

Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-graduação em Aqüicultura

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE
ABSORÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO
ATMOSFÉRICO POR MICROALGAS
UTILIZADAS NA AqüICULTURA PARA A
GERAÇÃO DE UM MECANISMO DE
DESENVOLVIMENTO LIMPO (MDL).**

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

Autor: Lucélia do Valle Borges
Orientador: Prof. Paulo César Abreu
Co-orientadora: Prof. ^a Clarisse Odebrecht

Rio Grande - RS.
Março, 2005.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	13
- Crescimento	15
- Produção primária	16
Método do Oxigênio	17
Método do ¹⁴ Carbono	18
Quociente fotossintético	19
- Lipídios Totais e produção de biodiesel	20
- Análises estatísticas	20
RESULTADOS	21
- Descrição das espécies	21
- Crescimento	25
- Produção primária	27
Método do Oxigênio	27
Método do ¹⁴ Carbono	30
Quociente fotossintético	40
- Lipídios Totais e produção de biodiesel	41
DISCUSSÃO	42
- Crescimento	42
- Produção primária	43
Medidas de produção primária por variação no oxigênio dissolvido	44
Método de produção primária pelo método ¹⁴ Carbono.....	47
Quociente fotossintético	48
- Potencialidade das espécies para cultivo em larga escala:	49
- Potencial para a produção de Biodiesel pelas espécies que apresentaram maiores valores de Produção Primária:	51
CONCLUSÕES	52
- Perspectivas futuras.....	52

Literatura Citada	53
Anexo	58

RESUMO:

O aumento das concentrações de CO₂ na atmosfera nos últimos anos tem gerado uma intensificação no efeito estufa. Devido as altas taxas de fixação de carbono pelas microalgas, o cultivo em larga escala e em condições semi-controladas destes microorganismos surge como uma alternativa para reduzir os níveis de CO₂ atmosféricos. Na aquicultura o alto custo de produção dos cultivos de microalgas afeta a rentabilidade da produção de organismos cultivados. Para aumentar o rendimento e reduzir os custos são necessárias pesquisas que resultem na utilização de espécies de microalgas mais produtivas. O objetivo deste trabalho foi determinar quais as espécies de microalgas fitoplanctônicas utilizadas na aquicultura, que apresentam as maiores taxas de absorção de CO₂, têm algum valor comercial e que possam ser cultivadas em larga escala. Os experimentos foram realizados com as espécies *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1955), *Chaetoceros affinis* Lauder, 1864, *C. muelleri* Lemmermann, 1898, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873, *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt, 1926, *T. pseudonana* (Husted) Hasle & Heimdal, 1970), *Tetraselmis chuii* Butcher, 1958, *T. tetrahele* (G.S. West) Butcher 1959 e *Isochrysis galbana* Parke, 1949. As espécies foram mantidas em meio f/2, temperatura constante (ótima para cada espécie), luminosidade média de 100 µmol/m²/s⁻¹ e fotoperíodo de 12L/12E. Medidas de produtividade primária em diferentes intensidades luminosas, pelo método do oxigênio e do ¹⁴C (produção dissolvida, particulada e total), foram realizadas com amostras de cultivo que estavam na fase logarítmica. Também foram determinados o Quociente Fotossintético (QF) e a fração lipídica das algas mais produtivas. *N. oculata*, *S. costatum* e *C. muelleri* foram as espécies que atingiram maior rendimento do crescimento celular, enquanto que *C. affinis* foi a espécie de menor taxa de crescimento. *N. oculata* e *I. galbana* foram as espécies mais produtivas, em termos de produção de O₂, e *N. oculata* e *T. fluviatilis* obtiveram os maiores valores de produção de carbono. A maioria das espécies apresentaram valores de QF superiores a 1,0. De acordo com os resultados de

crescimento e produção primária, quatro espécies apresentaram maior potencial para produção em larga escala: *N. oculata*, *S. costatum*, *T. fluviatilis* e *I. galbana*. Por apresentarem maior crescimento em menor luminosidade *N. oculata* e *S. costatum* poderiam ser cultivadas em períodos de menor luminosidade, enquanto que *T. fluviatilis* e *I. galbana*, espécies adaptadas à luz, poderiam ser cultivada na primavera/verão. Além disso, os resultados mostram que *N. oculata* produz grande quantidade de lipídeos e ácidos graxos, indicando uma grande capacidade para a produção de bio-combustíveis.

ABSTRACT:

The increase in atmospheric CO₂ concentration in the last years has intensified the "greenhouse effect". Due to their high carbon fixation rates, the large-scale cultivation of microalgae, under semi-controlled conditions, appears as an alternative to diminish the CO₂ levels in the atmosphere. High costs of microalgae production affects the aquaculture profitability. To increase the production yield and reduce costs new research is necessary to find more productive microalgae species. The main objective of this study was to determine which phytoplankton species used in aquaculture that present the highest CO₂ uptake rates, as well as commercial value and that could be produced in large-scale systems. The experiments were conducted with the species *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1955), *Chaetoceros affinis* Lauder, 1864, *C. muelleri* Lemmermann, 1898, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873, *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt, 1926, *T. pseudonana* (Husted) Hasle & Heimdal, 1970), *Tetraselmis chuii* Butcher, 1958, *T. tetrathele* (G.S. West) Butcher 1959 and *Isochrysis galbana* Parke, 1949 . The cells were kept in f/2 medium, constant temperature (optimum of each species), light intensity of ca. 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ and 12L/12D photoperiod. Primary production measurements were conducted in different light intensities using oxygen and ¹⁴C (dissolved, particulate and total production) methods. Measurements were carried out when culture were in the LOG phase. The Photosynthetic Quotient and lipid fraction of most productive species were also determined. *N. oculata*, *S. costatum* e *C. muelleri* reached the highest growth yield, while *C. affinis* was the less productive species. *N. oculata* and *I. galbana* showed

the highest oxygen production rates, while *N. oculata* e *T. fluviatilis* presented the highest carbon fixation rates. The most species showed PQ values bigger than 1.0. According to the results of growth and primary production rates, four species showed high potential for large-scale production: *N. oculata*, *S. costatum*, *T. fluviatilis* and *I. galbana*. Since *N. oculata* and *S. costatum* showed highest growth rates under low light intensity, these species could be cultivated during periods of low luminosity. On the other hand, *T. fluviatilis* and *I. galbana*, light adapted species, could be grown during spring/summer periods. Furthermore, the results indicate that *N. oculata* produces high amounts of lipid and fatty acid, indicating its great capacity for biofuels production .

AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao meu orientador o Professor Paulo César Abreu pelos valiosos ensinamentos e pela amizade, obrigada também pela paciência.

Aos professores participantes da banca examinadora, Daniel Conde e Virginia Garcia pelas correções e sugestões.

A professora Clarisse Odebrecht pela contribuição durante o desenvolvimento do trabalho e nas correções.

Aos professores Marcelo D'Oca e Joaquim Cruz do Departamento de Química pelo auxílio e troca de informações.

Aos amigos do Laboratório de ecologia do fitoplâncton e de microorganismos marinhos: Valnei, Bia, Odete, Sirlei, Joana Flor, Viviane, Marli, Bianca, Marcio, Carlos, Giuliano, Caroline, Amália e em especial a Simone. Obrigada pela harmoniosa convivência e por me receberem com tanta simpatia.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação em Aqüicultura, pelos ensinamentos e pela amizade.

A Petrobrás e a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A minha família e meus amigos pelo carinho, apoio e incentivo: Amo todos vocês!!!

INTRODUÇÃO:

Na atmosfera da Terra alguns gases, principalmente o dióxido de carbono (CO_2) o metano (CH_4) e o óxido nitroso (N_2O), funcionam como uma capa protetora impedindo que o calor absorvido da irradiação solar escape para o espaço, mantendo uma situação de equilíbrio térmico sobre o planeta, tanto durante o dia como durante a noite. Sem estes gases na atmosfera, a superfície da Terra estaria coberta de gelo e seria impossível a existência de vida no planeta. A essa particularidade da atmosfera que é benéfica para a vida dá-se o nome de "efeito estufa".

Entretanto, os níveis atmosféricos do dióxido de carbono e de outros gases têm aumentado muito desde a Revolução Industrial (Kirschbaum, 2003). Por exemplo, sabe-se que desde 1800 a concentração atmosférica de CO_2 aumentou de 280 ppm para 380 ppm hoje em dia (Takahashi, 2004). Este aumento tem causado uma intensificação do "efeito estufa" já que, quanto maior a concentração de gases, maior o aprisionamento do calor, gerando um aumento acentuado da temperatura média do globo.

O aumento da temperatura global tem pode resultar em sérios problemas climáticos como intensificação de chuvas e secas, com graves quebras na produção agrícola, que poderão levar à fome generalizada em algumas regiões mais pobres do planeta.. O agravamento do "efeito estufa" está acelerando também o derretimento de geleiras, o que acarretará no aumento do nível médio do mar. Com isso, ilhas e áreas litorâneas de baixa altitude podem desaparecer. O aumento da temperatura global também provocaria a proliferação de ervas daninhas e insetos e a transferência de pragas de clima quente para regiões de clima frio (Adams et al. 2003).

Algumas medidas para a redução dos níveis atuais de CO₂ na atmosfera foram propostas no Protocolo de Kyoto em 1997, que entrou em vigor recentemente. O Protocolo de Kyoto, um acordo mundial para a redução da emissão dos gases que provocam o "efeito estufa", estabelece que os países desenvolvidos terão a obrigação de reduzir em 5% a emissão de gases que causam o efeito estufa até 2012. Uma das possibilidades do tratado é que nações que emitem CO₂ poderão comprar "cotas" de países que atualmente representam um "sumidouro" de dióxido de carbono. Além disso, no Protocolo de Kyoto, principalmente por ação do Governo Brasileiro, instituiu-se o conceito de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), que são alternativas tecnológicas para o desenvolvimento de fontes de energia "limpas", isto é, que não emitam dióxido de carbono, ou que reduzam os níveis deste e outros gases da atmosfera.

Um exemplo de MDL seriam os projetos de reflorestamento, que visam a redução dos níveis de CO₂ pela absorção deste gás pelas plantas, através do processo de fotossíntese (Araújo, 2000). Entretanto, ao se lavrar o solo para o plantio, grande quantidade de CO₂ é liberada para a atmosfera o que, em muitos casos, anularia o efeito benéfico da absorção de dióxido de carbono e sua incorporação na biomassa das plantas, ao longo de sua vida (Araújo, 2000).

Em função destes problemas, seria interessante utilizar a produção de outros organismos autotróficos para a retenção de CO₂ da atmosfera. Na verdade, apesar de seu diminuto tamanho (a maioria não mais que 200 µm), as microalgas são responsáveis pela absorção do CO₂ atmosférico nos oceanos, uma vez que estas estão presentes em grande número na coluna de água que cobrem 3/4 partes da superfície do globo terrestre (Falkowski & Raven 1997).

Uma parte do dióxido de carbono absorvido pelas microalgas é transferida para o fundo oceânico num processo conhecido como "Bomba Biológica" (Lalli & Parsons 1993). Este processo, juntamente com a difusão direta do CO₂ para a água, impede que o acúmulo de gases do "efeito estufa" seja maior do que o previsto, considerando-se todas as emissões mas, principalmente, a queima de combustíveis fósseis. Recentemente, alguns pesquisadores propuseram incrementar a atividade da "Bomba Biológica" adicionando-se Ferro em determinadas regiões oceânicas ricas em nutrientes

(especialmente N e P), mas com baixa biomassa fitoplanctônica. Esta hipótese ganhou força especialmente após o trabalho de Martin & Fitzwater (1988), que demonstraram existir uma estreita relação entre as maiores taxas de produção e sedimentação do fitoplâncton em diferentes eras geológicas e o maior aporte de Ferro no ambiente aquático, devido a atividade vulcânica.

Vários experimentos foram realizados para testar esta hipótese. Estudos recentes mostraram que, de fato, a “fertilização” de extensas áreas oceânicas com Fe resultou num incremento significativo na produção primária fitoplanctônica, mas não na transferência da biomassa nova formada para o fundo oceânico (Boyd et al. 2000, Boyd 2004). Na verdade, o destino da matéria orgânica produzida permanece desconhecido e não se sabe que efeitos, positivos ou negativos, esse aumento da abundância de produtores primários pode ter no ecossistema aquático oceânico e no funcionamento das cadeias alimentares destes ambientes.

De maneira similar, processos naturais ou antrópicos que resultam em um grande aporte de nutrientes em áreas costeiras geram um aumento de biomassa fitoplanctônica (eutrofização) e, conseqüentemente, um maior seqüestro de CO₂ pelas microalgas. Entretanto, este aumento de microalgas nem sempre apresenta resultados positivos para o meio ambiente. O aumento acelerado de biomassa fitoplanctônica em ambientes rasos ou com baixa circulação resulta, na maioria das vezes, em baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, o que pode levar à morte de peixes, crustáceos e moluscos. Além disso, o aumento descontrolado da biomassa fitoplanctônica pode modificar significativamente a composição específica das microalgas permitindo, muitas vezes, o surgimento de espécies tóxicas que podem afetar até mesmo o ser humano.

Pode-se concluir, então, que a manipulação de ambientes costeiros ou oceânicos com o objetivo de aumentar a produtividade fitoplanctônica e, conseqüentemente reduzir os níveis locais de dióxido de carbono, ainda depende de muita pesquisa que permita, no futuro, um gerenciamento destes ambientes sem o perigo de produzir situações que afetem negativamente os ecossistemas aquáticos e também o homem.

Desta forma, o cultivo em larga escala de microalgas em condições semi-controladas surge como uma alternativa para se utilizar estes microorganismos para

reduzir os níveis de CO₂ da atmosfera. Além do rápido crescimento, as microalgas apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos e a possibilidade de serem cultivadas de maneira intensiva, o que pode representar uma contribuição para a diminuição do "efeito estufa", mesmo em condições adversas (Kurano et al.1995).

Para se ter uma idéia da capacidade de absorção de CO₂ pelas microalgas, medidas de produção primária anual realizadas em ambientes aquáticos apresentam os seguintes valores: Ambientes costeiros 1 - 4 T C ha⁻¹ ano⁻¹; Lagos Eutróficos 5 - 8 T C ha⁻¹ ano⁻¹; Microalgas cultivadas 11 - 36.5 T C ha⁻¹ ano⁻¹ (Margalef, 1977), enquanto que áreas reflorestadas apresentam uma produtividade média de 3 - 4 T C ha⁻¹ ano⁻¹. Como podemos verificar os valores de produção primária das microalgas são da mesma magnitude que os do reflorestamento, sendo que a absorção de dióxido carbono pelo fitoplâncton em condições de cultivo supera as taxas de produção de plantas superiores.

Além de sua capacidade de absorver dióxido de carbono, as microalgas podem ser utilizadas no consumo humano, principalmente como fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, entre outras substâncias, sendo algumas espécies utilizadas como matéria-prima na indústria de alimentação e farmacêutica (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Além disso, estudos sobre a produção e qualidade dos lipídios produzidos pelas microalgas indicam que o cultivo destes microorganismos pode resultar na produção de bio-combustíveis como, por exemplo, o biodiesel que poderia substituir combustíveis fósseis provenientes do refino de petróleo. (Brown & Zeiler, 1993).

Na aquicultura as microalgas podem ser empregadas como fonte primária de alimento para larvas, juvenis e até de adultos de moluscos, crustáceos e peixes. Também são a dieta primária do zooplâncton usado como alimento para crustáceos e peixes (Brown et al. 1997). Outra função das algas unicelulares na aquicultura, refere-se à melhoria da qualidade da água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (Lavens & Sorgeloos, 1996) e combate a bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (Reitan et al. 1997).

O alto custo de produção dos cultivos de microalgas afeta a rentabilidade dos produtores. Assim, para aumentar o rendimento e reduzir os custos são necessárias pesquisas que resultem na utilização de espécies mais produtivas (Borowitzka, 1997).

Um grande número de espécies de microalgas está disponível hoje para uso na indústria da aquicultura. Entretanto, para algumas aplicações particulares ou setores desta indústria, seria interessante a utilização de novas espécies com uma melhor qualidade nutricional ou rápido crescimento, que poderiam melhorar as taxas produtivas dos organismos alimentados com as microalgas (Brown, 2002).

Assim, com o crescimento da aquicultura em nosso país, o cultivo de microalgas em condições controladas e em larga escala, surge como uma alternativa que, além de permitir uma maior absorção de CO₂, pode ser empregado por empresas que procuram empregar tecnologias "limpas" em sua produção, e se beneficiar da produção de elementos de interesse comercial gerados pelas microalgas como, por exemplo, corantes, ácidos graxos, aminoácidos e proteínas, entre outros.

OBJETIVOS:

Geral:

Identificar quais espécies de microalgas utilizadas na aquicultura presentes na região estuarina da Lagoa dos Patos ou que fazem parte da coleção de cultivo do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) apresentam maior potencial para serem empregadas em cultivo de larga escala, como um Mecanismo de Desenvolvimento Limpo.

Específicos:

Determinar quais as espécies estudadas que apresentam:

- 1) maiores taxas de absorção de CO₂;
- 2) potencial para cultivo em larga escala e
- 3) algum valor comercial (aquicultura, indústria, aplicação biotecnológica).

MATERIAL E MÉTODOS:

Os experimentos foram realizados com dez espécies de microalgas utilizadas na aquíicultura e que fazem parte da coleção de cultivo do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos: Eustigmastophyceae: *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, 1955); Bacillariophyceae: *Chaetoceros affinis* Lauder, 1864, *C. muelleri* Lemmermann, 1898, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 1873, *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt, 1926, *T. pseudonana* (Husted) Hasle & Heimdal, 1970); Prasinophyceae: *Tetraselmis chuii* Butcher, 1958, *T. tetrathele* (G.S. West) Butcher 1959 e Prymnesiophyceae: *Isochrysis galbana* Parke, 1949 .

Nos cultivos as condições de temperatura e salinidade utilizadas para cada espécie eram as ótimas para o crescimento, de acordo com a bibliografia. Para as espécies *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros muelleri* não foram encontradas estas informações na literatura, sendo usado as condições de temperatura e salinidade em que estas espécies eram mantidas no banco de cultivo do laboratório (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de temperatura e salinidade usados nos experimentos de crescimento.

Espécie	T °C	Salinidade	Referência
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20	28	Abu-Resq et al. 1999
<i>Chaetoceros affinis</i>	15	22	Brunel, 1970
<i>Chaetoceros muelleri</i>	20	28	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20	28	Goldman, 1977
<i>Skeletonema costatum</i>	20	28	Goldman, 1977
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	20	28	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	27	28	Goldman, 1977
<i>Tetraselmis chuii</i>	20	28	Abu-Resq et al. 1999
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	20	28	Abu-Resq et al. 1999
<i>Isochrysis galbana</i>	27	28	Kaplan et al. 1986

Os cultivos foram mantidos em câmara ambiente para germinação (modelo 347-CDG, Fanem) em condições controladas de temperatura e luz e com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 escuro (Fig. 1) e irradiância de $100\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Estas condições foram repetidas em todos os experimentos.



Figura 1: Câmara ambiente para germinação (modelo 347-CDG, Fanem) com os cultivos das espécies analisadas.

→ Crescimento:

Para determinação da fase logarítmica das espécies foi realizada contagem celular em cultivos. Para cada espécie foi iniciado um cultivo com aproximadamente 150ml de meio f/2 (Guillard 1975) e cinco mL de inóculo. Para a contagem celular foi retirada, diariamente e aproximadamente no mesmo horário, uma alíquota (5 ml) durante cinco dias, a qual foi fixada com formalina. Um ml foi colocado em uma

câmara de Sedgewick-Rafter e esta sub-amostra foi quantificada utilizando microscópio óptico (Zeiss) com magnificação final de 200x. Foram contados aleatoriamente um mínimo de 30 campos, ou 100 células. O crescimento de cada espécie foi acompanhado até alcançar a biomassa máxima. A taxa de crescimento foi determinada a partir do incremento do número de células por unidade de tempo, durante a fase exponencial de crescimento (Stein, 1984).

Foram calculados de acordo com Schlegel (1986):

- Rendimento:

$$X = X_{\text{máx}} - X_0$$

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

- Taxa de crescimento exponencial:

$$\mu = \log X_t - \log X_0 / \log e (T-T_0) = \ln X_t - \ln X_0 / (T-T_0)$$

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

- Tempo de duplicação:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

- Fase LAG:

$$T_l = t_r - t_i = t_r - (\ln X_r - \ln X_0 / \mu)$$

Onde: r = crescimento real e i = crescimento ideal, t= tempo e X = densidade.

➔ Produtividade primária:

Medidas de produtividade primária, para se estimar o potencial de absorção de carbono, foram realizadas com amostras de cultivo que estavam na fase logarítmica, determinada de acordo com os experimentos de crescimento. Para isso, as microalgas foram cultivadas adicionando-se inicialmente 50 mL do inóculo da alga em 300 mL de meio f/2 (Guillard, 1975). Esse volume foi gradualmente aumentado com intervalos de aproximadamente quatro dias até alcançar um volume de 9 litros de cultivo, os quais eram suficientes para o desenvolvimento dos experimentos. Aeração constante foi utilizada a partir do volume de 1000L.

Os experimentos de produtividade foram realizados com incubação dos cultivos durante um período de três horas. Imediatamente antes da realização de cada experimento eram retiradas do cultivo duas amostras de cinco ml, uma para contagem celular e a outra para medições de clorofila *a*. Este pigmento foi extraído durante 24 horas no escuro a -12°C com acetona 90% (Strickland & Parsons, 1972), a leitura foi realizada em fluorímetro calibrado Turner modelo TD-700 sem adicificação (Welschmeyer, 1994).

As medidas de produção primária foram feitas empregando-se os métodos de oxigênio (Strickland & Parsons, 1972) e do ^{14}C em oito diferentes intensidades luminosas (curvas P_{XI}). Para tal, amostras de cultivo foram colocadas em frascos de DBO de 250 mL, para medidas de oxigênio e de 110 mL, para medidas de ^{14}C (Steeman Nielsen 1952) (em duas repetições para cada método). Estes frascos foram colocados em um aquário de vidro e com água circulante com temperatura igual a do cultivo, esta sendo mantida através de um Banho termostatizado (Tecnal TE 184). Na frente desta cuba foi colocada uma lâmpada de halogênio de 250 W como fonte de luz. A disposição em fila das garrafas de DBO determina um gradiente de luz desde valores mais altos (início da fila) até mais baixos (fim da fila) (Fig. 2). A intensidade luminosa foi determinada no lugar em que estava cada garrafa utilizando um aparelho Li-Cor com sensor esférico de luz e variou entre 30 e 780 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.



Figura 2: Aquário com as garrafas DBO dispostas em fila e iluminadas por uma lâmpada de halogênio.

Método do Oxigênio:

Os níveis de oxigênio dissolvido (O.D.) foram determinados antes e após o período de incubação (em torno de três horas) nos frascos DBO de 250 mL através de leituras feitas com um eletrodo de oxigênio (Metler Toledo MO128). As leituras foram feitas nos frascos claros e também em frascos escuros. Foram calculadas a produção primária líquida (concentração no claro – concentração inicial), produção primária bruta (concentração no claro – concentração no escuro) e respiração (concentração no escuro – concentração inicial).

Método do ^{14}C :

Frascos DBO de 100ml foram incubados (em duas repetições) juntamente com os frascos DBO usados para as medições de oxigênio. Em cada frasco foi adicionado 1ml de bicarbonato de sódio radioativo ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) em água estéril com atividade de $5\mu\text{Ci/ml}$. Inicialmente foram retiradas seis amostras de $50\mu\text{l}$ para cálculo do conteúdo de carbono inicial. Os frascos DBO foram colocados para incubar em cada luminosidade determinada. Após o período de incubação, foi adicionado em cada frasco 1 ml de formalina 37% para matar as células e terminar o processo de fotossíntese. De cada frasco foram retiradas duas amostras de 10ml, as quais foram filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/F) com auxílio de bomba à vácuo. Estes filtros foram deixados por três horas em atmosfera saturada de HCl para eliminar o ^{14}C inorgânico e formalina 37% para evitar contaminação bacteriana, sendo posteriormente transferidos para “vials” onde foi adicionado o coquetel de cintilação Ready Safe (Beckman), para leitura da radioatividade em cintilômetro Beckman - LS 6500.

Da parte da amostra que passou pelo filtro (o filtrado) foram retirados oito mL, utilizados para a estimativa do carbono orgânico dissolvido excretado pelas algas

durante o período de incubação. Para a retirada do ^{14}C inorgânico foi adicionado, neste filtrado, um ml de HCl e realizado o borbulhamento das amostras por 20 minutos. Após a amostra foi neutralizada com um ml de NaOH 6N e finalmente foi completado o volume de 20 ml do “vial” com líquido de cintilação (Schindler et al. 1972)

A produtividade total (ABM) foi determinada com a retirada de duas amostras de oito ml de cada garrafa, sem passar por filtração, e colocadas em vials. O mesmo procedimento usado para o filtrado foi seguido para eliminar o ^{14}C inorgânico. Após a adição do líquido de cintilação foi realizada a leitura da absorção do carbono.

As taxas de produção primária foram calculadas de acordo com Nielsen & Bresta (1984) para os valores dos filtros (produção particulada), filtrados (produção dissolvida) e sem filtração (produção primária total - ABM) segundo a fórmula:

$$\text{mgC/L.h} = \frac{A \times C \times D \times E \times F \times k_1}{B \times k_2}$$

Onde:

A = ^{14}C incorporado no organismo (dpm).

B = ^{14}C inicial (dpm).

C = Concentração do carbono na água.

D = Peso atômico do carbono (12).

E e F = Fatores de correção (1,05 e 1,06).

$k_1 = \frac{\text{mL amostra} + \text{mL NaOH}^{14}\text{CO}_3}{\text{mL filtrado}}$

$k_2 = \text{Tempo de incubação}$

O carbono inorgânico total presente nas amostras foi estimado a partir de medidas de alcalinidade, a qual foi calculada a partir de dados de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidade (refratômetro) e pH (Medidor de pH, Digimed DMPH-3) antes e após a adição de HCl 0,01N à amostra conforme descrito em Strickland & Parsons (1972).

Os resultados de produção obtidos tanto pelo método de oxigênio quando o de ^{14}C foram padronizados dividindo-se as taxas de produção primária pela biomassa fitoplanctônica (índice de assimilação). O rendimento quântico (inclinação inicial da

curva P x I) foi calculado pela fórmula $\Delta P/\Delta I$. A máxima taxa da fotossíntese ($P_{\text{máx}}$) e a intensidade luminosa neste ponto (I_c - $P_{\text{máx}}$) foram determinados para cada espécie.

Quociente Fotossintético:

O quociente fotossintético foi calculado como a razão molar entre o oxigênio liberado (produção bruta) e o carbono absorvido para cada intensidade luminosa e também considerando a produção de carbono total (ABM) ou pela fração particulada.

Lipídios totais e produção de Biodiesel:

Os lipídios totais de amostras das algas mais produtivas (*Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Skeletonema costatum*) foram extraídos pelo método de Bligh & Dyer (1959). A amostra foi homogeneizada como uma mistura de clorofórmio, metanol e água (2:10:0,5), por 30 minutos em agitador magnético sendo transferida para um funil de separação, acrescentando 50mL de uma mistura de clorofórmio e água destilada (1:1) para separar a fase apolar e polar. A fase inferior (extrato lipídico) foi transferida para um balão previamente seco e tarado e acrescentado um pouco de sulfato de magnésio para retirar a umidade da amostra que foi filtrada posteriormente. O extrato lipídico foi então seco em rota-evaporador e após em estufa até peso constante. Depois de frio o balão foi pesado e o peso dos lipídios foi determinado gravimetricamente por diferença.

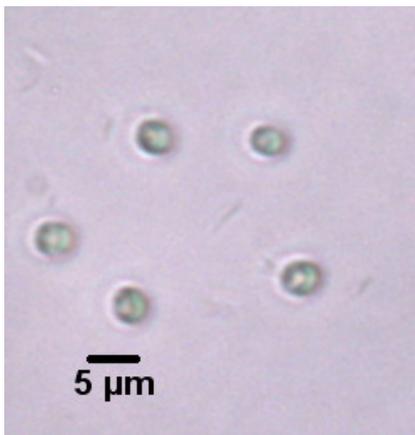
A fração lipídica foi convertida em Biodiesel utilizando catálise ácida, ácido sulfúrico, e etanol em refluxo por 1h (Ma & Hanna, 1990). A presença do Biodiesel e o desaparecimento da fração lipídica foram verificados por cromatografia em camada fina (TLC) (Collins et al. 1995).

→ Análise Estatística:

Foi feita uma análise comparativa não paramétrica das diversas variáveis medidas para as diferentes espécies de microalgas (oxigênio, produção particulada, produção dissolvida de produção total) empregando-se o teste de Kruskal-Wallis (Teste H) que compara amostras independentes e do mesmo tamanho.

RESULTADOS:

→ Descrição das espécies:



(A:400x)

Espécie: *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd:

Segundo Chrétiennot-Dinet et al. (1993):

Divisão: Eustigmatophyta
Classe: Eustigmatophyceae
Ordem: Eustigmatales
Família: Monopsidaceae

Espécie marinha, faz parte do picoplâncton. Esféricas a levemente ovóides, 2 – 4 μm de diâmetro. Um cloroplasto por célula. Somente clorofila *a* e o principal pigmento acessório é a violaxantina. Amplamente distribuída nos oceanos (Van Den Hoek et al. 1995).

Espécie: *Chaetoceros affinis* Lauder 1864:

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

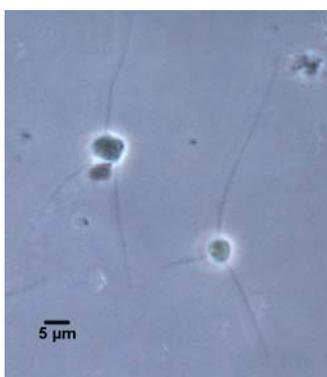
Divisão: Bacillariophyta
Classe: Coscinodiscophyceae
Ordem: Chaetoceratales

Família: Chaetocerotaceae

Espécie marinha, pelágica, nerítica, células 7 – 30 μm largura, unidas em cadeias retas. Cosmopolita porém não se desenvolve bem em temperaturas muito elevadas (Horner, 2002).



(A:400x)

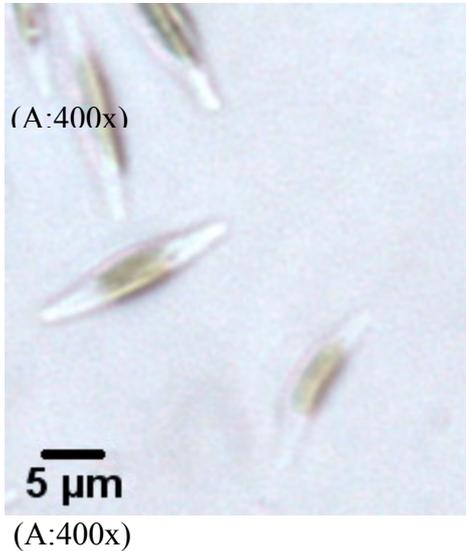


Espécie: *Chaetoceros muelleri* Lemmermann 1898

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999).

Divisão: Bacillariophyta
Classe: Coscinodiscophyceae
Ordem: Chaetoceratales
Família: Chaetocerotaceae

Espécie unicelular, eixo apical 4 – 6 μm. Ocasionalmente encontrada em águas salgadas, mais freqüente em águas continentais (Rines & Hargraves, 1988).



Espécie: *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897:

Segundo Tomas (1996):

Divisão: Chromophyta

Classe: Bacillariophyceae

Ordem: Bacillariales

Família: Phaeodactylaceae

Células solitárias, de três tipos: ovóides (naviculoides), fusiformes e, mais raramente, trirradiadas. Um cloroplasto. Células fusiformes de 25 – 35 μm de comprimento. Cosmopolita (Tomas, 1996).

Espécie: *Skeletonema costatum* (Greville 1866) Cleve 1873:

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

Divisão: Bacillariophyta

Classe: Coscinodiscophyceae

Ordem: Thalassiales

Família: Skelenetonemaceae

Células cilíndricas, 2 – 21 μm de diâmetro, unidas em longas cadeias por tubos externos arranjados em um anel marginal. Dois cloroplastos por célula. Cosmopolita em regiões costeiras ao redor do mundo exceto em mares polares. Pode formar extensivas florações na primavera (Horner, 2002).



Espécie: *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt 1926:

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

Divisão: Bacillariophyta

Classe: Coscinodiscophyceae

Ordem: Thalassiales

Família: Thalassiosiraceae

Células retangulares, eixo perivalvar usualmente menor que o diâmetro, valva achatadas no centro (Tomas, 1996).



(A:400x)

Espécie: *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal

1970:

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

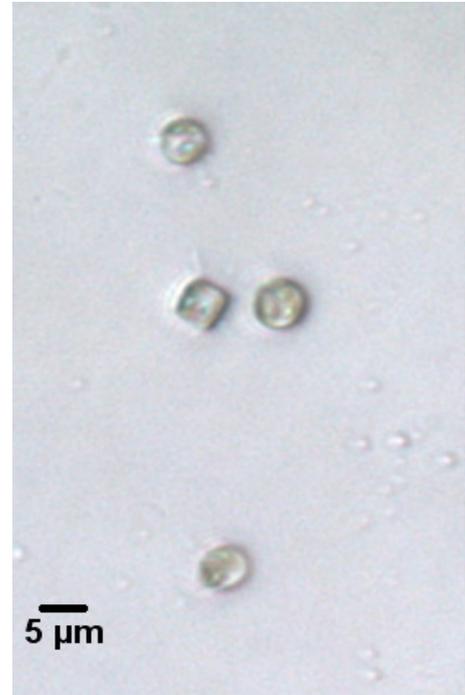
Divisão: Bacillariophyta

Classe: Coscinodiscophyceae

Ordem: Thalassiales

Família: Thalassiosiraceae

Células retangulares, 3,3 – 6,2 μm de diâmetro. Eixo pervalvar mais curto que ou igual ao diâmetro da célula. Superfície valvar achatada ou levemente convexa. Não formam colônias (Tomas, 1996).



(A:400x)



Espécie: *Tetraselmis chuii* Butcher, 1959.

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

Divisão: Chlorophyta

Classe: Prasinophyceae

Ordem: Chlorodendrales

Família: Chlorodendraceae

Células com 10-12 x 6-6,5 x 5-6 μm , comprimida, elipsóide a ovóide, arredondada na vista dorsal. Com quatro flagelos 1,2 vezes o comprimento da célula.

A: (400x)

Espécie: *Tetraselmis terathele* (G. S. West) Butcher 1959:

Segundo Bérard-Therriault et al. (1999):

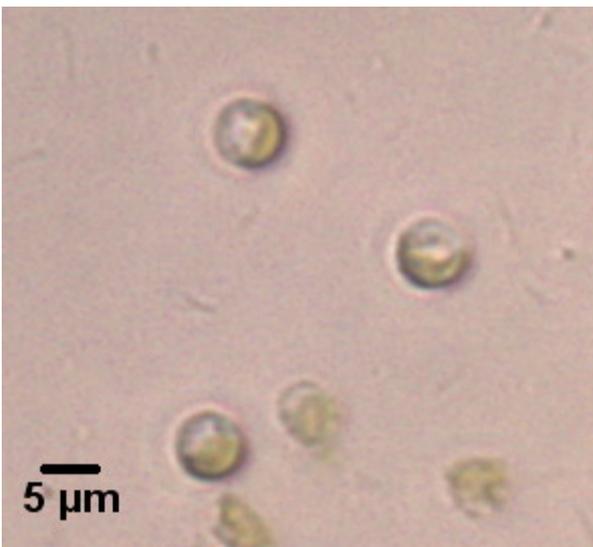
Divisão: Chlorophyta

Classe: Prasinophyceae

Ordem: Chlorodendrales

Família: Chlorodendraceae

Células de 10 – 16 μm de comprimento, com quatro flagelos, teca com escamas. Comprimida, profundos e amplos sulcos apicais lobado em quatro. Ocorre principalmente em marismas, poças mareais, Europa (Tomas, 1996).



Espécie: *Isochrysis galbana* Parke, 1949:

Segundo Van Den Hoek et al. (1995)

Divisão: Haptophyta

Classe: Haptophyceae

Ordem: Prymnesiales

Família: Isochrysidaceae

Células com 5 – 6 μm de diâmetro, com dois flagelos de aproximadamente 7 μm de comprimento. Alongada, variável na forma. Costeira, Atlântico (Tomas, 1996).

(A:400x)

➔Crescimento:

Nannochloropsis oculata apresentou a maior taxa de crescimento, alcançando 829.000 células/mL após o quinto dia de repicagem (Fig 3a), enquanto que no mesmo período *Chaetoceros affinis* atingiu o máximo de 44.600 células/mL (Fig 3f). As outras espécies variaram entre estes valores (Fig 3).

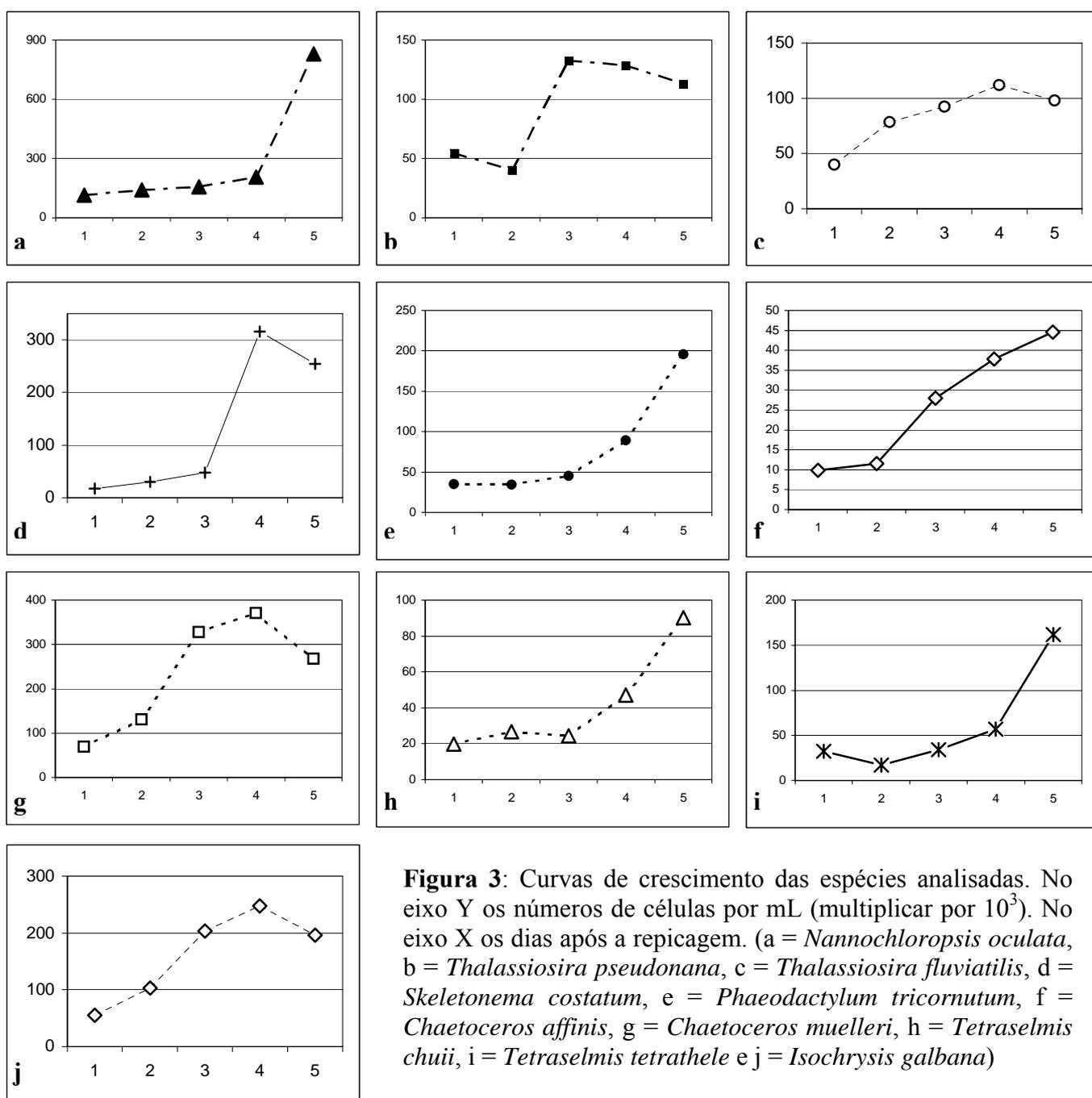


Figura 3: Curvas de crescimento das espécies analisadas. No eixo Y os números de células por mL (multiplicar por 10³). No eixo X os dias após a repicagem. (a = *Nannochloropsis oculata*, b = *Thalassiosira pseudonana*, c = *Thalassiosira fluviatilis*, d = *Skeletonema costatum*, e = *Phaeodactylum tricornerutum*, f = *Chaetoceros affinis*, g = *Chaetoceros muelleri*, h = *Tetraselmis chuii*, i = *Tetraselmis tetrathele* e j = *Isochrysis galbana*)

Na Tabela 2 estão os parâmetros das curvas de crescimento. *Nannochloropsis oculata* alcançou a maior abundância celular e o maior rendimento, seguida pela espécie *Chaetoceros muelleri*, porém esta última apresentou uma fase LAG mais curta. *Thalassiosira pseudonana* obteve a maior taxa de crescimento exponencial, porém apresentou um baixo rendimento e uma fase LAG longa. *Chaetoceros affinis* apresentou reduzida abundância, rendimento e taxa de crescimento exponencial, além de maior tempo de duplicação mas não mostra uma longa fase LAG.

Tabela 2: Parâmetros das curvas de crescimento. μ = Taxa de crescimento exponencial; Td = tempo de duplicação; Lag = Duração da fase LAG (tempo de geração - dias).

Espécie	Crescimento máximo (cél/mL)	Rendimento (cél/mL*10³)	μ	Td(dias)	Lag (g)
<i>N. oculata</i>	829	713,2	1,6801	0,41	0,89
<i>T. pseudonana</i>	132,5	77,5	2,4433	0,28	1,64
<i>T. fluviatilis</i>	112	72	1,5728	0,44	0,57
<i>S. costatum</i>	316	298	1,9186	0,36	0,73
<i>P. tricornutum</i>	196	161	1,3195	0,53	1,81
<i>C. affinis</i>	44,6	34,8	0,9494	0,73	0,83
<i>C. muelleri</i>	371	301	1,9721	0,35	0,68
<i>T. chuii</i>	90,2	70,4	1,1255	0,62	1,74
<i>T. tetrathele</i>	162	129,8	1,2719	0,54	1,95
<i>I. galbana</i>	247,8	192,4	1,8376	0,38	0,66

→ Produção Primária:

Na Tabela 3 estão listadas as abundâncias celulares, as concentrações de clorofila *a* e o pH dos cultivos no momento do início dos experimentos de produção primária. Além disso, estão listados os números de dias após ultima repicagem quando foram feitos os experimentos.

Tabela 3: Valores das contagens celulares (células/mL), clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$), pH e os dias depois da ultima repicagem para cada espécie.

Espécie	Dias (experimento)	Contagem (células/mL)	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)	pH cultivo
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4	289.000 \pm 9.450	95,66	8,88
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	4	106.800 \pm 12.990	965,4 \pm 23,08	8,78
<i>Thalassiosira pseudonana.</i>	3	46.600 \pm 14.910	152,27 \pm 3,96	8,7
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4	444.000 \pm 102.060	345,04 \pm 40,17	8,86
<i>Skeletonema costatum</i>	4	375.000 \pm 89.960	530,03	8,52
<i>Chaetoceros affinis</i>	4	55.200 \pm 8.150	162 \pm 22,23	7,87
<i>Chaetoceros muelleri</i>	3	74.800 \pm 21.080	148,4 \pm 4,04	8,87
<i>Tetraselmis chuii</i>	4	90.400 \pm 10.310	286,86	8,4
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	4	28.600 \pm 14.960	34,47 \pm 3,4	8,7
<i>Isochrysis galbana</i>	3	90.800 \pm 21.120	142,32 \pm 2,41	8,57

Para cada espécie os dados de produção por oxigênio e ^{14}C (particulada, dissolvida e total) foram padronizados dividindo-se os resultados pelas concentrações de clorofila *a*, obtendo-se o índice de assimilação.

Oxigênio:

A espécie *Tetraselmis tetrathele* mostrou os maiores valores de produção bruta de oxigênio, apresentando o máximo de produção de 58,99 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ em

319,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa (Fig 4a). *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* apresentaram 22,46 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ em 511,4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ e 19,47 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ em 653,6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ de luminosidade, respectivamente (Fig 4a). *Nannochloropsis oculata* teve uma produção mais alta (18,64 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$) em níveis mais baixos de luz apresentando uma fotoinibição a partir de 231 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ de luminosidade, diferentemente de *I. galbana* e *C. muelleri* que mostraram uma maior produção em altas intensidades luminosas.

Skeletonema costatum, *Thalassiosira fluviatilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum* e *Tetraselmis chuii* mostraram valores máximos de liberação de oxigênio de 9,55 a 17,43 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ (Fig 4a). Entretanto, *T. fluviatilis* e *T. pseudonana* mostram uma maior produção em intensidades luminosas acima de 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

Chaetoceros affinis apresentou os menores valores de produção sendo 3,63 $\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ o pico máximo, aos 135,9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ (Fig. 4a), e uma fotoinibição a intensidades luminosas maiores que esta (Fig. 4b).

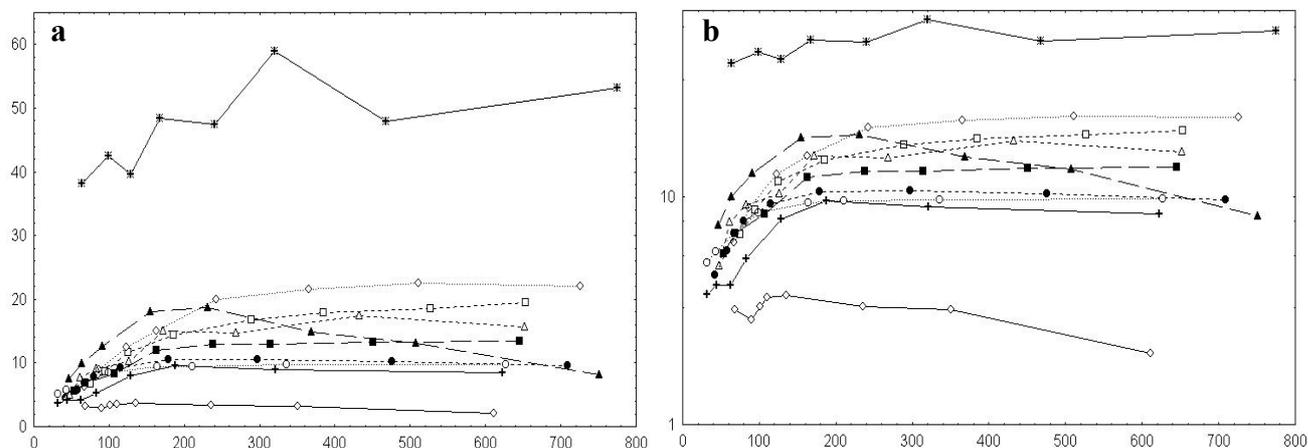


Figura 4: Produção bruta de oxigênio ($\text{mgO}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$) pelas diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

—▲— *Nannochloropsis oculata* —■— *Thalassiosira pseudonana* ...○... *Thalassiosira fluviatilis* —+— *Skeletonema costatum*
 -●- *Phaeodactylum tricorutum* —◇— *Chaetoceros affinis* -□- *Chaetoceros muelleri* -△- *Tetraselmis chuii*
 —*— *Tetraselmis tetrathele* ...◇... *Isochrysis galbana*

O Teste de Kruskal-Wallis (Fig 5) mostrou que a produção de oxigênio de *Chaetoceros affinis* foi significativamente diferente ($p < 0,05$) de *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis tetrathele* e *Isochrysis galbana*. Já a espécie *T. tetrathele* diferiu significativamente ($p < 0,05$) de *Thalassiosira fluviatilis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*, e *Chaetoceros affinis*. Estes resultados mostraram uma separação entre dois grupos, o primeiro com espécies com valores mais baixos formado pelas microalgas *T. fluviatilis*, *T. pseudonana*, *S. costatum*, *P. tricornutum*, e *C. affinis* e um segundo grupo com espécies com valores mais altos formado por *N. oculata*, *C. muelleri*, *T. chuii*, *T. tetrathele* e *I. galbana*.

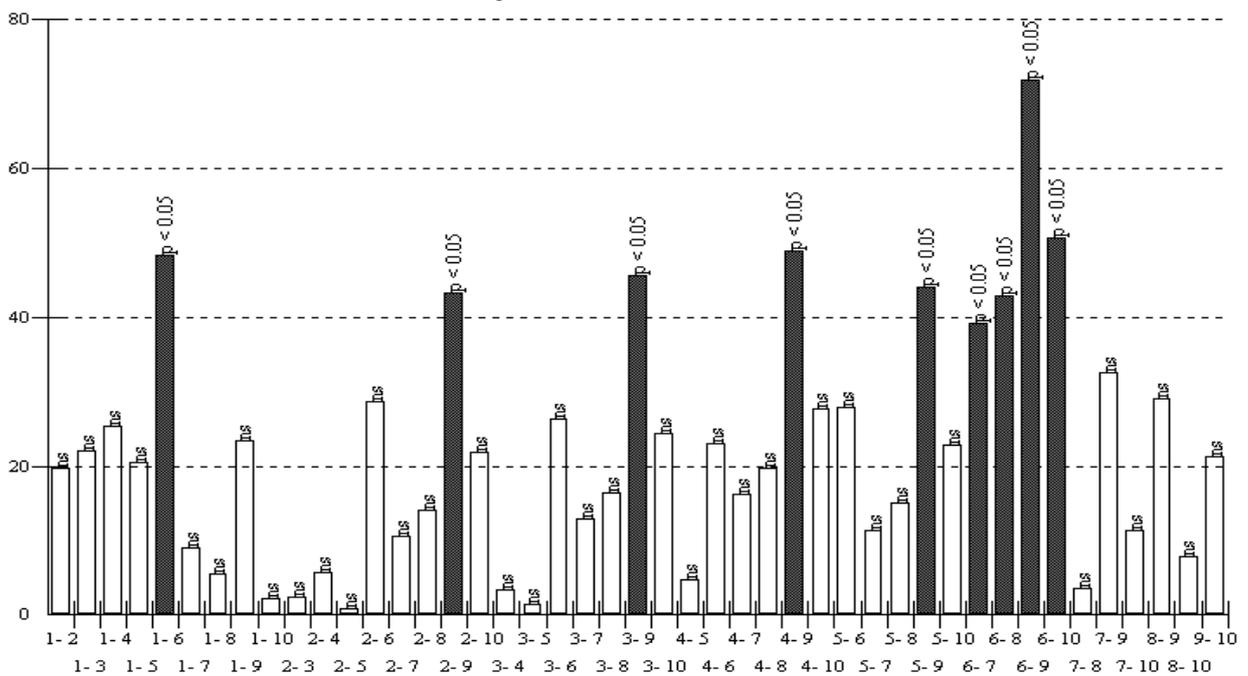


Figura 5: Gráfico das diferenças entre as médias das espécies para a liberação de oxigênio, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, onde ns indica diferença não significativa e $p < 0,05$ diferença significativa (1 = *Nannochloropsis oculata*, 2 = *Thalassiosira pseudonana*, 3 = *Thalassiosira fluviatilis*, 4 = *Skeletonema costatum*, 5 = *Phaeodactylum tricornutum*, 6 = *Chaetoceros affinis*, 7 = *Chaetoceros muelleri*, 8 = *Tetraselmis chuii*, 9 = *Tetraselmis tetrathele* e 10 = *Isochrysis galbana*).

¹⁴Carbono:

- Produção Particulada:

Nos resultados de produção particulada as espécies *Nannochloropsis oculata*, com o máximo de 33,81 mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹ na intensidade luminosa de 368,5 μmol/m²/s⁻¹, e *Thalassiosira fluviatilis*, com 17,68 mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹ em 542 μmol/m²/s⁻¹ de luz, apresentaram os maiores valores (Fig 6a).

Chaetoceros affinis e *Chaetoceros muelleri* foram as espécies com menor produção particulada. Os valores máximos apresentados por essas microalgas foram 0,2166 e 0,1483 mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹ respectivamente (Fig 6b).

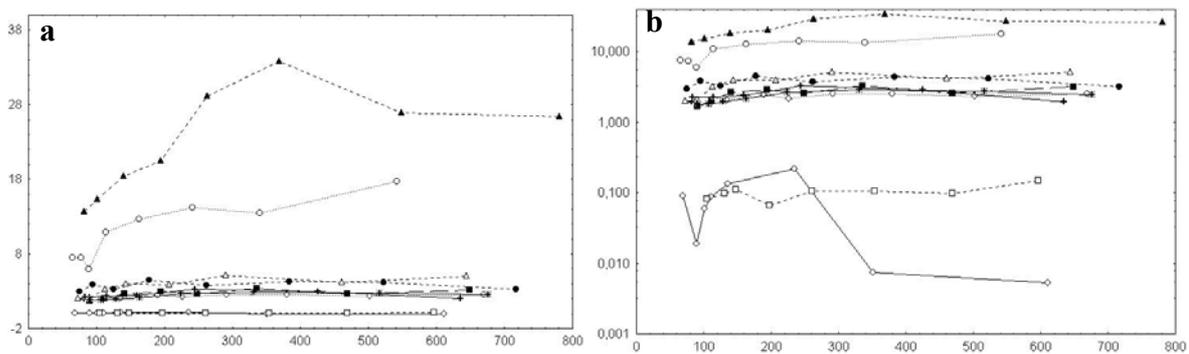


Figura 6: Produção particulada (mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹) pelas diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas (μmol/m²/s⁻¹) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

—▲— *Nannochloropsis oculata* —■— *Thalassiosira pseudonana* ...○... *Thalassiosira fluviatilis* —+— *Skeletonema costatum*
--●-- *Phaeodactylum tricornutum* —◇— *Chaetoceros affinis* --□-- *Chaetoceros muelleri* --△-- *Tetraselmis chuii*
—*— *Tetraselmis tetrathele* ...◇... *Isochrysis galbana*

Para a produção particulada o Teste de Kruskal-Wallis (Fig 7) mostrou que *T. tetrathele* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de *N. oculata*, *S. costatum*, *T. fluviatilis* e *T. chuii*. Enquanto que *N. oculata* foi significativamente diferente ($p < 0,05$) de *N. oculata*, *C. affinis*, *C. muelleri*, *T. tetrathele* e *I. galbana*. Estes resultados indicaram uma separação em dois grupos, porém a espécie *T. pseudonana* não apresenta diferença significativa entre nenhuma espécie de ambos. O primeiro grupo de espécies,

as quais apresentaram valores mais baixos, foi formado por *S. costatum*, *C. affinis*, *C. muelleri*, *T. tetrathele* e *I. galbana*. O segundo grupo formado pelas espécies *N. oculata*, *P. tricornerutum*, *T. fluviatilis*, *T. chuii* apresentou os valores mais altos.

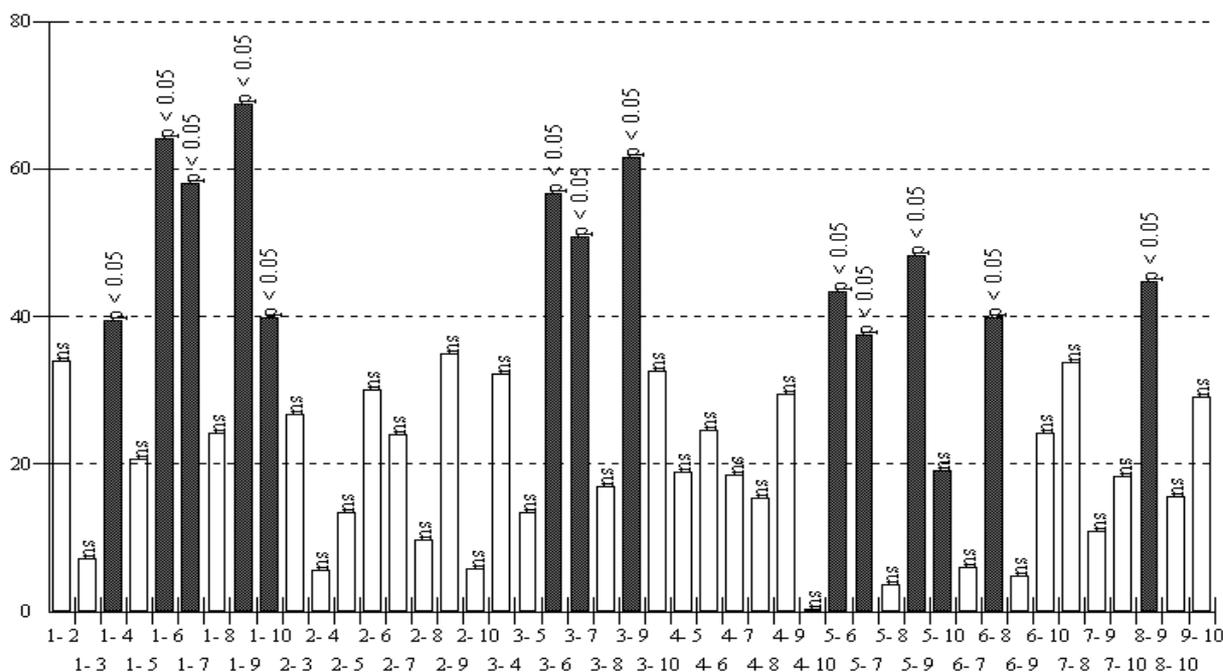


Figura 7: Gráfico das diferenças entre as médias das espécies para a produção particulada, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, onde ns indica diferença não significativa e $p < 0,05$ diferença significativa (1 = *Nannochloropsis oculata*, 2 = *Thalassiosira pseudonana*, 3 = *Thalassiosira fluviatilis*, 4 = *Skeletonema costatum*, 5 = *Phaeodactylum tricornerutum*, 6 = *Chaetoceros affinis*, 7 = *Chaetoceros muelleri*, 8 = *Tetraselmis chuii*, 9 = *Tetraselmis tetrathele* e 10 = *Isochrysis galbana*).

- Produção Dissolvida:

As espécies *T. fluviatilis* com o valor máximo de $6,67 \text{ mgC/mg Chl-a}^{-1}\text{h}^{-1}$ em $162,9 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$ de luminosidade, *S. costatum* com $2,58 \text{ mgC/mg Chl-a}^{-1}\text{h}^{-1}$ em $244,5 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$ e *N. oculata* com $1,82 \text{ mgC/mg Chl-a}^{-1}\text{h}^{-1}$ em $194,9 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$ foram as microalgas que apresentaram os maiores valores de produção dissolvida (Fig 8a).

C. affinis e *C. muelleri* apresentaram os menores valores de produção dissolvida sendo os valores máximos 0,1330 e 0,1131 mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹ respectivamente (Fig 8b).

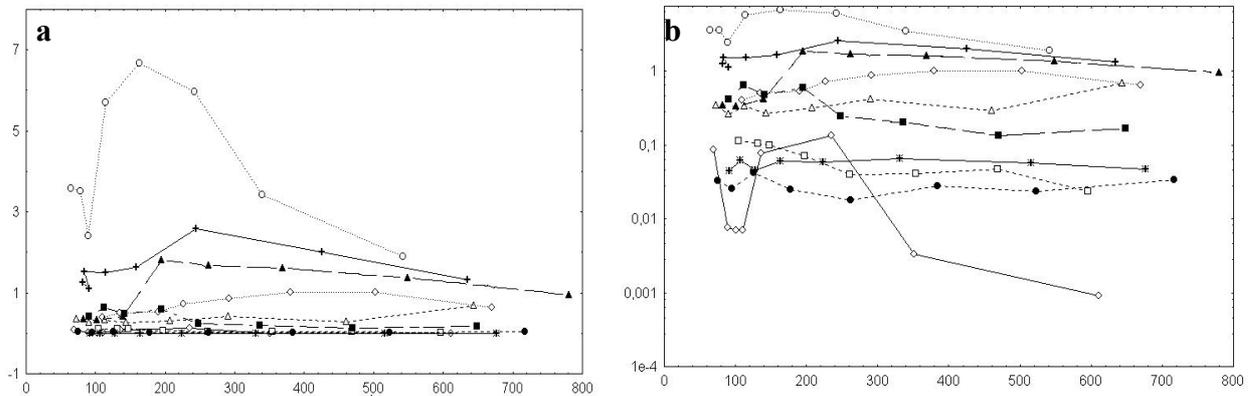


Figura 8: Produção dissolvida (mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹) pelas diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas (μmol/m²/s⁻¹) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

-▲- *Nannochloropsis oculata* -■- *Thalassiosira pseudonana* ...○- *Thalassiosira fluviatilis* -+ *Skeletonema costatum*
 -●- *Phaeodactylum tricornerutum* -◇- *Chaetoceros affinis* -□- *Chaetoceros muelleri* -△- *Tetraselmis chuii*
 -* *Tetraselmis tetrathele* ...◇- *Isochrysis galbana*

O Teste de Kruskal-Wallis para a produção dissolvida (Fig 9) mostrou que a microalga *T. tetrathele* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das espécies *N. oculata*, *T. pseudonana*, *S. costatum*, *T. fluviatilis*, *T. chuii* e *I. galbana*. E a espécie *T. fluviatilis* foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) de *P. tricornerutum*, *C. affinis*, *C. muelleri* e *T. tetrathele*. Novamente havendo uma separação entre dois grupos onde, *P. tricornerutum*, *C. affinis*, *C. muelleri* e *T. tetrathele* formaram um com espécies com produção mais baixa e *N. oculata*, *S. costatum*, *T. fluviatilis*, *T. chuii* e *I. galbana* o outro com microalgas com produção mais alta.

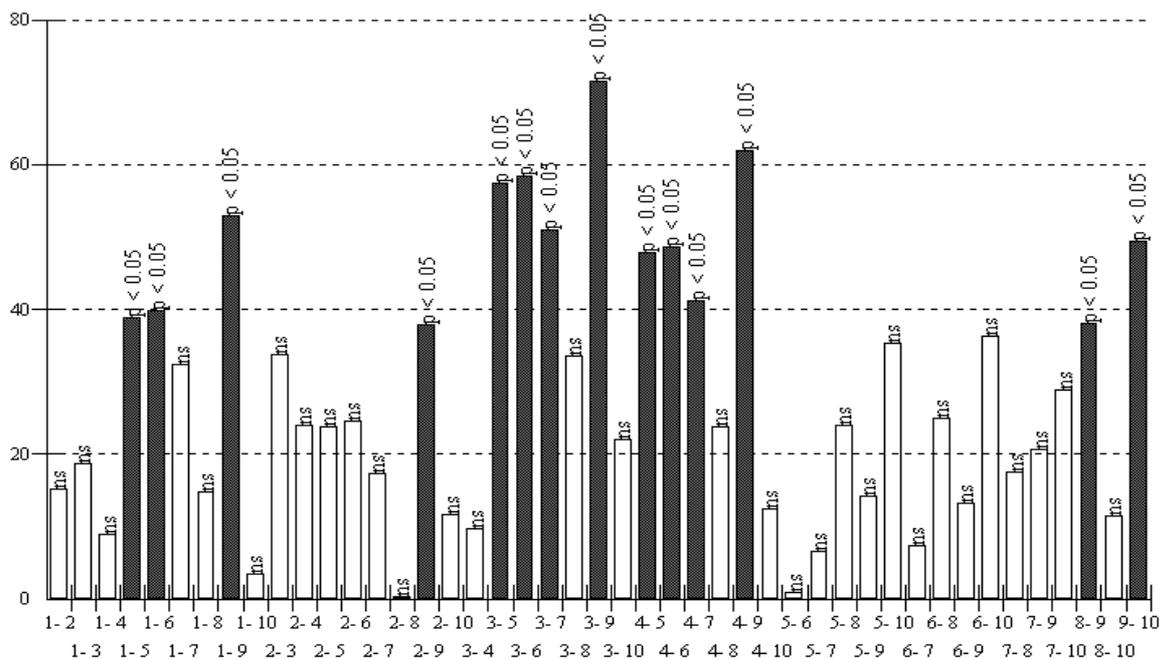


Figura 9: Gráfico das diferenças entre as médias das espécies para a produção dissolvida, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, onde ns indica diferença não significativa e $p < 0,05$ diferença significativa (1 = *Nannochloropsis oculata*, 2 = *Thalassiosira pseudonana*, 3 = *Thalassiosira fluviatilis*, 4 = *Skeletonema costatum*, 5 = *Phaeodactylum tricornutum*, 6 = *Chaetoceros affinis*, 7 = *Chaetoceros muelleri*, 8 = *Tetraselmis chuii*, 9 = *Tetraselmis tetrathele* e 10 = *Isochrysis galbana*).

- Produção Total (ABM):

Nos resultados de produção total (ABM) os maiores valores foram encontrados nas espécies *T. fluviatilis*, com o máximo de $22,68 \text{ mgC/mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ com $162,9 \mu\text{mol/m}^{-2}\text{/s}^{-1}$ de luz, e *N. oculata*, com $21,99 \text{ mgC/mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ em $368,5 \mu\text{mol/m}^{-2}\text{/s}^{-1}$ (Fig. 10a).

Os valores mais baixos de produção total foram $0,3110$ e $0,1442 \text{ mgC/mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ encontrados nas espécies *C. affinis* e *C. muelleri* respectivamente (Fig 10b).

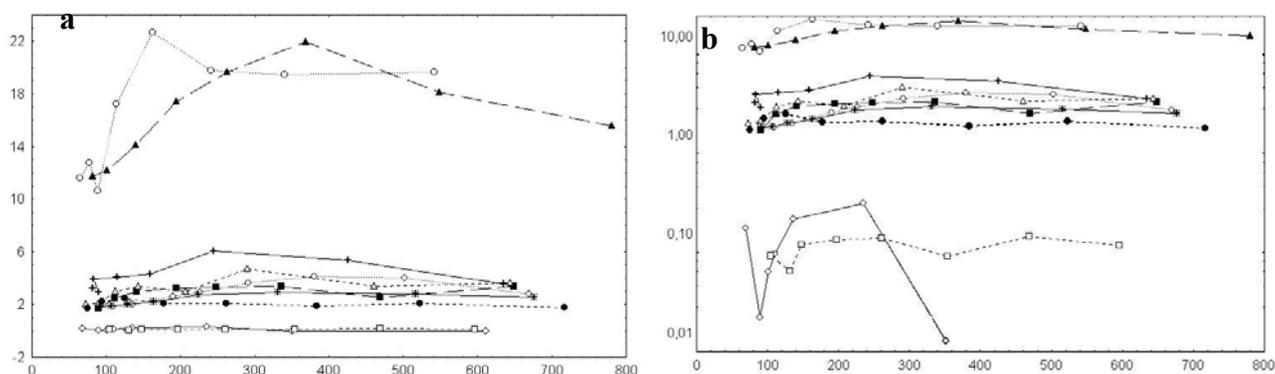


Figura 10: Produção total ($\text{mgC}/\text{mg Chl-}a^{-1} \text{h}^{-1}$) pelas diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas ($\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

-▲- *Nannochloropsis oculata* -■- *Thalassiosira pseudonana* ...○... *Thalassiosira fluviatilis* -+ *Skeletonema costatum*
 -●- *Phaeodactylum tricornerutum* -◇- *Chaetoceros affinis* -□- *Chaetoceros muelleri* -△- *Tetraselmis chuii*
 -* - *Tetraselmis tetrathele* ...◇... *Isochrysis galbana*

Nas análises estatísticas para a produção total (Fig 11) o Teste de Kruskal-Wallis mostrou que a microalga *T. tetrathele* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das espécies *N. oculata*, *T. pseudonana*, *S. costatum*, *T. fluviatilis*, *T. chuii* e *I. galbana*. E a espécie *T. fluviatilis* foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) de *P. tricornerutum*, *C. affinis*, *C. muelleri* e *T. tetrathele*. Novamente havendo uma separação entre dois grupos onde, *P. tricornerutum*, *C. affinis*, *C. muelleri* e *T. tetrathele* formaram um com espécies com produção mais baixa e *N. oculata*, *S. costatum*, *T. fluviatilis*, *T. chuii* e *I. galbana* o outro com microalgas com produção mais alta.

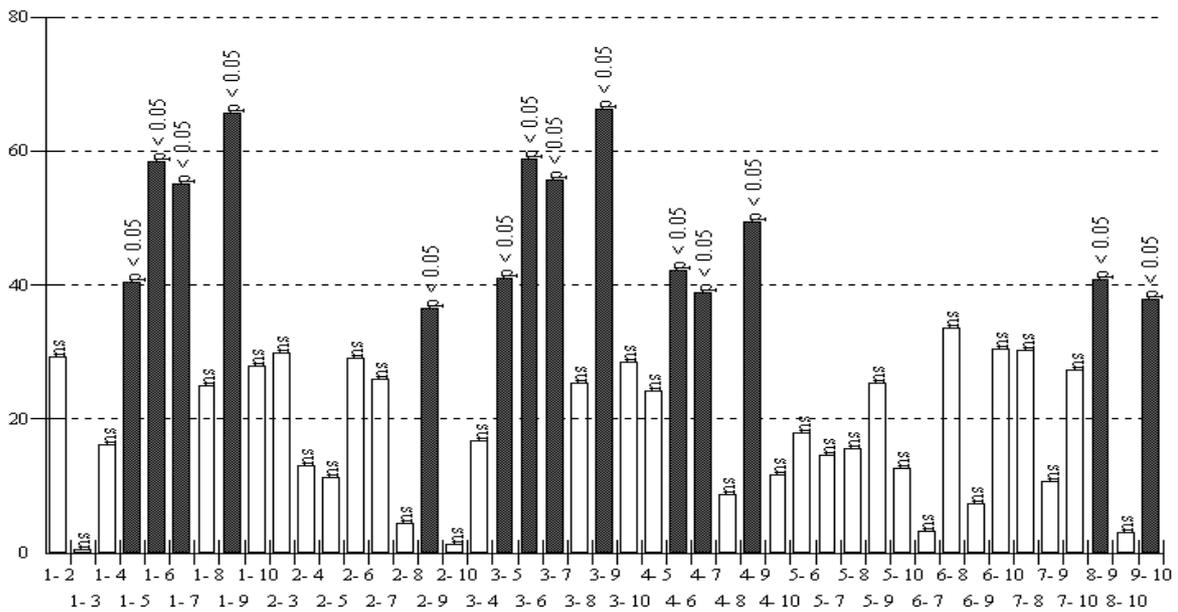


Figura 11: Gráfico das diferenças entre as médias das espécies para a produção total, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, onde ns indica diferença não significativa e $p < 0,05$ diferença significativa (1 = *Nannochloropsis oculata*, 2 = *Thalassiosira pseudonana*, 3 = *Thalassiosira fluviatilis*, 4 = *Skeletonema costatum*, 5 = *Phaeodactylum tricornerutum*, 6 = *Chaetoceros affinis*, 7 = *Chaetoceros muelleri*, 8 = *Tetraselmis chuii*, 9 = *Tetraselmis tetrathele* e 10 = *Isochrysis galbana*).

Os valores de produção total pelo método ABM e somando as frações particulada e dissolvida foram semelhantes em valores mais baixos (0 a 5 mg C mg chl a^{-1} h $^{-1}$) de 8 a 20 mg C mg chl a^{-1} h $^{-1}$ são maiores na ABM e acima de 25 mg C mg chl a^{-1} h $^{-1}$ na soma das frações particulada e dissolvida (Fig 12).

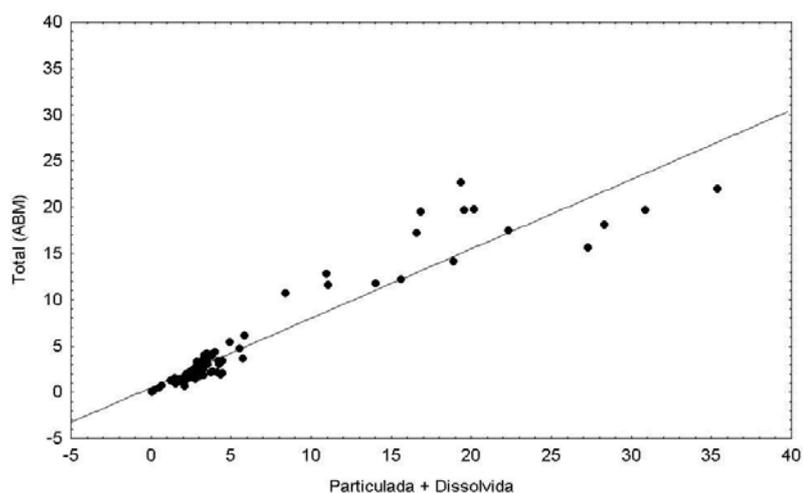


Figura 12: Gráfico de dispersão da produção total (ABM) pela produção (particulada + dissolvida) $y = 0,7497x + 0,5229$ e $r^2 = 0,8925$.

A produção particulada na maioria das espécies representa quase toda produção total chegando a 100% em *P. tricornutum* (Tabela 4). Porém as espécies *Chaetoceros affinis*, *C. muelleri*, *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* apresentaram alta produção dissolvida alcançando até 58% em *C. muelleri*.

Tabela 4 – Produção total (ABM), particulada dissolvida e total em mgC/mg Chl-*a*⁻¹h⁻¹ e percentual das diferentes frações na produção total nas diferentes intensidades luminosas ($\mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$) e para cada espécie.

Espécie	Luz	ABM	Part	Disol	Part+Dis.	% part(P+D).	% disol.(P+D)
<i>N. oculata</i>	82,5	11,73	13,73	0,34	14,07	98	2
	101,5	12,17	15,31	0,33	15,64	98	2
	139,6	14,10	18,46	0,42	18,88	98	2
	194,9	17,43	20,54	1,82	22,36	92	8
	262,6	19,63	29,18	1,68	30,86	95	5
	368,5	21,99	33,81	1,61	35,42	95	5
	549,1	18,12	26,95	1,37	28,31	95	5
	780,4	15,60	26,35	0,94	27,30	97	3
<i>C. affinis</i>	68,8	0,18	0,09	0,09	0,18	52	48
	89,8	0,02	0,02	0,01	0,03	71	29
	101,5	0,06	0,06	0,01	0,07	90	10
	110,9	0,10	0,09	0,01	0,10	93	7
	135,9	0,22	0,14	0,08	0,21	64	36
	235,1	0,31	0,22	0,13	0,35	62	38
	350,7	0,01	0,01	0,00	0,01	69	31
	610,9	0,00	0,01	0,00	0,01	85	15
<i>C. muelleri</i>	104,2	0,09	0,08	0,11	0,19	42	58
	131,4	0,07	0,10	0,11	0,20	48	52
	147,6	0,12	0,11	0,10	0,21	53	47
	197,2	0,13	0,07	0,07	0,14	48	52
	260,9	0,14	0,11	0,04	0,15	73	27
	354,0	0,09	0,11	0,04	0,15	72	28
	469,1	0,14	0,10	0,05	0,15	68	32
	596,0	0,12	0,15	0,02	0,17	86	14
<i>P. tricornutum</i>	74,9	1,72	2,99	0,03	3,02	99	1
	94,7	2,24	3,85	0,03	3,88	99	1
	125,2	2,50	3,25	0,04	3,29	99	1
	177,3	2,07	4,46	0,02	4,49	99	1
	262,2	2,11	3,76	0,02	3,77	100	0
	383,9	1,88	4,33	0,03	4,35	99	1
	522,5	2,11	4,15	0,02	4,17	99	1
	717,0	1,78	3,24	0,03	3,27	99	1

<i>S. costatum</i>	81,7	3,24	1,95	1,26	3,21	61	39
	83,4	2,93	1,83	1,11	2,95	62	38
	90,1	3,92	2,26	1,52	3,78	60	40
	114,7	4,08	2,31	1,50	3,81	61	39
	159,0	4,35	2,40	1,63	4,03	60	40
	244,5	6,08	3,26	2,58	5,85	56	44
	425,3	5,38	2,92	2,00	4,92	59	41
	634,5	3,58	1,98	1,33	3,31	60	40
<i>T. fluviatilis</i>	65,0	11,58	7,50	3,57	11,07	68	32
	77,6	12,75	7,45	3,52	10,97	68	32
	89,1	10,65	5,99	2,40	8,39	71	29
	113,8	17,22	10,91	5,69	16,60	66	34
	162,9	22,68	12,69	6,67	19,37	66	34
	241,7	19,77	14,24	5,96	20,20	71	29
	339,9	19,46	13,44	3,42	16,86	80	20
	542,0	19,65	17,68	1,89	19,57	90	10
<i>T. pseudonana</i>	90,2	1,74	1,69	0,42	2,11	80	20
	111,7	2,49	2,05	0,64	2,69	76	24
	141,0	3,00	2,64	0,47	3,11	85	15
	194,5	3,23	2,91	0,59	3,50	83	17
	248,3	3,29	2,63	0,25	2,88	91	9
	335,8	3,34	3,32	0,20	3,52	94	6
	469,4	2,56	2,60	0,13	2,73	95	5
	648,3	3,35	3,18	0,17	3,35	95	5
<i>T. chuii</i>	72,3	2,03	2,00	0,34	2,34	85	15
	90,4	2,12	2,14	0,26	2,40	89	11
	113,2	2,98	3,23	0,33	3,56	91	9
	143,5	3,39	3,97	0,27	4,24	94	6
	207,4	3,01	3,93	0,31	4,24	93	7
	290,6	4,71	5,12	0,41	5,53	93	7
	461,0	3,38	4,19	0,29	4,48	93	7
	643,7	3,62	5,07	0,69	5,76	88	12
<i>T. tetrathele</i>	91,58	1,77	0,04	1,37	1,82	98	2
	106,7	1,81	0,06	1,40	1,87	97	3
	128,1	1,97	0,04	1,42	2,01	98	2
	163,7	2,16	0,05	1,92	2,22	98	2
	223,8	2,66	0,05	1,93	2,71	98	2

	330,8	2,88	0,06	2,13	2,93	98	2
	516,2	2,73	0,05	1,42	2,78	98	2
	676,4	2,49	0,04	1,63	2,54	98	2
<i>I. galbana</i>	109,4	1,83	1,82	0,40	2,22	82	18
	135,0	2,00	2,07	0,51	2,58	80	20
	189,9	2,60	2,45	0,53	2,98	82	18
	226,3	2,95	2,20	0,72	2,92	75	25
	291,7	3,60	2,51	0,87	3,38	74	26
	380,0	4,14	2,50	1,01	3,51	71	29
	502,3	3,98	2,36	1,01	3,37	70	30
	669,6	2,77	2,53	0,64	3,17	80	20

Na Tabela 5 estão listados os parâmetros das curvas P_{xI}. *Tetraselmis tetrathele* apresentou o maior P_{máx} para a produção bruta de oxigênio e obteve a maior taxa de respiração. *Nannochloropsis oculata* mostrou o maior P_{máx} para o carbono particulado e *Thalassiosira fluviatilis* para o total (ABM).

Isochrysis galbana mostrou o maior rendimento quântico para o oxigênio e *Chaetoceros muelleri* para o carbono particulado, além disso, estas duas espécies apresentaram P_{máx} em altas intensidades luminosas para oxigênio, carbono particulado e total. No carbono total (ABM) *Skeletonema costatum* apresentou o maior rendimento quântico esta espécie também apresentou menor taxa de respiração e mais baixa irradiância no ponto de compensação.

Tabela 5: Parâmetros das curvas de produção x intensidade luminosa (PxI) do oxigênio (produção bruta), carbono particulado e carbono total (ABM). $P_{\text{máx}}$ = máxima taxa fotossintética ($\text{mg O}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ ou $\text{mg C}/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$); $I_{\text{P}_{\text{máx}}}$ = intensidade luminosa no $P_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$); Rendimento quântico ou inclinação inicial da curva $\Delta P/\Delta I$ ($\text{mg O}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}/\mu\text{M}$); R = respiração ($\text{mg O}_2/\text{mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$); I_c = ponto de compensação ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$).

Espécie	$P_{\text{máx}}(\text{O}_2)$	$I_{\text{P}_{\text{máx}}}(\text{O}_2)$	Rendimento quântico	R	I_c
<i>N. oculata</i>	18,64	231	0,098	0,0016	155,2
<i>T. fluviatilis</i>	9,76	627,2	0,05	0,0057	66,9
<i>T. pseudonana</i>	13,35	645,6	0,06	0,0006	54
<i>P. tricornutum</i>	10,62	297,5	0,086	0,0012	41,7
<i>S. costatum</i>	9,55	188,2	0,058	0	32,3
<i>C. affinis</i>	3,63	135,9	0,034	0,0016	101,5
<i>C. muelleri</i>	19,47	653,6	0,069	0,0042	94,9
<i>T. chuii</i>	17,43	432,9	0,081	0,0006	47,8
<i>T. tetrathele</i>	58,99	319,5	0,12	0,0155	64,16
<i>I. galbana</i>	22,46	511,4	0,903	0,0014	66,8
Espécie	$P_{\text{máx}}(\text{part})$	$I_{\text{P}_{\text{máx}}}(\text{part})$	Rendimento quântico		
<i>N. oculata</i>	33,807	368,5	0,0606		
<i>T. fluviatilis</i>	17,6832	542	0,0909		
<i>T. pseudonana</i>	3,3207	335,8	0,0187		
<i>P. tricornutum</i>	3,8534	94,7	0,0438		
<i>S. costatum</i>	3,2644	244,5	0,1757		
<i>C. affinis</i>	0,2166	235,1	0,0033		
<i>C. muelleri</i>	0,1483	596	1,671		
<i>T. chuii</i>	5,1186	290,6	0,0344		
<i>T. tetrathele</i>	2,8759	330,8	0,0053		
<i>I. galbana</i>	2,5327	669,6	0,0099		
Espécie	$P_{\text{máx}}(\text{ABM})$	$I_{\text{P}_{\text{máx}}}(\text{ABM})$	Rendimento quântico		
<i>N. oculata</i>	21,988	368,5	0,0507		
<i>T. fluviatilis</i>	22,6811	162,9	0,1630		
<i>T. pseudonana</i>	3,3516	648,3	0,0248		
<i>P. tricornutum</i>	2,5000	125,2	0,0267		
<i>S. costatum</i>	6,0765	244,5	0,3882		
<i>C. affinis</i>	0,3110	235,1	0,0035		
<i>C. muelleri</i>	0,1442	469,1	0,0034		
<i>T. chuii</i>	4,7074	290,6	0,0231		
<i>T. tetrathele</i>	2,1347	330,8	0,0073		
<i>I. galbana</i>	4,1361	380	0,0085		

Quociente Fotossintético:

As espécies *Chaetoceros affinis* e *C. muelleri* apresentaram uma grande variação nos resultados dos quocientes fotossintéticos. *C. affinis* com valores de 1,61 a 35,44 M para a fração particulada e de 1,1 a 45,3 M para a produção total (ABM). Já *C. muelleri* mostrou uma variação de 6,11 a 15,66 na produção particulada e 5,35 a 14,36 na produção total (Fig 13a e 13a).

Os quocientes fotossintéticos mais baixos na produção particulada e total foram apresentados pelas espécies *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira fluviatilis*. *N. oculata* com valores entre 0,23 e 0,66 M para produção particulada e 0,39 e 0,78M para produção total. *T. fluviatilis* com valores de 0,41 a 0,86M na fração particulada e 0,31 a 0,49 M na produção total (Fig 14b e 14b).

As demais espécies apresentaram seus valores de quociente fotossintético entre 1,31 a 7,14M para fração particulada e 0,78 a 6,0M para produção total (ABM).

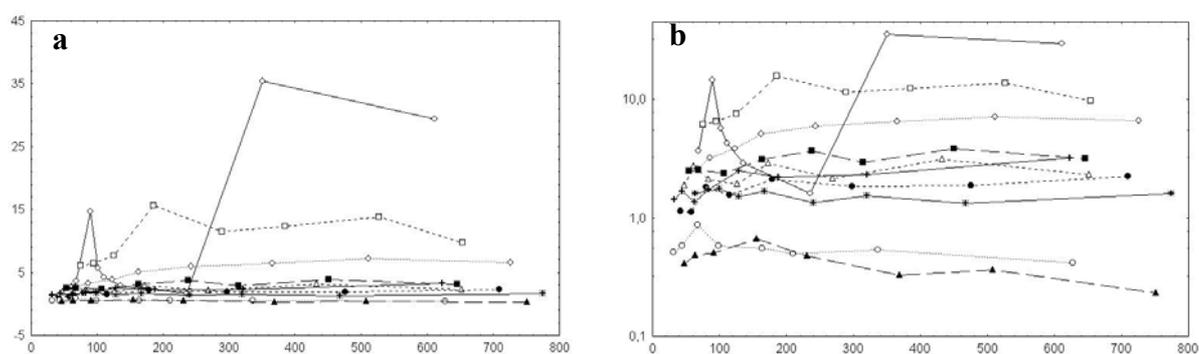


Figura 13: Quociente fotossintético para produção particulada das diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

-▲- *Nannochloropsis oculata* -■- *Thalassiosira pseudonana* ...○... *Thalassiosira fluviatilis* -+ *Skeletonema costatum*
-●- *Phaeodactylum tricornutum* -◇- *Chaetoceros affinis* --□- *Chaetoceros muelleri* --△- *Tetraselmis chuii*
-✱- *Tetraselmis tetrathele* ...◇... *Isochrysis galbana*

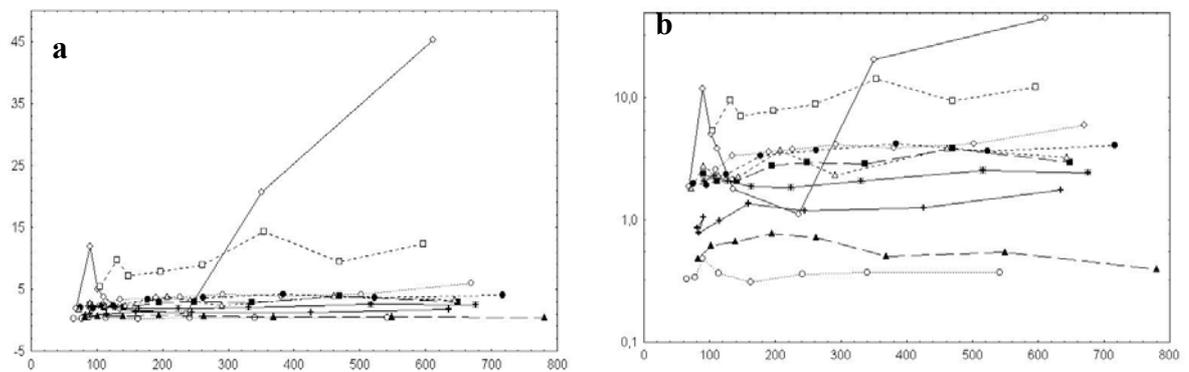


Figura 14: Quociente fotossintético para produção total das diferentes espécies nas diferentes intensidades luminosas ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) (a = escala linear, b = escala log-decimal).

-▲- *Nannochloropsis oculata* -■- *Thalassiosira pseudonana* ...○- *Thalassiosira fluviatilis* -+ *Skeletonema costatum*
 -●- *Phaeodactylum tricorutum* -◇- *Chaetoceros affinis* -□- *Chaetoceros muelleri* -△- *Tetraselmis chuii*
 -* *Tetraselmis tetrathele* ...◇- *Isochrysis galbana*

Lipídios totais e produção de biodiesel:

A extração da fração lipídica apresentou os seguintes resultados mostrou que a espécie *Nannochloropsis oculata* tem a maior presença de lipídios que as outras duas espécies testadas (Tabela 6).

Tabela – 6: Fração lipídica das algas mais produtivas.

Espécie	Fração lipídica (mg/g^{-1} de peso seco)	% da fração lipídica
<i>N. oculata</i>	161,9	16,2
<i>S. costatum</i>	28,9	2,9
<i>T. fluviatilis</i>	27	2,7

Para a espécie *Nannochloropsis oculata* foi realizado um teste qualitativo para produção de biodiesel com resultados positivos.

DISCUSSÃO:

➔ Crescimento:

As espécies estudadas apresentaram curvas de crescimento com padrão similar ao estabelecido para cultivos de fitoplâncton do tipo “batelada”, com as seguintes fases: 1) LAG ou de indução, fase inicial na qual não há aumento celular aparente; 2) LOG ou Logarítmica, observada após a fase LAG, na qual a divisão celular é rápida e onde há um aumento acentuado no número de células; 3) Estacionária, posterior a fase LOG, onde o crescimento atinge um equilíbrio e 4) Declínio, ou Senescência, subsequente a fase Estacionária, onde ocorre a morte da maioria das células devido a algum fator limitante (Fogg & Thake 1987). Entretanto, verifica-se que as espécies de microalgas estudadas apresentaram tempos de duração diferentes de algumas das fases. Por exemplo, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chuii* e *T. tetrahele* apresentaram fases LAG mais longas, enquanto que *Thalassiosira fluviatilis*, *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros muelleri* tiveram uma fase LAG muito curta. Além disso, nem todas as espécies estudadas atingiram as fases Estacionária e de Declínio durante o período de cultivo. É possível que alguns fatores como temperatura de cultivo, salinidade, fotoperíodo e mesmo disponibilidade de nutrientes possa ter afetado o crescimento destas algas de maneira diferente.

Apesar de não ter a maior taxa de crescimento, uma fase LAG curta provavelmente possibilitou a *Nannochloropsis oculata* atingir o maior rendimento entre todas as espécies estudadas ao final de cinco dias de cultivo. Por outro lado, *T. pseudonana* apresentou uma alta taxa de crescimento exponencial e um curto tempo de duplicação, mesmo assim obteve um baixo rendimento. O curto tempo de duração do cultivo (5 dias) e a longa duração da fase LAG desta espécie influenciaram no resultado, impedindo que um maior rendimento máximo fosse alcançado. Diferentemente, o baixo rendimento da espécie *Chaetoceros affinis* pode ser explicado pela sua pequena taxa de crescimento e conseqüentemente longo tempo de duplicação.

Considerando-se as 10 (dez) espécies testadas, *Nannochloropsis oculata* atingiu os maiores valores de abundância celular, enquanto que *Chaetoceros affinis* foi a espécie com menor taxa de crescimento no período de cinco dias. Nestes casos, parece

ter havido uma relação inversa entre o tamanho das células e a máxima abundância alcançada, isto é, *N. oculata*, que foi a menor espécie estudada (2 – 3 μm) atingiu a maior abundância celular, enquanto que *C. affinis*, com diâmetro de 7 – 30 μm , apresentou o menor crescimento para o mesmo tempo de cultivo. Sabe-se que em condições ótimas de cultivo o crescimento celular de células do fitoplâncton é inversamente proporcional ao tamanho das células (Morris 1980). Isto se deve ao fato de que uma maior área de superfície celular influencia positivamente a fotossíntese, já que define a área que a energia da luz deverá ultrapassar para ser absorvida. Desta forma, uma maior razão área/volume da célula aumenta o processo de absorção de luz e entrada de nutrientes, acelerando o processo de divisão e crescimento (Andrews 1991).

Considerando-se os resultados de crescimento celular obtidos, pode-se dizer que *Nannochloropsis oculata*, *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros muelleri* foram as espécies que atingiram maior crescimento celular e rendimento em curto espaço de tempo sendo, por isso, indicadas para estudos posteriores de cultivos em larga escala.

➔ **Produção primária:**

Produção primária é a quantidade de matéria orgânica acrescida pela fotossíntese em um dado volume de água por intervalo de tempo (Lalli & Parsons 1993). A principal forma para se medir produção primária é usar os elementos envolvidos na fotossíntese, seja na forma de liberação do oxigênio ou como fixação do carbono e, em ambos os casos, envolve a incubação de amostras de água durante um período de tempo (Williams et al. 2002).

Medidas de produção primária pelo método de oxigênio são mais baratas e rápidas em comparação com o método que utiliza o isótopo radioativo ^{14}C . Entretanto, para transformarmos os valores de oxigênio em carbono é necessário se aplicar um fator de conversão, conhecido como quociente fotossintético (QF), que é a razão molar entre as taxas de produção de oxigênio e absorção de CO_2 . Este fator de conversão é determinado a partir de medidas simultâneas de produção de O_2 e absorção de $^{14}\text{CO}_2$ para uma mesma cultura de células, como realizado neste estudo. Desta forma com os resultados aqui obtidos será possível determinar valores mais precisos de quociente

fotossintético, que poderão ser utilizados para a determinação dos valores de absorção de CO₂ a partir de medidas de produção primária por oxigênio.

A avaliação da relação fotossíntese x irradiância (curvas P x I) é fundamental em estudos de produção primária, porque mostra a eficiência com a qual uma espécie consegue transformar a energia luminosa em energia química. Uma curva P x I apresenta informações sobre a fisiologia da alga, qual sua capacidade fotossintética, o ponto máximo de saturação de luz, isto é, onde ocorre a produção fotossintética máxima e também como é seu comportamento em condições de pouca ou intensa luminosidade. Variações nessas curvas podem indicar as respostas celulares às mudanças nas condições ambientais, como mudanças de temperatura, salinidade, concentração de nutrientes e disponibilidade de luz, podendo alterar os níveis de produção primária nas diferentes intensidades luminosas (Macedo et al. 2002). Além disso, a análise destas curvas apresenta particular relevância para se predizer os fluxos de carbono nos oceanos, uma vez que ao se saber em que condições ocorre a máxima taxa fotossintética de uma espécie é possível prever o seu florescimento do fitoplâncton nos oceanos. Tal fato é importante principalmente para grandes microalgas que possuem rápida taxa de sedimentação. Em um florescimento destas microalgas no oceano, há uma grande fixação do carbono inorgânico da água através da fotossíntese e, conseqüentemente, retirada deste gás da atmosfera. Através da sedimentação, grande parte do carbono fixado pelas algas é transferido para o fundo dos oceanos, um processo conhecido como “Bomba Biológica” (Falkowski & Raven 1997).

Neste estudo a realização de medidas de produção primária em diferentes condições luminosas teve por objetivo identificar o nível ótimo de luz onde ocorrem as maiores taxas de produtividade primária principalmente para se estabelecer quais espécies poderão ser melhor cultivadas no verão (espécies adaptadas à luz), ou no inverno (espécies adaptadas à sombra).

Medidas de Produção Primária por variação do Oxigênio dissolvido:

Tetraselmis tetrathele apresentou a maior produção de oxigênio, apesar de ter apresentado a menor abundância celular e de concentração de clorofila no início dos experimentos de produção. Além disso, como se verá adiante, esta espécie de microalga

não apresentou elevada taxa de incorporação de carbono medido pelo método de ^{14}C . A fotossíntese é um processo químico que consiste na conversão de dióxido de carbono e água em carboidratos, com produção de oxigênio (Hall & Rao 1980). Porém, em experimentos que utilizam garrafas DBO, nem todo oxigênio medido provem da fotossíntese. A fonte de nitrogênio utilizada pelas algas pode influenciar o resultado. Por exemplo, quando o nitrato é a fonte principal de nitrogênio ele será reduzido à amônia antes de ser assimilado, essa conversão resulta na produção de oxigênio (Williams & Robertson 1991). Nesse trabalho a fonte de nitrogênio do meio utilizado para o cultivo (f/2) foi nitrato o que, provavelmente, influenciou no resultado das espécies que apresentaram uma alta liberação de oxigênio mas baixa fixação de carbono como *T. tetrathele*.

As duas propriedades mais importantes de um curva de produção x intensidade são a inclinação inicial da reta (α) e o $P_{\text{máx}}$ (Parsons et al.1984). Jassby e Platt (1976) recomendam o uso de formulações matemáticas para o esclarecimento destes parâmetros fisiológicos nos experimentos de fotossíntese. Entretanto, neste estudo os parâmetros das curvas P x I são dados com base nas observações experimentais sem a aplicação de nenhum modelo matemático para a padronização das curvas.

$P_{\text{máx}}$ é a taxa máxima de fotossíntese exibida por uma população de fitoplâncton, este valor representa a capacidade fotossintética máxima por unidade de biomassa (usualmente clorofila). Nem sempre o $P_{\text{máx}}$ alcançado em um experimento representa exatamente o valor para a espécie, ele provavelmente será um valor aproximado, uma vez que o $P_{\text{máx}}$ real pode estar entre duas intensidades luminosas medidas. Além disso, mesmo havendo um controle sobre as condições ótimas desejadas para o experimento, as variações de temperatura, nutrientes e luz podem alterar o cultivo.

Populações naturais apresentam um $P_{\text{máx}}$ entre 0,5 e 30 mg O_2 mg $\text{chl}a^{-1}$ h^{-1} , (Morris, 1980). Neste trabalho *Nannochloropsis oculata* apresentou $P_{\text{máx}}$ de 18,64 mg O_2 mg $\text{chl}a^{-1}$ h^{-1} um resultado maior do que o apresentado por Yamasaki & Yamaoka (2001) (13,8 mg O_2 mg $\text{chl}a^{-1}$ h^{-1}) em experimento para avaliar o efeito da concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) na produção de oxigênio

A inclinação inicial de uma curva P x I é definida como o “rendimento quântico” ou “eficiência fotossintética” (Parsons et al.1984), e depende do conteúdo de pigmentos da célula e de suas características de absorção. Esta é uma medida da máxima eficiência

quântica da fotossíntese (Morris 1980) e, em geral, resultaria das mudanças fisiológicas e bioquímicas da célula (Lalli & Parsons 1993). Diversos fatores podem afetar o valor do rendimento quântico como, por exemplo, a presença de pigmentos acessórios que aumentam a eficiência fotossintética. Além disso, o rendimento quântico pode mudar, dependendo do estado fisiológico da alga e as suas condições de crescimento. *Chaetoceros muelleri* apresentou o maior rendimento quântico considerando a sua produção de oxigênio. A presença de pigmentos acessórios pode ter contribuído para a maior eficiência quântica desta espécie.

A luz é um dos principais fatores limitantes do crescimento de microalgas, tanto num nível máximo quanto no mínimo. Segundo Morris (1980), espécies adaptadas à sombra mostram fotoinibição já em baixas intensidades luminosas, enquanto que espécies adaptadas à luz tendem a ter menor eficiência fotossintética, mas parecem ser menos suscetíveis a fotoinibição. No ambiente, a intensidade luminosa que atinge a camada eufótica controla o ecossistema aquático por meio da sua influência sobre a produção primária. Em comunidades mistas sob condições de sombreamento as algas adaptadas a sombra são mais competitivas (Odum 1988). Enquanto que em situações de altas intensidades, as microalgas adaptadas à luz não são inibidas e crescem melhor.

Com os dados de produção de oxigênio foi possível observar adaptações às intensidades luminosas nas espécies estudadas. Por exemplo, *C. muelleri*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*, mostraram uma maior produção de oxigênio em altas intensidades luminosas, indicando uma adaptação à elevada luminosidade na coluna de água. *Thalassiosira pseudonana* e *T. fluviatilis* não foram tão produtivas mas também apresentaram uma maior produtividade em altas intensidades. Já *Nannochloropsis oculata* foi mais produtiva em intensidades luminosas mais baixas, indicando uma adaptação à sombra.

Considerando-se a possibilidade de que os elevados valores de produção de oxigênio não seja resultado direto da fotossíntese, não seria indicado utilizarmos *Tetraselmis tetrathele* para um cultivo em larga escala. Neste caso, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* aparecem como as espécies mais produtivas, em termos de liberação de O₂.

Medidas de produção primária pelo método de ^{14}C :

Nannochloropsis oculata apresentou a mais alta taxa de produção particulada. Com este resultado podemos calcular uma absorção aproximada de 17 a 32 Ton.C ha⁻¹.ano⁻¹, este valor está de acordo com o citado por Margalef (1977) para microalgas cultivadas (11 – 36 Ton.C ha⁻¹.ano⁻¹). Devido ao seu tamanho (2 – 4 µm) essa espécie é classificada como picoplâncton. Em muitos ecossistemas pelágicos (oceano aberto) as algas do picoplâncton são os principais produtores primários (Van Den Hoek et al. 1995).

A diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* apresentou valores altos para fixação de carbono. Na produção particulada apresentou maior fixação de carbono em altas intensidades luminosas, assim como na liberação de oxigênio, o que comprova sua adaptação às condições de maior luminosidade. Da mesma forma, os altos valores de $P_{\text{máx}}$ para o carbono particulado e total em altas intensidades luminosas encontrados para *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana* reforçam a afirmação de que estas espécies também estão adaptadas às condições de maior luminosidade.

Para microalgas em cultura o $P_{\text{máx}}$ pode variar de 1,1 a 6,2 mg C mg chl a^{-1} h⁻¹ e de 0,1 a 6,0 mg C mg chl a^{-1} h⁻¹ para populações naturais, entretanto alterações podem ocorrer. Neste estudo *S. costatum* apresentou $P_{\text{máx}}$ de 6,08 mg C mg chl a^{-1} h⁻¹ mas em florações massivas desta alga esse valor pode variar de 9,0 a 16,9 mg C mg chl a^{-1} h⁻¹ (Parsons et al. 1984).

Um alto rendimento quântico encontrado para *C. muelleri* na produção particulada, provavelmente pelos motivos expostos anteriormente, ou seja, influência de pigmentos acessórios na absorção da luz.

O método ABM (Schindler et al. 1972) para medidas de produção primária total com ^{14}C foi uma técnica alternativa criada para reduzir os erros associados com a filtração e para acrescentar a fração dissolvida da produção primária não considerada pela técnica de filtração de Steeman Nielsen (1952). Na maioria das espécies não foram encontradas grandes diferenças entre os resultados de produção particulada e produção total (ABM). Entretanto, no caso das espécies *Chaetoceros affinis*, *C. muelleri*, *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* a produção dissolvida representou grande parte da produção total chegando a 58% em *C. muelleri*, o que demonstra a

importância de se medir esta fração também. Desta forma, como também sugerido por Abreu et al. (1994), o método ABM seria mais acurado por considerar as duas frações da produção primária.

Nos valores mais baixos de produção, comparando os resultados da produção total (ABM) com a produção total (particulada + dissolvida), a dispersão dos dados é menor. A medida que aumentam os valores de produção aumenta a dispersão dos dados, isto indica que quanto maior os resultados de produção maior a possibilidade de ocorrer erros ao se utilizar somente um dos métodos de ^{14}C , principalmente em experimentos com microalgas em cultivo ou que tenham uma alta produção de carbono.

Considerando os valores de fixação de carbono, *N. oculata* e *T. fluviatilis* parecem ser as espécies mais indicadas para um cultivo em larga escala visando uma grande absorção de carbono.

Quociente fotossintético:

O quociente fotossintético é a razão molar da taxa de oxigênio produzida e o carbono assimilado e varia como uma função da fonte de nitrogênio utilizada (Macedo et al. 2002).

Os altos quocientes fotossintéticos encontrados na maioria das espécies provavelmente são resultado da conversão de nitrato para amônia o que resulta na produção de duas moléculas de oxigênio por átomo de nitrogênio assimilado, além disso, a formação de produtos fotossintéticos ou compostos orgânicos também elevam os valores dos quocientes fotossintéticos (Williams & Robertson 1991).

Apesar de nitrato ser a fonte de nitrogênio do meio de cultivo utilizado nos experimentos, *N. oculata* e *T. fluviatilis* apresentaram quocientes fotossintéticos baixos, inferiores a 1,0. Segundo Williams et al. (2002) valores de quociente fotossintético menores que 0,75 resultam da fotorespiração. Fotorespiração é um metabolismo semelhante à respiração mitocondrial, com consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono, porém ocorrendo somente na presença de luz. O substrato inicial para o metabolismo fotorespiratório é a RuBP (ribulose bifosfato), a qual não é somente um aceptor de CO_2 mas também de oxigênio. A oferta de CO_2 e de O_2 direciona o comportamento da enzima RuBP carboxilase/oxigenase como catalisadora de

carboxilação (fotossíntese) ou de oxidação (fotorespiração) (Larcher 2000). Valores altos de oxigênio favorecem a fotorespiração. A fixação do gás carbônico e liberação do oxigênio aumentam com o incremento da atividade fotossintética. Desta forma, o aumento da produção de oxigênio dentro das garrafas devido a alta atividade fotossintética pode ter iniciado um processo de fotorespiração com o consumo deste O₂ em excesso e liberação de CO₂, o que provavelmente resultou em baixos valores de oxigênio, reduzindo o quociente fotossintético. Desta forma, pode-se dizer que a fotorespiração é um importante processo que pode limitar a fixação do carbono (Williams et al. 2002).

Abreu (1992) também observou valores mais baixos de quociente fotossintético quando incluiu os resultados de carbono orgânico dissolvido no cálculo desta razão, ou seja ao calcular o QF com a produção total (ABM) os valores são mais baixos. Isto confirma a importância de considerar a fração dissolvida da produção primária para melhor estimar o quociente fotossintético.

Entretanto, podemos dizer que as grandes variações nos valores dos quocientes fotossintéticos deve-se as diferenças observadas entre os dois métodos. Principalmente pelo fato de que cada um mede diferentes processos metabólicos, ou seja, o método de oxigênio mede o fluxo total de energia nas células durante a fotossíntese, enquanto que o método de ¹⁴C indica a quantidade de carbono fixado como matéria orgânica.

A eficiência com a qual o aparato fotossintético de uma célula pode fazer uso da energia absorvida para fixar carbono varia de uma espécie para outra e depende das condições ambientais e de seu estado fisiológico, ou seja, fatores como temperatura, luz, nutrientes e condições de cultivo podem acentuar maiores diferenças na produção de oxigênio e absorção de carbono por uma mesma espécie (Kirk 1994).

→Potencialidade das espécies para cultivo em larga escala:

De acordo com os resultados de crescimento e produção primária quatro espécies apresentam potencial para a produção em larga escala. São estas: *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae), *Thalassiosira fluviatilis*, *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) e *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). Estas espécies alcançaram altas abundâncias celulares e rápido crescimento, além de apresentaram uma

alta fixação de carbono e boa produção de oxigênio. Outras vantagens de cada uma estão detalhadas abaixo.

Nannochloropsis oculata é amplamente utilizada na aquicultura, principalmente como alimento para o zooplâncton que é fornecido a peixes e crustáceos cultivados. Esta espécie apresenta uma boa qualidade nutricional (Rocha et al. 2003), é fonte de importantes ácidos graxos polinsaturados (Brown 2002) e de pigmentos (Lubián et al. 2000). Esta espécie mostrou uma adaptação à sombra, o que recomendaria o seu cultivo em estações do ano em que há menor radiação solar e temperaturas amenas, já que a temperatura ótima para esta espécie é 20 °C. A grande produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (Tonon et al. 2002) indica a potencialidade desta alga para a produção de produtos para consumo humano de interesse nutricional e terapêutico, uma vez que estes estão associados com menores incidências de problemas do coração (Metting & Pyne 1986).

Thalassiosira fluviatilis mostrou uma alta fixação de carbono. Por ser uma diatomácea, as quais são consideradas peças chave no ciclo biogeoquímico do carbono de acordo com o conceito de “bomba-biológica” (Smetacek 1999), e tendo aplicação prática na aquicultura como alimento devido ao alto teor de proteína e ácidos graxos (Brown 2002) esta microalga pode ser indicada para o cultivo em larga escala e em estações do ano com intensidades luminosas mais altas uma vez que essa espécie mostrou-se adaptada a luz.

Outra diatomácea indicada para o possível cultivo em larga escala é a espécie *Skeletonema costatum*, que possui a vantagem de ser encontrada em grande quantidade na região do estuário da Lagoa dos Patos. Ela é abundante em águas costeiras próximas a desembocadura do Estuário da Lagoa dos Patos (Odebrecht & Garcia, 1998) e na primavera e verão é comum a sua floração com a entrada de águas marinhas no estuário (Odebrecht & Abreu 1998). Além disso, é uma microalga eurihalina, ou seja, aceita grande variação de salinidade. Nesse estudo essa microalga cresceu bem em intensidade luminosa média, porém, segundo Abreu (1992) esta espécie parece estar adaptada a alta intensidade o que torna possível seu cultivo no verão. Esta espécie tem boa qualidade nutricional (Borowitzka 1997; Brown 2002), apresenta propriedade antibacteriana (Metting & Pyne 1986) e é usada na aquicultura como alimento para larvas de crustáceos e moluscos bivalves, principalmente *Crassostrea gigas* (Muller-Feuga 2000).

Outra microalga indicada para um cultivo em larga escala é *Isochrysis galbana*, que apresentou um rápido crescimento, uma alta liberação de oxigênio e de fixação de carbono. Esta espécie tem amplo uso na aquicultura (Borowitzka 1997; Duerr et al. 1998; Wikfors & Ohno 2001; Brown 2002) e é adaptada a altas intensidades luminosas, podendo ser cultivada no verão já que sua temperatura ótima é 27 °C (Kaplan et al. 1986).

→Potencial para a produção de Biodiesel pelas espécies que apresentaram maiores valores de Produção Primária:

Os cultivos de microalgas em larga escala requerem um barato e eficiente método, o qual seja compatível com a aplicação final da alga, uma vez que o principal problema dos cultivos é o custo de produção (Borowitzka 1997). Neste sentido, investir em pesquisas para produzir um produto de valor comercial agregado a espécie cultivada tornaria a produção de microalgas mais rentável.

Devido sua alta produtividade e com os resultados dos níveis de lipídios podemos dizer que a espécie *Nannochloropsis oculata* tem grande potencial na produção de bio-combustíveis. Testes preliminares de produção de lipídio por esta microalga mostram que a quantidade de lipídios representa aproximadamente 16% de seu peso seco. Além disso, foi realizado um teste qualitativo que atestou a possibilidade de produzir biodiesel com esta espécie.

As espécies *T. fluviatilis* e *S. costatum* apesar da boa produtividade apresentaram apenas cerca de 2,8% de peso seco em fração lipídica, um valor aparentemente baixo para possibilitar a produção de biocombustível. Entretanto, sabe-se que o teor lipídio das microalgas varia de acordo com seu estado fisiológico e condições do meio como nutrientes, luz, temperatura, salinidade, fase de cultivo etc. Assim, estudos para testar esses parâmetros visando à obtenção de uma maior produção de ácidos graxos nestas espécies teriam grande relevância.

CONCLUSÕES:

As espécies *N. oculata*, *T. fluviatilis*, *S. costatum* e *I. galbana* seriam as indicadas entre as espécies estudadas para futuros estudos visando cultivos em larga escala na região por preencher os requisitos propostos nos objetivos do trabalho: maiores taxas de absorção de carbono e valor comercial. Podendo potencialmente ser empregadas como um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL).

→ Perspectivas futuras:

É necessário testar estas espécies mais produtivas em cultivos em média escala. Além disso, testes com resultados quantitativos precisam ser realizados para que estas microalgas possam ser utilizadas como matéria-prima para produção de biodiesel ou de outros produtos com interesse econômico.

LITERATURA CITADA:

- ABREU, P. C. 1992. Phytoplankton production and the microbial food web of the Patos Lagoon Southern Brazil. Tese de Doutorado, Univ Bremen, Alemanha.
- ABREU, P. C., C. ODEBRECHT & A. GONZÁLEZ. 1994. Particulate and dissolved phytoplankton production of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: comparisons of methods and influencing factors. *J. Plankton Res.* 16 (7): 737 – 753.
- ABU-REZQ, T. S., L. AL-MUSALLAM, J. AL-SHIMMARI, & P. DIAS. 1999. Optimum production for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia* 403, 97-107.
- ADAMS, R.M., C.C. CHEN, B.A. MCCARL & D.E. SCHIMMELPFENNIG. 2003. Climate Variability and Climate Change: Implications for Agriculture. *Advances in the Economics of Environmental Resources* 3, 115 –148.
- ANDREWS, J. H. 1991. Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms. Springer-Verlag. 302p.
- ARAUJO, M. S. M. 2000. Relatório de análise de Desenvolvimento Limpo – MDL. ANEEL.
- BÉRARD-THERRIault, L., M. POULIN & L. BOSSÉ. 1999. Guide d'Identification du Phytoplancton Marin de l'Estuaire et du Golfe du Saint-Laurent. Ottawa, Conseil National de recherches du Canadá. 387p.
- BLIGH E. C. & W. J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911- 927.
- BOROWITZKA, M. A. & L. J. BOROWITZKA. 1988. Microalgal Biotechnology. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, U. K. pp. 197-221.
- BOROWITZKA, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: oportunities and constrains. *J. appl. Phycol.* 9: 393-401
- BOYD, P. et al. 2000. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature.* 407: 695-702.
- BOYD, P. 2004. Ironing out algal issues in the Southern ocean. *Science.* 304: 396-397.
- BROWN, L. M. & K. G. ZEILER. 1993. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Convers. Mgmt.* Vol. 34, nº 9-11: 1005-1013.

- BROWN, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: CRUZ-SUÁRES, L. E., D. RICQUE-MARIE, M. TAPIA-SALAZAR, M. G. GASCIOLA-CORTÉS, & N. SIMOES (Eds.) Avances in nutrición acuícola. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. Cancun, Quintana Roo, México.
- BROWN, M. R., S. W. JEFFREY, J. K. VOLKMAN, & G. A. DUNSTAN, 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- BRUNEL, J. 1970. Le phytoplancton de la Baie des Chaleurs. Montreal, Canadá. Les presses de L'université de Montréal, 365p.
- BUTCHER, R. W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British Coastal waters. Part. I: Introduction and Chlorophyceae. London. Fishery investigations series IV. Ministry of agriculture, fisheries and food. 74p.
- CHRÉTIENNOT-DINET, M. J., A. SOURNIA, M. RICARD & C. BILLARD. 1993. A classification of the marine phytoplankton of the world from class to genus. *Phycologia*: 32(3), 159 – 179.
- COLLINS, C. H., G. L. BRAGA & P. S. BONATO. 1995. Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas. Editora Unicamp.
- DUERR, E. O., A. MOLNAR, & V. SATO. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *J. Mar. Biotechnol.* 7: 65-70
- FALKOWSKI, P. G. & J. A. RAVEN. 1997. Aquatic Photosynthesis. U.S.A., Blackwell Science. 374p.
- FOGG, G.E. e THAKE, B. 1987. Algae cultures ans phytoplankton ecology. 3^oed. Londres, The University of Wisconsin Press. 269p
- GOLDMAN, J. C. 1977. Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. *Limnol. Ocean.* Vol. 22, 932-935
- GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L. & M. H. CHANLEY (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum, New York, 29-60.
- HALL, D.O. & K. K. RAO. 1980. Fotossíntese. São Paulo, E.P.U. 89p.
- HORNER, R. 2002. A Taxonomic Guide to Some Common Marine Phytoplankton. England, Biopress Ltd. 195p.

- KAPLAN, D., Z. COHEN & A. ABELIOVICH. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* (9), 37-48.
- KIRK, J.T.O. 1994. Light & photosynthesis in aquatic ecosystems. 2° ed. New York, U.S.A Cambridge University Press. 509p.
- KIRSCHBAUM, M. U. F. 2003. To sink or burn? A discussion of the potential contributions of forests to greenhouse gas balances through storing carbon or providing biofuels. *Biomass and Bioenergy*, 24: 297-310.
- KURANO, N., H. IKEMOTO, H. MIYASHITA, T. HASEGAWA, H. HATA & S. MIYACHI, 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt.* Vol. 36, nº 6-9: 689-692.
- LALLI, C. & T. PARSONS. 1993. *Biological Oceanography: an introduction*. Butterworth & Heinemann Ltd. 301 p.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, Rima Editora. 531p.
- LAVENS, P. & P. SORGELOOS. 1996. Manual on the production and use of live food for aquacultures. *FAO Fisheries Technical Paper*. Nº 361. Rome, FAO. 295p.
- LUBIÁN, L. M., O. MONTERO, I. MORENO-GARRIDO, I. E. HUERTAS, C. SOBRINO, M. GONZÁLEZ-del VALLE, & G. PARES. 2000. Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *J. appl. Phycol.* 12: 249-255.
- MA, F. & HANNA, M. A.; Biodiesel production: a review; *Bioresource Technology*; 70:1-15,1990.
- MACEDO, M.F.; DUARTE, P. e FERREIRA, J.G. 2002. The influence of incubation periods on photosynthesis-irradiance curves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 274: 101-120
- MARGALEF, R. 1995. *Ecologia*. Barcelona, Omega S.A., 958p.
- MARTIN, J., S. FITZWATER. 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific Ocean. *Nature*. 331: 341-343.
- METTING, B. & J. W. PYNE. 1986. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.8: 386 – 394.
- MORRIS, I. 1980. *The physiological ecology of phytoplankton*. California. U.S.A. University of California Press. 625p.

- MULLER-FEUGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. appl. Phycol.* 12: 527 – 534.
- NIELSEN, G.E. & A.M BRESTA. 1984. Guidelines for the measurement of phytoplankton primary production. *Baltic. Mar. Biol.*, 1.
- ODEBRECHT, C. & P. C. ABREU. 1998. Microalgas. In SEELIGER, U., C. ODEBRECHT & J. P. CASTELLO (Eds.) *Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil*. Rio Grande, Ecoscientia. 36 – 40.
- ODEBRECHT, C. & V. M. T. GARCIA. 1998. Fitoplâncton. In SEELIGER, U., C. ODEBRECHT & J. P. CASTELLO (Eds.) *Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil*. Rio Grande, Ecoscientia. 117 – 122.
- ODUM, E. P. 1988. *Ecologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. 434p.
- PARSONS, T. R., M. TAKAHASHI & HARGRAVE, B. 1984. *Biological Oceanographic Process*, 3^oed. Oxford, England. Pergamon Press Ltd. 330p.
- REITAN, K. I., J. R. RAINUZZO & Y. OLSEN. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, 30:972-979.
- RINES, J. E. B. & P. E. HARGRAVES. 1988. *The Chaetoceros Ehreberg (Bacillariophyceae) Flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A.* Berlin, J. Cramer. 196p.
- ROCHA, J. M. S., J. E. C. GARCIA & M. H. F. HENRIQUES. 2003. Growth aspects of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20: 237-242.
- SCHINDLER, D. W., R. V. SCHIMIDT & R. A. REID. 1972. Acidification and bubbling as an alternative to filtration in determining phytoplankton production by the ¹⁴C method. *J. Fish. Res. Board Can.* 29: 1627-1631.
- SCHLEGEL, H.G. 1986. *General microbiology*. U.S.A. Cambridge University Press. 655p.
- SMETACEK, V. 1999. Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist*, vol. 150: 25-32
- STEEMAN NIELSEN, E. 1952. The use of radioactive carbon (¹⁴C) for measuring primary production in the sea. *J. Cons. Explor. Mer.* 18: 117 – 140.
- STEIN, J. R. 1984. *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. 2^a. ed. cambridge Univ. Press. 448p.

- STRICKLAND, J. D. H. e PARSONS, T. R. 1972. A Practical handbook of seawater analysis. Fish Research Board of Canada. Ottawa, 310p.
- TAKAHASHI, T. 2004. The fate of industrial carbon-dioxide. Science vol. 305: 352-353
- TOMAS, C. R. 1996. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. California. U.S.A. Academic Press, INC. 598p.
- TONON T., D. HARVEY , T. R. LARSON & I. A. GRAHAM. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. Phytochemistry 61(1):15 – 24.
- VAN DEN HOEK, C., D. G. MANN, & H. M. JAHNS. 1995. Algae: An Introduction to Phycology. New York, Cambridge University Press. 627p.
- WELSCHMEYER, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and phaeopigments. Limnol. and Ocean. 39 (8): 1985-1992.
- WIKFORS, G.H. & M. OHNO. 2001. Impact of algal research in aquaculture. J. Phycol. 37: 968-974.
- WILLIAMS, P.J. le B. & J. E. ROBERTSON. 1991. Overall planktonic oxygen and carbon dioxide metabolisms: The problem of reconciling observations and calculations of photosynthetic quotients. Journal of Plankton Research, vol. 13: 153-169.
- WILLIAMS, P.J. le B., D. N. THOMAS, & C. S. REYNOLDS. 2002. Phytoplankton Productivity. Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems. U.S.A. Blackwell Science.Ltd. 386p.
- YAMASAKI, S. & H. YAMAOKA. 2001. Effect of dissolved inorganic carbon concentration on oxygen production of a unicellular alga *Nannochloropsis oculata*. Fisheries Science 67: 533-534.

Anexo 1: Dados brutos de oxigênio ($\text{mgO}_2/\text{mg Chl-a}^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$), de carbono particulado, dissolvido e total ($\text{mgC}/\text{mg Chl-a}^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$) e de quociente fotossintético.

Espécie	Part	Disol	Total	O ₂	Luz ¹⁴ C	Luz O ₂	QF. Part	QF. Total
<i>Nannochloropsis oculata</i>	13,728	0,341	11,725	7,49	82,5	47,2	0,41	0,48
	15,313	0,331	12,167	9,93	101,5	63,6	0,49	0,61
	18,463	0,419	14,098	12,54	139,6	91,3	0,51	0,67
	20,539	1,819	17,428	18,12	194,9	155,2	0,66	0,78
	29,184	1,679	19,631	18,64	262,6	231,0	0,48	0,71
	33,807	1,609	21,988	14,81	368,5	368,8	0,33	0,51
	26,946	1,367	18,117	13,07	549,1	507,4	0,36	0,54
	26,353	0,943	15,598	8,19	780,4	750,9	0,23	0,39
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	1,6875	0,4188	1,7375	5,58	90,2	54,0	2,48	2,41
	2,0527	0,6371	2,4921	6,90	111,7	68,6	2,52	2,08
	2,6412	0,4724	2,9990	8,32	141,0	107,0	2,36	2,08
	2,9116	0,5934	3,2259	12,04	194,5	163,0	3,10	2,80
	2,6336	0,2453	3,2887	12,92	248,3	237,9	3,68	2,95
	3,3207	0,2022	3,3441	12,92	335,8	313,8	2,92	2,90
	2,5955	0,1345	2,5630	13,24	469,4	450,5	3,83	3,88
	3,1813	0,1683	3,3516	13,35	648,3	645,6	3,15	2,99
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	7,4975	3,5715	11,5815	5,12	65,0	31,8	0,51	0,33
	7,4494	3,5213	12,7528	5,74	77,6	43,6	0,58	0,34
	5,9868	2,4040	10,6501	6,90	89,1	66,9	0,86	0,49
	10,9089	5,6933	17,2154	8,47	113,8	98,7	0,58	0,37
	12,6946	6,6712	22,6811	9,38	162,9	164,0	0,55	0,31
	14,2449	5,9562	19,7745	9,51	241,7	210,4	0,50	0,36
	13,4371	3,4220	19,4591	9,68	339,9	335,7	0,54	0,37
	17,6832	1,8873	19,6478	9,76	542,0	627,2	0,41	0,37
<i>Skeletonema costatum</i>	1,9546	1,2583	3,2412	3,70	81,7	32,3	1,42	0,86
	1,8335	1,1121	2,9314	4,08	83,4	44,6	1,67	1,04
	2,2611	1,5222	3,9187	4,08	90,1	62,4	1,35	0,78
	2,3091	1,4960	4,0817	5,34	114,7	83,4	1,73	0,98
	2,4023	1,6250	4,3468	7,92	159,0	128,8	2,47	1,37
	3,2644	2,5809	6,0765	9,55	244,5	188,2	2,19	1,18
	2,9193	2,0043	5,3797	8,99	425,3	320,6	2,31	1,25
	1,9756	1,3307	3,5817	8,39	634,5	622,2	3,19	1,76
	2,9864	0,0330	1,7163	4,53	74,9	41,7	1,14	1,98
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	3,8534	0,0253	2,2449	5,79	94,7	57,7	1,13	1,93
	3,2501	0,0425	2,5000	7,82	125,2	79,9	1,80	2,34
	4,4612	0,0248	2,0721	9,22	177,3	115,2	1,55	3,34
	3,7569	0,0180	2,1145	10,47	262,2	178,8	2,09	3,71
	4,3253	0,0280	1,8829	10,62	383,9	297,5	1,84	4,23
	4,1482	0,0237	2,1079	10,28	522,5	475,2	1,86	3,66
	3,2358	0,0341	1,7821	9,65	717,0	709,4	2,24	4,06

Continuação...

	Part	Disol	Total	O2	Luz 14C	Luz O2	QF. Part	QF. Total
<i>Chaetoceros affinis</i>	0,0912	0,0855	0,1767	3,12	68,8		3,65	1,9
	0,0188	0,0077	0,0222	2,81	89,8		14,68	11,9
	0,0599	0,0070	0,0636	3,22	101,5		5,67	5,1
	0,0886	0,0070	0,0967	3,53	110,9		4,24	3,8
	0,1354	0,0771	0,2160	3,63	135,9		2,87	1,8
	0,2166	0,1330	0,3110	3,22	235,1		1,61	1,1
	0,0074	0,0033	0,0128	3,12	350,7		35,44	20,7
	0,0053	0,0009	0,0009	1,99	610,9		29,40	45,3
<i>Chaetoceros muelleri</i>	0,0807	0,1131	0,0927	6,78	104,2	75,1	6,11	5,35
	0,0980	0,1051	0,0651	8,69	131,4	94,9	6,48	9,67
	0,1121	0,0976	0,1202	11,61	147,6	124,8	7,60	7,11
	0,0665	0,0716	0,1345	14,42	197,2	185,7	15,66	7,90
	0,1069	0,0395	0,1395	16,78	260,9	288,8	11,50	8,87
	0,1064	0,0408	0,0912	17,90	354,0	384,8	12,32	14,36
	0,0985	0,0472	0,1442	18,58	469,1	526,7	13,79	9,50
	0,1483	0,0236	0,1169	19,47	596,0	653,6	9,68	12,25
<i>Tetraselmis chuii</i>	1,9973	0,3446	2,0331	4,94	72,3	47,8	1,85	1,82
	2,1379	0,2606	2,1167	7,73	90,4	61,0	2,71	2,74
	3,2258	0,3332	2,9777	9,12	113,2	83,4	2,12	2,30
	3,9674	0,2696	3,3887	10,23	143,5	126,0	1,93	2,26
	3,9299	0,3123	3,0051	15,05	207,4	172,4	2,87	3,76
	5,1186	0,4140	4,7074	14,64	290,6	268,8	2,15	2,33
	4,1859	0,2930	3,3761	17,43	461,0	432,9	3,12	3,87
	5,0705	0,6891	3,6183	15,63	643,7	651,7	2,31	3,24
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	1,7746	0,0425	1,3714	38,20	91,58	64,165	1,61	2,09
	1,8132	0,0553	1,3962	42,55	106,7	99,27	1,76	2,29
	1,9703	0,0432	1,4216	39,65	128,1	129,17	1,51	2,09
	2,1622	0,0546	1,9216	48,35	163,7	167,55	1,68	1,89
	2,6621	0,0523	1,9276	47,38	223,8	240,3	1,33	1,84
	2,8759	0,0573	2,1347	58,99	330,8	319,5	1,54	2,07
	2,7333	0,0512	1,4160	47,87	516,2	467,35	1,31	2,54
	2,4924	0,0445	1,6314	53,19	676,4	774,9	1,60	2,45
<i>Isochrysis galbana</i>	1,8171	0,4006	1,8348	6,30	109,4	66,8	2,60	2,58
	2,0719	0,5084	1,9968	8,88	135,0	86,3	3,21	3,33
	2,4454	0,5315	2,5973	12,51	189,9	123,4	3,84	3,61
	2,1956	0,7249	2,9490	14,97	226,3	162,8	5,11	3,81
	2,5144	0,8670	3,5968	20,00	291,7	243,0	5,97	4,17
	2,5038	1,0069	4,1361	21,52	380,0	365,2	6,45	3,90
	2,3595	1,0066	3,9806	22,46	502,3	511,4	7,14	4,23
	2,5327	0,6391	2,7655	22,11	669,6	726,4	6,55	6,00