

Bioensaio

Limitação Nutricional

Tetraselmis gracilis (Chlorophyta - Prasinophyceae)

Grupo 4

Carine de Godoi Rezende Costa

5653276

Danilo Rodrigues Vieira

5653262

Luis Fabiano Baldasso

5653338

Patrícia Martins Sparagna

5653092

Renan Kuwana

5653168

Roberto Tomazini de Oliveira

5653450

Sumário

1	Introdução	p.3
1.1	Microalgas	p.3
1.2	Nutrientes	p.3
1.2.1	Nitrogênio	p.3
1.2.2	Fósforo	p.3
1.2.3	Vitaminas	p.4
1.3	Experimento	p.4
1.4	Etapas de crescimento esperadas	p.4
2	Materiais e métodos	p.6
2.1	Preparação dos cultivos	p.6
2.2	Amostragem e contagem	p.6
2.3	Processamento dos dados	p.6
3	Resultados	p.8
4	Discussões	p.10
4.1	Crescimento	p.10
4.2	Erros	p.10
5	Conclusões	p.11
	Referências Bibliográficas	p.13

1 Introdução

1.1 Microalgas

As algas são organismos que vivem em sistemas aquáticos sob incidência de luz solar. Sua importância na natureza está grandemente relacionada à elevada participação no balanço global da fotossíntese. No mar, mais de 90% da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fitoplâncton. De acordo com Falkowski, Barber e Smetacek (1998), o fitoplâncton fornece cerca de metade de toda a produção primária global, sendo muito importante para todos os ecossistemas costeiros e oceânicos.

A maioria das algas da classe Prasinophyceae são unicelulares, flageladas e possuem clorofilas a e b. São encontradas em águas doces, salobras e marinhas, ocorrendo nos hemisférios norte e sul, principalmente em regiões temperadas (SHINKE, 1999).

Segundo Lourenço et al. (1996), microalgas do gênero *Tetraselmis* estão entre as mais utilizadas em maricultura para alimentação de herbívoros marinhos pela sua capacidade de desenvolverem-se em uma ampla faixa de condições físicas e químicas, sendo assim de fácil cultivo, por serem robustas, atóxicas, além de apresentar crescimento rápido. Pelos mesmos motivos, microalgas do gênero *Tetraselmis* também são amplamente utilizadas em bioensaios.

A *Tetraselmis gracilis* possui um comprimento celular que varia entre 8 e 12 μm e quatro flagelos. O formato ligeiramente comprido da célula caracteriza a espécie.

1.2 Nutrientes

A água do mar contém grande quantidade de sólidos e gases dissolvidos. Setenta elementos químicos estão presentes na água do mar e podem ser detectados por métodos analíticos. Apesar de haver muitos elementos químicos dissolvidos na água do mar (em suas formas elementares isoladas ou combinadas quimicamente), a distribuição dos mesmos é extremamente heterogênea.

Muitos elementos químicos que apresentam concentrações tipicamente baixas são extremamente importantes para organismos marinhos, por serem nutrientes inorgânicos. A disponibilidade reduzida de nutrientes torna-os, freqüentemente, fatores limitantes para o desenvolvimento de vegetais.

Para avaliar o papel de vários nutrientes em relação ao crescimento e à produtividade de microalgas, estudos devem ser realizados e é de fundamental importância o cultivo da alga a qual deseja-se estudar, pois pode-se definir os componentes que devem ser acrescentados em maiores ou menores quantidades nos meios de cultura para proporcionar melhor desenvolvimento da espécie. Também é possível identificar componentes efetivamente desnecessários para a espécie. Esses aspectos são extremamente importantes em empreendimentos comerciais.

No experimento em questão foram preparadas quatro culturas,

uma de controle e outras três, cada uma com a indisponibilidade de um nutriente necessário às células: fósforo, nitrogênio e vitaminas.

1.2.1 Nitrogênio

O nitrogênio constitui diversas substâncias do metabolismo das algas. Ele pode ser encontrado em diversas formas inorgânicas não assimiladas no interior de células algáceas, como o nitrito, o nitrato e o amônio, sendo que suas concentrações variam enormemente.

Na água do mar pode ser encontrado como nitrogênio molecular ou gasoso (N_2), sendo o gás mais abundante no mar; como nitrato, que é a forma mais utilizada pelo fitoplâncton a mais estável; e como nitrito, que apesar de ser tóxico, em pequenas concentrações pode ser absorvido e assimilado por microalgas. A amônia e o íon amônio são formas preferencialmente utilizadas pelo fitoplâncton. Os ácidos aminados e a uréia também estão presentes, sendo formas de menor importância para o fitoplâncton marinho.

As principais formas de nitrogênio empregadas em meio de cultura são sais de nitrato, de amônio e a uréia. O suprimento de nitrogênio provoca influência sobre as microalgas em um meio de cultura. Se a concentração é alta, há uma tendência de que as concentrações de proteínas e de clorofila nas células aumente. No entanto se a concentração de nitrogênio forem baixas, há uma grande diminuição na taxa de divisão celular, assim como nas concentrações de clorofila e proteína.

O nitrogênio está entre os principais limitantes da produção primária marinha. Em muitos locais do oceano (giro central do Pacífico Norte, Atlântico subtropical em grande do Oceano Índico), o nitrogênio limita o crescimento do fitoplâncton, pelo menos em parte do ano.

1.2.2 Fósforo

Relacionado a processos celulares envolvidos com trocas energéticas, o fósforo está presente nas algas na forma de ATP, açúcares fosfatados e foto-enzimas. A assimilação do fósforo pelo fitoplâncton é dependente da luz solar. Isso pode estar relacionado à acumulação de energia no ATP.

As formas inorgânicas mais encontradas na água do mar são o orto-fosfato e os poli-fosfatos. As algas podem utilizar também formas orgânicas, como açúcares fosfatados, apesar deste processo exigir hidrólise enzimática extra-celular. Devido à distribuição heterogênea de fósforo no mar, as microalgas podem absorver grandes quantidades deste elemento para que o seu crescimento não seja prejudicado quando este nutriente não está disponível. Sais de sódio ou potássio são geralmente os fosfatos utilizados por microalgas marinhas, enquanto que os fosfatos de cálcio e de ferro são insolúveis e, portanto, indisponíveis para as algas. Além disso, a concentração de arsênio na água do mar influencia na absorção de fósforo.

A produção primária é limitada também pelo fósforo, devido à sua

distribuição irregular nos oceanos e pela grande demanda deste nutriente pelos organismos. O mar do sul da China, o mar do Sargaços e parte do Mediterrâneo são locais de baixa biomassa fitoplanctônica, em razão da baixa concentração de fósforo.

Em meios de cultura o fósforo é normalmente adicionado em grandes concentrações, podendo ser adicionado sob a forma de fosfatos, pentóxido de fósforo ou glicerosfosfato de sódio.

1.2.3 Vitaminas

As vitaminas B₁ (tiamina), H (biotina) e B₁₂ (cianocobalamina) são as vitaminas importantes para as algas. A tiamina age como uma coenzima e está envolvida na respiração celular (transporte de O₂) e em processos de fermentação.

A cianocobalamina é geralmente adicionada em grandes quantidades nos meios de cultura (em comparação com outras vitaminas) devido à sua necessidade em altas concentrações. Em um meio natural, geralmente esta vitamina não é encontrada em grandes proporções, quando comparada às outras duas. A biotina algumas vezes não é adicionada ao meio de cultura.

Não é necessária para diversas microalgas a utilização da molécula inteira da vitamina para o seu metabolismo. Por conta disto, muitas vezes algas se utilizam do produto de degradação de moléculas de vita-

minas utilizadas por outras algas.

Muitas algas conseguem sintetizar estas três vitaminas e, dependendo da alga, sintetiza duas ou apenas uma delas. Contudo, para garantir o crescimento de espécies no meio de cultura deve-se adicionar as três vitaminas acima citadas.

No geral, vitaminas não são adicionadas ao meio de cultura em grandes concentrações quando se compara às quantidades de outros nutrientes.

1.3 Experimento

Nesse experimento, verificamos a importância da composição nutricional do meio sobre o crescimento da microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta - Prasinophyceae). Foram utilizados quatro meios de cultura, sendo:

1. Meio controle (Tabela 1.1)
2. Meio sem nitrogênio
3. Meio sem fósforo
4. Meio sem vitaminas

As amostragens e contagens de algas foram realizadas durante os dias 14 e 21 de junho de 2008.

Tabela 1.1: meio f/2 segundo Guillard e Ryther (1962)

Componente	Concentração no meio
Nitrato (NaNO ₃)	883,0 µM
Fosfato (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	36,3 µM
Silicato (Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O)	107,0 µM
Vitaminas (B ₁₂ , tiamina e biotina)	
Metais-traço (Cu, Zn, Co, Mn, Molibdato, Fe+EDTA)	

1.4 Etapas de crescimento esperadas

Em bioensaios, o termo crescimento refere-se às mudanças pelas quais a cultura passa, e, segundo Sipaúba-Tavares e Rocha (2001), as fases são as seguintes:

Fase de indução ou lag: apesar da maioria das células serem viáveis, muitas não estão em condições de se dividirem, especialmente se vieram de um meio mais antigo. Isso ocorre pois enzimas podem ter sido inativadas e os metabólitos podem ter diminuído a níveis insuficientes, impedindo a divisão celular. É necessário um equilíbrio do ácido glicólico (CH₂OH.COOH) no meio para que os produtos da fixação do carbono estejam presentes, disponíveis ao crescimento.

Fase exponencial ou log: ocorre o início da divisão celular a uma taxa constante. Nesta fase, observa-se um máximo na taxa de crescimento, variando conforme a espécie algal utilizada.

Fase de redução do crescimento: a taxa de crescimento nesta fase fica reduzida, devido ao fato do tempo requerido para a duplicação

da célula algal aumentar. Isto pode ocorrer por diversos fatores, tais como diminuição da disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, aumento da densidade populacional e da consequente diminuição da disponibilidade de luz para cada célula, ao aumento da concentração de metabólitos no meio ou às alterações em fatores ambientais (tais como pH, temperatura) os quais podem reduzir a atividade fotossintética.

Fase estacionária: a taxa de crescimento é compensada pela taxa de mortalidade, não ocorrendo um aumento na população algal. Nesse sentido, agem fatores como a exaustão de nutrientes (nitrato, fosfato e ferro), a diminuição do CO₂ ou do O₂ no meio, a alteração do pH e o auto-sombreamento (o qual reduz a penetração de luz e pode levar à produção de substâncias tóxicas).

Fase senescente ou de declínio: a taxa de mortalidade das células supera a taxa de reprodução e formação de novas células. Nesta fase, o número de células viáveis decresce geometricamente.

Essas fases estão ilustradas na Figura 1.1.

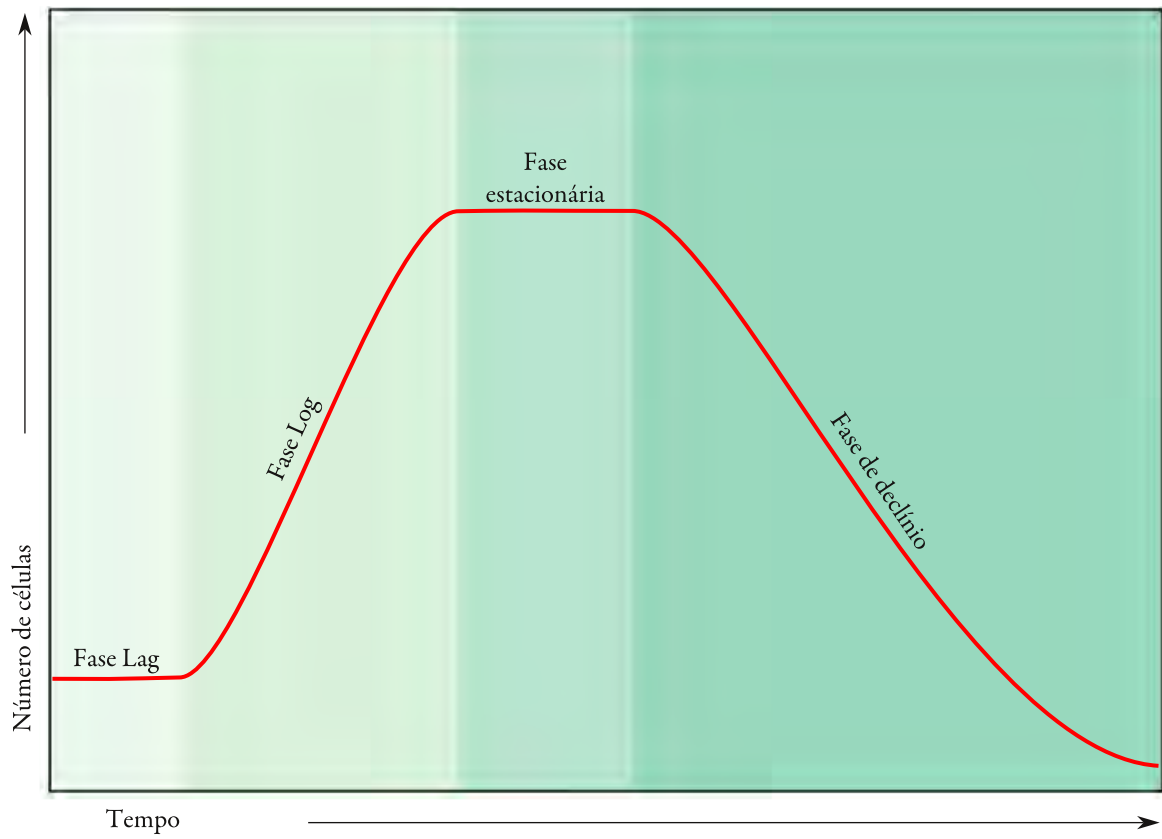


Figura 1.1: Curva de crescimento de algas em sistemas de cultivo fechados e suas diferentes fases

2 Materiais e métodos

2.1 Preparação dos cultivos

Foram utilizados 4 erlenmeyers de 250 ml devidamente identificados próximo à boca do frasco (para não atrapalhar a incidência de luz), sendo um para controle (C), outro para ausência de nitrogênio (C-N), outro para ausência de fósforo (C-P) e o último para ausência de vitaminas (C-V). Cada erlenmeyer recebeu 200 ml do meio de cultura relativo a cada tratamento e também foi inoculado com micropipeta 1 ml

da cultura de *Tetraselmis gracilis*, após homogeneizar completamente a cultura-mãe. Cada frasco foi agitado suavemente e em movimentos circulares para a esquerda e para a direita, tomando cuidado de não molhar o tampão.

Os 4 erlenmeyers foram levados para uma bancada iluminada com lâmpadas fluorescentes, que fornecem os melhores resultados para cultivos de microalgas de acordo com Lourenço (2006), onde permaneceram a 20 °C com ciclos de luz/escuro de 12×12 h.

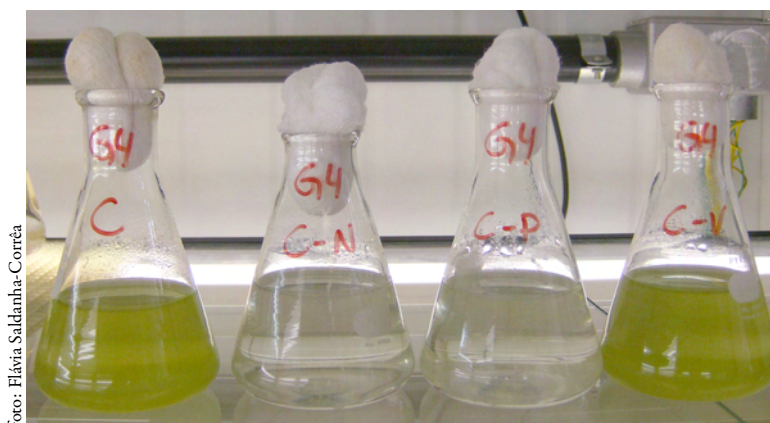


Figura 2.1: culturas de *Tetraselmis gracilis* após 3 dias. Observa-se que as culturas “Controle” (marcada com C) e “Sem vitaminas” (marcada como C-V) apresentam coloração verde intensa, que é explicada pela maior concentração de células nesses meios (conforme Tabela 3.1).

2.2 Amostragem e contagem

A amostragem foi feita homogeneizando-se a cultura e, logo em seguida, transferindo-se cerca de 1 ml da cultura para um frasco *snap-cap* nas proximidades da chama de um bico de Bunsen, com a finalidade de evitar a contaminação tanto da amostra quanto da cultura por microorganismos do ambiente. Imediatamente após a transferência, a amostra foi fixada com Lugol (Figura 2.2).

Neste experimento, foi realizada uma amostragem para cada cultivo no início do experimento e mais seis contagens nos dias 1, 2, 3, 5, 6 e 7 do experimento.

O crescimento da cultura foi avaliado feito pelo método da contagem direta por microscopia. Neste método, utilizam-se hemocitômetros (Figura 5.1, p.12), que são câmaras de contagem, inicialmente desenvolvidos para contagem de células sanguíneas, de onde deriva-se o nome. A seguir, descreveremos o método com base no texto de Lourenço (2006).

Para a realização da contagem, deve-se limpar um câmara de contagem adequada e uma lamínula com álcool e papel delicado. A lamínula deve ser fixada sobre o hemocitômetro colocando-se gotículas de álcool sobre as saliências da câmara e então preenche-se o vão formado com

uma alíquota da amostra usando-se uma pipeta Pasteur.

A câmara assim preparada deve ser levada ao microscópio (Figura 2.2) onde procede-se a contagem nas duas divisões do hemocitômetro, de forma que se possa calcular um valor médio dos dois valores obtidos. As câmaras são compostas por linhas ou áreas, dependendo do modelo. A contagem consistiu em contar ao menos 400 células (ou todas as células na grade de contagem, caso não houvesse número suficiente de células) sem deixar células não contadas em uma linha ou área. Multiplicando-se o número de linhas/áreas contadas por um fator, especificado para cada lâmina e número de células contadas, pela quantidade de células efetivamente contadas, obtém-se o número de células por mililitro.

Nos primeiro e último dia de experimento, foi feita uma amostragem para determinação de clorofila-a.

2.3 Processamento dos dados

Após as contagens, foram elaboradas as tabelas da Seção 3 e então as curvas de crescimento da Figura 3.1. Com base nessas curvas foi verificado o padrão da curva obtida (ver Seção 4) e foram identificadas as diferentes etapas do crescimento da cultura.

Uma vez identificado o trecho exponencial da curva, foi calculada a taxa de crescimento (μ) aplicando-se a Equação 2.1. Também foi determinada a taxa de duplicação diária, bastando-se dividir μ por 0,693.

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_{t-1}}{t_t - t_{t-1}} \quad (2.1)$$

nesta equação, N é a densidade celular e t é o dia.



foto: Danilo R. Vieira

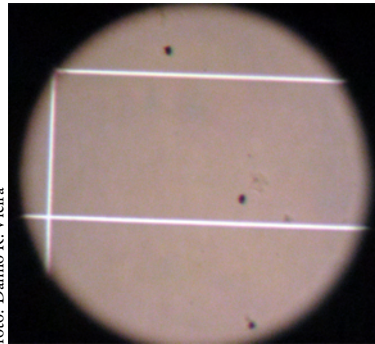


foto: Danilo R. Vieira



foto: Flávia Saldanha-Corrêa

Figura 2.2: à esquerda: cultura de *Tetrahymena gracilis* da qual foram tiradas alíquotas para a preparação das culturas; ao centro: contagem no microscópio óptico com câmara Nageotte (os pontos pretos são as células); à direita: fixação da amostra com Lugol.

3 Resultados

Os valores obtidos nas contagens encontram-se na Tabela 5.1. Como pode-se observar na tabela citada, podemos obter dois valores de concentração celular por amostra: um para a primeira contagem outro para a réplica. Com esses dois valores, calculamos uma média e a incerteza da contagem, que encontram-se na Tabela 3.1.

A incerteza foi calculada a partir das diferenças entre contagens de uma mesma amostra e combinadas com erros dados por Lund, Kipling e Cren (1958) de acordo com o número de células contadas, sendo que os erros que foram efetivamente utilizados são: 50% para contagens nas

quais foram contados de 8 a 24 células e 10% para a faixa de 360 a 440.

Com os valores médios e incertezas da Tabela 3.1, foram plotadas as curvas de crescimento da *Tetraselmis gracilis* para cada um dos meios de cultura utilizados nesse experimento. As curvas encontram-se na Figura 3.1 na página 9

Além da quantidade de células, foi calculada a biomassa inicial e final para cada um dos experimentos, os valores encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.1: concentração de células em cada meio (cel/ml). Valores médios obtidos a partir da Tabela 5.1. A incerteza foi calculada a partir das diferenças entre contagens de uma mesma amostra e combinadas com erros dados por Lund, Kipling e Cren (1958) de acordo com o número de células contadas.

Dia	Controle	Sem Nitrogênio	Sem Fósforo	Sem Vitaminas
0	5 480 ± 18%	8 880 ± 12%	6 980 ± 23%	12 800 ± 11%
1	7 031 ± 66%	9 609 ± 57%	2 969 ± 55%	6 016 ± 58%
2	29 843 ± 26%	8 560 ± 10%	10 520 ± 10%	28 667 ± 10%
3	66 560 ± 14%	26 068 ± 17%	36 622 ± 12%	71 164 ± 15%
4	—	—	—	—
5	198 636 ± 11%	73 422 ± 12%	34 821 ± 11%	236 111 ± 13%
6	7 510 000 ± 10%	56 374 ± 13%	56 744 ± 16%	5 910 000 ± 10%
7	7 460 000 ± 10%	40 653 ± 12%	37 495 ± 19%	287 916 ^a

Tabela 3.2: concentrações e clorofila-a em cada um dos meios, no início e no fim do experimento

Meio	Cl-a inicial		Cl-a final	
	(mg/m ³)	(mg/cel)	(mg/m ³)	(mg/cel)
Controle	8,1578	$1,4886 \times 10^{-03}$	1 582,99	$2,1220 \times 10^{-10}$
Sem nitrogênio	8,1578	$9,1867 \times 10^{-04}$	47,38	$1,1655 \times 10^{-09}$
Sem fósforo	8,1578	$1,1687 \times 10^{-03}$	125,78	$3,3546 \times 10^{-09}$
Sem vitaminas	8,1578	$6,3733 \times 10^{-04}$	1 278,10	$4,4391 \times 10^{-09}$

Tabela 3.3: taxas de crescimento e taxas de duplicação diária para cada um dos meios de cultura.

Meio	Taxa de crescimento (μ)	Taxa de duplicação diária
C	1,396	2,013
C-N	0,716	1,033
C-P	1,256	1,812
C-V	1,227	1,770

^a: contagem prejudicada pela formação de agrupamento de células.

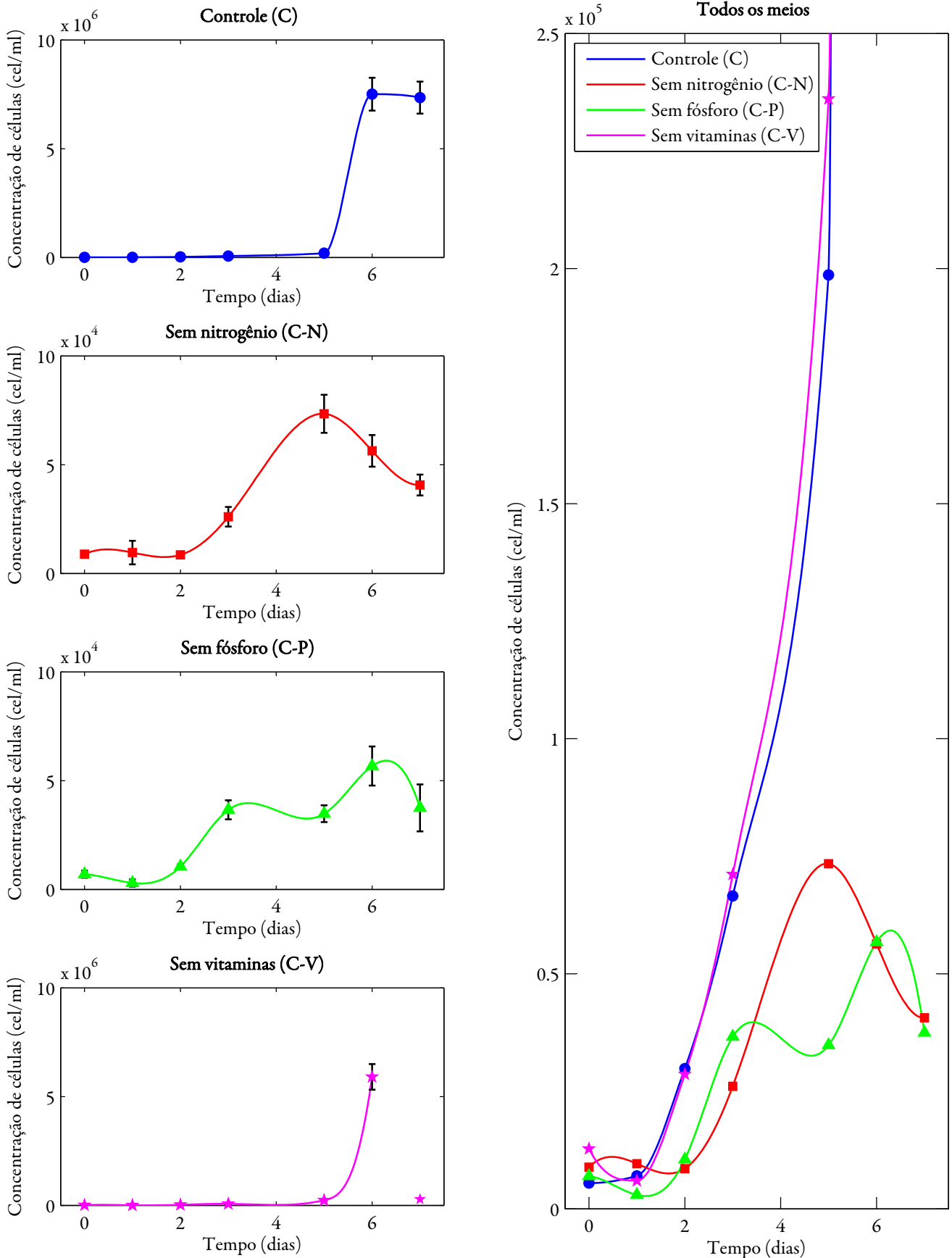


Figura 3.1: curvas de crescimento correspondentes a cada um dos meios de cultura. É importante salientar que os gráficos “Controle” e “Sem vitaminas” apresentam escala vertical com duas ordens de grandeza de diferença dos demais. Na cultura sem vitaminas ocorreu a formação de agrupamento no dia 7, portanto esse dia foi desconsiderado na construção da curva. As barras de erro indicam a faixa na qual o valor verdadeiro encontra-se, com um intervalo de confiança de 95%. Na construção das barras levou-se em consideração os erros percentuais para a quantidade de células contadas, calculados por Lund, Kipling e Cren (1958), e a variação existente entre contagens de uma mesma amostra, não considerando possíveis erros aleatórios ocorridos na amostragem ou no preparo da câmara de contagem.

4 Discussões

4.1 Crescimento

As diferentes fases do crescimento dos meios de cultura podem ser facilmente reconhecidos como mostra a Tabela 4.1. O crescimento inicial caracterizado por uma evolução tipicamente logarítmica. A maturação ou amadurecimento da cultura observado pelo crescimento tipicamente exponencial do meio como em um “*bloom*” onde o máximo de rendimento é obtido. A fase seguinte é o declínio do meio causado por uma exaustão dos fatores físicos químicos e biológicos caracterizado por uma curva com coeficiente linear negativo indicando uma tendência de diminuição da cultura.

Pode-se notar que a curva correspondente à amostra sem fósforo não obedece o padrão esperado, padrão esse observado na curva da amostra sem nitrogênio. Isso provavelmente deve-se a erros relacionados à contagem das algas e/ou a sua amostragem.

Observando os valores de μ , pode-se verificar que há uma discrepância entre os diferentes tipos de tratamento dado às culturas de *Tetraselmis*, conforme observado na Tabela 3.3. As taxas de crescimento das amostras em meio sem nitrogênio e sem fósforo tiveram os menores valores, o que remete ao fato de que esses nutrientes são limitantes para o crescimento da colônia. Nos meios de controle e sem vitamina, observou-se o maior crescimento da população de *Tetraselmis gracilis*, indicando que a vitamina não é um fator limitante para a divisão celular.

De acordo com a Tabela 3.2 pode-se verificar que inicialmente não foram observadas diferenças representativas entre as concentrações de clorofila-a (cl-a) em todos os meios de cultura.

No final do experimento as concentrações de cl-a por célula são muito menores do que no início para todos os meios tratados. Comparando-se as concentrações finais de cl-a entre os meios de con-

trole, sem nitrogênio e sem fósforo, observa-se que os valores dos dois últimos são aproximadamente uma ordem de grandeza menores que o do meio de controle. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato do nitrogênio e do fósforo serem nutrientes limitantes para o crescimento da população. Vale ressaltar que o meio sem vitamina apresentou uma aglomeração de células no último dia de contagem e, portanto, não pode ser utilizado para fins de comparação.

4.2 Erros

Todos os métodos de estimar abundância de algas que envolvam tomar amostras de uma população maior estão sujeitos aos erros ao acaso envolvidos em todo processo de amostragem segundo Lund, Kipling e Cren (1958).

Lund, Kipling e Cren (1958) mostram que, contando 360–440 células, temos um erro associado de 10% com um intervalo de confiança de 0,95. O mesmo autor também explica que para dobrar a acurácia da contagem, seria necessário contar um número de células quatro vezes maior, o que seria inviável nesse experimento. Neste experimento, a maioria das contagens enquadra-se na faixa apresentada, porém, há contagens em que o número de células contadas foi inferior, o que pode ser uma fonte de erros.

Uma grande fonte de erros para experimentos deste tipo ocorre na amostragem. De acordo com Lourenço (2006), se a amostra não estiver completamente homogeneizada no momento da contagem, o resultado pode subestimar o número real de células ou superestimar, caso seja retirado material do fundo do frasco com a pipeta Pasteur.

Em uma das amostras, houve a formação de um aglomerado de células, o que impediu a contagem adequada.

Tabela 4.1: intervalos correspondentes a cada uma das fases de crescimento e dias de rendimento máximo para cada uma das culturas nos diferentes meios.

Meio	Intervalos de dias correspondente às fases			Dia de rendimento máximo
	Logarítmica	Exponencial	Declínio	
C	0–1	1–6	—	6
C–N	0–2	2–5	5–7	5
C–P	0–2	1–3	6–7	6
C–V	0–1	1–6	—	6

5 *Conclusões*

A partir da observação da Figura 3.1, pode-se verificar que as culturas crescem de modo semelhante até o quinto dia do experimento, quando o nitrogênio passa a ser um fator limitante para o crescimento da cultura sem esse nutriente. A partir do quinto dia, a cultura do meio sem nitrogênio entrou na fase de declínio. Como dito anteriormente, o meio de cultura sem fósforo comportar-se-ia analogamente ao meio

sem nitrogênio, porém devido a possíveis erros experimentais, a curva não apresentou o padrão esperado.

Também nota-se que a curva correspondente ao meio sem vitamina acompanha a curva do meio de controle, o que indica que a vitamina não é um fator limitante para o crescimento da população, pelo menos durante o tempo analisado.

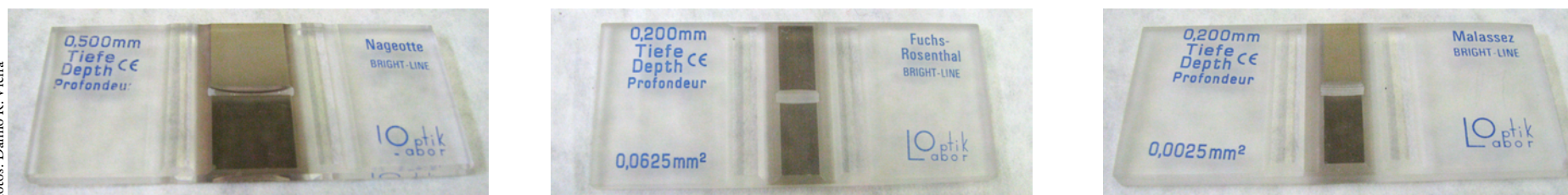


Figura 5.1: câmaras de contagem utilizadas. À esquerda: Nageotte; ao centro: Fuchs-Rosenthal; à direita: Malassez.

Tabela 5.1: valores obtidos durante as contagens. L/A significa linhas ou áreas contadas; Lam. significa tipo de lâmina utilizada; Cel. significa quantidade de células contadas. Os tipos de lâmina são: Nageotte (N); Fuchs Rosenthal (FR) e Malassez (M).

Dia	Meio de controle			Meio sem nitrogênio			Meio sem fósforo			Meio sem vitaminas										
	Contagem 1 L/A	Contagem 2 Cel.	Lam.	Contagem 1 L/A	Contagem 2 Cel.	Lam.	Contagem 1 L/A	Contagem 2 Cel.	Lam.	Contagem 1 L/A	Contagem 2 Cel.	Lam.								
0	40	126	40	148	N	40	225	40	215	N	40	151	40	198	N	40	323	40	317	N
1	16	19	16	26	FR	16	29	16	33	FR	16	10	16	9	FR	16	21	16	18	FR
2	23	429	31	397	N	40	214	—	—	N	40	263	—	—	N	24	430	—	—	N
3	10	400	10	432	N	23	402	28	423	N	18	404	18	420	N	9	419	10	424	N
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	11	433	11	441	FR	9	405	9	421	N	19	409	19	418	N	9	411	9	439	FR
6	100	393	100	358	M	13	447	12	437	N	13	434	11	413	N	100	296	100	295	M
7	100	373	100	362	M	16	414	17	424	N	19	406	18	459	N	9	429	6	405	FR

Referências Bibliográficas

FALKOWSKI, P. G.; BARBER, R. T.; SMETACEK, V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, v. 281, p. 200–206, jul. 1998. ISSN 1095-9203.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, v. 8, p. 229–239, abr. 1962. ISSN 1480-3275.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p. ISBN 85-7656-113-1.

LOURENÇO, S. O. et al. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, v. 148, p. 153–168, ago. 1996. ISSN 0044-8486.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; CREN, E. D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, v. 11, n. 2, p. 143–170, abr. 1958. ISSN 1573-5117.

SHINKE, K. P. *Alguns efeitos fisiológicos do cádmio sobre a microalga Tetraselmis gracilis (Kyllin 1935) Butcher 1959, em cultivo, com ênfase na fotossíntese*. 109 f. Tese (Mestrado em Oceanografia Biológica) — Instituto Oceanográfico, São Paulo, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*. São Carlos: RiMa, 2001. 106 p. ISBN 85-86552-17-8.