (Klähn & Hagemann 2011).

A sacarose, em todos os organismos fotossintéticos, é a base do metabolismo do carbono. A participação da sacarose no metabolismo primário celular, talvez seja a principal razão da baixa resistência à salinidade (Klähn & Hagemann 2011). Além disso, em cianobactérias diazotróficas, a sacarose é

doadas para os heterocitos, onde serve como esqueleto de carbono para a síntese dos aminoácidos (Erdmann & Hagemann 2001).

A resistência da trealose, quando comparada à sacarose, é considerada levemente inferior. Entretanto, uma vantagem potencial da trealose é que este soluto não é um metabólito intermediário chave, tal como a sacarose. Além disso, ele é mais estável do que os outros dissacarídeos não redutores, incluindo a sacarose (Crowe et al. 1992).

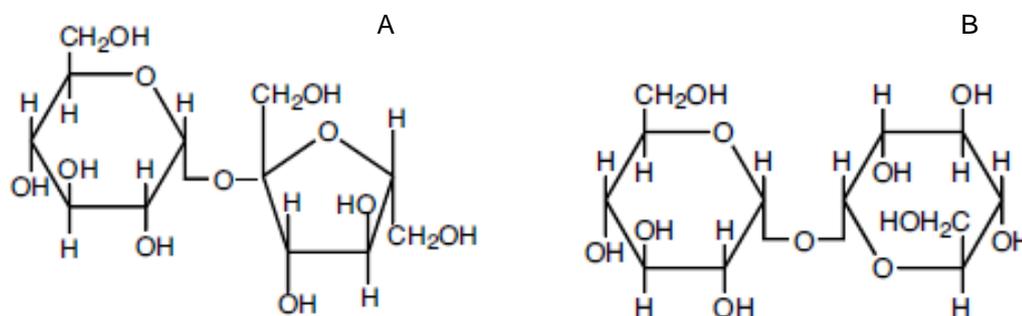


Figura 1: Estrutura molecular da sacarose (A) e estrutura molecular da trealose (B).

1.2.1.1.2 Glicosilglicerol

O glicosilglicerol (Figura 2) é um soluto osmótico presente principalmente em cianobactérias de ambientes marinhos, mas também pode ser encontrado em cianobactérias de ambientes dulcícolas (Mackay et al. 1983, Reed et al. 1984). O acúmulo do soluto glicosilglicerol confere às células uma resistência significativamente maior à salinidade do que em células que acumulam sacarose e ou trealose. Estima-se que as cianobactérias, que contenham o glicosilglicerol como principal soluto, sejam capazes de suportar salinidades até duas vezes maiores do que a concentração da água do mar (Hagemann 2011).

Cianobactérias que acumulam glicosilglicerol, como soluto osmótico dominante, são definidas como espécies moderadamente halotolerantes (Reed et al. 1986, Hagemann et al. 1999).

Em síntese, a produção do glicosilglicerol ocorre somente quando há o aumento de NaCl. O nível estacionário do estresse se estabelece horas após o choque salino devido ao acúmulo do soluto (Reed & Stewart 1985, Reed et al. 1985, Warr et al. 1985). Ao ocorrer o choque hiposmótico, o glicosilglicerol intracelular é liberado rapidamente, enquanto que, a concentração deste soluto no meio circundante se eleva (Reed et al. 1986, Fulda et al. 1990).

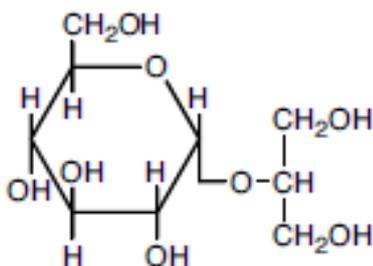


Figura 2: Estrutura molecular do α -glicosilglicerol.

1.2.1.1.3 Glicina Betaína

A glicina betaína (Figura 3) é um composto anfótero, solúvel em água, mas que inclui uma unidade de hidrocarboneto, que consiste em três grupos metil (Carillo et al. 2011). As cianobactérias que acumulam a glicina betaína são comuns em ambientes hipersalinos. Para uma maior proteção ao estresse salino, algumas cianobactérias acumulam além da glicina betaína outros solutos osmóticos como sacarose, a trealose e/ou o glicosilglicerol (Sakamoto

& Muraka 2002). Além das cianobactérias, este soluto também é descrito para bactérias heterotróficas e plantas halotolerantes (Hagemann 2011).

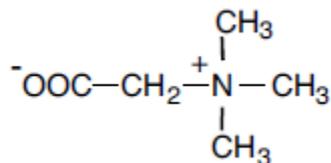


Figura 3: Estrutura molecular da glicina betaína.

1.2.2 Temperatura

A temperatura dos ambientes onde se encontram as comunidades fitoplanctônicas é altamente variável (Lande & Lewis 1989). Em uma escala global, as comunidades fitoplanctônicas são expostas a temperaturas que variam desde -1,8°C até 30°C, sendo que uma única célula pode ser exposta a uma grande variedade de temperaturas em um único dia (Moisan et al. 2002).

Segundo Ratkowsky et al. (1983), há uma temperatura ótima de crescimento para cada organismo, onde abaixo ou acima dessa temperatura a taxa de crescimento diminui. A temperatura parece estar diretamente relacionada com a taxa de crescimento, a taxa de respiração, as taxas metabólicas, a capacidade fotossintética e a composição bioquímica das células (Roberts & Zohary 1987, Renaud et al. 2002, Mackey et al. 2013). Entretanto, sabe-se que a função entre a taxa de crescimento e a temperatura varia de acordo com as diferentes espécies e com os diferentes clone ou cepas (Suzuki & Takahashi 1995).

As cianobactérias são conhecidas por terem sua temperatura ótima maior do que outros grupos de fitoplâncton (Reynolds & Walsby 1975, Paerl & Huisman 2009). Em elevadas temperaturas, as cianobactérias competem mais efetivamente com outros produtores primários, como diatomáceas, clorófitas, criptófitas e dinoflagelados (Elliott et al. 2006, Domis et al. 2007, Jöhnk et al. 2008). Em síntese, a taxa de crescimento desses organismos eucarióticos declina, enquanto que, a taxa de crescimento das cianobactérias alcança seu ótimo (Coles & Jones 2000).

A temperatura é um importante fator na formação das florações. Entretanto, segundo Chu et al. (2007), além de influenciar na formação das florações, a temperatura também é responsável por regular a composição das espécies de cianobactérias. Em florações de cianobactérias, a temperatura da água ainda pode aumentar localmente, através da intensa absorção de luz por seus pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores (Paerl & Huisman 2009). Esse aumento de temperatura local representa um importante mecanismo de “*feedback*” positivo, já que com isso haverá o favorecimento competitivo para as cianobactérias sobre os outros organismos fitoplanctônicos eucarióticos (Hense 2007).

1.2.3 Razão N:P (Nitrogênio: Fósforo)

Desde o início das investigações ecológicas fitoplanctônicas, sabe-se que a disponibilidade dos nutrientes no ambiente aquático pode desempenhar um importante fator estruturante das comunidades (Tilman et al. 1982). No

ambiente aquático, um dos mais importantes princípios da bioquímica dos macroelementos foi estabelecido em 1958, sendo conhecido como a razão de Redfield de C:N:P (carbono: nitrogênio: fósforo, 106:16:1). Este conceito se refere à relação entre a composição dos organismos e a química da água, devido à síntese ou decomposição de matéria orgânica e sua remineralização (Redfield 1958). Entretanto, sabe-se que essa razão de Redfield de 106:16:1 (C:N:P) pode apresentar variações nos diferentes organismos (Falkowski 2000). Pelo menos quatro mecanismos conhecidos podem explicar a variabilidade das razões C:N:P nas comunidades fitoplanctônicas, sendo eles: a composição taxonômica, a estequiometria do ambiente, a estequiometria do interior da célula e a quantidade de material de plâncton morto ou detritos do ambiente (Martiny et al. 2003).

Dentre os macroelementos, a concentração do nitrogênio e do fósforo é frequentemente limitante à produção primária nos ecossistemas aquáticos (Hall et al. 2005). Em ambientes com altas concentrações de P e baixas razões N:P, as cianobactérias muitas vezes tornam-se o grupo dominante (Schindler 1977). Essa dominância das cianobactérias tem sido associada a três fatores: a capacidade competitiva mais eficiente pelo nitrogênio do que outros organismos fitoplanctônicos (Nöges et al. 2008); a capacidade de alguns organismos de fixação do nitrogênio atmosférico (Huisman & Hulot 2005) e a capacidade de armazenamento do excesso de nitrogênio nas cianoficinas (Levine & Schindler 1999). Essas três características conferem às cianobactérias vantagens adaptativas em eventos de deficiência nas concentrações de nitrogênio.

Definir os fatores que influenciam o crescimento das cianobactérias é extremamente complexo, já que eles atuam sobre o crescimento de forma sinérgica.

1.3. Cianobactéria *Aphanothece stagnina* (Sprengel 1863) A. Braun

A espécie de cianobactéria *Aphanothece stagnina* pertence a ordem Chroococcales e a família Cyanobacteriaceae, sendo classificada nesta família após análises moleculares e filogenéticas (Hoffmann et al. 2005). Segundo Komárek e Anagnostidis (1999), o gênero *Aphanothece* é cosmopolita e se caracteriza por apresentar colônias multicelulares, que podem variar de micro à macroscópica, com células imersas em mucilagem, com forma esférica ou amorfa e coloração esverdeada, azul-esverdeada ou marrom. Além disso, as espécies do gênero *Aphanothece* (oriundas do estuário da Lagoa dos Patos) não são produtoras de cianotoxinas (Araújo 2005).

Dentre as espécies mais estudadas desse gênero, pode-se citar a *Aphanothece halophytica* e a *A. microscopica*, em especial por ambas possuírem aplicações biotecnológicas e serem de fácil cultivo (Sugino et al. 1999, Waditee et al. 2003, Zheng et al. 2006, Zepka et al. 2010, Queiroz et al. 2011, Jacob-Lopes & Fraco 2013). Entretanto, outras espécies desse gênero deveriam ser mais exploradas, principalmente quando apresentam características ecológicas relevantes, tal como as densas e recorrentes florações de *Aphanothece stagnina* no estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS).

As colônias da *A. stagnina* possuem mucilagem firme e espessa, sendo composta por células que estão dispostas desordenadamente. Estas células são ovais ou cilíndricas, com as extremidades arredondadas, com 3,8 – 9(11) x (2)3 – 5(6,8) μm , coloração verde azulada e sem aerótopos (Komárek & Anagnostidis 1999, Werner 2002, Martins et al. 2012). Embora *A. stagnina* seja frequentemente bentônica e forme talos macroscópicos, alguns trabalhos relatam a ocorrência de colônias microscópicas com hábito planctônico (Werner 2002). Geralmente, isto ocorre em corpos d'água eutrofizados, onde a *A. stagnina* pode aparecer livre (microscópica) e flutuante (planctônica) (Komárek & Anagnostidis 1999).

Na literatura, os trabalhos de levantamento dessa espécie são numerosos e com ampla distribuição global (Dasey et al. 2003, Bárbara et al. 2005, Lobo et al. 2009, Alfinito 2011, Martins et al. 2012, Halder & Sinha 2013, Tavera et al. 2013). Entretanto, são escassos os trabalhos de cultivo com *A. stagnina*. Entre os escassos trabalhos, podem ser citados Rohatgi e Singh (1979), Barnet et al. (1981), Rai (1990), Ghazala et al. (2010), Nguyen et al. (2012) e Singh et al. (2013). Apesar das informações oriundas desses trabalhos, ainda há uma lacuna sobre os principais fatores limitantes ao crescimento e os aspectos ecológicos e fisiológicos da espécie. O cultivo da cepa de *A. stagnina*, oriunda do estuário da Lagoa dos Patos, fornecerá importantes respostas quanto a essa escassez de informação.

1.4 Justificativa e Hipóteses

A ocorrência da espécie de cianobactéria *Aphanothece stagnina* foi descrita pela primeira vez no estuário da Lagoa dos Patos, na década de oitenta (Coutinho e Seeliger 1984). Entretanto, nas últimas duas décadas a magnitude destas florações têm se tornado uma problemática questão ambiental (De Lorenzo 1995, Araújo 2005, Lobo et al. 2009). Apesar da ampla ocorrência dessas florações no estuário da Lagoa dos Patos, as maiores densidades são encontradas em enseadas semifechadas e urbanizadas, com baixa variação de salinidade e alta concentração de nutrientes (De Lorenzo 1995, Araújo 2005). Essas florações apresentam uma parte do seu ciclo sob o hábito planctônico e outro sob o hábito bentônico, sendo que ambas as formas afetam o ecossistema através da diminuição de luminosidade e da depleção do oxigênio (Baumgarten 2010).

A partir de observações das variações ambientais sobre as florações da espécie da cianobactéria *A. stagnina*, no estuário da Lagoa dos Patos, sugere-se que os principais fatores limitantes ao seu crescimento são as variações de salinidade, de temperatura e de razão N:P. Sabe-se que esta espécie não é produtora de toxina nem diazotrófica, porém possui características favoráveis ao crescimento. Os resultados desse estudo fornecerão uma importante resposta quanto ao crescimento de *A. stagnina* e as variações desses fatores ambientais.

Além disso, os resultados fornecerão informações sobre ótimas condições de cultivo, visando o benefício máximo de sua utilização para futuros fins

biotecnológicos. Por fim, ressalta-se como justificativa que as informações disponíveis na literatura sobre a cianobactéria *A. stagnina* são escassas.

Neste estudo pretende-se averiguar a veracidade as seguintes hipóteses:

- *A. stagnina* deve apresentar uma alta plasticidade quanto às variações de salinidade, já que esse fator é extremamente dinâmico em ambientes estuarinos;
- *A. stagnina* deve apresentar melhores taxas de crescimento nas salinidades mais baixas, já que as densas florações são encontradas em ambientes com menor influência salina;
- Supõe-se que *A. stagnina* acumule sacarose, trealose e glicosilglicerol, como principais solutos osmóticos;
- *A. stagnina*, assim como outras cianobactérias, responde com maiores taxas de crescimento as temperaturas mais elevadas;
- As taxas de crescimento de *A. stagnina* devem estar relacionadas com as variações da razão N:P, já que as maiores e mais densas florações encontram-se nos locais com maior acúmulo de nutrientes, tal como o Saco da Mangueira (estuário da Lagoa dos Patos).

1.5 Objetivo geral

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar diferentes condições de cultivo sobre o crescimento da cianobactéria *Aphanothece stagnina*, isolada do estuário da Lagoa dos Patos.

1.5.1 Objetivos específicos:

- Isolar e purificar uma cepa de *A. stagnina*, oriunda do estuário da Lagoa dos Patos;
- Avaliar o efeito combinado das salinidades 0, 8, 16, 24 e 32 e das temperaturas 12°C, 20°C e 28°C sobre o crescimento da cianobactéria *A. stagnina*;
- Avaliar o efeito das razões nitrogênio e fósforo (N:P) 5:1, 20:1, 40:1 e 100:1 sobre o crescimento da cianobactéria *A. stagnina*;
- Avaliar a presença dos solutos osmóticos: sacarose, trealose, glicosilglicerol e glicina-betaína na cepa de *A. stagnina*, nas salinidades 0, 25 e 55, através de RMN (ressonância magnética nuclear);
- Avaliar os efeitos das condições de cultivo sobre o crescimento de *A. stagnina* em relação aos eventos de florações do estuário da Lagoa dos Patos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento, purificação e identificação

A coleta da cianobactéria *A. stagnina* foi realizada com o auxílio de uma rede de arrasto, em uma enseada semifechada do estuário da Lagoa dos Patos, o Saco da Mangueira (Rio Grande - RS). O isolamento foi realizado em laboratório com a técnica de micropipetagem e diluições seriadas (Lourenço 2006), sendo a pureza do cultivo acompanhada em microscopia ótica.

Para reduzir o crescimento de bactérias e fungos foi utilizada a técnica adaptada de Melo et al. (2011), onde apenas o crescimento fotoautotrófico é possível. O cultivo foi submetido ao meio BG11 (Rippka et al. 1979) modificado (Apêndice II) acrescido de azida sódica 5 mM, um inibidor da cadeia respiratória, e de fluoreto de sódio 50 mM, um inibidor da glicólise. Após cinco dias na presença dos inibidores, o cultivo foi centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm. O precipitado com as células foi ressuscitado em meio BG11 modificado (três vezes). Posteriormente, as células foram novamente ressuscitadas e inoculadas em meio BG11 modificado. Foi realizado o acompanhamento em microscopia ótica para verificar a normalidade das células por sete dias, o que foi confirmado. Entretanto, apesar da redução de contaminantes, o cultivo não foi considerado axênico.

A identificação da cepa isolada foi realizada pela especialista em taxonomia de cianobactérias, Vera Werner (Fundação Zoobotânica/RS), seguindo a classificação proposta por Hoffmann et al. (2005) e Komárek

(2006). As condições de cultivo em todos os experimentos foram do tipo batelada, em câmara incubadora com fotoperíodo controlado (12 h claro/ 12 h escuro) e intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para garantir uma melhor distribuição luminosa, em todos os experimentos foi realizada a rotação dos frascos Erlenmeyers. As variações de condição de cultivo foram quanto a temperatura, a salinidade e as modificações realizadas no meio BG-11, para satisfazer as razões N:P. No entanto, para a etapa de isolamento e purificação a temperatura foi mantida a 20°C , salinidade 0 ^(*) e meio BG11 modificado (BGN/3, N:P=16:1).

2.2 Efeito de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento de *Aphanothece stagnina*

Os experimentos sobre o efeito de diferentes condições de cultivo no crescimento da espécie *A. stagnina* foram divididos em três etapas. A primeira etapa consistiu na aclimação e no esgotamento do nitrogênio intracelular. A segunda etapa foi a realização dos experimentos com os fatores salinidade e temperatura combinados. Já a terceira etapa consistiu na realização dos experimentos com as diferentes razões N:P, com as melhores condições de cultivo estabelecidas nos experimentos anteriores (salinidade e temperatura).

A aclimação da salinidade foi realizada com aumento de três unidades de salinidade a cada três dias, totalizando 11 dias de aclimação. A aclimação da temperatura consistiu no aumento ou decréscimo de duas unidades de temperatura (2°C), a cada duas horas, tendo sempre como partida inicial um

¹ A salinidade identificada como 0 possui concentração de $0,25 \text{ g L}^{-1}$, devido as adições dos sais necessários ao meio. Entretanto, para fins didáticos será adotado ao longo da dissertação o termo salinidade 0 (zero).

cultivo estabelecido a 20°C. Para o experimento da razão N:P foi realizado o esgotamento das reservas intracelulares de nitrogênio (“*Starvation*”). Para isso, as células foram precipitadas por centrifugação por 10 minutos a 6000 rpm, sendo ressuspensas quatro vezes em meio sem nitrogênio (meio BG-11; Apêndice II). Posteriormente, as células foram novamente ressuspensas e inoculadas em meio sem nitrogênio (BG-11), sendo mantidas por sete dias (Piedras 2007).

Todos os experimentos tiveram duração de 25 dias e foram realizados em triplicatas. Em relação aos inóculos, todos foram coletados em fase exponencial e lidos em espectrofotômetro a 750 nm, o que forneceu o índice de turbidez. Para padronizar, todos os inóculos tiveram 1(uma) unidade de absorbância no índice de turbidez (1 OD) e proporção de 2 mL de inóculo em 200 mL de meio de cultivo (1:100).

Nos experimentos de salinidade e temperatura, foi utilizado o Planejamento Fatorial Multiníveis $3^2 \times 5^2$, em que a variável temperatura (X1) foi variada em três níveis (12°C, 20°C e 28°C) e a variável salinidade (X2) foi variada em cinco níveis (0, 8, 16, 24 e 32), totalizando 15 combinações. A partir da análise estatística dos resultados de temperatura e salinidade, foi possível determinar a melhor condição de cultivo. Após determinada, iniciou-se os experimentos de razão N:P com variação de 5:1, 20:1, 40:1 e 100:1. Todas as variações nos tratamentos em relação ao meio de cultivo e as salinidades podem ser visualizadas no Apêndice II. Imagens dos experimentos e das florações podem ser visualizadas no Apêndice III.

2.4 Solutos osmóticos orgânicos

Além das salinidades 0, 8, 16, 24 e 32, outro experimento foi realizado quanto às variações de salinidades. Neste segundo experimento, a salinidade variou entre 35 a 60, em intervalos de cinco. As condições de cultivo foram as mesmas do experimento de isolamento, porém com temperatura 28°C e variando quanto a salinidade. A avaliação foi apenas visual (+ com crescimento/ - sem crescimento), sendo observado crescimento desde 0 até 55 (Apêndice III). Para análise dos solutos osmóticos orgânicos foram utilizados os cultivos com as salinidades 0, 25 e 55. A metodologia de extração dos solutos foi adaptada de Reed et al. (1984) e Martins e Santos (1995). Os cultivos em fase exponencial foram centrifugados por 20 minutos a 6000 rpm. O precipitado foi ressuscitado em etanol 80% e fervido a 80°C, durante uma hora, com posterior liofilização. O resíduo seco foi ressuscitado com a mistura de água e clorofórmio (2:1), com nova liofilização. Essas amostras foram dissolvidas em D₂O (água deuterada) e estocadas por 24 horas para reação de equilíbrio de mutarrotação.

As análises de RMN foram realizadas em parceria com o Departamento de Bioquímica (Universidade Federal do Paraná- UFPR). Todos os espectros foram obtidos com um espectrômetro de RMN Bruker 400 MHz AVANCE III, equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm (Sonda de Banda Larga Inversa). A detecção ocorreu a temperatura 303 K contendo 116 nmol de

TMSP-d4 (2,2,3,3- tetradeuterium-3-trimetilsilil propionato de sódio) como padrão ($\delta = 0$).

A ressonância de ^1H foi realizada após a calibração do pulso de 90° (p1) até 360° , usando no início (p1) de $4 \mu\text{s}$ de incremento de $2 \mu\text{s}$ (p1 8,90-12,09 μs), o centro de irradiação foi entre 1881,63 - 1881,81 Hz, para obter a largura do espectro de 6009 Hz, usando 128 varreduras para acumulação do experimento, obtendo-se uma proporção entre o sinal e o ruído (S/R) de pelo menos 1000/1 (90° pulso, relaxação =10,0 s, tempo de aquisição =5,45259 s). A concentração dos solutos foi proporcional à razão entre a área do sinal analisado e o sinal do TMSP. A integração das áreas foi realizada sem rotação do tubo respeitando uma largura média a meia altura da base do TMSP de 0,8-1,0 Hz.

2.3 Métodos analíticos de crescimento

A estimativa da biomassa foi obtida a partir do teor de clorofila-a, pelo método adaptado de Mackinney (1941), e pela densidade celular em câmara de Neubauer.

A estimativa do teor de clorofila-a foi realizada a cada 24 horas, sendo a primeira amostra coletada 24 horas após o inóculo inicial (dia 1). As amostras do cultivo foram filtradas em filtros de fibra de vidro (GF-5) e a clorofila-a extraída com metanol absoluto, durante 12 horas. Todas as amostras foram preservadas quanto à luminosidade e temperatura (extração a frio). Ao final da extração, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6000 rpm, para

eliminar possíveis fibras. A leitura de absorvância de clorofila-a foi realizada em espectrofotômetro a 663 nm. Para diminuir a variação entre as amostras, cada réplica da triplicata foi lida três vezes, gerando uma média final para cada réplica.

O teor de clorofila-a foi calculado utilizando o coeficiente de Mackinney, 1941:

$$\mu\text{g L}^{-1}\text{cla} = \frac{\text{Abs}_{663} - \text{Abs}_{750} \times 12,63 \times 1,5 \text{ mL}_{(\text{metanol})}}{1,5 \text{ mL}_{(\text{filtrado})}} \times 1000$$

A contagem celular foi realizada a cada 48 horas, sendo a primeira amostra coletada uma hora após o inóculo inicial (dia 0). As contagens foram padronizadas com um mínimo de 400 indivíduos contados (limite relativo: $\pm 10\%$) e um mínimo de cinco grandes campos na câmara de Neubauer, dispostos transversalmente. Assim como no teor de clorofila, cada réplica foi contada três vezes, gerando uma média final para cada réplica.

Com os valores da densidade celular (Cel.mL^{-1}) foram calculadas as taxas de crescimento (μ), taxa de divisões por dia (K) e os tempos duplicação (T_d) (Lourenço 2006):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad K = \mu / 0,6931^* \quad T_d = 0,6931 / \mu$$

Em que:

\ln é o logaritmo natural;

N_0 é o número de células no tempo inicial;

N_t é o número de células no tempo no final;

Δt é intervalo de tempo.

* O valor 0,6931 é referente ao logaritmo natural de base 2, que é muito utilizado em cultivo de microalgas com células que se multiplicam por divisão binária.

As fases de crescimento (Figura 4) foram determinadas a partir de regressão linear da fase exponencial (ou Fase LOG). Portanto, os dias anteriores foram considerados como sendo a fase LAG e os dias posteriores como sendo a fase Estacionária.

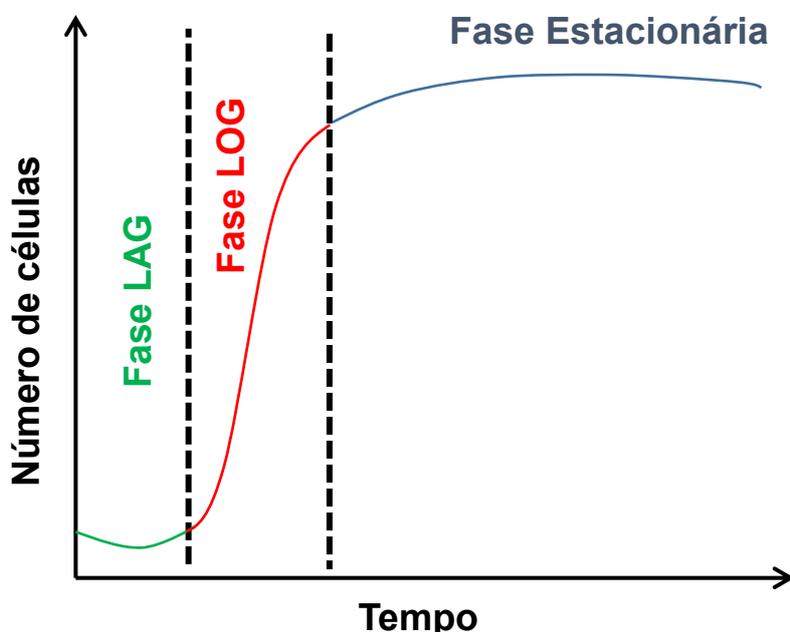


Figura 4: Curva esquemática do crescimento sigmoidal. (FONTE: AUTORA, 2014).

2.5 Análises gráficas e estatísticas

As curvas de crescimento foram elaboradas tanto com os valores de teor de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) quanto com os valores de densidade celular (Cel. mL^{-1}). Entretanto, para as análises de variância e testes estatísticos se optou apenas

pelo uso dos valores de densidade celular. Isso ocorreu devido ao coeficiente de correlação ter sido positivo e significativo ($p < 0,05$) entre ambos os fatores e em todos os experimentos. Além disso, esses resultados foram agrupados em uma única reta de correlação, devido à normalidade, homocedasticidade e baixa variação entre os dados. Também foram aplicadas as mesmas análises e testes estatísticos para os valores das taxas de crescimento, das taxas de divisões e dos tempos de duplicação.

Para os resultados de crescimento dos experimentos com Planejamento Fatorial Multiníveis (salinidade x temperatura) foi utilizada a ANOVA Multifatorial. Para os resultados de crescimento do experimento da razão nitrogênio e fósforo (N:P) foi utilizada a ANOVA Uni-fatorial. Todas as variáveis quantificadas foram testadas quanto a Normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de Homocedasticidade (Cochran C., Hartley e Bartlett), ambos a 5% de significância, como requisito para as análises estatísticas. Quando necessário, transformações matemáticas foram empregadas aos valores das variáveis para atender estes requisitos. Posteriormente, foram aplicadas as análises de variâncias, utilizando um nível de significância 5% com teste estatístico de Post-Hoc de TUKEY (Zar 2010).

3. RESULTADOS

A cepa de *Aphanothece stagnina* (CY012) foi isolada, purificada e devidamente identificada. Com os valores de teor de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) e de densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) foi possível elaborar as curvas de crescimento. A partir dos valores de densidade celular ($\ln \text{Cel.mL}^{-1}$) foram calculadas as taxas de crescimento (μ), taxas de divisões por dia (K) e tempos de duplicação (T_d) (Apêndices IV, V, VI, VII)

3.1 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C

Com os valores do teor de clorofila-a (Fig. 5) e da densidade celular (Fig. 6) foi possível elaborar as curvas de crescimento nos diferentes tratamentos. Os valores e desvio padrão de clorofila-a e da densidade celular podem ser observados no Apêndice IV.

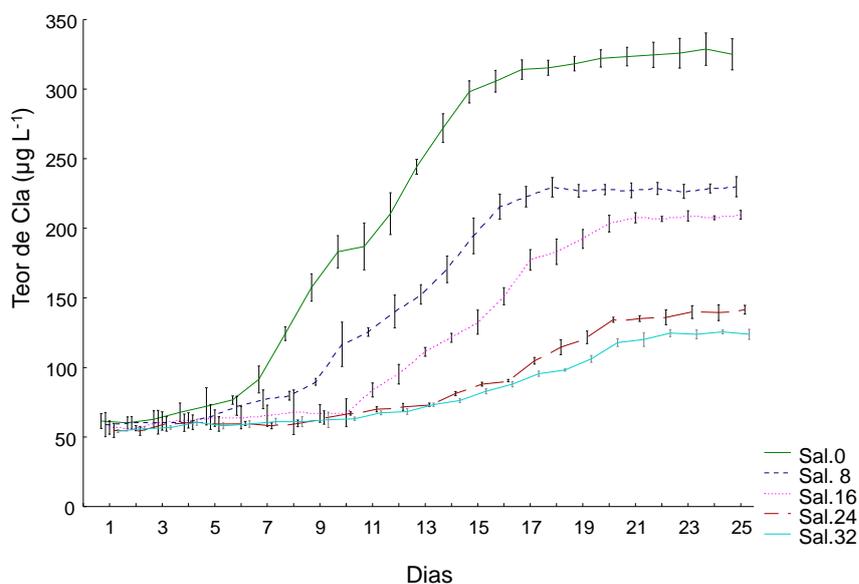


Figura 5: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C.

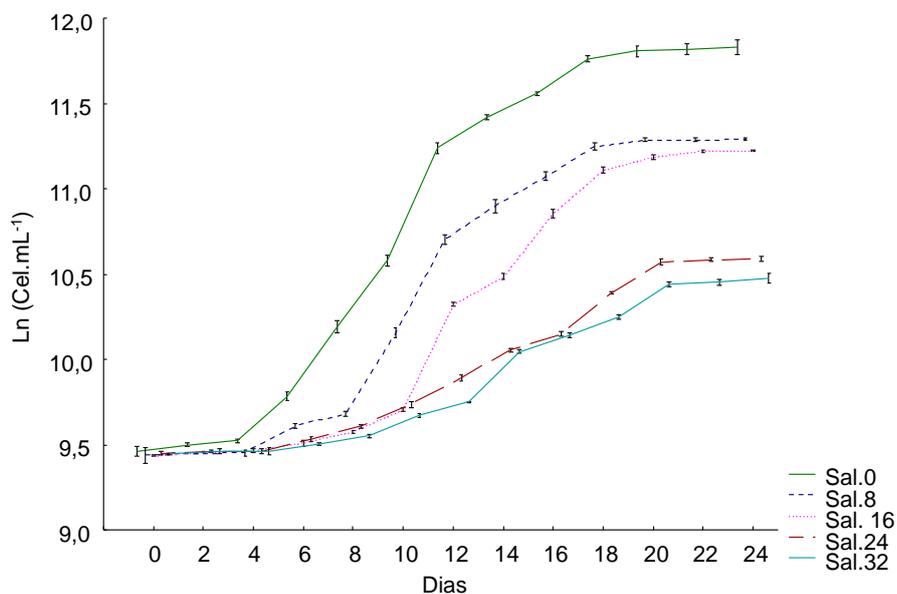


Figura 6: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 12°C.

Foi utilizado o coeficiente de correlação entre os valores dos teores de clorofila-a e da densidade celular (Fig. 7). Essa correlação demonstrou ser positiva, significativa, com alto coeficiente de linearidade (r^2) e baixo coeficiente angular (declividade), quando comparado aos tratamentos a 28 °C.

$$\text{Clorofila-a} = 40,246 + 23,335 * \text{Cel.mL}^{-1} * 10^4 ; r^2 = 0,97$$

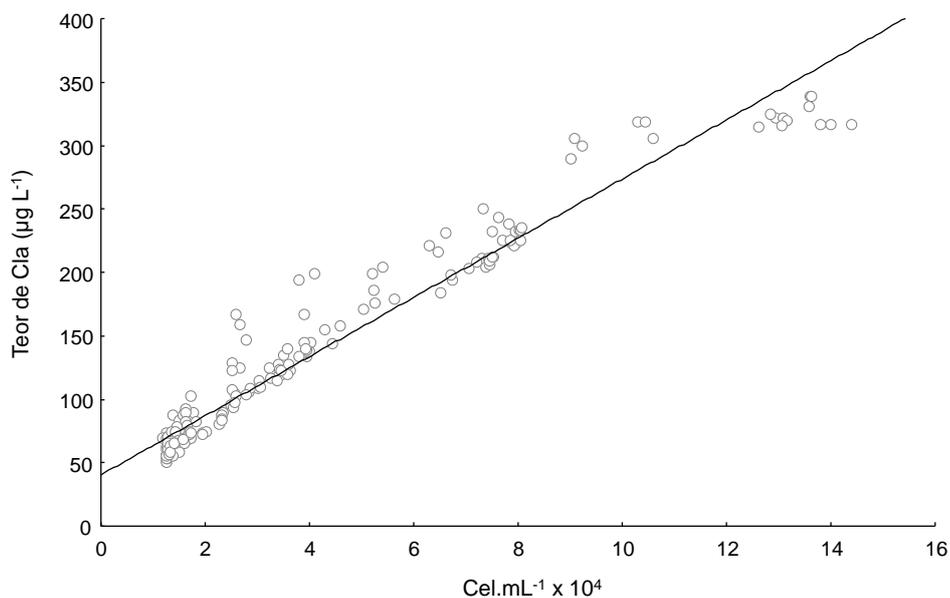


Figura 7: Coeficiente de correlação entre a densidade celular (Cel.mL⁻¹ x 10⁴) e teor de clorofila (µg L⁻¹) nas diferentes salinidades a 12°C.

Foi observado que a maior densidade celular foi obtida no tratamento com salinidade 0 ($p < 0,05$), sendo que, com o aumento da salinidade houve uma diminuição no crescimento celular ($p < 0,05$). Além disso, foi observado um padrão semelhante de crescimento entre as salinidades 24 e 32. Por conseguinte, o período entre as fases do crescimento podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1: Fase do crescimento celular de *A. stagnina* (em dias) nas diferentes salinidades a 12°C.

Salinidade	Fase LAG	Fase LOG	Fase Estacionária
0	0 - 5°	6° - 18 °	A partir do 18°
8	0 - 5°	6° - 18 °	A partir do 18°
16	0 - 11°	12° - 20°	A partir do 20°
24	0 - 9°	10° - 20°	A partir do 20°
32	0 - 9°	10° - 20°	A partir do 20°

3.2 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C

Com os valores do teor de clorofila-a (Fig. 8) e da densidade celular (Fig. 9) foi possível elaborar as curvas de crescimento nos diferentes tratamentos. Os valores e desvio padrão de clorofila-a e da densidade celular podem ser observados no Apêndice V.

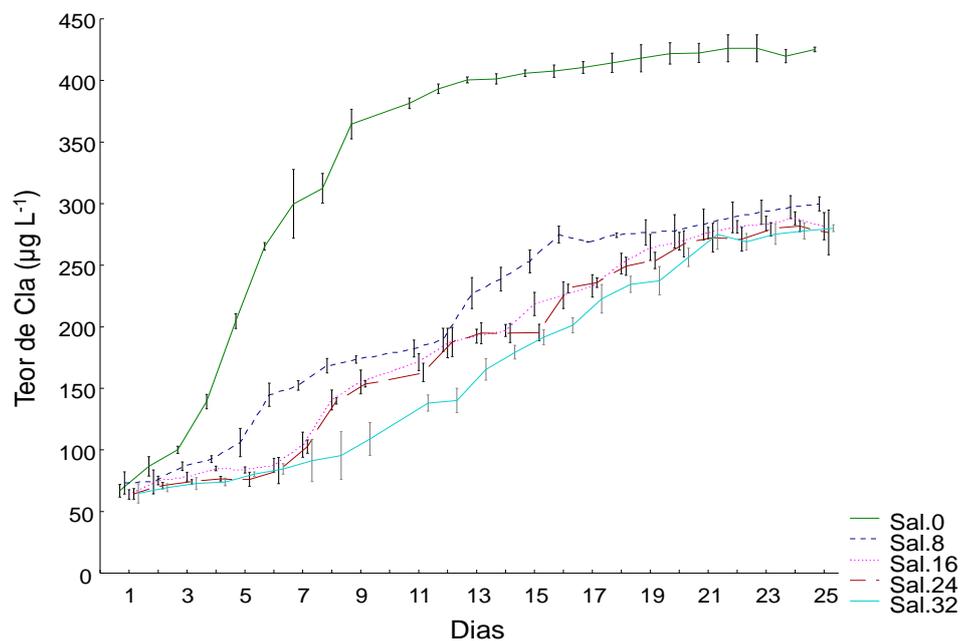


Figura 8: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C.

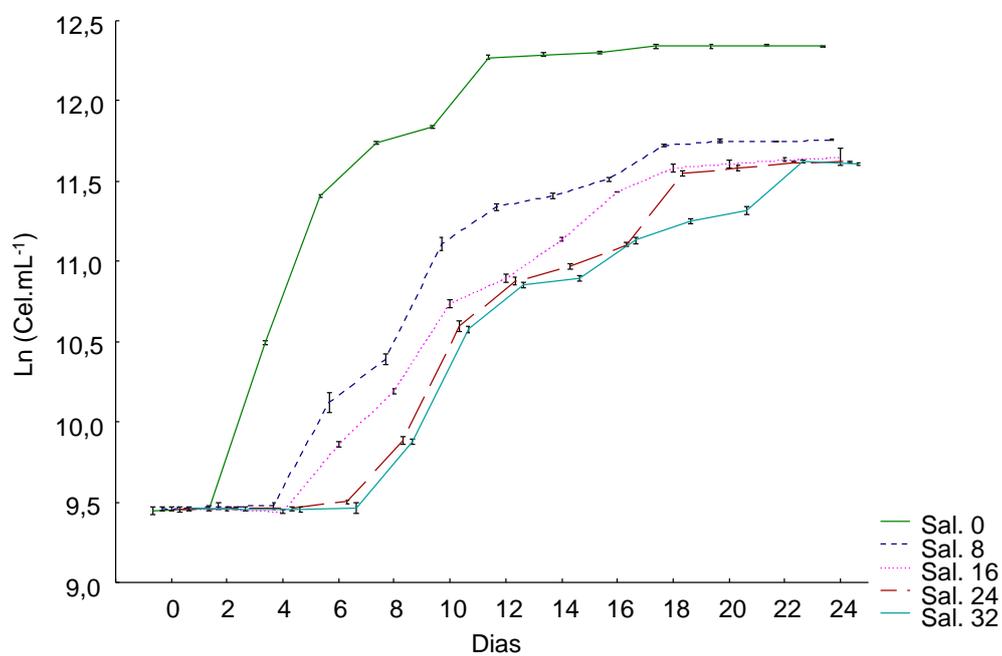


Figura 9: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 20°C.

Foi utilizado o coeficiente de correlação entre os valores dos teores de clorofila-a e da densidade celular (Fig. 10). Essa correlação demonstrou ser positiva, significativa, com alto coeficiente de linearidade e baixo coeficiente angular, quando comparado aos demais tratamentos.

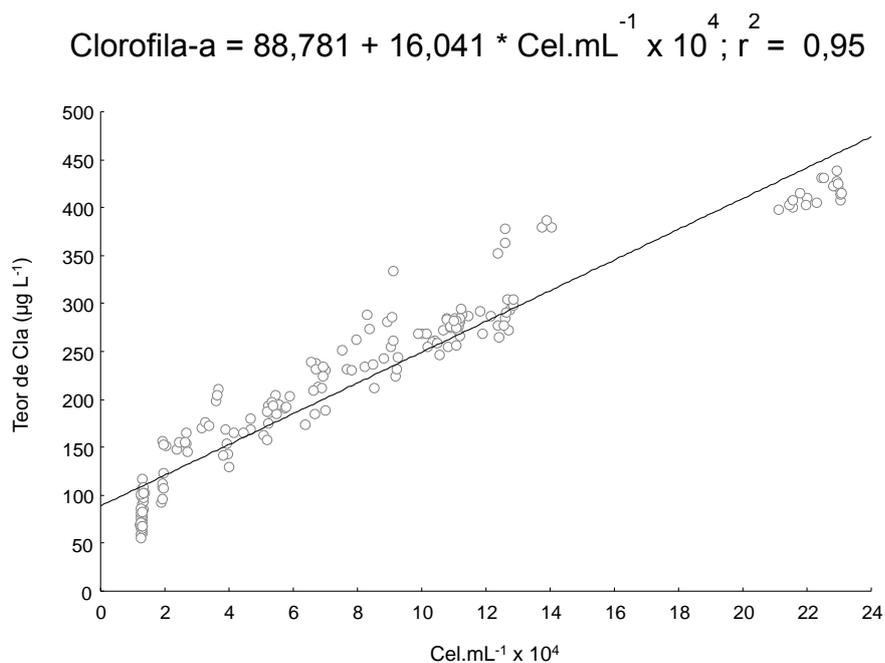


Figura 10: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes salinidades a 20°C .

O maior crescimento foi encontrado no tratamento com salinidade 0 ($p < 0,05$) e, conforme o aumento da salinidade, foi observada uma diminuição da densidade ($p < 0,05$). Além disso, é possível visualizar o intervalo de tempo das fases de crescimento na Tabela 2.

Tabela 2: Fase do crescimento celular de *A. stagnina* (em dias) nas diferentes salinidades a 20°C.

Salinidade	Fase LAG	Fase LOG	Fase Estacionária
0	0 - 1°	2° - 12°	A partir do 12°
8	0 - 5°	6° - 18°	A partir do 18°
16	0 - 5°	6° - 18°	A partir do 18°
24	0 - 9°	10° - 18°	A partir do 18°
32	0 - 9°	10° - 20°	A partir do 20°

3.3 Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C

Com os valores do teor de clorofila-a (Fig. 11) e da densidade celular (Fig. 12) foi possível plotar as curvas de crescimento nos diferentes tratamentos. Os valores e desvio padrão de clorofila-a e da densidade celular podem ser observados no Apêndice VI.

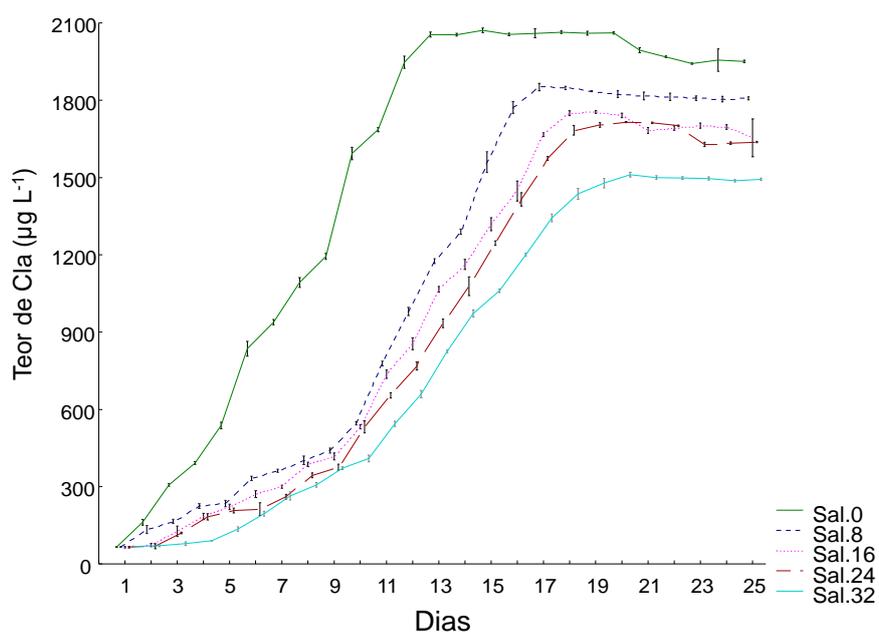


Figura 11: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C.

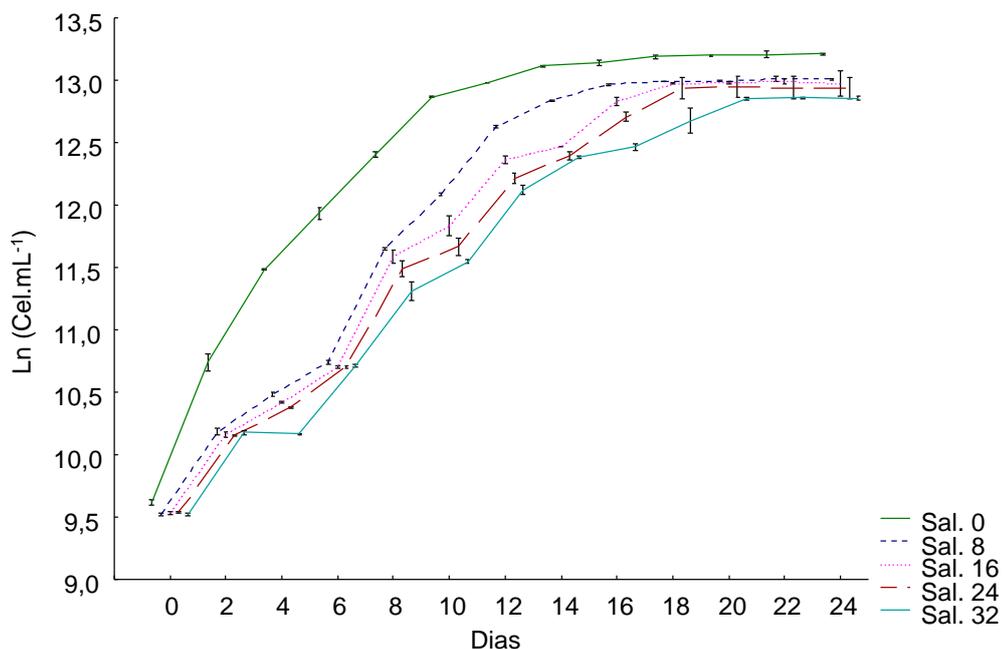


Figura 12: Crescimento celular nas diferentes salinidades a 28°C.

Foi utilizado o coeficiente de correlação entre os valores dos teores de clorofila-a e da densidade celular (Fig.13). Essa correlação demonstrou ser positiva, significativa, com alto coeficiente de linearidade e alto coeficiente angular, quando comparado aos tratamentos nas menores salinidades.

$$\text{Clorofila-a} = 108,72 + 38,193 * \text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4 ; r^2 = 0,98$$

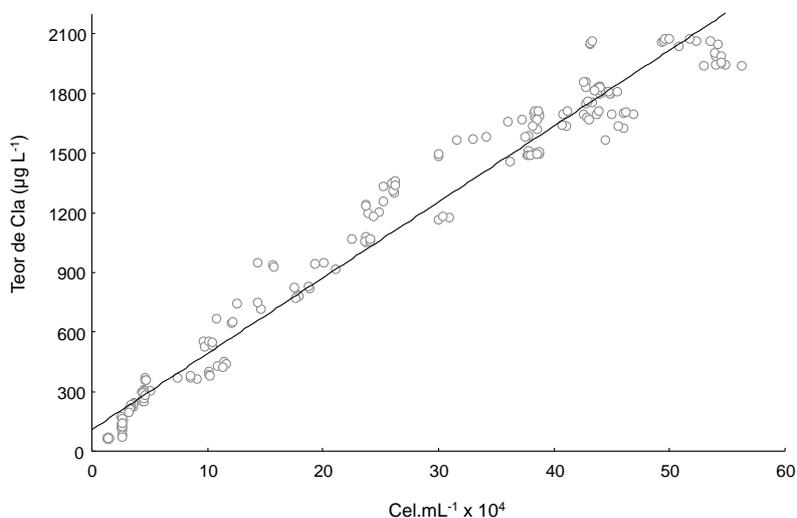


Figura 13: Coeficiente de correlação entre a densidade celular (Cel.mL⁻¹ x 10⁴) e teor de clorofila (µg L⁻¹) nas diferentes salinidades a 28°C.

Foi observado o maior crescimento celular no tratamento com salinidade 0 ($p < 0,05$) e, conforme o aumento da salinidade, o crescimento decaiu ($p < 0,05$). Além disso, o período entre as fases de crescimento podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3: Fase do crescimento celular de *A. stagnina* (em dias) nas diferentes salinidades a 28°C.

Salinidade	Fase LAG	Fase LOG	Fase Estacionária
0	0 - 1°	2° - 10 °	A partir do 10°
8	0 - 1°	2° - 12 °	A partir do 12°
16	0 - 7°	8° - 18°	A partir do 18°
24	0 - 7°	8° - 18°	A partir do 18°
32	0 - 7°	8° - 20°	A partir do 20°

Em síntese, dentre todos os experimentos com salinidade e temperatura, o tratamento que mais influenciou negativamente o crescimento de *A. stagnina* foi o de temperatura 12° C e salinidade 32. Já o experimento que mais estimulou o seu crescimento, foi o de temperatura 28°C e salinidade 0. Por isso, para os experimentos nas diferentes razões N:P foi utilizado à temperatura 28°C e salinidade 0. Apesar de a salinidade ter influenciado no crescimento de *A. stagnina*, é possível afirmar que a temperatura exerce maior influência sobre o crescimento.

Adicionalmente, foi verificado que as variações de temperatura exerceram influência no teor de clorofila-a por célula. Nas equações de regressão das

correlações foi constatado que os maiores valores de coeficiente angular foram encontrados em 28°C (Fig. 13). O coeficiente angular define a declividade e é equivalente a média entre o teor de clorofila-a pela densidade celular.

3.4 Crescimento celular nas diferentes razões N:P

Com os valores do teor de clorofila-a (Fig. 14) e da densidade celular (Fig. 15) foi possível elaborar as curvas de crescimento nos diferentes tratamentos. Os valores e desvio padrão de clorofila-a e da densidade celular podem ser encontrados no Apêndice VII.

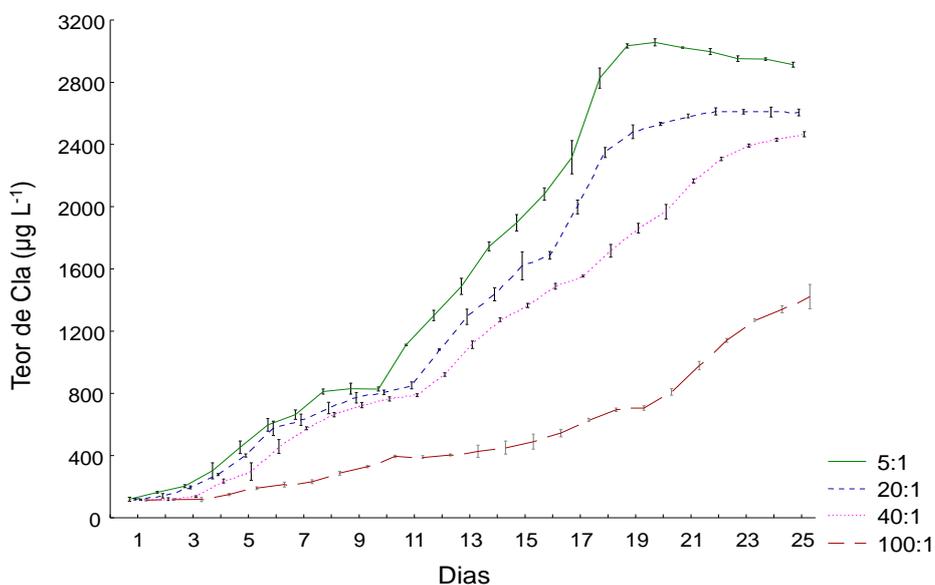


Figura 14: Crescimento celular nas diferentes razões N:P.

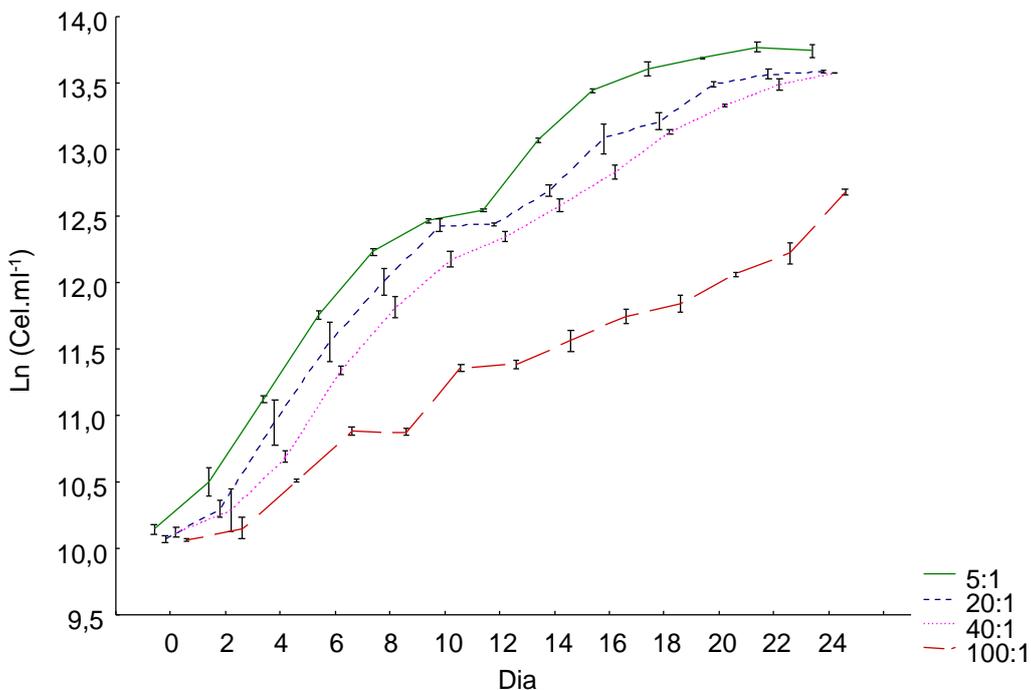


Figura 15: Crescimento celular nas diferentes razões N:P.

Foi utilizado o coeficiente de correlação entre os valores dos teores de clorofila-a e da densidade celular (Fig. 16). Essa correlação demonstrou ser positiva, significativa, com alto coeficiente de linearidade e alto coeficiente angular. Além disso, o coeficiente angular foi semelhante ao do outro experimento a 28°C (nas diferentes salinidades).

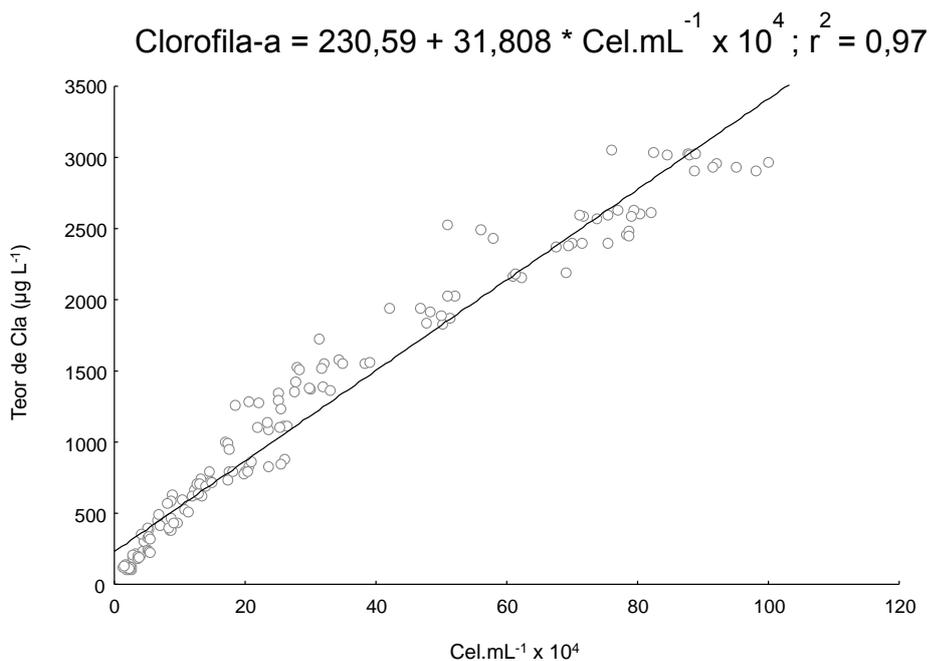


Figura 16: Coeficiente de correlação entre a densidade celular ($\text{Cel.mL}^{-1} \times 10^4$) e teor de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas diferentes razões N:P.

De uma forma geral, foi encontrado maior crescimento celular nos tratamentos em menores razões N:P ($p < 0,05$) e, conforme o aumento, houve um decréscimo no crescimento ($p < 0,05$). As fases de crescimento com os intervalos de tempo podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4: Fase do crescimento celular de *A. stagnina* (em dias) nas diferentes razões N:P.

Razão N:P	Fase LAG	Fase LOG	Fase Estacionária
5:1	0 - 5°	6° - 20°	A partir do 20°
20:1	0 - 5°	6° - 20°	A partir do 20°
40:1	0 - 7°	A partir do 8°	Não alcançada
100:1	0 - 13°	A partir do 13°	Não alcançada

3.5 Taxa de crescimento, taxa de divisões por dia e tempo de duplicação

As taxas de crescimento (μ), taxas de divisões por dia (K) e tempos de duplicação (T_d), das diferentes salinidades e temperaturas, podem ser observadas na figura 17 (A, B e C) e na tabela 5. De uma forma geral, as taxas de crescimento decaem nas três temperaturas, conforme o aumento da salinidade. Por conseguinte, também há um decréscimo nas taxas de divisões por dia e um aumento nos tempos de duplicação. Em relação às temperaturas, pode-se observar um aumento significativo ($p < 0,05$) nas taxas a 28°C.

Tabela 5: Valores médios das taxas de crescimento (μ), taxas de divisões por dia (K) e tempos de duplicação (T_d) para cada tratamento de temperatura e salinidade.

Tratamento (Salinidade/Temperatura)	μ	K	T_d
0 / 12°C	0,16± 0,05	0,24± 0,08	4,13± 0,14
8 / 12°C	0,14± 0,01	0,21± 0,01	4,63± 0,03
16 / 12°C	0,11± 0,03	0,16± 0,05	5,92± 0,18
24 / 12°C	0,084± 0,01	0,12± 0,02	8,25± 0,17
32 / 12°C	0,07± 0,01	0,11± 0,01	8,96± 0,13
0 / 20°C	0,26± 0,02	0,37± 0,08	2,62± 0,02
8 / 20°C	0,14± 0,06	0,20± 0,09	4,83± 0,22
16 / 20°C	0,14± 0,01	0,20± 0,01	4,84± 0,001
24 / 20°C	0,1± 0,03	0,15± 0,05	6,52± 0,2
32 / 20°C	0,081± 0,01	0,11± 0,01	8,57± 0,4
0 / 28°C	0,27± 0,07	0,39± 0,01	2,54± 0,06
8 / 28°C	0,25± 0,01	0,36± 0,01	2,70± 0,01
16 / 28°C	0,15± 0,01	0,21± 0,01	4,54± 0,01
24 / 28°C	0,15± 0,06	0,21± 0,01	4,62± 0,21
32 / 28°C	0,13± 0,04	0,18± 0,01	5,33± 0,19

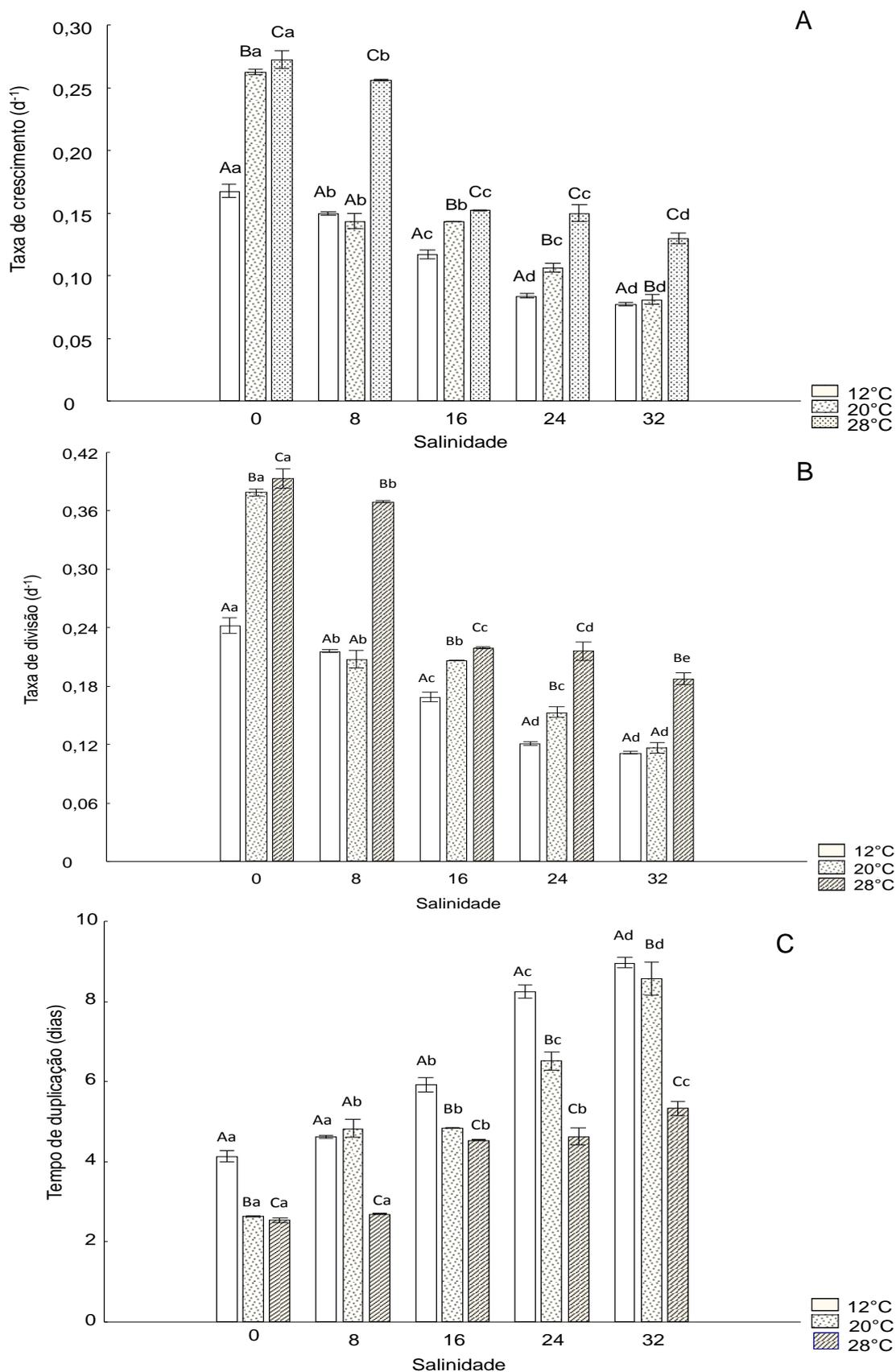


Figura 17: Taxas de crescimento (A), taxas de divisão (B) e tempos de duplicação (C) nas diferentes salinidades e temperaturas.

*As letras maiúsculas correspondem as diferenças significativas entre as temperaturas (na mesma salinidade) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre as salinidades (na mesma temperatura).

As taxas de crescimento (μ), taxas de divisões por dia (K) e tempos de duplicação (T_d) das diferentes razões N:P, podem ser visualizadas nas figuras 18 (A, B e C) e na tabela 6. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as razões 5:1 e 20:1 (Figs. 18 A, B e C), entretanto, ambas foram superiores as demais razões (40:1; 100:1).

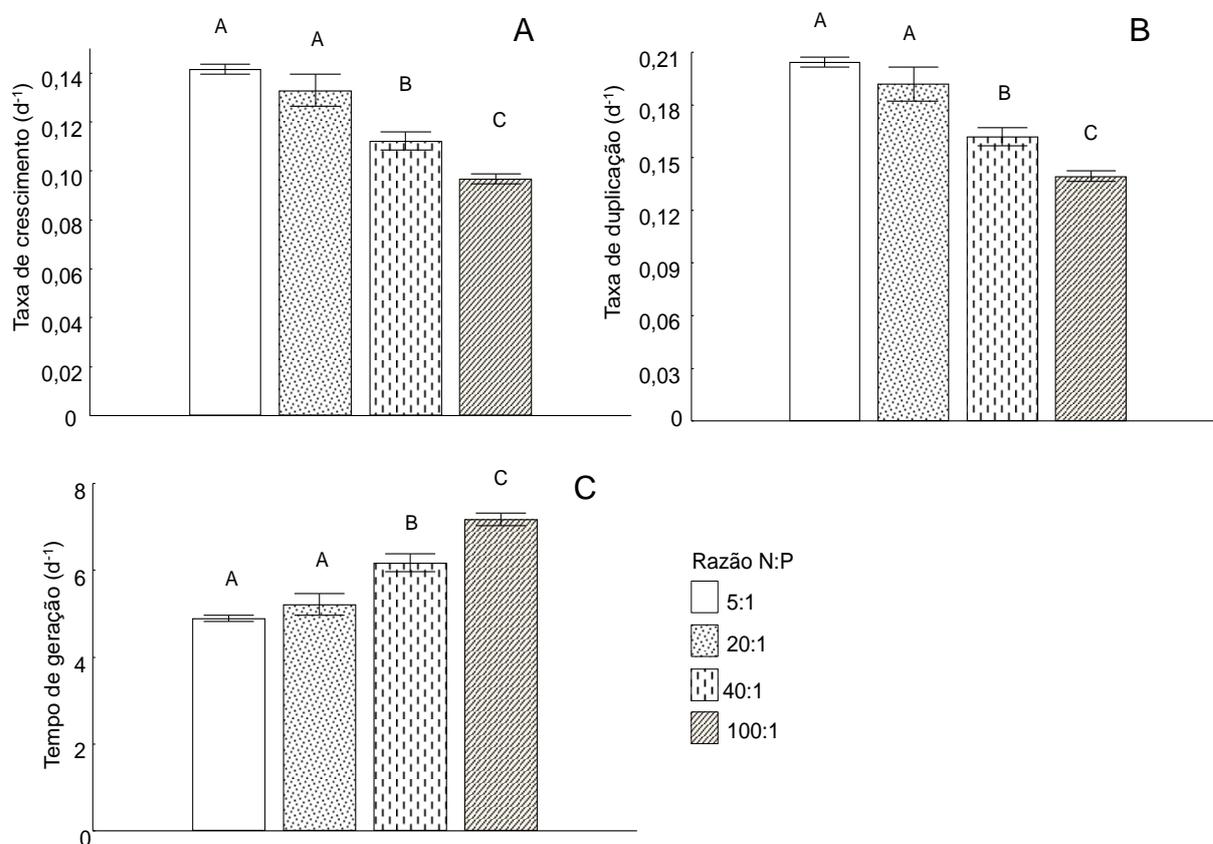


Figura 18: Taxas de crescimento (A), taxas de divisões (B) e tempos de duplicação (C) nas diferentes razões N:P.

*As letras maiúsculas correspondem as diferenças significativas entre as temperaturas (na mesma salinidade) e as letras minúsculas as diferenças significativas entre as salinidades (na mesma temperatura).

Tabela 6: Valores médios das taxas de crescimento (μ), taxas de divisões por dia e tempos de duplicação (T_d) para cada tratamento de razão N:P

Tratamento (Razão N:P)	μ	K	T_d
5:1	0,14± 0,02	0,20± 0,003	4,89± 0,07
20:1	0,13± 0,07	0,19± 0,01	5,22± 0,26
40:1	0,11± 0,03	0,16± 0,05	6,17± 0,21
100:1	0,09± 0,02	0,13± 0,003	7,17± 0,15

3.6 Solutos osmóticos orgânicos: sacarose, trealose, glicosilglicerol e glicina-betaína

Os espectros de varreduras das três amostras (salinidades 0, 25 e 55) podem ser visualizados na figura 19. A partir desse espectro de varredura, as amostras foram analisadas individualmente.

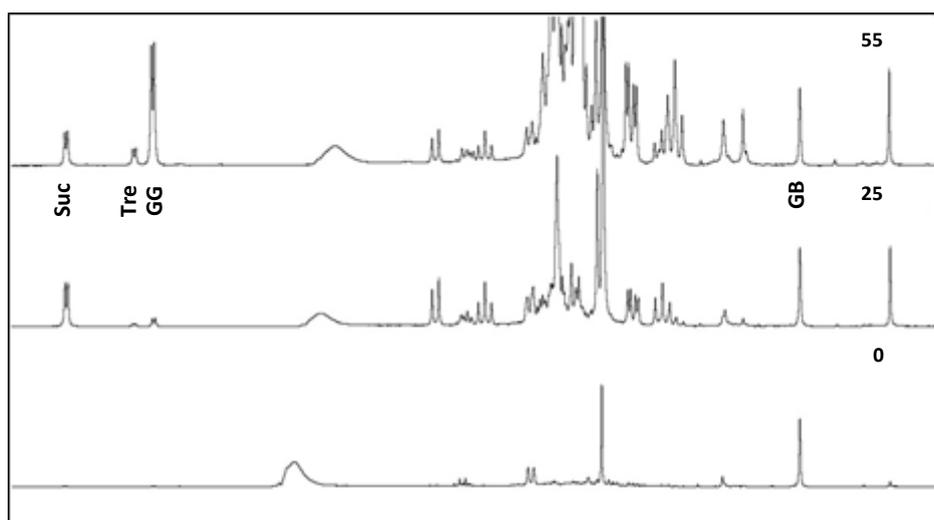


Figura 19: Espectros de ¹H-RMN em resposta ao estresse osmótico, trealose (Tre), sacarose (Suc), glicosilglicerol (GG) e glicina betaína (GB).

A partir do espectro de RMN da salinidade 0 (Fig. 20) foi constatada a presença dos principais solutos osmóticos orgânicos: sacarose (5.430 ppm), glicosilglicerol (5.147ppm) e glicina betaína (3.038ppm).

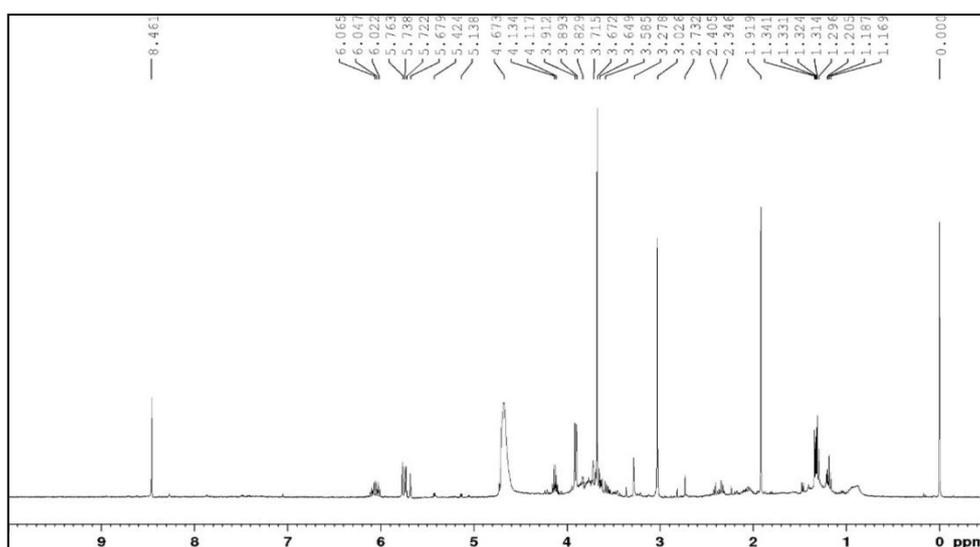


Figura 20: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 0.

A partir do espectro de RMN da salinidade 25 (Fig. 21) foi constatada a presença dos principais solutos osmóticos orgânicos: sacarose (5.430 ppm), trealose (5.200ppm), glicosilglicerol (5.147ppm) e glicina betaína (3.038ppm).

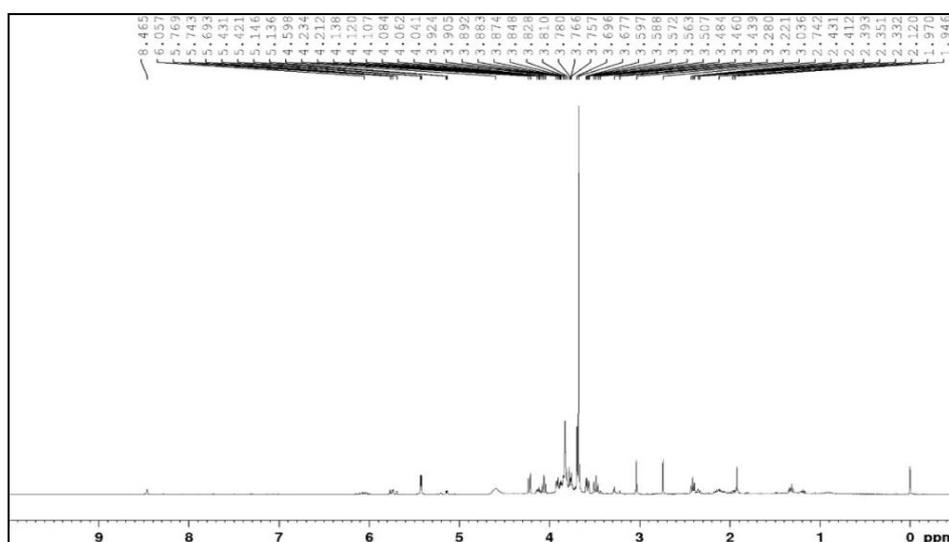


Figura 21: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 25.

Já, no espectro de RMN da salinidade 55 (Fig. 22) também foi notada a presença dos principais solutos osmóticos orgânicos: sacarose (5.430 ppm), trealose (5.200ppm), glicosilglicerol (5.147ppm) e glicina betaína (3.038ppm).

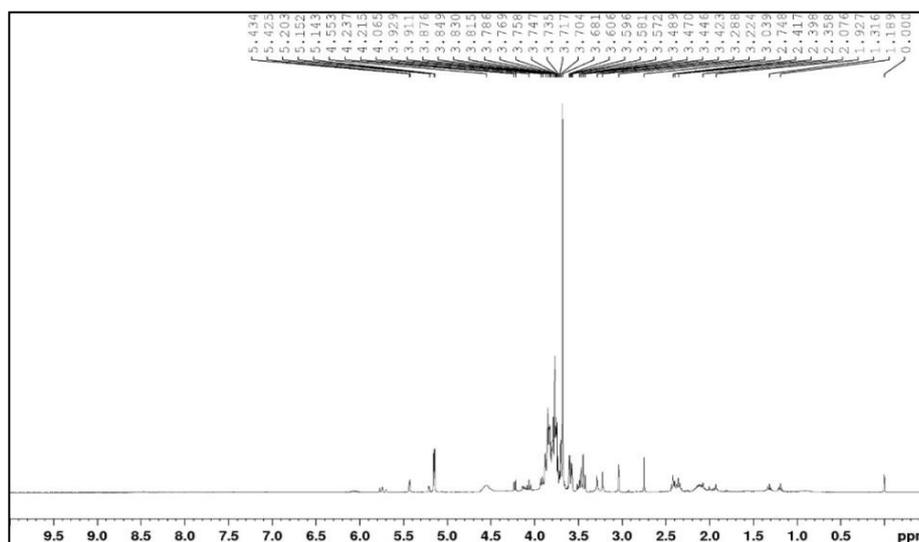


Figura 22: Espectro de ^1H -RMN em D_2O dos solutos osmóticos orgânicos da salinidade 55.

Em relação às concentrações (Tabela 7), demonstrou-se que com o aumento da salinidade *A. stagnina* acumula principalmente glicosilglicerol. Também há o aumento da sacarose e da trealose, entretanto em menores concentrações. Já a concentração da glicina betaína se mantém estável, mesmo em concentrações mais elevadas de salinidade.

Tabela 7: Tabela com os solutos osmóticos acumulados quanto ao o sinal do ^1H do RMN (ppm) e concentração nas diferentes salinidades. Os desvios químicos são referentes ao TMS (δ = 0 ppm) e os valores de concentração são expressos em nmol.

Metabólito	^1H Ref. Sinal (ppm)	(0-sal)	(25-sal)	(55-sal)
Sacarose	5.430	5	264	206
Trealose	5.200	0	19	120
Glicosilglicerol	5.147	1	61	821
Glicina-Betaína	3.038	210	225	210

4. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que os três parâmetros influenciaram as taxas de crescimento e, portanto, as taxas de divisões por dia e os tempos de duplicação de *A. stagnina*. Adicionalmente, os níveis de salinidade atuaram quantitativamente e qualitativamente nos solutos osmóticos orgânicos acumulados.

Em relação à salinidade, o crescimento celular foi observado desde a salinidade 0 até a 55, sendo que os melhores valores de crescimento foram alcançados na menor salinidade (0), e conforme o aumento da salinidade, esses valores foram decaindo. Há diversos estudos que demonstram esse padrão para cianobactérias aquáticas (Kebede 1997, Rafiqi et al. 2003, Tang et al. 2007).

Em outro experimento, *A. stagnina* (considerada uma cianobactéria de água doce pelos autores) foi submetida a diferentes concentrações de NaCl (0 M; 0,25 M; 0,5 M; 0,75 M; 43,83). Após 48 horas, foi constatado que todas as taxas e parâmetros analisados (taxa de fixação do carbono, atividade da RuBisCO, teor de clorofila-a e de proteína) decaíram com a elevação da salinidade. Além disso, na concentração de 0,75 M o crescimento foi totalmente inibido (Rai 1990). A exceção da concentração 0,75M, os resultados do decréscimo das taxas e parâmetros estão de acordo com a redução de crescimento do presente trabalho, principalmente quanto ao decréscimo no teor de clorofila. Não obstante, a inibição a 0,75 M, provavelmente seja devido à inexistência de uma prévia aclimação.

Em cultivos de outras cepas aquáticas não aclimatadas de *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803) e *Microcystis firma*, foi demonstrado haver um decréscimo nas atividades metabólicas e um atraso do crescimento com o aumento da salinidade (Erdmann et al. 1992). Sendo assim, presume-se que para espécies dulcícolas, a aclimação seja indispensável para variações na salinidade.

Em um experimento com *Spirulina platensis*, nas mesmas concentrações de NaCl (0 M; 0,25 M; 0,5 M; 0,75 M), foram determinadas as taxas de crescimento, a atividade fotossintética e a respiração endógena. O mesmo padrão de decréscimo das taxas foi observado, conforme o aumento da salinidade. Além disso, foi comprovado que com o aumento da salinidade a atividade do fotossistema II é afetada e as taxas de respiração são elevadas (Zeng & Vonshak 1998). Em outro estudo, com diferentes cianobactérias e salinidades distintas (0 a 20 g L⁻¹ de NaCl), vários padrões de crescimento foram relatados. Entretanto, de uma forma geral, metade das espécies de cianobactérias apresentaram um decréscimo ou inibição de suas taxas de crescimento, conforme o aumento de salinidade (Mosander et al. 2002).

Na maioria dos trabalhos na literatura foi utilizado apenas o NaCl, enquanto que, no presente estudo se aplicou o sal marinho não iodado. A composição dos sais é extremamente importante e determinante para o crescimento dos microorganismos (Parker et al. 1997). Para as cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *M. flos-aquae*, foi relatado haver diferentes padrões de crescimento quanto aos sais adicionados. Ao adicionar NaCl não foi constatada inibição do crescimento e ao adicionar NaHCO₃ o crescimento foi

inclusive estimulado, entretanto, ao adicionar KCl ou $KHCO_3$ o crescimento foi fortemente inibido (Parker et al. 1997). Por isso, é recomendado que para os estudos futuros com *A. stagnina* sejam testados diferentes sais em distintas razões.

Como demonstrado, a salinidade pode influenciar de diferentes maneiras o crescimento das cianobactérias. A explicação pelo qual o crescimento diminuiu em função do aumento da salinidade não foi avaliada nesse estudo. Entretanto, presume-se que há um alto gasto energético para a adaptação das células às variações de salinidade e, com isso, influenciando o crescimento. Pressupõe-se que a principal justificativa pelo qual o crescimento tenha sido afetado seja devido à diminuição das taxas fotossintéticas, ao aumento das taxas respiratórias (Lu & Vonshak 2002) e pela realocação de carboidratos para a síntese dos solutos osmóticos (Oren 1999). O decréscimo das taxas fotossintéticas ocorre através da quebra do complexo de oxidação da água do PSII, ocasionando a ausência da transferência dos elétrons ao PSI (Allakhverdiev & Murata 2008). Já o aumento das taxas respiratórias pode ser em decorrência do aumento da atividade da citocromo oxidase da membrana plasmática ou pela ativação de melhores transportadores de elétrons da respiração (Molitor et al. 1986).

Contudo, as cianobactérias possuem certas adaptações quanto às variações de salinidade, como é o caso da produção de solutos osmóticos orgânicos (Hagemann 2011). Os principais solutos osmóticos orgânicos encontrados em *A. stagnina* foram a sacarose, a trealose, o glicosilglicerol e a glicina betaína. A sacarose aparece em todas as salinidades, porém, o

aumento da concentração ocorre entre a salinidade 0 e 25, e na salinidade 55 há um pequeno decréscimo. Já a trealose não aparece na salinidade 0, e da salinidade 25 para a 55 ocorreu um pequeno aumento na sua concentração.

Por conseguinte, para variações de salinidades baixas e intermediárias, a sacarose foi o principal soluto osmorregulador para *A. stagnina*. A sacarose também é encontrada em diversas cianobactérias, com a função de osmorregulador, tais como: *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803) (Miao et al. 2006), *Anabaena* sp. (Curatti et al. 2002), *Scytonema* sp. (Page-Sharp et al. 1999). A fonte de carbono e energia para a formação tanto da trealose quanto da sacarose é oriunda da fotossíntese e do glicogênio (Page-Sharp et al. 1998, Klähn & Hagemann 2011) e sabe-se que o aumento da salinidade afeta as taxas fotossintéticas (Allakhverdiev & Murata 2008). Sendo assim, ambos os solutos não são bons osmorreguladores em salinidades muito elevadas e, por isso, não são representativos em altas concentrações de salinidade (como a salinidade 55). Quanto à trealose, é conhecido na literatura que esse soluto é acumulado principalmente por cianobactérias filamentosas e formadoras de “mats” (tapetes) (Erdmann & Hagemann 2001). Por isso, pressupõe-se que por *A. stagnina* ser uma espécie cocóide e raramente formadora de tapetes (Komárek 2006), a trealose não tenha significância em sua concentração como soluto osmótico.

O glicosilglicerol demonstrou ser o principal soluto de regulação osmótica em salinidades intermediárias e elevadas para *A. stagnina*. Esse soluto apareceu em todas as salinidades, e conforme o aumento na concentração da salinidade, a concentração do soluto aumentou gradativamente. O

glicosilglicerol, assim como a sacarose, é sintetizado a partir do carbono fixado na fotossíntese e do glicogênio (Tel-Or et al. 1986, Hagemann 2011). Com o aumento da salinidade, ocorre o início da síntese do glicosilglicerol, que é necessário para manter os processos metabólicos em salinidades elevadas (Edrmand et al. 1992). Espécies que acumulam glicosilglicerol como principal osmólito orgânico são consideradas moderadamente halotolerantes (Hagemann et al. 1999).

Diversas espécies de cianobactérias acumulam esse soluto, tais como: *Synechocystis* sp. (cepa PCC 6803) (Nikkinen et al. 2012), *Microcystis firma* (Hagemann et al. 1987), *Synechococcus* sp. (Fulda et al. 1999), *Agmenellum quadruplicatum* (Tel-Or et al. 1986), *Microcoleus chthonoplastes* (Karsten 1996). As espécies *Synechococcus* sp. e *Synechocystis* sp. apresentam o mesmo padrão da *A. stagnina*, quanto ao acúmulo dos solutos osmóticos. Em baixas salinidades há o acúmulo de sacarose e em salinidades elevadas há o acúmulo de glicosilglicerol (Fulda et al. 1999, Miao et al. 2006, Nikkinen et al. 2012). Já a espécie *Microcoleus chthonoplastes*, em baixas salinidades acumula trealose, enquanto que, em altas salinidades acumula glicosilglicerol (Karsten 1996). Sendo assim, acumular diferentes osmólitos orgânicos, conforme a variação da salinidade, é comum em cianobactérias.

Por fim, a glicina betaína apareceu nas três salinidades, contudo, a variação na concentração desse soluto foi insignificante. Com isso, é sugerido que para *A. stagnina*, a glicina betaína parece não apresentar importância como osmorregulador. Em algumas bactérias e organismos fitoplanctônicos, a glicina betaína pode ter função como fonte de energia (Smith et al. 1988, Keller

et al. 1999). Em condições óxicas, a glicina betaína é degradada por sucessivas M-demetilações, fornecendo energia ao organismo (Levering et al. 1981). Dessa forma, é proposto que *A. stagnina* utilize a glicina betaína como fonte de energia e, por isso, conforme a variação da salinidade, não há variação na concentração desse soluto.

A partir dos resultados de crescimento nas diferentes salinidades e pelos solutos acumulados, pode-se afirmar que a cepa *A. stagnina* (oriunda do estuário da Lagoa dos Patos) é moderadamente halotolerante, eurialina e oligoalina. Na literatura, *A. stagnina* por vezes é considerada uma espécie de ambiente dulcícola (Rai 1990, Komárek & Anagnostidis 1998) e em outros estudos é vista como uma espécie de ambiente salino (Silva & Silva et al. 2007, Silva & Silva et al. 2011). Essa divergência pode ser oriunda ou da identificação não fidedigna da espécie ou por variação genética nas diferentes populações. Segundo Komárek (2006), a identificação deveria adotar as características ecológicas, ultraestruturais, moleculares, fisiológicas, bioquímicas e o conhecimento sobre os diferentes morfotipos.

A espécie *A. stagnina* possui semelhança morfológica com outras espécies do gênero *Aphanothece* (*A. castagnei*, *A. microscopica* e *A. sacrum*), o que dificulta a identificação. Desta forma, para *A. stagnina*, as características diacríticas de identificação da espécie são a ecologia e, possivelmente, o genótipo. Segundo Jiří Komárek (University of South Bohemia, República Tcheca, Com. Pess.)², a ecologia de *A. stagnina* em regiões temperadas da Europa e em regiões tropicais e subtropicais da América é muito divergente. Por isso, é sugerido que existam diferenças genotípicas e adaptativas nessas

²(comunicação pessoal): Mensagem recebida por <juliana.biologiamarinha@gmail.com> em 29 de maio de 2014.

diferentes populações. Entretanto, ainda não há estudos que comprovem a diferença ou semelhança genotípica dessa espécie.

Em relação às temperaturas, os melhores valores de crescimento foram encontrados na temperatura mais elevada (28°C), enquanto que nas temperaturas mais baixas, foi verificado um decréscimo. A partir dos resultados, *A. stagnina* pode ser classificada como uma espécie mesófila, com ótimo de crescimento a 28°C. Na literatura, diversos trabalhos reportam as melhores taxas de crescimento em temperaturas próximas a 28°C (Konopka & Brock 1978, Saker & Griffiths 2000, Paerl & Huisman 2008, Jöhn et al. 2008, Lurling et al. 2013). Sabe-se que com o aumento na temperatura há um aumento da maioria das reações químicas e, conseqüentemente, um maior crescimento celular (Renaud et al. 2002).

Em temperaturas baixas, além de ocorrer o inverso com a velocidade das reações, a movimentação das moléculas também é afetada, tornando-se mais lenta (Tortora et al. 2013). Além disso, sabe-se que em baixas temperaturas há mudanças na permeabilidade da membrana, o que pode levar a perda de íons e pequenas moléculas, diminuindo as taxas fotossintéticas e produção de ATP (Murata 1989, Renaud et al. 2002). Sendo assim, os experimentos a 12°C podem não ter fornecido energia suficiente para manter o crescimento celular de *A. stagnina* constante, o que ocasionou em menores taxas de crescimento.

Além do crescimento, a temperatura parece ter influenciado no teor de clorofila-a por célula. Na maior temperatura (ambos os experimentos a 28°C) há um aumento no teor de clorofila-a por célula, quando comparado aos demais experimentos (12 e 20°C). O aumento no teor de clorofila-a por células

é conhecido em outras espécies fitoplanctônicas, tais como, *Microcystis* sp., *Merismopedia* sp., *Oscillatoria* sp. e *Aulacoseira* sp. (Coles & Jones 2000), parecendo ser um padrão para os organismos.

Nos experimentos de razões N:P, as melhores taxas de crescimento, taxas de divisões por dia e tempos de duplicação foram encontrados nas menores razões N:P (5:1 e 20:1) e com o aumento das razão N:P, essas taxas decresceram. Sabe-se que há uma ampla variedade de razões N:P, no qual as cianobactérias possuem seus ótimos de crescimento. Um dos mecanismos propostos para essa grande variabilidade nas razões N:P é a estequiometria celular de cada espécie (Geider & Roche 2002). Essa estequiometria é controlada pela alocação bioquímica das reservas energéticas para as diferentes estratégias de crescimento, e é referido como hipótese da taxa de crescimento (Elser et al. 2003, Klausmeier et al. 2004). De acordo com Martiny et al. (2013), células que possuem rápido crescimento celular podem ter uma razão N:P menor, devido a um maior investimento em ribossomos, que são ricos em fósforo. Portanto, essa é uma das possíveis explicações para o melhor crescimento de *A. stagnina* nas menores razões N:P. Entretanto, é proposto para futuros estudos com *A. stagnina*, que as características bioquímicas e estequiométricas dessa espécie sejam avaliadas.

Outra possível explicação é a capacidade de armazenar o excesso dos compostos nitrogenados nas cianoficinas, que em caso de limitação são utilizados (Levine & Schindler 1999). Para avaliar esta hipótese para *A. stagnina*, deve-se realizar um esgotamento do nitrogênio intracelular (“*Starvation*”) por um maior período. Apesar de algumas cianobactérias

possuírem a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, sabe-se que essa cepa oriunda do estuário da Lagoa dos Patos não é fixadora (Yunes, Com. Pess.).

A salinidade, a temperatura e razão N:P são parâmetros altamente variáveis em regiões estuarinas e urbanizadas, tal como o estuário da Lagoa dos Patos. A variação anual de salinidade está entre 0 e 34, com média de 13 (Fernandes et al. 2009); a de temperatura está entre 10°C e 32°C, com média de 20,1°C (Garcia et al. 2003) e a razão N:P geralmente está abaixo de 10:1 (Abreu et al. 1994). As florações de *Aphanothece* já foram estudadas, quanto a essas e outras variações ambientais no estuário da Lagoa dos Patos (De Lorenzo 1995, Araújo 2005). De Lorenzo (1995) sugeriu que as florações não são influenciadas pela salinidade, temperatura ou pH; porém, seriam influenciadas pelas baixas razões N:P e pelos ventos predominantes. Segundo essa autora, as maiores biomassas de *Aphanothece* sp. estiveram associadas as baixas razões N:P. Já no trabalho de Araújo (2005), é sugerido que as florações de *Aphanothece* sp. sejam influenciadas pelas salinidades, mas também pelos ventos e baixas razões N:P.

Em ambos os estudos, a temperatura parece não ter influenciado nas florações de *A. stagnina*, o que estaria em desacordo com os resultados encontrados no presente estudo. Sendo assim, é sugerido que a variação de temperatura não exerceu forte influência nas florações da *A. stagnina*, devido ao Saco da Mangueira ser uma região mais protegida. Além disso, há estudos que comprovam que densas florações possuem a capacidade de aumentar a temperatura interna, (Hense 2007), através da absorção de luz intensa pelos

pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores (Paerl & Huisman 2009). Por outro lado, no ambiente natural outros fatores interferem simultaneamente nessas florações, tais como ventos, predação e competição (dentre outros) e, por isso, torna-se complexa a comparação com o ambiente controlado dos cultivos.

No estuário da Lagoa dos Patos, *M. aeruginosa* é outra cianobactéria predominante e ao compará-las, observa-se algumas semelhanças e divergências. Na salinidade, *M. aeruginosa* também demonstrou um melhor crescimento na salinidade 0. Entretanto, enquanto *A. stagnina* cresceu até a salinidade 55, o crescimento de *M. aeruginosa* foi completamente inibido após a salinidade 4 (Salomon et al. 2001). Na temperatura, *M. aeruginosa* também apresenta melhor crescimento em temperaturas superiores a 20°C (Yunes et al. 1998), o que é conhecido como um padrão para a maioria das cianobactérias. E por fim, a razão N:P ideal para *M. aeruginosa* está próxima a 13:1 (Yunes et al. 1998), estando entre a variação encontrada para *A. stagnina* (entre 5:1 e 20:1).

Apesar de *A. stagnina* não ser produtora de toxinas, como ocorre em *M. aeruginosa*, sua ampla plasticidade quanto aos fatores testados parece ser uma importante vantagem ecológica. Além disso, ter uma boa adaptação quanto às variações de salinidades é uma importante característica, principalmente em ambientes estuarinos, tal como o estuário da Lagoa dos Patos.

5. CONCLUSÃO

A espécie *A. stagnina*, isolada do estuário da Lagoa dos Patos, vem despertando atenção, quanto às suas densas, extensas e recorrentes florações. A partir dos experimentos realizados em laboratório, pode-se afirmar que o tratamento que mais influenciou negativamente o crescimento de *A. stagnina* foi o da temperatura 12°C e salinidade 32, enquanto que, o tratamento que mais influenciou positivamente o crescimento de *A. stagnina* foi o de temperatura 28°C e salinidade 0.

Essa espécie pode ser classificada como moderadamente halotolerante, oligoalina e eurialina. Quanto ao crescimento nas temperaturas, sugere-se que essa espécie seja classificada como mesófila. Já nos crescimentos nas diferentes razões N:P, esta espécie pode ser considerada melhor adaptada a ambientes onde o fósforo não seja limitante. Em relação aos solutos osmóticos, nas salinidades de baixas a intermediárias (0 a 25) o principal foi a sacarose, enquanto que, em salinidades de intermediárias a elevadas (25 a 55), o principal soluto acumulado foi o glicosilglicerol.

Por fim, conclui-se que *A. stagnina* possui alta plasticidade quanto aos parâmetros testados. Na salinidade, conforme aumenta a concentração, há um decréscimo no crescimento celular. Já conforme o aumento da temperatura foi observado um aumento progressivo nas taxas de crescimento. Nas razões N:P, foi verificado que conforme o aumento da razão N:P, houve uma diminuição

nas taxas de crescimento. Entretanto, ao comparar as três variáveis (salinidade, temperatura e razão N:P) é possível afirmar que a temperatura exerce maior influência sobre o crescimento de *A. stagnina*.

Perspectivas futuras:

- Identificar o genótipo de diferentes populações de *A.stagnina*, através de biologia molecular, pelo sequenciamento da região 16S rRNA;
- Avaliar o efeito de diferentes sais sobre o crescimento de *A. stagnina*;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente outros solutos osmóticos orgânicos nas salinidades 0, 25 e 55;
- Avaliar outras variações de temperaturas para poder determinar a temperatura mínima, máxima e ótima de crescimento;
- Realizar estudos bioquímicos e estequiométricos nas células de *A. stagnina*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, RMM, K KOHLS & D BEER. 2007. Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environ. Microbiol.*, 9 (6): 1384-1392.
- ABREU, PC, C ODEBRECHT & A GONZÁLEZ. 1994. Particulate and dissolved phytoplankton production of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: comparison of methods and influencing factors. *J. Plankton Res.*, 16 (7): 737-753.
- ALFINITO, S. 2011. A check list of the freshwater algal flora of Sierra Leone, Tropical West Africa. I. Cyanophyceae to Conjugatophyceae (exclusive of Bacillariophyceae). *Biodivers. Journal.*, 2 (3): 121-144.
- ALLAKHVERDIEV, SI, & N MURATA. 2008. Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, 98:529–539.
- ANDERSON, DM. 2005. The ecology and oceanography of harmful algal blooms multidisciplinary approaches to research and management. *IOC Technical Series 74*, UNESCO 2007.
- APSE, MP & E BLUMWALD. 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Plant. Biotechnol.*, 13: 146-150.
- ARAÚJO, EDCH. 2005. Fatores ambientais que colaboram para a ocorrência de cianobactérias nas águas ao redor da cidade de Rio Grande-(RS). Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica), Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 112p.

- BALDIA, SF, AD EVANGELISTA, EV ARALAR & AE SANTIAGO. 2007. Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines. *J. Appl. Phycol.*, 19: 607–613.
- BAUMGARTEN, MGZ. 2010. A eutrofização das águas de uma enseada do estuário da Lagoa dos Patos (RS) protegida pela legislação ambiental. *Fepam em Revista*, 3 (2): 34-42.
- BÁRBARA, I, J CREMADES, S CALVO, MC LÓPEZ-RODRIGUEZ * J DOSILS. Checklist of the benthic marine and brackish Galician algae (NW Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid.*, 62(1):69-100.
- BARNET, YM, MJ DAFT & WDP STEWART. 1981. Cyanobacteria-cyanophage interactions in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 51: 541-552.
- BERMAN-FRANK, I, P LUNDGREN & P FALKOWSKI. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.*, 154:157-164.
- BROWN, AD. 1976. Microbial Water Stress. *Bacteriol. Rev.*, 40(4): 803-846.
- BURBAGE, CD, & BJ BINDER. 2007. Relationship between cell cycle and light-limited growth rate in oceanic *Prochlorococcus* (MIT 9312) and *Synechococcus* (WH8103) (Cyanobacteria). *J. Phycol.*, 43: 266–274.
- CARILLO, P, D PARISI, P WOODROW, G PONTECORVO, G MASSARO, MG ANNUNZIATA, A FUGGI & R SULPICE. 2011. Salt-induced accumulation of glycine betaine is inhibited by high light in durum wheat. *Functional Plant Biology*, 38: 139-150.

CARMICHAEL, WW. 2001. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 7(5): 1393-1407.

CHAKDAR, H & S PABBI. 2012. Extraction and purification of Phycoerythrin from *Anabaena variabilis* (CCC421). *Phycol. Soc.*, 42 (1):25-31.

CHORUS, I & J BARTRAM. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London. 400p.

CHU, Z, X JIN, N IWAMI & Y INAMORI. 2007. The effect of temperature on growth characteristics and competitions of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria mougeotii* in a shallow, eutrophic lake simulator system. *Hydrobiologia.*, 581:217-223.

CLELAND, JL, L ROBERT. 1993. Formulation and delivery of proteins and peptides. National Meeting of the American Chemical Society, Denver.

COLES, J & RC JONES. 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J. Phycol.*, 36: 7-16.

COSTA, JAV, LM Colla, PD Filho, K Kabke & A Weber. 2002. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 603–607.

COUTINHO, R & U SEELIGER. 1984. The horizontal distribution of the benthic algal flora in the Patos Lagoon Estuary, Brazil, in relation to salinity, substratum and wave exposure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 10: 247-257.

CROWE, JH, FA HOEKSTRA & L CROWE. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 54: 574-599.

CURATTI, L, E FLORES & G SALERNO. 2002. Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. *FEBS Lett.*, 513: 175-178.

DASEY, M, N RYAN, J WILSON, G MCGREGOR, L FABBRO, BA NEILAN, BP BURNS, H KANKAANPÄÄ, LF MORRIS, GA CODD, D RISK & L BOWLING. 2005. Investigation into the taxonomy, toxicity and ecology of benthic cyanobacterial accumulations in Myall Lake, Australia. *CSIRO.*, 56: 1-11.

DE LORENZO, M. 1995. Relação de nutrientes e de fatores ambientais na ocorrência de cianobactéria *Aphanothece* sp. ao redor da cidade de Rio Grande. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia), Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 46p.

DOMIS, LNS, WM MOOIJU & J HUISMAN. 2007. Climate-induced shifts in an experimental phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hydrobiologia.*, 584: 403-413.

DOR, I, & M HORNOFF. 1985. Salinity-temperature relations and morphotypes of a mixed population of coccoid cyanobacteria from a hot, hypersaline pond in Israel. *Mar. Ecol.*, 6 (1): 13-25.

ELLIOTT, JA, ID JONES & SJ THACKERAY. 2006. Testing the sensitivity of phytoplankton communities to changes in water temperature and nutrient load, in a temperate lake. *Hydrobiologia.*, 559: 401-411.

ELSER, JJ, K ACHARYA, M KYLE, J COTNER, W MAKINO, T MARKOW, T WATTS, S HOBBIE, W FAGAN, J SCHADE, J HOOD & RW STERNER. 2003. Growth rate–stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecol. Lett.*, 6: 936–943.

ERDMANN, N, S FULDA & M HAGEMANN. 1992. Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 363-368.

ERDMANN, N & M HAGEMANN. 2001. Salt acclimation of algae and cyanobacteria: a comparison. In: Rai, LC & JP Gaur (ed.). *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Ed. Springer, Berlin, Chap.11: 323-361.

FALKOWSKI, PG. 2000. Rationalizing elemental ratios in unicellular. *J. Phycol.*, 36:3-6.

FERNADEZ, EHL, IO MONTEIRO, OO MÜLLER. 2009. On the Dynamics of Mangueira Bay—Patos Lagoon (Brazil). *J. Coastal Res.*, 47: 96-101.

FU, FX & PRF BELL. 2003. Effect of salinity on growth, pigmentation, N₂ fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 257: 69-76.

FU, FX, ME WARNER, Y ZHANG, Y FENG & DA HUTCHINS. 2007. Effects of increased temperature and CO₂ photosynthesis growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *J. Phycol.*, 43: 485–496.

FULDA, S, J HUCKAUF, A SCHOOR & M HAGEMANN. 1999. Analysis of stress responses in the cyanobacterial strains *Synechococcus* sp. PCC 7942,

Synechocystis sp. PCC 6803, and *Synechococcus* sp. PCC 7418: osmolyte accumulation and stress protein synthesis. *J Plant Physiol.*, 154: 240-249.

GARCIA, MA, MB RASEIRA, JP VIEIRA, KO WINEMILLER, AG GRIMM. 2003. Spatiotemporal variation in shallow-water freshwater fish distribution and abundance in a large subtropical coastal lagoon. *Environ. Biol. Fish.*, 68: 215-268.

GARCIA-PICHEL, F, J BELNAP, S NEUER & F SCHANZ. 2003. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algological Stud.*, 109: 213-227.

GEIDER, RJ, & JL ROCHE. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.*, 37: 1-17.

GHAZALA, B, B NAILA & M SHAMEEL. 2010. Fatty acids and biological activities of crude extracts of freshwater algae from Sindh. *Pak. J. Bot.*, 42(2): 1201-1212.

GOH, F, KD domi, BP BURNS, BA NEILAN. 2010. Identification and regulation of novel compatible solutes from hypersaline stromatolite-associated cyanobacteria. *Arch. Microbiol.*, 192: 1031-1038.

GOLUBIC, S. 1980. Halophily and halotolerance in cyanophytes. *Origins Life Evol. Biosphere*, 10:169-183.

HAGEMANN, M, N ERDMANN & E WITTENBURG. 1987. Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. *Arch. Microbiol.*, 148: 275-279.

HAGEMANN, M, R JEANJEAN, S FULDA, M HAVAUX, F JOSET & N ERDMANN. 1999. Flavodoxin accumulation contributes to enhanced cyclic electron flow around photosystem I in salt-stressed cells of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Physiol. Plant.*, 105: 670-678.

HAGEMANN, M. 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev.*, 35: 85-123.

HALDER, N & SN SINHA. 2013. Some new records of the species of the genera *Aphanothece* NAG and *Merismopedia* MEYEN from Hooghli District, West Bengal, India. *Ind. Jour. of Plant Sciences.*, 2(3): 58-65.

HALL, SR, VH SMITH, DA LYTLE & MA LEIBOLD. 2005. Constraints on primary producer on primary producer N:P stoichiometry along N:P supply ratio gradients. *Ecology.*, 86(7): 1894-1904.

HALLEGRAEFF, GM. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia.*, 32 (2): 79-99.

HENSE, I. 2007. Regulative feedback mechanisms in cyanobacteria-driven systems: a model study. *Mar. Ecol-Prog. Ser.*, 339:41-47.

HOFFMANN, D, J KOMÁREK & J KASTOVSKY. 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria)- state in 2004. *Algolog. Stud.*, 117: 95-115.

HUDNELL, HK. 2008. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Ed. Springer, Durham. 949p.

HUISMAN, J & FD HULOT. 2005. Population dynamics of harmful cyanobacteria: Factors affecting species composition. In: Huisman, J, HCP

Matthijs & PM Visser (ed.). Harmful Cyanobacteria, Ed. Springer, Netherlands, Chap. 7: 143–176.

JACOB-LOPES, E & TT FRANCO. 2013. From oil refinery to microalgal biorefinery. *Journal of CO2 Utiliz.*, 2: 1-7.

JÖHNK, KD, J HUISMAN, J SHARPLES, B SOMMEIJER, PM VISSER & J STROOM. 2008. Summer heat waves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob. Change Biol.*, 14, 495–512.

KARSTEN, U. 1996. Growth and organic osmolytes of geographically different isolates of *Microcoleus chthonoplastes* (Cyanobacteria) from benthic microbial mats: response to salinity change. *J. Phycol.*, 32:501-506.

KEBEDE, E. 1997. Response of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *J. Appl. Phycol.*, 9: 551–558.

KELLER, MD, RP KIENE, PA MATRAI & WK BELLOWS. 1999. Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. I. Batch cultures. *Mar. Biol.*, 135: 237: 248.

KLÄHN, S & M HAGEMANN. 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, 13(3): 551-562.

KLAUSMEIER, CA, E LITCHMAN, T DAUFRESNE & SA LEVIN. 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 429: 171-174.

KOMÁREK, J & K ANAGNOSTIDIS. 1999. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H, G GÄRTNER, H HEYNIG & D MOLLENHAUER (ed.). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer Verlag, Jena. 548p.

KOMÁREK, J. 2006. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae*, 21(4): 349-375.

KONOPKA, A, & TD BROCK. 1978. Effect of temperature on blue-green algae (Cyanobacteria) in Lake Mendota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(4): 572-576.

LANDE, R & MR LEWIS. 1989. Models of photoadaptation and photosynthesis by algal cells in a turbulent mixed layer. *Deep-Sea Research.*, 36(8): 1161-1175.

LEVERING, PR, DJ BINNEMA, JP DIJKEN & W HARDER. 1981. Enzymatic evidence for a simultaneous operation of two one-carbon assimilation pathways during growth of *Arthrobacter* P1 on choline. *FEMS Microbiol. Lett.*, 12:19-25.

LEVINE, SN & DW SCHINDLER. 1999. Influence of nitrogen to phosphorus supply ratios and physicochemical conditions on cyanobacteria and phytoplankton species composition in the Experimental Lakes Area, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56: 451-466.

LOBO, FL, CC BARBOSA, EMMIL NOVO & JS YUNES. 2009. Mapping potential cyanobacterial bloom using Hyperion/EO-1 data in Patos Lagoon estuary. *Acta Limnol. Bras.*, 21(3): 299- 308.

LOURENÇO, SO. 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. RiMa, São Carlos. 606p.

LU, C & A VONSHAK. 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol. Plantarum.*, 114: 405-413.

LURLING, M, F ESHETU, EJ FAASSEN, S KOSTEN, & VLM HUSZAR. 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58: 552–559.

MACKAY, MA, RS NORTON & LJ BOROWITZKA. 1983. Marine blue-green algae have a unique osmoregulatory system. *Mar. Biol.*, 73: 301-307.

MACKAY, MA, RS NORTON & LJ BOROWITZA. 1984. Organic Osmoregulatory Solutes in Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2177-2191.

MACKAY, RMK, A PAYTAN, K CALDERA, AR GROSSMAN, D MORAN, M MCLLVIN & MA SAITO. 2013. Effect of temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiol.*, 163: 815-819.

MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140:315-322.

MADIGAN, MT, JM MARTINKO, PV DUNLAP & DP CLARK. 2010. Microbiologia de Brock. 12. Ed. Artmed, Porto Alegre. 1128p.

MARTINS, LO & H SANTOS. 1995. Accumulation of manosylglycerate and di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(9): 3299–3303.

MARTINS,MD, LHZ BRANCO & VR WERNER. 2012. Cyanobacteria from coastal lagoons of Southern Brazil: coccoid organisms. *Brazilian Journal of Botany.*, 35(1): 31-48.

MARTINY, AC, CTA PHAM, FW PRIMEAU, JA VRUGT, JK MOORE, SA LEVIN & MW LOMAS. Strong latitudinal patterns in the elemental ratios of marine plankton and organic matter. *Nat. Geo.*, 6: 279-283.

MCFADDEN, GI. 2001. Chloroplast Origin and integration. *Plant Physiol.*, 125(1): 50-53.

MELO, RS. 2008. Avaliação da utilização de exopolissacarídeos de cianobactérias como fonte de inibidores na formação do biofilme bacteriano. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Bioquímica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 106p.

MELO, RS, MHCB NEVES & OR BAPTISTA. 2011. Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, 1849. *Acta Bot. Brasil.*, 25(1): 234-240.

MIAO, X, Q WU, G WU & N ZHAO. 2006. Sucrose accumulation in salt-stressed cells of agp gene deletion-mutant in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218: 71-77.

MILLER, DM, JH JONES, JH YOPP, DR TINDALL & WE SCHMID. 1976. Ion metabolism in a halophilic blue-green alga, *Aphanothece halophytica*. *Arch. Microbiol.*, 11: 145- 149

MOISAN, JR, TA MOISAN & MR ABBOTT. 2002. Modelling the effect of temperature on the maximum growth rates of phytoplankton populations. *Ecol. Model.*, 153:197-215.

MOISANDER, PH, E MCCLINTON III & HW PAERL. 2002. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb. Ecol.*, 43: 432-442.

MOLITOR, V, W ERBER & GA PESCHEK. 1986. Increased levels of cytochrome oxidase and sodium-proton antiporter in the plasma membrane of *Anacystis nidulans* after growth in sodium-enriched media. *FEBC Letters*, 204(2): 251-256.

MUR, LR, OM SKULBERG & H UTKILEN. 1999. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I & J BARTRAM (ed.). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, Chap. 2: 25-54.

MURATA, N. 1989. Temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioener. Biomem.*, 21(1): 61-75.

NGUYEN, QT, M OKAJIMA, T MITSUMATA, K KAN, HT TRAN & T KANEKO. 2012. Trivalent metal-mediated gelation of novel supergiant sulfated polysaccharides extracted from *Aphanothece stagnina*. *Colloid. Polym. Sci.*, 290:163–172.

NIKKINEN, HL, K HAKKILA, L GUNNELIUS, T HUOKKO, M POLLARI & T TYYSTJÄRVI. 2012. The SigB σ factor regulates multiple salt acclimation responses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant. Physiol.*, 158: 514-523.

NÕGES, T, R LAUGASTE, P NÕGES, I TÕNNO. 2008. Critical N:P ratio for cyanobacteria and N₂-fixing species in the large shallow temperate lakes Peipsi and Vortsjarv, North-East Europe. *Hydrobiologia.*, 599: 77-86.

O'NEIL, JM, TW DAVIA, MA BURFORD & CJ GOBLER. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae.*,14:313-334.

OREN, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Bio. R.*, 63(2): 334-348.

OREN, A. 2012. Salts and brines. In: WHITTON, BA & M POTTS (ed.). Introduction to the Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Ed. Springer, New York, Chap. 15: 401-426.

PAERL, HW, RS FULTON, PH MOISANDER & J DIYBLE. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World.*,1: 76-113.

PAERL, HW & RS FULTON. 2006. Ecology of Harmful Cyanobacteria. In: GRANÉLI, E & JT TURNER (ed.). Ecology of Harmful Algae. Ed. Springer, Berlin. Chap. 8: 95-109.

PAERL, HW & J HUISMAN. 2008. Blooms like it hot. *Science*, Volume 320.

PAERL, HW & J HUISMAN. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol.*, 1(1): 27-37.

PAGE-SHARP, M, CA BEHM, GD SMITH. 1998. Cyanophycin and glycogen synthesis in a cyanobacterial *Scytonema* species in response to salt stress. *FEMS Microbiol. Lett.*, 160: 11-15.

PAGE-SHARP, M, CA BEHM & GD SMITH. 1999. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils. *Biochem. Biophys. Acta*, 1472: 519-528.

PARKER, DL, HD KUMAR, LC RAI & JB SINGH. 1997. Potassium salts inhibit growth of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in pond water and defined media: implications for control of Microcystin-producing aquatic blooms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6): 2324–2329.

PEROVICH, G. 2008. Causes, Prevention, and Mitigation Workgroup Report. In: HUDNELL, HK (ed.). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Ed. Springer, Durham. Chap. 9: 185-215.

PIEDRAS, FR. 2007. Liberação de polissacarídeos extracelulares por *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiaceae) em função do crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. Dissertação de Mestrado (Biologia de Ambientes Aquáticos e Continentais), Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. 37p.

QUEIROZ, MI, EJ LOPES, LQ ZEPKA, GB REINALDO, R GOLDBECK. 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technol.*, 98: 2163–2169.

QUEIROZ, MI, MO HORNES, AG SILVA-MANETTI & JACOB-LOPES. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Appl. Energ.*, 88: 3438-3443.

RAFIQL, IM, A HASSAN, G SULEBELE, CA OROSCO, P ROUSTAIAN & KCA JALAL. 2003. Salt stress culture of blue-green algae *Spirulina fusiformis*. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 6(7): 648-650.

RAI, AK. 1990. Biochemical characteristics of photosynthetic response to various external salinities in halotolerant and freshwater cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69: 177-180.

RATKOWSKY, DA, RK LOWRY, TA McMEEKIN, AN STOKES & RE CHANDLER. 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.*, 157(3): 1222-1226.

RAVEN, JA & JF ALLEN. 2003. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.*, 4(3):209.

REDFIELD, AC. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Scient.*, 46 (3): 205- 221.

REED, RH & WDP STEWART. 1983. Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar.Biol.*,88: 1-9.

REED, RH, DL RICHARDSON, SRC WARR & WDP STEWART. 1984. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1-4.

REED, RH, SRC WARR, NW KERBY & WDP STEWART. 1985. Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from freeliving and immobilized cyanobacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, 8: 101-104.

REED, RH, LJ BOROWITZKA, MA MACKAY, JA CHUDEK, R FOSTER, SRC WARR, DJ MOORE & WDP STEWART. 1986. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev.*,39: 51-56.

RENAUD, RM, LV THINH, GLAMBRINIDIS & DL PARRY. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquacul.*, 211: 195-214.

REYNOLDS, CS & AE WALSBY. 1975. Water-blooms. *Biol. Rev.*, 50: 437-481.

RIPPKA, R, J DERUELLES, JB WATERBURY, M HERDMAN & RY STANIER. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen Microbiol.*,111: 1-61.

ROBERT, RD & T ZOHARY. 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zeal. J. Mar. Fresh.*, 21: 391-399.

ROHATGI, A & SP SIGH. 1979. Isolation and characterization of pigment mutants of the blue-green alga *Aphanothece stagnina*. *Mol. Gen. Genet.*, 169: 59-62.

SAKAMOTO, A & N. MURATA. 2002. The role of betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. 25:163-171.

SAKER, ML & DJ GRIFFITHS. 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycol.*, 39 (4), 349-354.

SALOMON, PS, JS YUNES, A MATTHIENSEN & GA COOD. 2001. Does salinity affect the toxin content of an estuarine strain of *Microcystis aeruginosa*? *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*, 16:537-548.

SCHINDLER, DW. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science.*, 195 (4275): 260-262.

SENTHILKUMAR, T & S JEYACHANDRAN. 2006 Effect of salinity stress on the marine cyanobacterium *Oscillatoria acuminata* Gomont with reference to proline accumulation. *Seaweed Res. Utiln.*, 28(1): 99-104.

SILVA E SILVA, LH, RCS HAYAKAWA, AAC IESPA, CMD IESPA, DO DELFINO & FAS LOPES. 2007. Cianobactérias planctônicas da Lagoa Pitanguinha, RJ, Brasil. *Rev. biociên.*, 13(12): 63-70.

SILVA E SILVA, LH, SAPMN ALVES, FC MAGINA, SBVC GOMES, DO DELFINO & FAZ LOPES. 2011. Determinação das cianobactérias de subsuperfície de sedimentos marginais do Brejo do Pau Fincado do Complexo Lagunar de Araruama, RJ, Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências UFRJ*, 34(2): 14-23.

SINGH, PK. 1973. Nitrogen fixation by the unicellular blue-green alga *Aphanothece*. *Arch. Microbiol.*, 92: 59-62.

SINGH, PK. 1977. Growth and nitrogen fixation of unicellular blue-green alga *Aphanothece castagnei*. *Biol. Plantarum*, 19 (2) : 156-157.

SINGH, MPVV, SM PRASAD & M SINGH. 2013. Cadmium induced photoinhibition of photosynthesis in cyanobacterium *Aphanothece stagnina* grown under various concentrations of nitrogen and phosphorus. *J. Biol. Chem. Research.*, 30(1): 289-295.

SMITH, LT, JA POCARD, T BERNARD & D RUDULIER. 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 170 (7): 3142-3149.

STAL, L & R MOEZELAAR. 1997. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21(2): 179-211.

STAL, L. 2012. Cyanobacterial Mats and Stromatolites. In: WHITTON, BA & M POTTS (ed.). Introduction to the Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Ed. Springer, New York. Chap. 4: 65-115.

SUGINO, M, T HIBINO, Y TANAKA, N NII, T TAKABE & T TAKABE. 1999. Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Science.*, 137: 81-88.

SUZUKI, Y & M TAKAHASHI. 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *J. Phycol.*, 31:880-888.

TANG, D, S SHI, D LI, C.HU & Y LIU. 2007. Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. *J. Arid Environ.*, 71: 312-320.

TAVERA, R, E NOVELO & S LÓPEZ. 2013. Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) in Karst environments in Yucatán, México. *Botan. Sciences.*, 91(1): 27-52.

TEL-OR, E, S SPATH, L PACKER & RJ MEHLHORN. 1986. Carbon-13 NMR Studies of Salt Shock-Induced Carbohydrate Turnover in the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant Physiol.*, 82: 646-652.

TILMAN, D, SS KILHAN & P KILHAM. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 13:349-372.

TORTORA, GJ, BR FUNKE & CL CASE. 2013. Microbiology: an introduction. Pearson, Boston. 975p.

TSUJIMURA, S. 2003. Application of the frequency of dividing cells technique to estimate the in situ growth rate of *Microcystis* (Cyanobacteria). *Freshwater Biology*, 48, 2009–2024.

TUCKER, S, & P POLLARD. 2005. Identification of Cyanophage Ma-LBP and Infection of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian Subtropical Lake by the Virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2): 629-635.

ULITZUR, S. 1974. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. Short Generation-Time Marine Bacteria. *Microbial Ecol.*, 1: 127-135.

VISKARI, PJ & CL COLYER. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Anal Biochem.*, 319 (2): 263-271.

WADITEE, R, Y TANAKA, K AOKI, T HIBINO, H JIKUYA, J TAKANO, T TAKABE & T TAKABE. Isolation and functional characterization of *N*-methyltransferases that catalyze betaine synthesis from glycine in a halotolerant photosynthetic organism *Aphanothece halophytica*. *The Journ. of Biolog. Chem.*, 278(7): 4932–4942.

WARR, SRC, RH REED, JA CHUDEK, R FOSTER & WDP STEWART. 1985. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta.*, 163:424-429.

WERNER, VR. 2002. Cyanophyceae/Cyanobacteria no Sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas), Univesidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil,362p.

WESTHUIZEN, AJ, & JN ELOFF. 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 163:55-59.

WHITTON, BA & M POTTS. 2012. Introduction to the Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Ed. Springer, New York. 749p.

YUNES, JS, A MATTHIENSEN, M PARISE, PS SALOMON, SL RAGGETT, KA BEATTIE & GA COOD. 1998. *Microcystis Aeruginosa* growth stages and the occurrence off microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. *Harmful Algae.*, 19-21.

ZAR, JH. 2010. Biostatistical analysis.50 Ed.Pearson,New Jersey.944 p.

ZENG, MT & A VONSHAK. 1998. Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comp. Biochem. Physiology. A: Physiology* 120: 113-118.

ZEPKA, LQ, JACOB-LOPES, E, GOLDBECK, R, SOUZA-SOARES,LA & QUEIROZ, MI. 2010. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Biosesource Technol.*, 101:7107-7111.

ZHANG, Y, X QIUJIN & B XI. 2013. Effect of NaCl salinity on the growth, metabolites, and antioxidant system of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecol.*, 28 (4): 477-487.

ZHENG , W, C CHEN, Q CHENG, Y WANG, C CHU. Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, 6: 1093-1099.

APÊNDICE I

APÊNDICE I – Classificação para os organismos referentes às concentrações de salinidades.

CLASSIFICAÇÃO	DEFINIÇÃO
Talassohalino ^{a*}	Possuem concentração iônica semelhante a da água do mar.
Atalassohalino ^{a*}	Possuem concentração iônica extremamente diferente a da água do mar.
Halofílico ^a	Requerem elevada salinidade para o crescimento.
Halotolerante ^a	Apesar de não necessitarem de uma alta salinidade para o crescimento, elas crescem em salinidades elevadas.
Estenoalino ^b	Adaptados a viver em uma estreita variação de salinidade.
Eurialino ^b	Adaptados a viver em uma ampla variação de salinidade.
Oligohalino ^b	Possuem um crescimento ótimo em baixas salinidades.
Mesohalino ^b	Possuem um crescimento ótimo em salinidades intermediárias.
Polihalino ^b	Possuem um crescimento ótimo em salinidade elevadas.

^aTermos derivados de Oren (2012) ; ^bTermos derivados de Golubic (1980); * classificação não utilizada no presente trabalho.

APÊNDICE II

APÊNDICE II- Tabela com os meios de cultivo utilizados em todos os experimentos, pH entre 7,4 – 7,6 e aferido até 1litro.

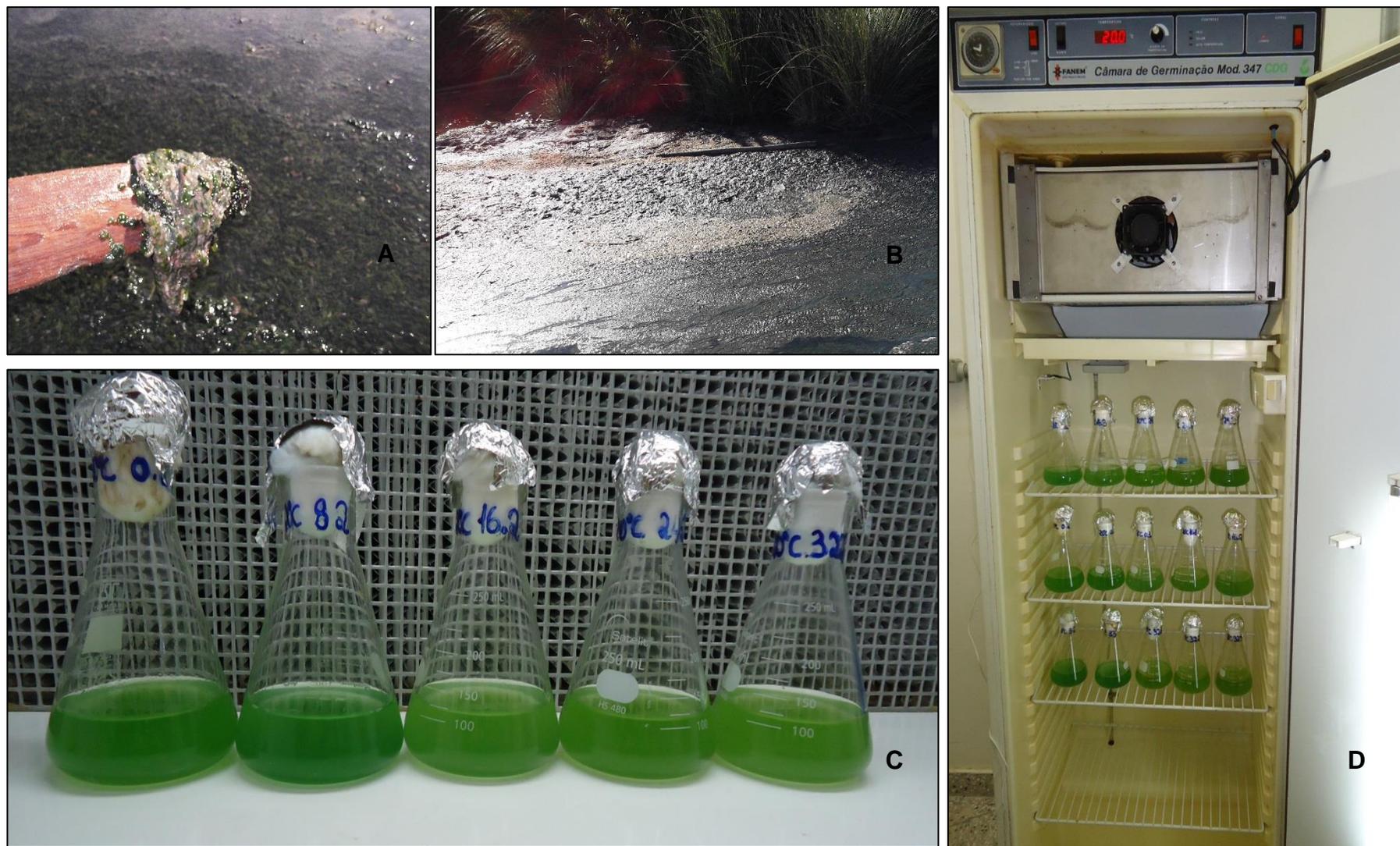
SAIS	BG-11 (Ripka1947)	BGN/3* (SAL.0) ±16:1	BGN/3* SAL.8	BGN/3* SAL.16	BGN/3* SAL.24	BGN/3* SAL.32	N:P 5:1**	N:P 20:1**	N:P 40:1**	N:P 100:1**
K₂HPO₄ (30g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
MgSO₄.7H₂O (75 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
CaCl₂. 2H₂O (36 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Citrato de amônio férico (6 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Na₂ EDTA 1 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Ácido cítrico (6 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Na₂CO₃ (20 g.L⁻¹)	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
NaNO₃ (150 g.L⁻¹)	-	3,33mL	3,33mL	3,33mL	3,33mL	3,33mL	1mL	4mL	8mL	20mL
Sal marinho não iodado	-	-	8 g.L ⁻¹	16 g.L ⁻¹	24 g.L ⁻¹	32 g.L ⁻¹	-	-	-	-
Metais Traços **	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

* BGN/3: Meio BG-11 modificado em relação à concentração de nitrato (NaNO₃), com razão N:P=16:1 e salinidade zero.

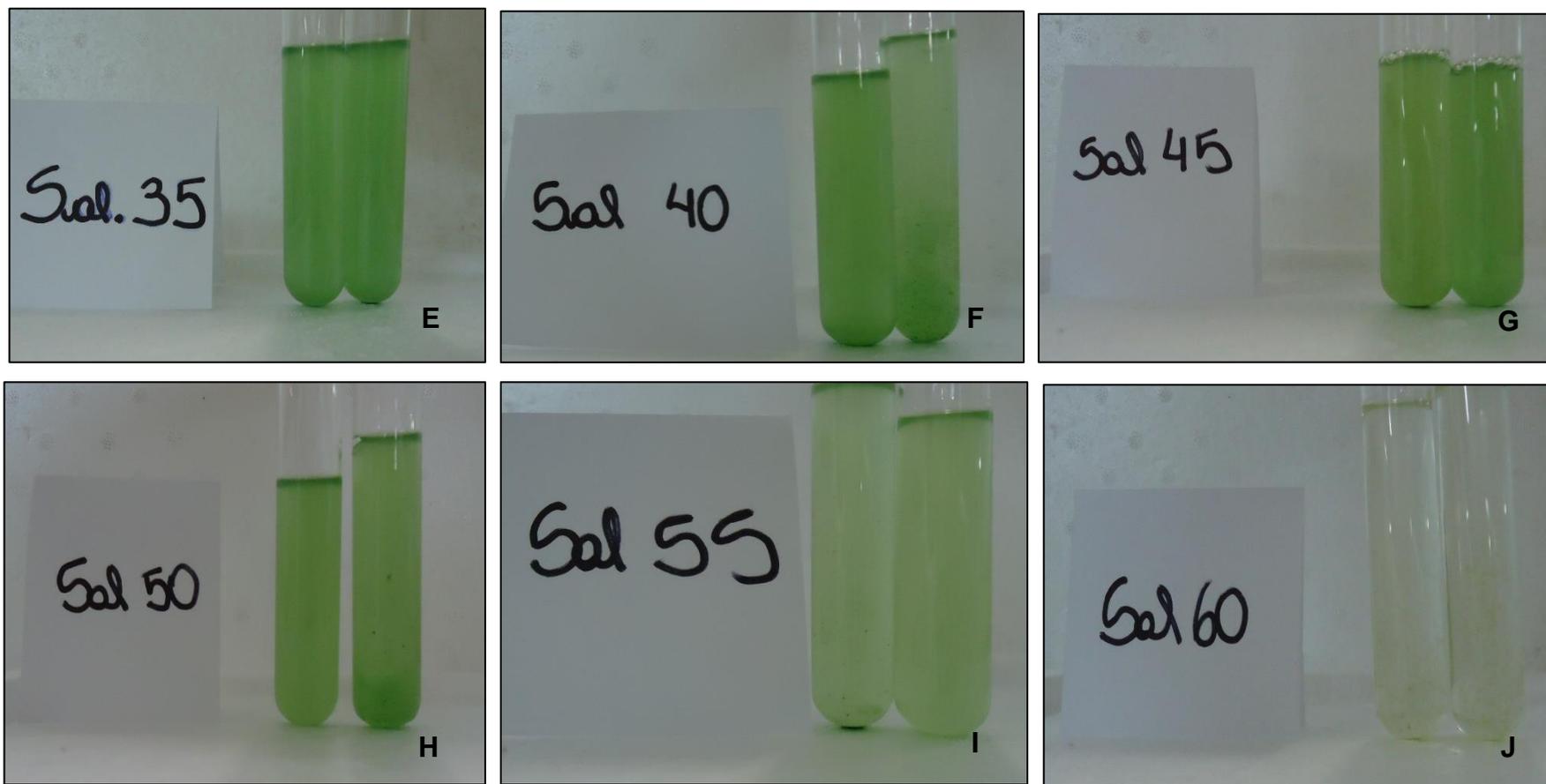
** Meio BG-11 modificado em relação às razões N:P, com salinidade zero.

*** Metais Traços: 0,222 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 1,81 g.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O; 0,39 g.L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,079 g.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; 0,04 g.L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O; 2,86 g.L⁻¹ de H₃BO₃.

APÊNDICE III



Figuras A e B: Imagens das florações de *Aphanothece* em enseadas do estuário da Lagoa dos Patos. (FOTOS: Pablo Guimarães- Aluno de Doutorado do PPGOFQG- FURG). Figuras C e D: Imagens do experimento nas diferentes salinidades a 20°C com *Aphanothece stagnina* (FONTE: Autora, 2014).



Figuras E-J: Imagens do experimento de aclimação das salinidades que variaram de 35 a 60, sendo o crescimento observado desde a salinidade 35 até 55 (FONTE: AUTORA, 2014).

APÊNDICE IV

APÊNDICE IV- Tabela com os valores de densidade celular ($\text{cel.mL}^{-1} \times 10^4$) no experimento a temperatura 12°C.

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
0	1,28 ± 0,037 ^{aA}	1,25 ± 0,059 ^{aA}	1,25 ± 0,003 ^{aA}	1,27 ± 0,015 ^{aA}	1,26 ± 0,004 ^{aA}
2	1,33 ± 0,016 ^{abA}	1,27 ± 0,008 ^{aA}	1,27 ± 0,006 ^{abA}	1,28 ± 0,011 ^{aA}	1,28 ± 0,018 ^{abA}
4	1,36 ± 0,014 ^{bcA}	1,27 ± 0,020 ^{aB}	1,28 ± 0,017 ^{abB}	1,28 ± 0,021 ^{abB}	1,28 ± 0,031 ^{abB}
6	* 1,77 ± 0,045 ^{dA}	* 1,49 ± 0,020 ^{bB}	1,34 ± 0,027 ^{bcC}	1,37 ± 0,020 ^{bC}	1,34 ± 0,007 ^{bcC}
8	* 2,67 ± 0,101 ^{eA}	* 1,60 ± 0,026 ^{cB}	1,44 ± 0,010 ^{cdC}	1,48 ± 0,017 ^{cC}	1,40 ± 0,016 ^{cC}
10	* 3,93 ± 0,145 ^{fA}	* 2,57 ± 0,079 ^{dB}	1,64 ± 0,020 ^{eC}	* 1,69 ± 0,032 ^{dC}	* 1,58 ± 0,018 ^{dC}
12	* 7,60 ± 0,250 ^{gA}	* 4,44 ± 0,140 ^{eB}	* 3,03 ± 0,028 ^{fC}	* 1,97 ± 0,040 ^{eD}	* 1,71 ± 0,005 ^{eE}
14	* 9,11 ± 0,114 ^{hA}	* 5,41 ± 0,219 ^{fB}	* 3,57 ± 0,058 ^{gC}	* 2,32 ± 0,021 ^{fD}	* 2,30 ± 0,026 ^{fD}
16	* 10,45 ± 0,150 ^{iA}	* 6,45 ± 0,162 ^{gB}	* 5,17 ± 0,119 ^{hC}	* 2,56 ± 0,034 ^{gD}	* 2,54 ± 0,030 ^{gD}
18	* 12,84 ± 0,225 ^{jA}	* 7,69 ± 0,181 ^{hB}	* 6,66 ± 0,123 ^{iC}	* 3,25 ± 0,019 ^{hD}	* 2,83 ± 0,040 ^{hD}
20	13,44 ± 0,452 ^{jA}	7,96 ± 0,100 ^{hB}	* 7,19 ± 0,120 ^{jC}	* 3,89 ± 0,084 ^{iD}	* 3,42 ± 0,050 ^{iE}
22	13,56 ± 0,464 ^{jA}	7,97 ± 0,075 ^{hB}	7,46 ± 0,075 ^{jB}	3,95 ± 0,045 ^{iC}	3,46 ± 0,071 ^{iE}
24	13,72 ± 0,630 ^{jA}	8,02 ± 0,076 ^{hB}	7,47 ± 0,0381 ^{jC}	3,96 ± 0,055 ^{iD}	3,54 ± 0,104 ^{iE}

As letras minúsculas são as diferenças significativas entre os dias. As letras maiúsculas são diferenças significativas entre as salinidades.

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE IV- Tabela com os teores de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) no experimento a temperatura 12°C.

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
1	61,46 ± 5,69	58,94 ± 9,13	56,83 ± 5,05	54,73 ± 5,25	54,30 ± 1,26
2	60,20 ± 4,43	60,20 ± 4,78	56,41 ± 1,92	54,30 ± 3,34	55,99 ± 1,45
3	62,72 ± 6,35	60,62 ± 8,84	61,46 ± 6,95	59,36 ± 5,50	56,83 ± 1,26
4	67,78 ± 6,95	60,20 ± 6,48	61,88 ± 5,78	60,62 ± 5,50	60,62 ± 2,18
5	71,99 ± 14,06	64,41 ± 9,53	63,57 ± 6,23	59,36 ± 5,05	58,09 ± 2,18
6	* 76,62 ± 3,17	* 72,41 ± 7,18	63,99 ± 8,40	59,78 ± 1,45	59,36 ± 2,52
7	* 91,35 ± 10,20	* 77,04 ± 7,03	65,25 ± 8,01	58,09 ± 2,18	61,04 ± 2,62
8	* 124,19 ± 5,10	* 79,56 ± 3,34	67,78 ± 16,81	59,78 ± 2,62	61,04 ± 3,85
9	* 157,45 ± 10,20	* 89,67 ± 2,52	66,93 ± 6,68	63,99 ± 5,10	62,30 ± 5,83
10	* 183,13 ± 2,17	* 116,61 ± 16,81	67,36 ± 10,59	* 66,93 ± 1,26	* 63,15 ± 1,26
11	* 186,92 ± 17,82	* 125,45 ± 3,17	83,77 ± 5,25	* 69,88 ± 1,92	* 67,36 ± 1,45
12	* 210,50 ± 15,79	* 140,19 ± 12,43	* 95,14 ± 7,40	* 71,57 ± 2,62	* 68,20 ± 2,18
13	* 244,18 ± 5,69	* 152,40 ± 7,40	* 111,14 ± 3,34	* 73,25 ± 1,26	* 73,25 ± 1,26
14	* 271,96 ± 10,88	* 170,50 ± 10,02	* 121,24 ± 3,34	* 81,25 ± 1,48	* 76,20 ± 1,45
15	* 298,06 ± 8,28	* 194,50 ± 13,36	* 132,61 ± 9,10	* 87,98 ± 1,45	* 82,93 ± 1,92
16	* 305,64 ± 8,28	* 215,55 ± 9,47	* 151,13 ± 6,48	* 90,51 ± 0,72	* 87,98 ± 1,92
17	* 314,06 ± 7,91	* 222,70 ± 7,71	* 177,24 ± 7,71	* 104,82 ± 2,52	* 95,56 ± 1,92
18	* 315,32 ± 5,69	* 229,44 ± 7,40	* 183,13 ± 9,53	* 114,51 ± 5,69	* 98,09 ± 0,72
19	318,27 ± 5,50	226,91 ± 4,78	* 192,39 ± 7,18	* 121,66 ± 4,78	* 106,09 ± 2,52
20	322,06 ± 6,56	227,76 ± 3,85	* 203,34 ± 6,31	* 134,29 ± 1,92	* 117,88 ± 2,91
21	323,32 ± 7,03	227,34 ± 5,50	207,55 ± 3,85	135,14 ± 2,18	119,98 ± 5,05
22	324,59 ± 9,53	228,60 ± 4,55	206,71 ± 1,92	135,98 ± 5,69	124,61 ± 2,62
23	325,85 ± 11,22	226,49 ± 5,25	208,81 ± 3,85	139,77 ± 4,78	123,77 ± 3,34
24	328,80 ± 12,26	228,60 ± 3,34	207,55 ± 1,45	139,35 ± 5,96	125,45 ± 1,45
25	325,01 ± 11,73	229,86 ± 7,68	209,65 ± 3,34	141,45 ± 3,34	123,77 ± 3,78

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE V

APÊNDICE V- Tabela com os valores de densidade celular (cel.mL⁻¹ x 10⁴) no experimento a temperatura 20°C

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
0	1,28 ± 0,033 ^{aA}	1,28 ± 0,018 ^{aA}	1,28 ± 0,013 ^{aA}	1,27 ± 0,027 ^{aA}	1,27 ± 0,018 ^{aA}
2	* 1,28 ± 0,022 ^{aA}	1,30 ± 0,030 ^{aA}	1,28 ± 0,017 ^{aA}	1,28 ± 0,014 ^{aA}	1,28 ± 0,017 ^{aA}
4	* 3,62 ± 0,047 ^{bA}	1,30 ± 0,027 ^{aB}	1,26 ± 0,019 ^{aB}	1,28 ± 0,013 ^{aB}	1,27 ± 0,018 ^{aB}
6	* 9,03 ± 0,085 ^{cA}	* 2,49 ± 0,161 ^{bB}	* 1,91 ± 0,027 ^{bC}	1,33 ± 0,018 ^{aD}	1,28 ± 0,041 ^{aD}
8	* 12,52 ± 0,130 ^{dA}	* 3,25 ± 0,109 ^{cB}	* 2,66 ± 0,041 ^{cC}	* 1,97 ± 0,052 ^{bD}	1,95 ± 0,029 ^{bD}
10	* 13,88 ± 0,137 ^{eA}	* 6,68 ± 0,300 ^{dB}	* 4,60 ± 0,129 ^{dC}	* 3,99 ± 0,144 ^{cD}	* 3,92 ± 0,091 ^{cD}
12	* 21,38 ± 0,241 ^{fA}	* 8,40 ± 0,169 ^{eB}	* 5,38 ± 0,153 ^{eC}	* 5,29 ± 0,144 ^{dC}	* 5,17 ± 0,075 ^{deC}
14	21,69 ± 0,246 ^{fA}	* 8,99 ± 0,149 ^{eB}	* 6,88 ± 0,104 ^{fC}	* 5,81 ± 0,082 ^{eD}	* 5,39 ± 0,075 ^{eE}
16	22,01 ± 0,257 ^{fA}	* 10,01 ± 0,118 ^{fB}	* 9,23 ± 0,031 ^{gC}	* 6,65 ± 0,080 ^{fD}	* 6,82 ± 0,166 ^{fD}
18	22,86 ± 0,347 ^{fA}	* 12,31 ± 0,137 ^{gB}	* 10,71 ± 0,257 ^{hC}	* 10,36 ± 0,188 ^{hC}	* 7,67 ± 0,131 ^{ghD}
20	22,84 ± 0,291 ^{fA}	12,69 ± 0,143 ^{gB}	10,98 ± 0,276 ^{hC}	10,72 ± 0,203 ^{hiC}	* 8,22 ± 0,217 ^{hD}
22	22,95 ± 0,101 ^{fA}	12,63 ± 0,026 ^{gB}	11,29 ± 0,144 ^{hC}	11,10 ± 0,075 ^{iC}	11,15 ± 0,061 ^{iC}
24	22,90 ± 0,073 ^{fa}	12,79 ± 0,059 ^{gB}	11,50 ± 0,621 ^{hC}	11,15 ± 0,062 ^{iC}	10,98 ± 0,106 ^{iC}

As letras minúsculas são as diferenças significativas entre os dias. As letras maiúsculas são diferenças significativas entre as salinidades.

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE V- Tabela com os teores de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) no experimento a temperatura a 20°C.

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
1	66,94 ± 5,50	73,25 ± 9,53	63,99 ± 4,06	64,41 ± 4,55	64,83 ± 8,12
2	* 86,73 ± 8,21	74,10 ± 10,20	75,36 ± 3,64	71,15 ± 2,62	69,47 ± 3,34
3	* 100,20 ± 3,17	86,73 ± 3,64	78,31 ± 3,78	74,10 ± 1,92	72,83 ± 5,10
4	* 139,35 ± 6,23	92,62 ± 2,91	85,04 ± 1,92	76,62 ± 1,92	74,10 ± 3,18
5	* 204,61 ± 6,31	106,09 ± 12,04	83,78 ± 2,62	76,20 ± 5,96	80,41 ± 1,93
6	* 265,23 ± 3,34	* 144,82 ± 9,81	* 87,57 ± 5,83	83,36 ± 11,22	84,62 ± 4,38
7	* 299,75 ± 29,27	* 152,40 ± 4,06	* 104,41 ± 10,74	102,72 ± 5,69	91,36 ± 17,88
8	* 312,38 ± 12,65	* 168,40 ± 6,23	* 140,61 ± 8,59	139,77 ± 2,62	95,57 ± 20,46
9	* 364,59 ± 12,65	* 173,45 ± 3,17	* 155,35 ± 10,10	* 153,67 ± 2,62	109,04 ± 13,97
11	* 381,43 ± 4,37	* 182,29 ± 7,18	* 171,35 ± 7,18	* 162,93 ± 7,88	* 138,09 ± 6,96
12	* 393,21 ± 4,06	* 189,45 ± 9,86	* 186,92 ± 12,63	* 187,77 ± 12,46	* 140,19 ± 10,34
13	400,37 ± 2,52	* 227,34 ± 13,18	* 192,40 ± 5,96	* 194,92 ± 8,96	* 165,45 ± 9,11
14	401,21 ± 4,43	* 238,71 ± 10,10	* 197,03 ± 5,05	* 194,92 ± 8,12	* 179,35 ± 5,79
15	405,84 ± 2,62	* 253,02 ± 9,64	* 218,50 ± 9,86	* 195,34 ± 6,95	* 191,56 ± 6,48
16	407,53 ± 5,25	* 274,91 ± 7,18	* 225,66 ± 11,32	* 231,13 ± 3,78	* 201,24 ± 6,48
17	410,48 ± 5,05	* 269,02 ± 1,52	* 233,23 ± 9,64	* 235,76 ± 4,06	* 222,71 ± 12,14
18	414,26 ± 8,28	* 274,49 ± 1,92	* 251,34 ± 8,84	* 249,23 ± 7,71	* 234,50 ± 6,96
19	418,05 ± 11,57	276,60 ± 10,79	264,39 ± 11,03	253,86 ± 7,03	* 237,44 ± 12,05
20	421,84 ± 9,10	277,44 ± 14,19	269,44 ± 7,61	267,34 ± 11,03	* 256,39 ± 7,89
21	422,26 ± 8,21	282,91 ± 13,36	276,18 ± 4,78	272,39 ± 12,26	274,91 ± 12,65
22	426,05 ± 11,46	288,81 ± 12,96	281,23 ± 5,25	271,12 ± 10,13	269,02 ± 7,03
23	426,05 ± 11,46	293,02 ± 10,33	283,75 ± 6,23	279,12 ± 5,78	275,33 ± 8,84
24	419,74 ± 5,69	297,23 ± 9,64	287,96 ± 5,50	281,65 ± 4,55	277,86 ± 7,03
25	425,21 ± 1,92	299,75 ± 5,96	281,65 ± 11,57	276,60 ± 19,07	279,97 ± 2,92

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE VI

APÊNDICE VI- Tabela com os valores de densidade celular (cel.mL⁻¹ x 10⁴) no experimento a temperatura 28°C

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
0	1,50 ± 0,031 ^{aA}	1,36 ± 0,017 ^{aA}	1,38 ± 0,016 ^{aA}	1,38 ± 0,004 ^{aA}	1,36 ± 0,009 ^{aA}
2	* 4,64 ± 0,346 ^{abA}	* 1,50 ± 0,078 ^{aA}	2,57 ± 0,053 ^{aA}	2,57 ± 0,019 ^{aA}	2,60 ± 0,007 ^{aA}
4	* 9,72 ± 0,049 ^{bA}	* 3,56 ± 0,059 ^{aB}	3,34 ± 0,027 ^{aB}	3,22 ± 0,018 ^{aB}	2,59 ± 0,007 ^{aB}
6	* 15,22 ± 0,793 ^{cA}	* 4,63 ± 0,081 ^{bB}	4,44 ± 0,061 ^{aB}	4,45 ± 0,055 ^{aB}	4,52 ± 0,024 ^{abB}
8	* 24,35 ± 0,500 ^{edA}	* 11,48 ± 0,162 ^{cB}	* 10,78 ± 0,640 ^{bB}	* 9,81 ± 0,653 ^{bB}	* 8,50 ± 0,024 ^{bcB}
10	* 38,60 ± 0,184 ^{efA}	* 17,76 ± 0,150 ^{dB}	* 13,84 ± 1,108 ^{bB}	* 11,68 ± 0,808 ^{bC}	* 10,21 ± 0,137 ^{cC}
12	43,17 ± 0,085 ^{fA}	* 30,46 ± 0,459 ^{eB}	* 23,34 ± 0,707 ^{cdC}	* 20,20 ± 0,896 ^{cCD}	* 17,92 ± 0,692 ^{dD}
14	49,61 ± 0,346 ^{fA}	37,67 ± 0,170 ^{fB}	* 26,04 ± 0,092 ^{dC}	* 24,22 ± 0,840 ^{cC}	* 23,74 ± 0,267 ^{eC}
16	50,70 ± 1,157 ^{ghA}	42,70 ± 0,100 ^{gB}	* 37,24 ± 1,275 ^{eC}	* 32,89 ± 1,295 ^{dC}	* 25,55 ± 0,642 ^{eD}
18	53,35 ± 0,931 ^{ghA}	43,84 ± 0,144 ^{gB}	* 43,00 ± 0,253 ^{fB}	* 41,72 ± 3,891 ^{eB}	* 32,10 ± 3,565 ^{fC}
20	54,11 ± 0,316 ^{hA}	44,01 ± 0,081 ^{gB}	43,21 ± 0,451 ^{fB}	41,97 ± 3,855 ^{eBC}	* 38,03 ± 0,555 ^{fC}
22	54,40 ± 1,663 ^{hA}	44,62 ± 1,023 ^{gB}	43,81 ± 1,232 ^{fB}	41,83 ± 3,809 ^{fBC}	38,33 ± 0,288 ^{fC}
24	54,58 ± 0,199 ^{hA}	44,65 ± 0,227 ^{gB}	43,17 ± 4,446 ^{fB}	41,46 ± 3,760 ^{fBC}	38,03 ± 0,447 ^{fC}

As letras minúsculas são as diferenças significativas entre os dias. As letras maiúsculas são diferenças significativas entre as salinidades.

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE VI- Tabela com os teores de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) no experimento a temperatura a 28°C.

DIAS	SAL.0	SAL.8	SAL.16	SAL.24	SAL.32
1	65,26 ± 1,45	65,68 ± 1,26	64,83 ± 3,17	64,83 ± 3,17	67,36 ± 1,93
2	* 161,66 ± 11,22	* 133,46 ± 16,81	73,25 ± 6,68	69,04 ± 10,59	70,73 ± 4,38
3	* 306,49 ± 5,69	* 164,61 ± 8,59	126,72 ± 21,29	119,99 ± 3,34	78,73 ± 6,96
4	* 391,53 ± 5,78	* 224,81 ± 10,02	183,98 ± 13,14	182,71 ± 13,14	90,09 ± 0,73
5	* 537,20 ± 13,26	* 234,92 ± 12,43	221,03 ± 11,01	207,13 ± 9,86	135,56 ± 9,14
6	* 835,26 ± 30,32	* 332,17 ± 9,10	* 271,12 ± 13,96	212,61 ± 26,29	195,34 ± 9,65
7	* 938,41 ± 11,57	* 361,64 ± 6,48	* 299,75 ± 6,35	* 261,02 ± 9,56	263,97 ± 16,42
8	* 1092,49 ± 19,85	* 402,06 ± 17,87	* 386,48 ± 9,53	* 343,54 ± 10,02	* 306,49 ± 9,56
9	* 1193,96 ± 12,65	* 439,95 ± 10,20	* 417,21 ± 14,63	* 375,11 ± 12,04	* 371,74 ± 5,26
10	* 1593,48 ± 25,39	* 546,04 ± 6,48	* 532,99 ± 8,84	* 532,14 ± 24,63	* 409,21 ± 13,31
11	686,11 ± 8,28	* 778,01 ± 9,10	* 736,33 ± 16,99	* 654,66 ± 11,03	* 543,93 ± 10,59
12	1947,55 ± 24,65	* 979,67 ± 17,05	* 855,05 ± 24,09	* 767,90 ± 16,51	* 658,87 ± 14,64
13	2055,32 ± 10,20	1175,43 ± 9,81	* 1065,97 ± 11,36	* 934,20 ± 17,42	* 825,16 ± 5,70
14	2054,48 ± 5,69	1289,94 ± 11,03	* 1162,38 ± 20,53	* 1078,18 ± 38,10	* 972,09 ± 13,85
15	2071,32 ± 9,86	1559,81 ± 42,70	* 1318,99 ± 26,50	* 1245,32 ± 9,10	* 1060,50 ± 8,02
16	2055,74 ± 5,10	1772,41 ± 24,17	* 1447,40 ± 40,59	* 1415,40 ± 27,01	* 1200,27 ± 5,97
17	2059,95 ± 18,86	1851,14 ± 15,06	* 1666,74 ± 7,40	* 1573,70 ± 7,88	* 1343,41 ± 15,99
18	2064,16 ± 5,25	1847,77 ± 6,68	* 1749,68 ± 9,64	* 1683,16 ± 19,82	* 1436,45 ± 22,25
19	2060,37 ± 8,12	1835,14 ± 2,18	1754,73 ± 5,69	1704,21 ± 9,48	* 1478,55 ± 19,29
20	2061,64 ± 4,43	1823,77 ± 14,06	1741,68 ± 9,10	1715,15 ± 2,18	* 1510,97 ± 9,65
21	1994,28 ± 10,02	1816,62 ± 15,79	1683,16 ± 12,13	1712,63 ± 3,34	1500,02 ± 7,72
22	1968,60 ± 3,17	1813,25 ± 14,63	1692,00 ± 8,96	1701,26 ± 2,52	1498,34 ± 5,10
23	1942,49 ± 2,52	1808,20 ± 8,96	1701,68 ± 8,96	1628,43 ± 8,59	1496,23 ± 6,48
24	1956,39 ± 45,53	1804,41 ± 11,46	1696,21 ± 9,10	1633,48 ± 5,10	1487,39 ± 4,78
25	1950,91 ± 4,43	1807,35 ± 5,78	1654,11 ± 77,38	1638,11 ± 2,52	1493,29 ± 4,78

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE VII

APÊNDICE VII- Tabela com os valores de densidade celular ($\text{cel.mL}^{-1} \times 10^4$) no experimento das razões N:P.

DIAS	5:1	20:1	40:1	100:1
0	2,54 ± 0,1000 ^{aA}	2,36 ± 0,073 ^{aA}	2,49 ± 0,1000 ^{aA}	2,35 ± 0,028 ^{aA}
2	3,64 ± 0,412 ^{aA}	2,36 ± 0,207 ^{aA}	3,57 ± 0,060 ^{aA}	2,83 ± 0,229 ^{aA}
4	6,76 ± 0,163 ^{aA}	2,97 ± 1,058 ^{abA}	4,38 ± 0,198 ^{abA}	3,66 ± 0,032 ^{abA}
6	* 12,78 ± 0,405 ^{bA}	* 5,72 ± 1,650 ^{bAB}	8,41 ± 0,275 ^{bAB}	5,32 ± 0,162 ^{abcB}
8	* 20,52 ± 0,559 ^{cA}	* 10,50 ± 1,636 ^{cAB}	* 13,54 ± 1,126 ^{cB}	5,30 ± 0,171 ^{abcdC}
10	* 25,89 ± 0,563 ^{cdA}	* 16,45 ± 1,290 ^{dA}	* 19,43 ± 1,198 ^{cdB}	8,56 ± 0,212 ^{bcdeC}
12	* 27,98 ± 0,218 ^{dA}	* 25,20 ± 0,223 ^{dA}	* 22,97 ± 0,874 ^{dA}	8,79 ± 0,281 ^{bcdeB}
14	* 47,60 ± 0,769 ^{eA}	* 32,50 ± 1,561 ^{eB}	* 29,08 ± 1,376 ^{eB}	* 10,52 ± 0,877 ^{cdefC}
16	* 68,85 ± 1,264 ^{fA}	* 48,33 ± 5,507 ^{fB}	* 37,41 ± 2,126 ^{fC}	* 12,62 ± 0,757 ^{efD}
18	* 81,00 ± 4,444 ^{gA}	* 55,00 ± 3,605 ^{gB}	* 50,47 ± 0,740 ^{gB}	* 13,95 ± 0,932 ^{efC}
20	* 88,12 ± 0,612 ^{hA}	* 72,22 ± 1,306 ^{hB}	* 61,55 ± 0,714 ^{hC}	* 17,31 ± 0,286 ^{efgD}
22	95,66 ± 4,041 ^{iA}	78,16 ± 3,403 ^{iB}	* 72,16 ± 3,055 ^{iC}	* 20,33 ± 1,755 ^{gD}
24	92,78 ± 4,852 ^{hiA}	79,59 ± 0,660 ^{iB}	* 78,60 ± 0,249 ^{jB}	* 32,25 ± 0,702 ^{iC}

As letras minúsculas são as diferenças significativas entre os dias. As letras maiúsculas são diferenças significativas entre as salinidades.

* Fase exponencial (FASE LOG).

APÊNDICE VII-Tabela com os teores de clorofila ($\mu\text{g L}^{-1}$) no experimento no experimento das razões N:P.

DIAS	5:1	20:1	40:1	100:1
1	119,99 \pm 13,31	119,14 \pm 4,44	116,62 \pm 5,26	113,25 \pm 5,10
2	164,19 \pm 6,68	141,46 \pm 14,57	119,56 \pm 8,96	117,46 \pm 6,68
3	203,76 \pm 9,81	194,92 \pm 9,81	136,83 \pm 5,70	118,30 \pm 14,53
4	302,70 \pm 54,43	277,44 \pm 7,18	236,60 \pm 13,39	150,30 \pm 7,03
5	453,42 \pm 42,32	400,79 \pm 9,81	297,23 \pm 59,33	190,29 \pm 8,96
6	* 597,40 \pm 43,03	* 575,09 \pm 47,67	458,47 \pm 47,07	213,45 \pm 17,09
7	* 663,50 \pm 31,78	* 629,82 \pm 37,90	575,51 \pm 8,96	232,39 \pm 12,82
8	* 811,69 \pm 17,24	* 706,02 \pm 38,41	* 663,50 \pm 15,28	285,86 \pm 12,90
9	* 829,79 \pm 36,69	* 772,11 \pm 35,42	* 724,54 \pm 17,24	328,80 \pm 7,40
10	* 827,26 \pm 14,06	* 806,64 \pm 15,79	* 764,12 \pm 13,31	394,48 \pm 8,12
11	* 1111,44 \pm 4,55	* 851,26 \pm 23,66	* 788,95 \pm 9,48	391,53 \pm 9,54
12	* 1300,89 \pm 35,09	* 1081,13 \pm 4,55	* 920,73 \pm 11,58	403,74 \pm 7,18
13	* 1488,24 \pm 54,68	* 1292,05 \pm 51,97	* 1112,28 \pm 25,40	427,74 \pm 41,63
14	* 1745,47 \pm 31,01	* 1437,29 \pm 44,42	* 1273,10 \pm 12,18	* 451,31 \pm 44,37
15	* 1897,03 \pm 55,87	* 1620,01 \pm 95,04	* 1365,30 \pm 14,06	* 489,62 \pm 50,43
16	* 2081,85 \pm 41,69	* 1687,79 \pm 25,80	* 1488,66 \pm 19,82	* 544,35 \pm 25,26
17	* 2318,03 \pm 112,57	* 1998,49 \pm 47,41	* 1553,91 \pm 6,48	* 628,97 \pm 11,23
18	* 2826,59 \pm 68,24	* 2348,76 \pm 34,18	* 1717,26 \pm 42,76	* 693,81 \pm 11,46
19	* 3034,57 \pm 14,53	* 2482,22 \pm 46,51	* 1862,08 \pm 32,80	* 705,18 \pm 15,43
20	* 3056,88 \pm 24,11	* 2532,74 \pm 10,74	* 1967,75 \pm 49,22	* 809,16 \pm 21,74
21	3023,20 \pm 4,06	2583,26 \pm 13,27	* 2166,04 \pm 13,37	* 978,40 \pm 28,64
22	2997,52 \pm 20,22	2613,15 \pm 23,66	* 2306,66 \pm 11,46	* 1141,33 \pm 12,96
23	2952,47 \pm 19,29	2610,20 \pm 15,79	* 2392,54 \pm 10,52	* 1272,68 \pm 9,48
24	2949,11 \pm 9,11	2609,36 \pm 33,03	* 2430,43 \pm 10,52	* 1340,89 \pm 23,02
25	2913,32 \pm 15,79	2605,99 \pm 23,37	* 2465,80 \pm 17,42	* 1421,72 \pm 82,19

* Fase exponencial (FASE LOG).