



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renan Silva Arruda

Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento e na interação de *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae), isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ

Rio de Janeiro

2016

Renan Silva Arruda

**Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento e na interação de
Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema sp.*
(Pavlovophyceae), isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ**



Dissertação apresentada, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho

Coorientador: Prof.^a Dra. Patrícia Domingos

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

A773 Arruda, Renan Silva.
Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento e na interação de
Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae)
isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ / Renan Silva Arruda. – 2016.
81f. : il.

Orientadora: Marcelo Manzi Marinho
Coorientador: Patrícia Domingos
Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado
do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1.Algas - Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ) - Teses. 2. Salinidade - Lagoa
Rodrigo de Freitas (RJ) -Teses. 3.Eutrofizacão - Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ)
- Teses. I. Marinho, Marcelo Manzi. II.Domingos, Patricia. III.Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV.
Título.

CDU 582.26(816.5)

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renan Silva Arruda

**Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento e na interação de
Nannochloropsis sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae)
isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ**

Dissertação apresentada, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de dezembro de 2016.

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Domingos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Gleyci Aparecida Oliveira Moser
Faculdade de Oceanografia - UERJ

Prof.^a Dra. Marina Suzuki (UENF)
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Rio de Janeiro
2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

As palavras sempre me fogem à cabeça quando necessito expressar grandes sentimentos. E não é diferente agora ao relembrar as dificuldades e conquistas enfrentadas ao longo desses dois anos.

Inicialmente, meus agradecimentos a CAPES e FAPERJ (Processo E-26/111.401/2012) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ. Ao Departamento de Botânica do Museu Nacional e seu Laboratório de Ficologia (UFRJ) e Dra Mariangela Menezes.

Minha imensa gratidão a meus pais acadêmicos, Patrícia Domigos e Marcelo Manzi, pela orientação, discussões, puxões de orelha e carinho. Aos meus colegas do LAB-Algas por aturarem meu excêntrico humor e compartilharem comigo estes dois anos de buscas, descobertas, inquietudes e realizações.

E por último, minha imensurável gratidão à minha família (vovó, minhas tias e tios) que me apoiam em todas as minhas empreitadas, mesmo quando estas parecem loucuras, e que me inspiram a sempre seguir. E por fim a meus incríveis pais, Rosane e Jaziel, pelo incondicional amor e todo esforço empenhado a mim ao longo da minha vida pessoal e acadêmica.

RESUMO

ARRUDA, Renan. Silva. **Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento e na interação de *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae) isoladas da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.** 2016. 81f. Dissertação, (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A Lagoa Rodrigo de Freitas (LRF) encontra-se incorporada à área urbana e, conseqüentemente, é impactada por atividades antrópicas, destacando-se o intenso lançamento de efluentes domésticos na sua bacia de drenagem, o que acarretou em sua eutrofização. Tal processo é responsável por frequentes eventos de floração de microalgas que resultam, muitas vezes, em episódios de mortandade de peixes. Dentre as espécies fitoplanctônicas presentes na LRF, destacamos nesse trabalho *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae), que apresentaram contribuição relevante no ano 2012, estando ambas envolvidas em eventos consecutivos de floração. O conhecimento sobre a ecofisiologia de espécies desses gêneros, considerando a dinâmica de variáveis ambientais, tal como salinidade, é fundamental para o entendimento dos principais mecanismos controladores dessas florações. Com o objetivo de investigar a influência da salinidade sobre o crescimento e na interação entre três cepas de *Nannochloropsis* sp (NN-M, NN-J e NN-S) e uma de *Diacronema* sp. (DI), testes foram realizados em meio f/2, contendo ou não exsudatos da espécie concorrente em três salinidades (8S, 14S e 20S). Taxa de crescimento (μ) e rendimento máximo ($R_{\max}$) foram mensurados com o incremento da clorofila *a*, assim como avaliação do rendimento quântico efetivo (ϕ PSII) e parâmetros da curva rápida de luz (CRL: α , $ETR_{\max}$ e E_K). As cepas DI e NN-S obtiveram melhores taxas de crescimento em 14S ($\mu = 0,93$ / $R_{\max} = 30,12$ e $\mu = 0,38$ / $R_{\max} = 91,24$), estando restritas a um menor intervalo de flutuação de salinidade (estenohalinas). Enquanto as cepas NN-M e NN-J não apresentaram diferenças em suas taxas para as salinidades testadas, suportando maior amplitude de variação de salinidade (eurialinas), contudo maiores $R_{\max}$ foram observados em 14S ($R_{\max} = 351,1$ e $R_{\max} = 496,4$). Dessa forma, as cepas de *Nannochloropsis* sp. apresentaram variabilidade intraespecífica na resposta fisiológica à variável testada. Nos testes de interação, as cepas NN-S e DI apresentaram atividade aleloquímica, que fora demonstrado por inibição (exsudato de NN-S) e estímulo (exsudato de DI) das taxas de crescimento da espécie concorrente, assim como alterações dos valores rendimento quântico efetivo (ϕ PSII) e dos parâmetros de CRL. Uma tendência de aumento dos valores dos parâmetros da CRL durante o decorrer do experimento de interação com a cepa NN-S foi observado, sugerindo a ideia de atenuação da ação do aleloquímico contido no exsudato de DI.

Palavras-chave: Eutrofização. Floração costeira. Alelopatia.

ABSTRACT

ARRUDA, Renan. Silva. **Evaluation of the effects of salinity on the growth and interaction of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) and *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae) isolated from Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.** 2016. 81f.
Dissertação, (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The Rodrigo de Freitas Lagoon (RFL) is incorporated into the urban area and, consequently, is impacted by anthropic activities, especially the intense discharge of domestic effluents in its drainage basin, which has led to its eutrophication. This process is responsible for frequent microalgae blooming events that often result in episodes of fish mortality. Among the phytoplankton species present in the RFL, we highlight in this work *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) and *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae), which presented a relevant contribution in 2012, both of which are involved in consecutive flowering events. Knowledge about the ecophysiology of species of these genera, considering the dynamics of environmental variables, such as salinity, is fundamental for understanding the main control mechanisms of these blooms. In order to investigate the influence of salinity on growth and interaction between three strains of *Nannochloropsis* sp (NN-M, NN-J and NN-S) and one of *Diacronema* sp. (DI), tests were performed on f / 2 medium, containing or not exudates of the competing species in three salinities (8S, 14S and 20S). Growth rate (μ) and maximum yield (R_{max}) were measured with the increase of chlorophyll a, as well as evaluation of the effective quantum yield ($\phi PSII$) and fast light curve parameters (FLC: α , ETR_{max} and EK). The strains DI and NN-S obtained better growth rates in 14S ($\mu = 0,93$ / $R_{max} = 30,12$ and $\mu = 0,38$ / $R_{max} = 91,24$), being restricted to a lower salinity fluctuation interval (Stenohalins). While NN-M and NN-J strains showed no differences in their rates for the salinities tested, they had a higher amplitude of salinity variation (eurialines), however larger R_{max} were observed in 14S ($R_{max} = 351,1$ and $R_{max} = 496,4$). Thus, the strains of *Nannochloropsis* sp. Presented intraspecific variability in the physiological response to the tested variable. In the interaction tests, the NN-S and DI strains showed allelochemical activity, which was demonstrated by inhibition (NN-S exudate) and stimulus (DI exudate) of the growth rates of the competing species, as well as changes in the quantum yield values ($\phi PSII$) and the CRL parameters. A tendency to increase the values of FLC parameters during the course of the interaction experiment with the NN-S strain was observed, suggesting the idea of attenuation of the action of the allelochemical contained in the DI exudate.

Keywords: eutrophication. coastal bloom. Allelopathy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia ótica de <i>Nannocloropsis</i> sp.	14
Figura 2 - Microscopia ótica de <i>Diacronema</i> sp.	17
Figura 3 - Esquema em Z da fotossíntese	19
Figura 4 -Mapa da Lagoa Rodrigo de Freitas.....	24
Figura 5 - Cultivo	28
Figura 6 – Detalhe do sistema de aeração dos cultivos	30
Figura 7 - Ilustração da curva rápida de luz (CRL) e seus parâmetros fotossintéticos	32
Figura 8 - Esquema do experimento de interação	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas de crescimento de <i>Diacronema sp.</i> nas diferentes salinidades testadas.....	37
Gráfico 2 - Taxas de crescimento (μ) e $R_{\max}$ de <i>Diacronema sp.</i> nas diferentes salinidades testadas.....	38
Gráfico 3 - Variação da quota celular de Clorofila a de <i>Diacronema sp.</i> nas diferentes salinidades testadas ao longo do experimento.	39
Gráfico 4 - Curvas de crescimento das três cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	40
Gráfico 5 – Comparativos entre as taxas de crescimento (a) e $R_{\max}$ (b) das cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	41
Gráfico 6 - Rendimento quântico (Φ) PSII de <i>Diacronema sp.</i>	44
Gráfico 7 - Rendimento quântico (Φ) PSII das cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	45
Gráfico 8 - Taxas de crescimento (μ) e $R_{\max}$ de <i>Diacronema sp.</i> no exsudato de <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S) nas salinidades testadas.....	46
Gráfico 9 - Razão de resposta (RR) entre controle e tratamentos	47
Gráfico 10 – Comparativo entre rendimento quântico (Φ) PSII para <i>Diacronema sp.</i> (DI) em meio f/2 puro e meio f/2 contendo exsudato de <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S).	48
Gráfico 11 - Efeito do exsudato de <i>Diacronema sp.</i> sobre o crescimento de <i>Nannochloropsis sp.</i>	49
Gráfico 12 - Razão de resposta (RR) entre controle e tratamentos	51
Gráfico 13 - Comparativo entre rendimento quântico (Φ) PSII para <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S) em meio f/2 puro e meio f/2 contendo exsudato de <i>Diacronema sp.</i> (DI).	52
Gráfico 14 - Demonstrativo das curvas rápidas de luz de <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S).	53
Gráfico 15 - Parâmetros da curva rápida de luz	55

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Composição do meio f/2.....	28
Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de <i>Diacronema sp.</i>	38
Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA Two-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a taxa de crescimento das cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	42
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA Two-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a rendimento máximo das cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i>	43
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos do exsudato de <i>Nannochloropsis sp.</i> sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de <i>Diacronema sp.</i>	47
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos do exsudato de <i>Diacronema sp.</i> sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de <i>Nannochloropsis sp.</i>	50

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	NANNOCHLOROPSIS SP.	14
2	DIACRONEMA SP.	16
3	CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL	17
4	FOTOSSÍNTESE	18
5	FLUTUAÇÃO DE SALINIDADE E SEUS EFEITOS SOBRE O FITOPLÂNCTON	19
6	ALELOPATIA	21
7	HIPÓTESE	25
8	OBJETIVO	26
8.1	Objetivos específicos	26
9	METODOLOGIA	27
9.1	Cepas Estudadas	27
9.2	Condições de Cultivo	29
9.3	Aclimação das Cepas	29
9.4	Avaliação do efeito da salinidade sobre o crescimento	29
9.4.1	<u>Crescimento Celular</u>	30
9.4.2	<u>Atividade fotossintética</u>	31
9.5	Avaliação dos efeitos da salinidade sobre a interação entre as cepas	34
9.5.1	<u>Análises Estatísticas</u>	35
10	RESULTADOS	37
10.1	Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento de <i>Diacronema sp.</i> e <i>Nannochloropsis sp.</i>	37
10.2	Avaliação dos efeitos da salinidade sobre a atividade fotossintética de <i>Nannochloropsis sp.</i> e <i>Diacronema sp.</i>	44
10.2.1	<u>Rendimento quântico do PSII</u>	44
10.3	Avaliação do efeito da salinidade sobre as interações entre as cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i> e <i>Diacronema sp.</i>	46

10.3.1	<u>Efeito do exsudato de <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S) sobre o crescimento de <i>Diacronema sp</i> (DI).</u>	46
10.3.2	<u>Efeito do exsudato de <i>Diacronema sp.</i> sobre o crescimento de <i>Nannochloropsis sp.</i> (NN-S)</u>	49
10.3.3	<u>Avaliação da atividade fotossintética</u>	53
11	DISCUSSÃO	56
11.1	Clorofila como medida de crescimento	56
11.2	Avaliação dos efeitos da salinidade sobre o crescimento de <i>Diacronema sp.</i> e <i>Nannochloropsis sp.</i>	57
11.3	Avaliação do efeito da salinidade sobre as interações entre as cepas de <i>Nannochloropsis sp.</i> e <i>Diacronema sp.</i>	61
	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO

A comunidade fitoplanctônica abrange, em geral, os principais produtores primários de lagunas costeiras. Espécies de diversos grupos taxonômicos como cianobactérias, diatomáceas, dinoflagelados e criptofíceas se destacam em importância (BARNES 1980; DOMINGOS 1991; ESTEVES 2008). Organismos de pequeno tamanho, como pico e nanoflagelados, também são ecologicamente importantes por estarem envolvidos na assimilação de carbono orgânico dissolvido (DOC), fazendo com que este elemento seja incorporado em sua biomassa e retorne para os níveis tróficos superiores (AZAM *et al.* 1983; POMEROY *et al.* 2007).

A Lagoa Rodrigo de Freitas é um sistema lagunar cuja comunidade fitoplanctônica é caracterizada por organismos de pequeno tamanho, principalmente pico e nanoflagelados, além de cianobactérias, dinoflagelados e criptofíceas, com pequena biomassa, mas alta produtividade (BECKER 2002; DOMINGOS *et al.* 2012).

O fato de a Lagoa estar incorporada à área urbana faz com que este ecossistema sofra com as atividades antrópicas, destacando-se o intenso lançamento de efluentes domésticos na sua *bacia de drenagem* (SOARES *et al.* 2012), o que acarretou em sua eutrofização. Este processo de eutrofização artificial é responsável por frequentes eventos de floração de microalgas que resultam, muitas vezes, em episódios de mortandade de peixes (WILLEMSSEN 1980, SMITH 1983, ESTEVES 2008, DOMINGOS *et al.* 2012). Os fitoflagelados (prasinofíceas, crisofíceas, dinoflagelados e criptofíceas), caracteristicamente frequentes e abundantes neste ambiente, são apontados como responsáveis por grande parte das florações na LRF, sobretudo em períodos chuvosos onde há maior aporte de fósforo orgânico (SOARES *et al.* 2012).

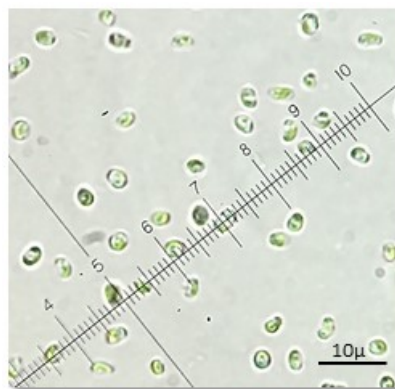
Dentre as espécies fitoplanctônicas presentes na Lagoa Rodrigo de Freitas, destacamos nesse trabalho *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) e *Diacronema* sp. (Pavlovophyceae), que apresentaram contribuição relevante no ano 2012. *Nannochloropsis* sp. esteve envolvida em eventos consecutivos de floração, destacando-se os meses de maio (14% da densidade relativa) a novembro (3% da densidade relativa), chegando a alcançar 26% da densidade relativa em setembro (Alves-de-Souza *et al.*, dados não publicados). É importante ressaltar que a

dominância ou floração desses dois táxons não tinham registros usuais neste ambiente e em outras regiões do mundo os primeiros registros datam do final da década de 1990 (ZHANG 2015, YAMASAKI 2015).

1 *Nannochloropsis* sp.

Nannochloropsis sp. D. J. Hibberd (Classe Eustigmatophyceae), é representado por organismos unicelulares, com células sub-esféricas (2-4 μ m de diâmetro) ou cilíndricas (3-4 μ m x 1,5 μ m) (Figura 1). Apresenta em seu perfil pigmentar clorofila *a* como pigmento principal e carotenóides como zeaxantina, cantaxantina e anteroxantina (ANTIA e CHENG, 1982; KARLSON *et al.* 1996; LUBIÁN *et al.* 2000). Devido a seu pequeno tamanho e ultraestrutura simples, a identificação taxonômica desse gênero é uma tarefa difícil (KARLSON *et al.* 1996; ANDERSEN *et al.* 1998; SUDA *et al.* 2002). Técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica e microscopia de transmissão, apesar de fornecerem informações importantes sobre características morfológicas, não são suficientes para uma identificação precisa. Nas últimas duas décadas, uma abordagem molecular aplicada à taxonomia tornou-se o caminho mais eficiente e seguro para identificações filogenéticas, especialmente a nível específico (ANDERSEN *et al.* 1998; KRIENITZ *et al.* 2000).

Figura 1 - Microscopia óptica de *Nannochloropsis* sp. (40x)



Fonte: Foto do autor, 2015;

Inicialmente descrito com ocorrência exclusivamente marinha (HIBBERD 1981), este gênero também é registrado em águas salobras (ANDERSEN, BRETT e POTTER 1998; LIM *et al.* 2012). *Nannochloropsis limnetica* é a única espécie de água doce e vive em temperaturas próximas a 0°C (FIETZ *et al.* 2005; FAWLEY e FAWLEY 2007). Seis espécies estão incluídas no gênero *Nannochloropsis*: *N. oculata* (Droop) Hibberd (1981), *N. salina* Hibberd (1981), *N. gaditana* Lubián (1982), *N. granulata* (Karlson *et al.* 1996), *N. limnetica* (Krienitz *et al.* 2000), e *N. oceanica* sp. nov Suda *et al.* (2002).

Nannochloropsis é globalmente distribuída e possui significativo papel em ambientes naturais, sobretudo na assimilação e incorporação de carbono orgânico dissolvido (FOGG 1995). Destacam-se como características importantes desse taxon, rápida capacidade de proliferação, assim como o fato de sintetizarem e armazenarem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI's), em especial o ácido eicosapentaenóico (EPA). Dessa forma, espécies desse gênero são amplamente utilizadas para alimentação em aquicultura, como fonte natural de pigmentos e fonte alternativa na produção de biocombustíveis. (VOLKMAN *et al.* 1993; APT e BEHRENS 1999; LUBIÁN *et al.* 2000; TONON *et al.* 2002; FAWLEY e FAWLEY 2007; SHI *et al.* 2008).

Florações de espécies de *Nannochloropsis* foram registradas em poucas regiões ao redor do mundo: *N. gaditana* no sistema lagunar de Camacchio, Itália (ANDREOLI *et al.* 1999); *Nannochloropsis* sp. em Leganes, Iloilo, Filipinas (CREMEN *et al.* 2007); e *N. limnetica* na Alemanha, Minnesota e Dakota do Norte (FAWLEY e FAWLEY 2007). Recentemente, um grande evento de floração de *N. granulata* foi registrado na zona costeira do mar Bohai até o norte do mar Amarelo na China com densidades celulares de 10^9 a 10^{10} por litro (ZHANG 2015).

Os registros de floração de espécies de *Nannochloropsis* são todos relativamente recentes (registros nos últimos 15 anos) e esparsos (em continentes diferentes) (KHATOON *et al.* 2014, ZHANG *et al.* 2015), porém não há como afirmar que as atuais condições ambientais passaram a favorecer o processo de floração, ou se, por dificuldades na identificação, as florações envolvendo esse táxon não eram adequadamente identificadas e registradas (ZHANG *et al.* 2015).

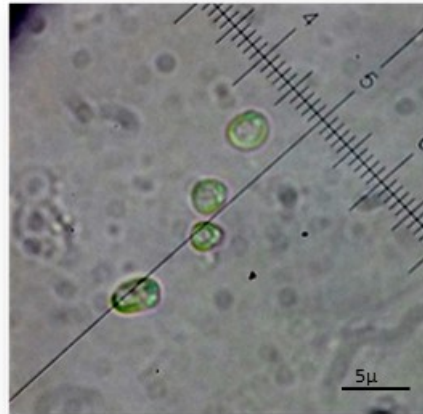
2 *Diacronema* sp.

Diacronema sp. (Prauser) (Classe Pavlovophyceae) Green et Hibberd, é um organismo unicelular móvel, com formato ovalado e leve compressão ventral. Possui dois flagelos inseridos ventralmente e um pequeno haptonema não visível em microscopia ótica (Figura 2). Tem como pigmento principal clorofila *a* e diadinoxantina e fucoxantina como acessórios (KEES, LATASA e ESTRADA 2003). O gênero *Diacronema* caracteriza-se por habitar desde águas doces até salobras (BENDIF et al. 2011).

Espécies pertencentes a este gênero são amplamente utilizadas como matérias-primas na aquicultura de bivalves, crustáceos e peixes (RAINUZZO, REITAN e OLSEN 1997, COUTTEAU, ACKMAN e SORGELOOS 1996). Devido a seu perfil lipídico, composto de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI's), tais como docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA) (IAMASAKI, MII e MITANI 2015), hoje há um grande interesse biotecnológico para com espécies desse grupo (HUANG et al 2014, SHAH et al 2014), principalmente para a produção de biodiesel (GUIHÉNEUF et al. 2011; CARVALHO et al. 2009). Muitos estudos fisiológicos foram realizados para espécies de *Pavlova* e *Diacronema* objetivando verificar as melhores condições para otimizar a produção de AGPI's (CARVALHO et al. 2006, BENDIF et al. 2011, PAL et al. 2011, VOOREN et al. 2012).

Alguns representantes desta classe são citados em eventos de florações em ambientes costeiros e oceânicos (ex. *Phaeocystis poucheti*) (VELDHUIS, COLIJN e VENECAMP 1986), com impactos sobre o funcionamento dos ecossistemas marinhos, ciclos biogeoquímicos e mudanças climáticas (MOESTRUP 1994), não havendo registros de floração para o gênero *Diacronema*, ao menos em ambientes naturais. Um lago artificial e raso no Parque Natural Doñana (Espanha), utilizado unicamente para aquicultura, foi cenário de floração de *Diacronema* sp. (RODRIGUÉZ et al. 2014).

Figura 2 - Microscopia ótica de *Diacronema* sp. (100x)



Fonte: Fotos do autor, 2015;

3 Considerações sobre estresse ambiental

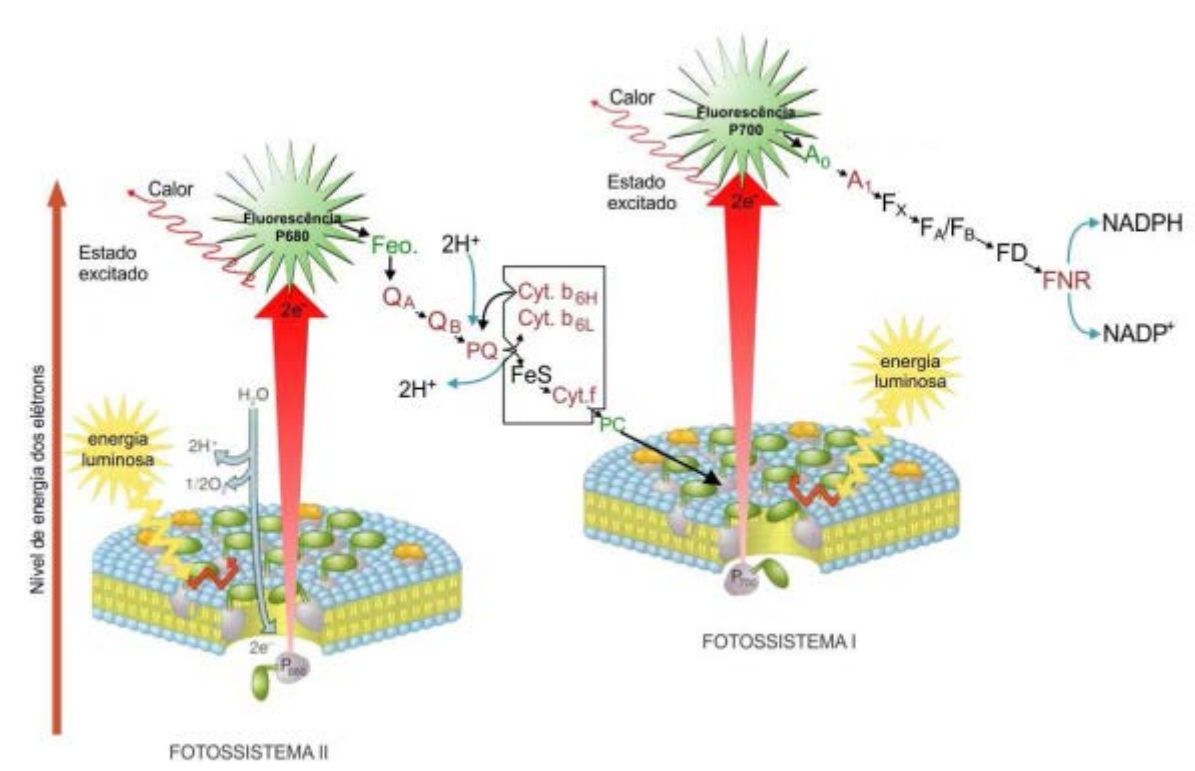
A dinâmica de variáveis ambientais em um sistema lagunar tem influência direta sobre o metabolismo do fitoplâncton (REYNOLDS 2006). Compreender a ação de cada fator, e até mesmo a sinergia destes, é um antigo desafio para o entendimento do funcionamento desta comunidade. Muitos trabalhos relacionam o estresse ambiental a alterações fisiológicas no fitoplâncton, sendo a fotossíntese a principal via metabólica alterada (POWLES 1984; ARO, VIRGIN e ANDERSSON 1993). Do ponto de vista fisiológico, estresse é a condição causada por fatores que tendem a alterar um equilíbrio (NILSEN e ORCUTT 1996). Estresse por variação de salinidade, temperatura e nutrientes, dentre outros, são apontados por Hagemann e Erdmann, (1997) como inibidores do processo fotossintético. Para melhor compreender esses mecanismos faz-se necessário compreender adequadamente o processo fotossintético.

4 Fotossíntese

A fotossíntese corresponde à síntese de compostos orgânicos a partir da conversão biológica da energia luminosa em energia química. Para a realização da fotossíntese, os organismos fotossintetizantes dispõem de complexos antena, constituídos por clorofila-a e pigmentos acessórios, responsáveis pela captação e transferência da energia para uma região especializada, onde ocorrem as reações fotoquímicas, denominada de centro de reação, constituído por proteínas e moléculas de clorofila *a*. O conjunto formado por esses complexos com centros de reação origina duas unidades fotossintéticas distintas: fotossistemas I (PSI) e II (PSII). Ambas estão arranjados em série e interligadas por uma cadeia de transporte de elétrons, cujo fluxo é determinado em função da diferença do potencial de redução entre os diferentes constituintes: plastoquinona (PQ), complexo citocromo *b6f*, plastocianina (PC), ferredoxina e ferredoxina-NADP redutase (RAVEN *et al.* 2001, FALKOWSKI e RAVEN 2007). Ao absorver energia luminosa (fóton), os pigmentos fotossintéticos transferem elétrons de um orbital mais interno para um mais externo (mais energético). O retorno para o estado fundamental transfere a energia absorvida pelo elétron para um pigmento vizinho e, neste processo, parte da energia é dissipada por emissão de luz e/ou de calor (Figura3). A emissão da luz envolvida nesse processo é chamada de fluorescência e a sua medida é uma ferramenta importante para o estudo do funcionamento e eficiência dos fotossistemas dos organismos fotossintetizantes (FALKOWSKI e RAVEN 2007).

Estudos anteriores sugerem que a exposição a estresses ambientais, tais como variação de salinidade, temperatura e estresse oxidativo, reduzem a atividade dos fotossistemas (HAGEMANN e ERDMANN 1997). Estudos mais recentes afirmam que não há uma relação direta nesse processo, mas uma inibição da restauração do PSII através da supressão da síntese de proteínas nos casos de danos causados por excesso de luz (TAKAHASHI e MURATA 2008).

Figura 3 - Esquema em Z da fotossíntese



Legenda: O esquema representa o transporte de elétrons entre os fotossistemas II e I, a emissão de fluorescência pela clorofila-a e a dissipação de calor.

Fonte: <https://sites.google.com/site/geologiaebiologia/geologia-e-biologia-10o/conteudos-de-biologia/obteno-de-matria/fotossntese-1#TOC-Mecanismo-fotossintico>.

Outro fator que pode interferir no processo fotossintético em ambientes aquáticos é a interação alelopática, onde o aleloquímico age diretamente, provocando a inibição da fotossíntese (KORNER e NICKLISH 2002; LEU, GOUSSIAS e GROSS 2012).

5 Flutuação de salinidade e seus efeitos sobre o Fitoplâncton

Todo organismo aquático tem limitações em sua habilidade de suportar mudanças de salinidade. A salinidade na LRF é resultado das trocas de massas d'água que se estabelecem com o mar através do Canal do Jardim de Alah, somada às contribuições de águas fluviais e pluviais. O resultado da mistura entre águas

doce e salgada determina a salinidade da água, que no ano de 2012 teve variações de 8 a 20,4 tendo esse mesmo padrão para toda coluna d'água. A flutuação de salinidade nesse ambiente é um dos fatores que determinam o estabelecimento ou não de muitas espécies fitoplanctônicas.

A ampla variação de salinidade sob a qual uma espécie particular pode sobreviver está diretamente relacionada com sua capacidade de osmoregulação (REID 2012). Em ambientes aquáticos, sobretudo os costeiros, a flutuação de salinidade é um fator de estresse significativo, fato que justifica a alta especialização dos organismos fitoplanctônicos que vivem sob tais condições, de modo a suportar essas alterações (MÄLKKI 1999). Estudos realizados em sistemas com elevada flutuação salina assinalam estes como possuidores de grande diversidade (DOMINGOS e MENEZES 1998; CALJON 1983, 1987; TORGAN 1997). Dados mais recentes apontam uma maior diversidade em salinidades intermediárias (TELESH, SCHUBERT E SKARLATO 2011). Menezes *et al.* (2012) realizaram um estudo comparativo entre a composição florística do Canal do Piraquê, posterior ao exutório da bacia de drenagem da Lagoa Rodrigo de Freitas e a do corpo principal da própria Lagoa e registraram maior variabilidade das populações planctônicas de cianobactérias e microalgas no canal. Os autores afirmam que as condições especiais do canal, promovidas pelo aporte dos rios, alterariam a composição química e física da água, dentre elas a alta e frequente flutuação de salinidade.

Sabe-se que o estresse salino promove um desequilíbrio iônico que afeta diversos processos metabólicos, tais como a fixação de carbono, fotossíntese, respiração e síntese de pigmentos (STEPIEN e KLOBUS 2006; CHO 2007; PAL *et al.* 2011). De acordo com Rao *et al.* (2007), a capacidade de adaptação à salinidade difere entre algas e elas são agrupados como halofílicas (necessitam de cloreto de sódio para crescimento adequado) e halotolerantes (não necessitam de sal, mas têm mecanismos de adaptação para sobreviver em meio salino).

Muitos trabalhos avaliam a eficiência fotossintética através das atividades dos fotossistemas (PSII e PSI), que por sua vez são indiretamente influenciados pelo estresse salino (POWLES 1984; ARO, VIRGIN e ANDERSSON, 1993; HAGEMANN e ERDMANN, 1997; ADIR *et al.* 2003; ALLAKHVERDIEV e MURATA 2004). A extensão do efeito de fotoinibição pode ainda ser aumentado por estresse ambiental de forma geral, seja salino, por calor, frio ou estresse oxidativo (TAKAHASHI e MURATA 2008).

Legrand *et al.* (2003) afirmam que situações de estresse ambiental, como por exemplo, alterações significativas de salinidade e/ou intensidades luminosas muito altas, podem também conduzir determinadas populações fitoplanctônicas a produzir aleloquímicos, de modo a sobrepujar outras populações daquele mesmo ambiente.

6 Alelopatia

A composição e dinâmica das comunidades de algas são influenciadas não apenas por fatores ambientais físicos e químicos, mas também pelas interações entre os membros dessa comunidade. Dentre essas interações, inclui-se o complexo sistema químico de sinalização, com um conjunto de metabólitos secundários que podem atuar como reguladores tanto positivos quanto negativos do crescimento de espécies e, assim, também determinar a distribuição e abundância das populações fitoplanctônicas (LEWIS 1986). Neste contexto, alelopatia pode ser entendida como interações bioquímicas, tanto de estimulação quanto de inibição, entre diferentes produtores primários e microorganismos (MOLISCH 1937 e LEGRAND *et al.* 2003).

Esse fenômeno biológico se dá pela produção e excreção de biomoléculas que afetam direta ou indiretamente o crescimento, sobrevivência e/ou reprodução de outros organismos. Tais biomoléculas são principalmente metabólitos secundários, chamados aleloquímicos e são produzidos por plantas, algas, bactérias, corais e fungos (MENDES e VERMELHO 2013). Embora os ecossistemas terrestres tenham sido o foco da maioria das pesquisas, a alelopatia ocorre também em ecossistemas aquáticos (EINHELLIG 1995).

A concepção que considera como alelopatia apenas a interação química causadora de efeitos negativos para o receptor já rendeu a descrição de possíveis cenários evolutivos para seu estabelecimento (LEFLAIVE e TEN-HAGE 2007). Por outro lado, não foi encontrado nenhum trabalho que desenvolvesse de modo semelhante um quadro teórico compatível com o estabelecimento das chamadas interações alelopáticas positivas (SAMPAIO, 2011). No entanto, a utilização ambígua do conceito não é contestada por Keating (1977).

Estudos pioneiros sobre a habilidade do fitoplâncton afetar outros organismos por interações químicas começaram a ser realizados na década de 40 (PRATT *et al.* 1944; LEFÊVRE e NISBET 1948; SIEBURTH 1960). Interações inibitórias em habitats aquáticos foram registradas em alguns estudos, incluindo (i) inibição do fitoplâncton por macrófitas (KORNER e NICKLISCH 2002; LEU *et al.* 2002); (ii) inibição de algas e cianobactérias por outras cianobactérias (KEATING 1977; SCHLEGEL *et al.* 1999, SUKENIK *et al.* 2002; SUIKKANEN *et al.* 2004; SEDMAK e ELERSEK 2005); (iii) inibição recíproca entre dinoflagelados e cianobactérias (VARDI *et al.* 2002); e (iv) inibição de bactérias, fitoplâncton, e / ou ciliados por algas (FISTAROL *et al.* 2003; SKOVGAARD e HANSEN 2003). Estudos que registram efeitos positivos foram realizados por Keating (1977) que verificou efeito positivo ou neutro de “filtrados celulares” de cepas de diversas espécies fitoplanctônicas, isoladas do lago Linsley, Connecticut – Estados Unidos, sobre espécies sucessoras na dinâmica da comunidade do lago e negativo sobre suas antecessoras.

Situações de estresse ambiental, tais como limitação de nutrientes, variação significativas de pH e temperatura, ou ainda flutuação de salinidade, parecem induzir a produção de compostos aleloquímicos (LEGRAND *et al.* 2003). Além disso, a própria interação entre espécies fitoplanctônicas pode promover liberação de substâncias de efeito alelopático, sobretudo em eventos de floração, onde a pressão competitiva torna-se maior (GRANÉLI e JOHANSSON 2003). Sendo assim, fatores que aumentam o efeito do aleloquímico podem alterar o equilíbrio competitivo em favor de organismos produtores desses aleloquímicos. Em geral, o papel ecológico e o sinergismo entre diferentes compostos químicos e o mecanismo de ação desempenhado pela maioria dos metabólitos secundários não é bem conhecido (BABICA, BLÁHA, e MARSÁLEK 2006; LEÃO *et al.* 2010). Portanto, é essencial, caracterizar a interação alelopática em um sistema controlado para entender a natureza das substâncias em questão e o seu objetivo biológico (SUKENIK *et al.* 2002).

A ação alelopática negativa de *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) sobre *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyta) foi demonstrada em laboratório, onde os principais alvos de inibição fotossintética foram a diminuição da quantidade e tamanho do complexo antena e número de centros de reação ativos, a diminuição da eficiência fotoquímica no PSII e o bloqueio da cadeia de transporte de elétrons

(CHANGPENG YE, HEPING LIAO, YUFENG YANG 2014). Semelhantemente Lelong *et al.* (2011), registraram menos centros de reação ativos e diminuição da eficiência fotossintética para atividades alelopáticas de *Alexandrium minutum*. Os autores ainda afirmaram que os efeitos foram intensificados com o passar do tempo, com o aumento da densidade celular.

Em relação ao gênero *Nannocloropsis*, há apenas um registro de possível atividade alelopática na costa de Bohai no mar Amarelo, na China, onde o processo de floração de *N. granulata* causou perdas econômicas devido à morte de uma grande quantidade de moluscos, em especial os da espécie *Argopecten irradians*, embora nenhuma evidência demonstrasse que a floração formada fora tóxica, pois nenhum composto químico foi identificado (ZHANG 2015).

Iamasaki, Mii e Mitani (2015) verificaram em seus estudos, auto-inibição no crescimento de *Diacronema lutheri* (antes *Pavlova lutheri*) ao utilizarem meio de cultura contendo exsudato de *D. lutheri* sob temperatura de 15°C e 20°C e estímulo do crescimento em 25°C, caracterizando dessa forma atividade alelopática para o filtrado.

Legrand *et al.* (2003) afirmam que situações de estresse ambiental, como por exemplo, alterações significativas de salinidade e/ou intensidades luminosas muito altas, podem conduzir determinadas populações fitoplanctônicas a produzir aleloquímicos, de modo a sobrepujar outras populações daquele mesmo ambiente. Pelo fato de receber o aporte de água doce através de seus tributários por meio de Canal Piraquê e se comunicar com o mar através do canal do Jardim de Alah (Figura 4), a LRF experimental abruptas variações de salinidade, sobretudo em ocasiões de maré de sizígia ou ainda com o aumento do aporte dos rios contribuintes nos períodos chuvosos (DOMINGOS *et al.* 2012). Dessa forma, tornando-se um ambiente estressante a comunidade fitoplanctônica e possibilitando possíveis interações alelopáticas entre estes organismos.

Figura 4 -Mapa da Lagoa Rodrigo de Freitas



Legenda: Mapa da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, destacando (1) Canal do Piraque e (2) Canal Jardim de Alah.

Fonte: <https://www.arcgis.com/home/webmap/viewer.html?webmap=d58377189a844bb4af01a774e6e71d2a>

Neste contexto, estudos ecofisiológicos com ênfase no efeito da salinidade, associados a testes de interação, podem contribuir para uma melhor compreensão sobre a dinâmica de populações de espécies fitoplanctônicas e fornecer subsídios para o entendimento de mecanismos controladores dos eventos de florações na Lagoa Rodrigo de Freitas.

7 HIPÓTESE

Considerando o exposto, a hipótese deste estudo é que a dinâmica da ocorrência/dominância de *Diacronema* sp. e *Nannochloropsis* sp. em florações na Lagoa Rodrigo de Freitas é condicionada por:

- i. Respostas ecofisiológicas à variação de salinidade;
- ii. Por interações bióticas mediadas por aleloquímicos. As interações alelopáticas também apresentam variabilidade em nível intraespecífico.

8 OBJETIVO

Investigar a influência da salinidade sobre o crescimento e interações entre cepas de *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp. a fim de identificar as condições que contribuem para o melhor desenvolvimento de ambas no ambiente, assim como possíveis padrões de dominância.

8.1 Objetivos específicos

- i) Avaliar a influência da salinidade sobre o crescimento e atividade fotossintética de cepas de *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp.
- ii) Investigar variabilidade intraespecífica entre cepas de *Nannochloropsis* sp., através das respostas fisiológicas para taxas de crescimento e eficiência fotossintética sob diferentes condições de salinidade
- iii) Avaliar a existência de interações alelopáticas entre *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp., sob diferentes condições de salinidade, através do cultivo de diferentes cepas em exsudatos de monoculturas.

9 Metodologia

9.1 Cepas Estudadas

As cepas estudadas foram isoladas a partir de amostras coletadas, com auxílio de rede de fitoplâncton (malha de 20 μm), na Lagoa Rodrigo de Freitas no ano de 2012, nos meses de maio, julho e setembro. Os indivíduos foram isolados com microcapilar de vidro, com auxílio de microscópio ótico, e transferidos para tubos de ensaio, contendo meio f/2 (GUILLARD 1975) (Quadro 1). Para preparação do meio utilizou-se água do mar filtrada em filtro GF/C de borosilicato com porosidade de 1,2 μm e diluída de maneira a alcançar a salinidade 14. Em seguida, as culturas foram purificadas através de plaqueamento em meio f/2 sólido (agar a 5% MERCK®), em salinidade 14 e, após 5 dias de crescimento, transferidas com auxílio de alça de platina para tubos de ensaio contendo meio f/2 líquido com a mesma salinidade (Figura 5). A salinidade 14 representa a média anual entre o máximo e o mínimo de salinidade registrado no ano de coleta das cepas (DOMINGOS *et al.* 2012). As cepas foram identificadas em nível de gênero, com base em análise molecular, pelo Laboratório de Ficologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (ALVES-DE-SOUZA *comunicação pessoal*).

No presente trabalho foram estudadas três cepas de *Nannochloropsis* sp., registradas como NN-M, NN-J e NN-S, e uma cepa de *Diacronema* sp. registrada como DI. As cepas são mantidas no banco de cultivo do Laboratório de Ecologia e Fisiologia do Fitoplâncton (LabAlgas), Departamento de Biologia Vegetal / IBRAG / UERJ.

9.2 Condições de Cultivo

Para a realização dos experimentos, as cepas estudadas foram mantidas em cultivos estanques unialgais clonais, em meio f/2 com salinidade 14 (14S), em temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h (claro/escuro), com intensidade luminosa de $80\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, obtida com utilização de lâmpadas fluorescentes. A iluminação do cultivo foi ajustada através de um sensor quântico (LiCor - LI-190SA) acoplado a um radiômetro (LiCor - LI-250 light meter).

9.3 Aclimação das Cepas

As cepas foram previamente aclimatadas e mantidas nas diferentes salinidades utilizadas neste estudo: 8, 14 e 20 (8S, 14S e 20S). A partir da salinidade média (14S), utilizaram-se os mínimos e máximos históricos de salinidades anteriormente registradas num período de 10 anos (SOARES *et al.* 2012).

O processo de aclimação inicial durou aproximadamente três semanas, possibilitando o crescimento de pelo menos três gerações. Os inóculos para os experimentos foram retirados das culturas em aclimação no início da fase exponencial de crescimento.

9.4 Avaliação do efeito da salinidade sobre o crescimento

O efeito da salinidade sobre o crescimento das cepas de *Nannochloropsis* e *Diacronema* foi avaliado em cultivos estanques unialgais e realizados em frascos Erlenmeyers de 300 mL, contendo 200 mL de meio de cultura, na temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, intensidade luminosa de $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos foram realizados em três condições de salinidade: 8S, 14S e 20S, em

triplicata, durante 12 dias. Os tratamentos utilizados para cepas de *Diacronema sp.* foram designados como DI-8S, DI-14S e DI-20S e para as cepas de *Nannochloropsis sp.* como NNM-8S, NNM-14S, NNM-20S, NNJ-8S, NNJ-14S, NnJ20S, NnS-8S, NnS-14S e NnS-20S. Os inóculos iniciais para os experimentos foram retirados de cultivos aclimatados nas condições específicas a serem testadas, no sétimo dia de cultivo. A concentração inicial dos cultivos foi de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila *a*. Para evitar a elevação do pH e consequente limitação de carbono, as culturas foram aeradas com auxílio de compressor Boyu® S-4000 (Figura 6).

Figura 6 – Detalhe do sistema de aeração dos cultivos



Fonte: Fotos do autor, 2015;

9.4.1 Crescimento Celular

O crescimento foi monitorado diariamente através da concentração de clorofila *a* *in vivo*, medida com auxílio de analisador de fitoplâncton Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). As taxas máximas de crescimento (μ) foram calculadas a partir do aumento da Chl *a*. Os dados dos tratamentos foram ajustados por regressão não linear ao modelo da curva logística (equação 1) com auxílio do software SigmaPlot 12.5®.

$$N_t = \frac{N_0 * k}{(N_0 + (k - N_0) * \exp(-\mu * t))} \quad (1)$$

Onde N_t = clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$); t = tempo (dias); N_0 = valor inicial de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$); k = capacidade suporte ($\mu\text{g L}^{-1}$), μ = taxa intrínseca de crescimento (dia^{-1}).

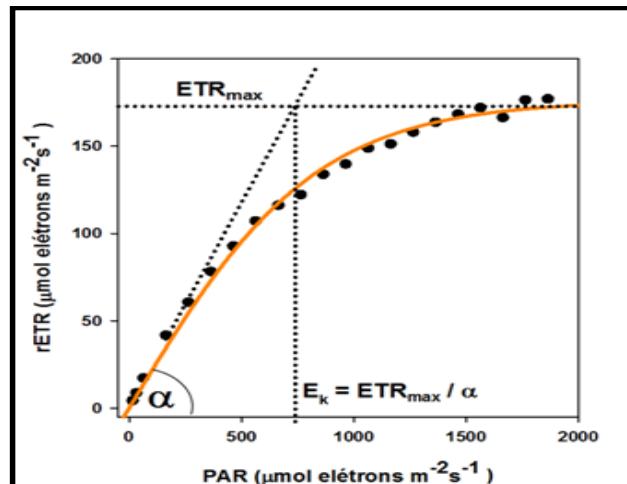
O Rendimento máximo das culturas (R_{max}) foi calculado pela razão entre a máxima biomassa alcançada por uma determinada cultura e a biomassa do respectivo inóculo (MARINHO e AZEVEDO 2007).

A quota celular, que é a quantificação média de clorofila a por densidade celular foi obtida pela razão entre a quantidade de clorofila e a densidade celular ao longo da curva de crescimento (AZEVEDO 2013).

9.4.2 Atividade fotossintética

Os efeitos da salinidade sobre a atividade fotossintética foram avaliados através de curvas rápidas de luz (CRL), estimadas pelas taxas de transporte de elétrons (ETR) e determinadas com auxílio do Phyto-PAM (Figura 7). Esse analisador realiza quantificação do sinal da fluorescência dos elétrons da clorofila a do fotossistema II (PSII) por pulso de luz com amplitude modulada (PAM). A partir destes valores de fluorescência são determinados uma série de parâmetros que caracterizam o estado do aparato fotossintético (KRAUSE; WEIS, 1991).

Figura 7 - Ilustração da curva rápida de luz (CRL) e seus parâmetros fotossintéticos



Fonte: J. Phycol. 12:421–430.

Um dos parâmetros que pode ser determinado é o rendimento da conversão da energia luminosa em energia química, que ocorre durante a fotossíntese. Este rendimento, chamado de rendimento quântico, pode ser de duas categorias: efetivo, caso o organismo fotossintético tenha permanecido em condição de iluminação antes da análise; e potencial, caso o organismo tenha sido aclimatado ao escuro.

Neste estudo foi o rendimento quântico efetivo (ϕPSII), através da razão entre a diferença da fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$) atingida, obtida através de um pulso de luz que promove a saturação do PSII, menos o nível atual de fluorescência obtida previamente (F) e fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$) (Equação 2). Este parâmetro também possibilita uma avaliação do desempenho de uma cultura sob uma determinada situação de estresse (KROMKAMP *et al.* 2009; SUKENIK *et al.* 2009).

Amostras dos cultivos com 3 mL foram expostas por 20 segundos a 21 intensidades luminosas variando de 16 a 1864 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As curvas rápidas de luz (CRL) foram estimadas através da taxa de transporte de elétrons (ETR), calculada multiplicando o ϕPSII , que corresponde eficiência do PSII, pela radiação fotossinteticamente ativa (PAR) versus o fator 0,5 (Equação 3), já que

apenas ~50% do quantum é distribuído para o PSII (Genty *et al.* 1989). Os dados obtidos no Phyto-PAM foram exportados para o programa SigmaPlot 12.5® e o ajuste das CRL se deu pela equação 4 (RALPH & GADEMANN 2005) substituindo o valor de fotossíntese máxima (Pm) pela taxa máxima de transporte de elétrons (ETR_{máx}). O Ek, que corresponde ao ponto de saturação da fotossíntese, foi calculado dividindo ETR_{max} por α (Equação 5) (FALKOWSKI 1994). A atividade fotossintética através da CRL foi medida apenas para as cepas de *Nannochloropsis* sp., pois durante a realização destes experimentos os cultivos da cepa de *Diacronema* sp. sofreram contaminação e entraram em colapso. Novas amostras foram coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas visando o isolamento de cepas de *Diacronema*, mas sem sucesso até o momento.

$$\phi\text{PSII} = (F_{\text{máx}} - F)/F_{\text{máx}} \quad (2)$$

$$\text{ETR} = \phi\text{PSII} \times \text{PAR} \times 0.5 \quad (3)$$

$$P = P_m \cdot (1 - e^{-(\alpha E_d / P_m)}) \quad (4)$$

$$E_k = \text{ETR}_{\text{max}} / \alpha \quad (5)$$

Legenda:

ΦPSII = eficiência do PSII

ETR= Taxa de transferência de elétrons

PAR = Radiação entre (400-700 nm)

Ed = Irradiância

P = taxa fotossintética

Pm = taxa fotossintética máxima

α = inclinação inicial da curva

A avaliação da atividade fotossintética através da CRL foi realizada apenas para as cepas de *Nannochloropsis* sp., pois durante o desenvolvimento destes experimentos os cultivos da cepa de *Diacronema* sp. sofreram contaminação e

entraram em colapso. Novas amostras foram coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas visando o isolamento de cepas de *Diacronema*, mas sem sucesso até o momento.

9.5 Avaliação dos efeitos da salinidade sobre a interação entre as cepas

As cepas estudadas, após o processo de aclimação, foram mantidas em monoculturas nas salinidades a serem testadas. Os experimentos de interações foram realizados em duas etapas. A primeira etapa teve por objetivo produzir o exsudato das cepas para ser posteriormente utilizado como meio de cultivo. Dessa forma, erlenmeyers com capacidade de 1,5L contendo 1L de meio f/2 foram inoculados com $150 \mu\text{g.l}^{-1}$ de clorofila *a* da espécie em teste e mantidas por 20 dias, até a chegada da cultura na fase estacionária e nas condições já descritas no item 4.2. No 20º dia de cultivo, as células foram separadas do meio de cultivo através de centrifugação (1.500 rpm, 10 min, 20°C), seguido de filtração em filtro de membrana de celulose regenerada de $0,45\mu\text{m}$ (Kasvi K15-1500), sendo produzidos um litro de cada exsudato livre de células. Após a etapa de filtração foi realizada a reposição de nutrientes nos exsudatos, seguindo o protocolo de preparo do meio f/2.

Na segunda etapa, cada cepa foi inoculada nos diferentes exsudatos e nas salinidades a serem testadas (8, 14 e 20S) para avaliar a possível influência de substâncias presentes neles (Figura 8). Nessa fase os inóculos iniciais tiveram concentração de $50\mu\text{g.l}^{-1}$ de clorofila *a* e a partir deste ponto seguiram todo processo descrito no item 4.4.

Para os controles do experimento foi utilizado meio f/2 puro na salinidade a ser testada. Medidas diárias de crescimento foram realizadas com auxílio do Phyto-PAM. Os parâmetros da CRL foram medidos em 4 tempos distintos (0h, 24h, 48h e 72h) visando observar se os efeitos do exsudato são atenuados ou intensificados com o tempo.

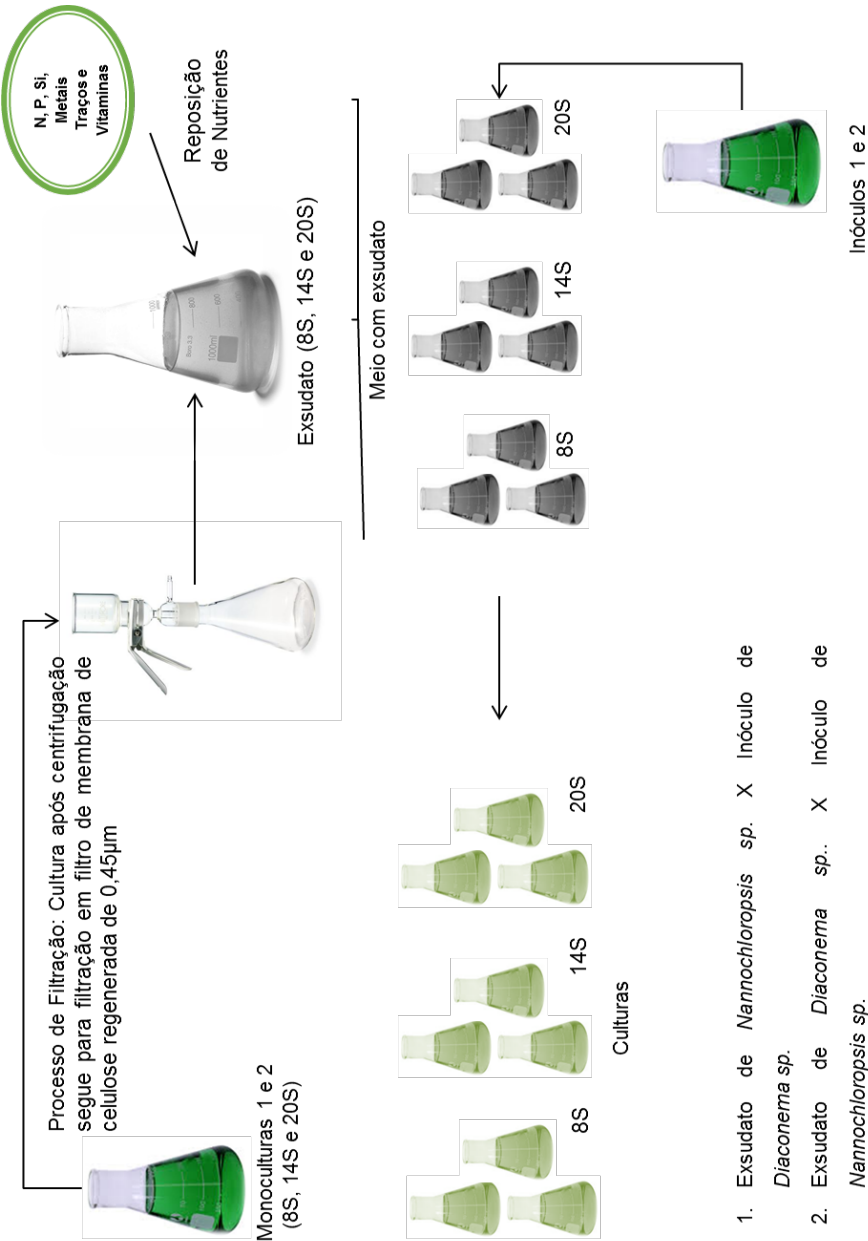
Os resultados do efeito do exsudato foram expressos a partir da relação de resposta (RR), calculada como a razão entre as taxas de crescimento em cada tratamento e a taxa de crescimento obtido no controle (Equação 6), que neste experimento foi o valor de μ obtido no tratamento com 14S.

$$RR = \mu^{\text{tratamento}} / \mu^{\text{Controle}} \quad (6)$$

9.5.1 Análises Estatísticas

Para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa entre as taxas de crescimento, rendimento máximo, e os parâmetros das curvas rápidas de luz (α , $ETR_{\text{máx}}$ e E_k), foram realizadas análises de variância unidirecional (ANOVA One-way) ou bidirecional (ANOVA Two-way). Quando existentes, as diferenças foram localizadas pelo teste *a posteriori* Holm-Sidak. Em todas as análises, o nível de significância assumido foi de $p < 0,05$ e os testes estatísticos foram realizados usando a ferramenta de pacote do programa Sigma Plot 12.5[®].

Figura 8 - Esquema do experimento de interação

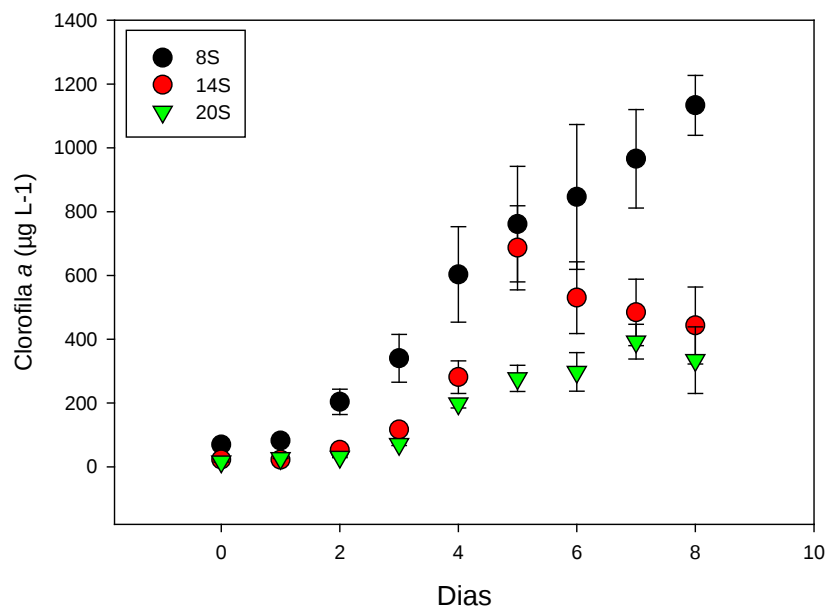


10 Resultados

10.1 Avaliação dos efeitos da salinidade no crescimento de *Diacronema* sp. e *Nannochloropsis* sp.

A cepa de *Diacronema* sp. (DI) apresentou maior taxa de crescimento em 14S ($\mu = 0,93$), sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos. O menor μ foi obtido em 8S ($\mu = 0,65$) ($F_{2,215} = 7,432$; $p < 0,005$) (Gráfico 1 e 2a e Tabela 1). Em relação ao rendimento máximo, foi verificado no tratamento 14S o maior valor ($R_{\max} = 30,12$) e o menor em 8S ($R_{\max} = 16,51$), sem apresentarem diferença significativa com o tratamento 20S ($R_{\max} = 24,24$) ($F_{2,390} = 7,573$; $p < 0,005$) (Gráfico 2b e Tabela 1).

Gráfico 1 - Curvas de crescimento de *Diacronema* sp. nas diferentes salinidades testadas



A quota celular de clorofila *a* não apresentou variação entre as condições de salinidades testadas ou ao longo do tempo (Gráfico 3).

Gráfico 2 - Taxas de crescimento (μ) e $R_{\max}$ de *Diacronema sp.* nas diferentes salinidades testadas

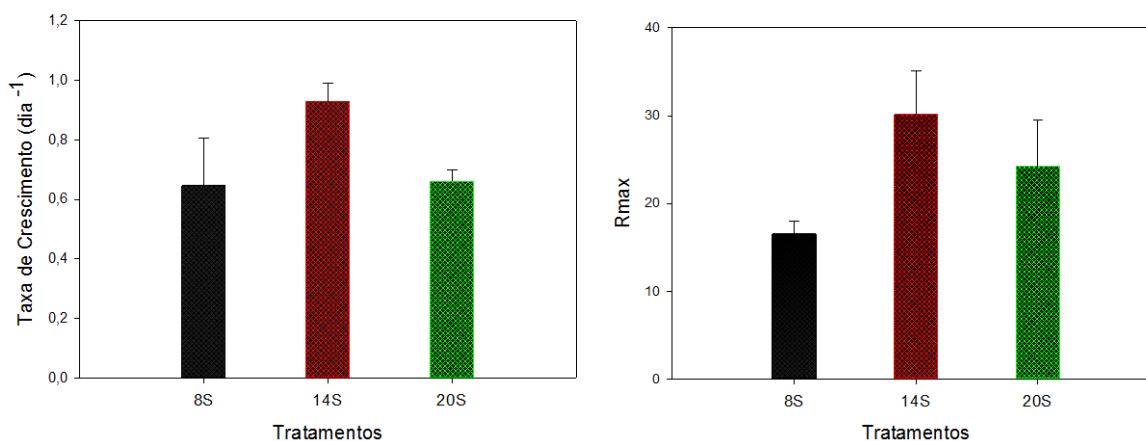
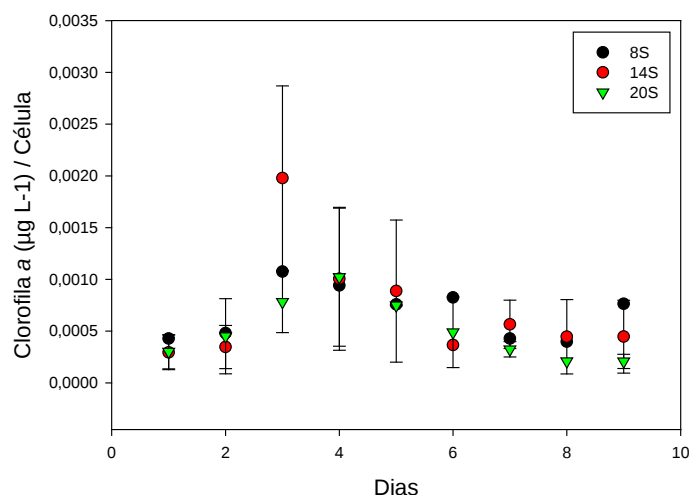


Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de *Diacronema sp.*

Taxas de crescimento (μ)		Rendimento Máximo ($R_{\max}$)	
Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)		Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)	
	DI		DI
8S	A	8S	A
14S	B	14S	B
20S	A	20S	AB

Legenda: As letras indicam grupos homogêneos para cada salinidade, de acordo com o teste a posteriori Holm-Sidak ($p < 0,05$).

Gráfico 3 - Variação da quota celular de Clorofila *a* de *Diacronema sp.* nas diferentes salinidades testadas ao longo do experimento.

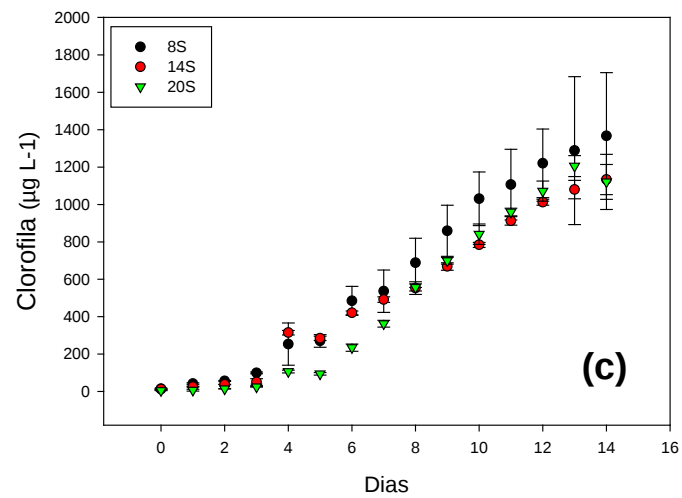
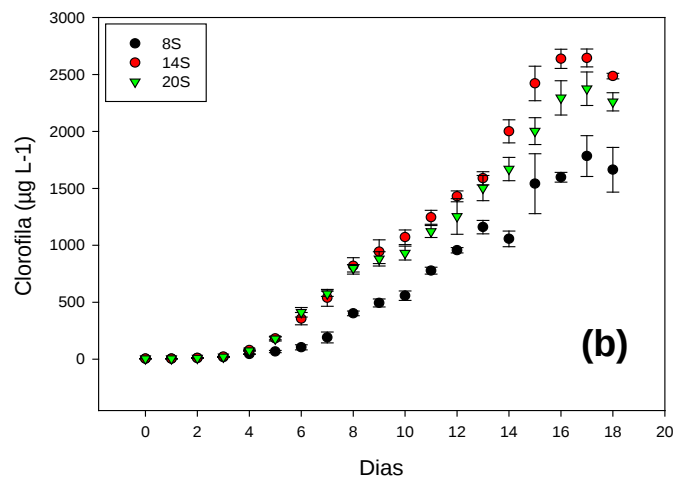
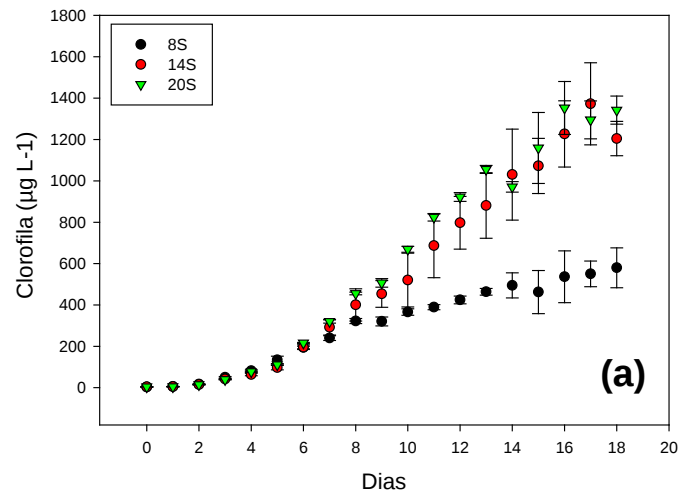


A cepa de *Nannochloropsis sp.* NN-M não apresentou diferença significativa para a taxa de crescimento nas diferentes salinidades testadas. Entretanto na salinidade 8S foi observado o menor valor de $R_{\max} = 200,39$ dentre todos os tratamentos (14S/ $R_{\max} = 351,11$ e 20S/ $R_{\max} = 337,43$) (Gráfico 4a, 5a e 5b) (Tabela 2 e 3).

A cepa NN-J não apresentou diferença em seus valores de taxas de crescimento (8S/0,175 14S/ 0,145 20S/ 0,142) (Tabela 2). Quanto a seus rendimentos, em 14S verificou-se o maior valor ($R_{\max} = 496,4$), sendo diferente apenas do tratamento 8S ($p < 0,05$) (Gráfico 4b e 5a e 5b) (Tabela 2 e 3).

A cepa NN-S apresentou menor taxa de crescimento em 20S (0,184), sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos (8S/ $\mu = 0,318$ e 14S/ $\mu = 0,376$) (Tabela 2). Contudo foi em 20S que a cepa atingiu seu maior $R_{\max}$ (249,16), sendo diferente dos demais tratamentos (8S/ $R_{\max} = 134,90$ e 14S/ $R_{\max} = 91,24$) ($p < 0,05$) (Gráfico 4c, 5a e 5b) (Tabela 2 e 3);

Gráfico 4 - Curvas de crescimento das três cepas de *Nannochloropsis* sp.



Legenda: (a) Cepa NN-M, (b) Cepa NN-J e (c) Cepa NN-S.

Gráfico 5 – Comparativos entre as taxas de crescimento (a) e $R_{\max}$ (b) das cepas de *Nannochloropsis* sp.

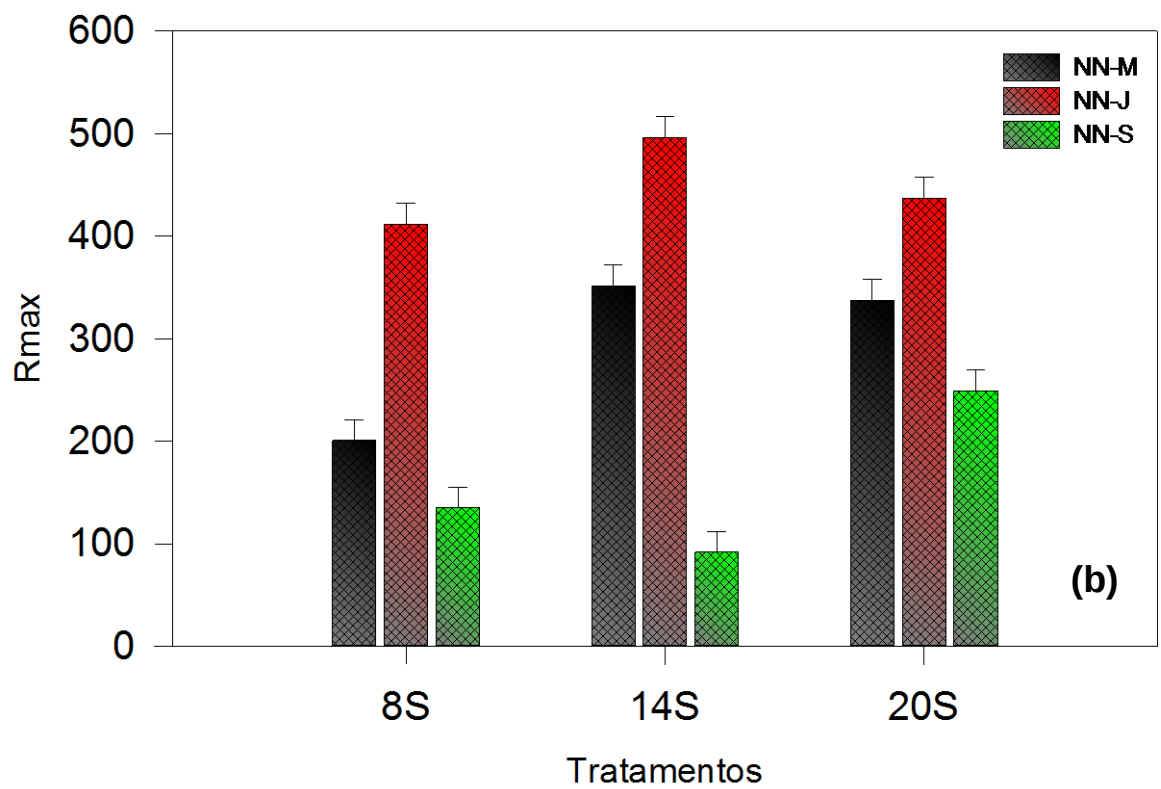
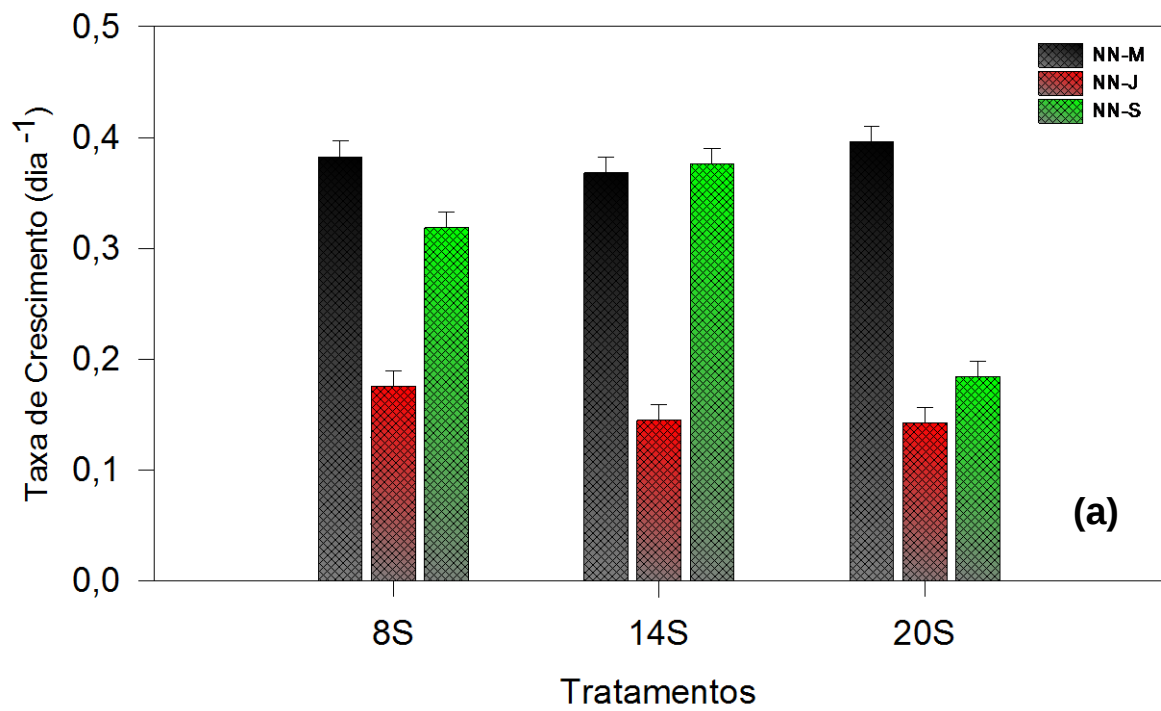


Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA Two-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a taxa de crescimento das cepas de *Nannochloropsis* sp.

Fonte de Variação			
CEPA	$F_{2,26} = 196,265$	$p < 0,001$	
SALINIDADE	$F_{2,26} = 14,179$	$p < 0,001$	
CEPA x SALINIDADE	$F_{4,26} = 18,292$	$p < 0,001$	
Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)			
Comparações para Taxa de Crescimento:			
Salinidade x Cepa			
	NN-M	NN-J	NN-S
8S	A1	B1	C1
14S	A1	B1	A2
20S	A1	B1	B3

Legenda: As letras A, B e C indicam grupos homogêneos para cada salinidade e os números indicam grupos homogêneos para cada cepa nas diferentes salinidades, de acordo com o teste a posteriori Holm-Sidak ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA Two-Way) para os efeitos das cepas e da salinidade sobre a rendimento máximo das cepas de *Nannochloropsis sp*

Fonte de Variação		
CEPA	$F_{2,26} = 150,802$	$p < 0.001$
SALINIDADE	$F_{2,26} = 16,009$	$p < 0.001$
CEPA x SALINIDADE	$F_{4,26} = 10,507$	$p < 0.001$

Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)			
Comparações para Rendimento Máximo: Salinidade x Cepa			
	NN-M	NN-J	NN-S
8S	A1	B1	A1
14S	A2	B1	C1
20S	A2	AB1	B2

Legenda: As letras indicam grupos homogêneos para cada salinidade e os números indicam grupos homogêneos para cada cepa nas diferentes salinidades, de acordo com o teste a posteriori Holm-Sidak ($p < 0,05$).

10.2 Avaliação dos efeitos da salinidade sobre a atividade fotossintética de *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp.

10.2.1 Rendimento quântico do PSII

O rendimento quântico (Φ) do PSII foi avaliado diariamente durante todo experimento para todos os tratamentos dados as quatro cepas. Os dados mostram uma maior variação desses valores para a cepa DI, cepa que teve sua taxa de crescimento afetada pelas variações de salinidades testadas (Gráfico 6). Já as cepas NN-M, NN-J e NN-S tiveram menores variações em seus rendimentos quânticos (Φ) do PSII, contudo não foi identificada uma relação direta com suas respectivas taxas de crescimento (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Rendimento quântico (Φ) PSII de *Diacronema* sp.

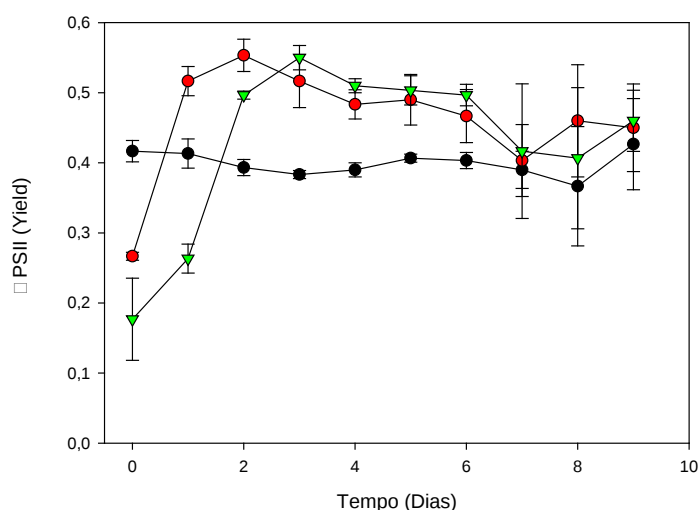
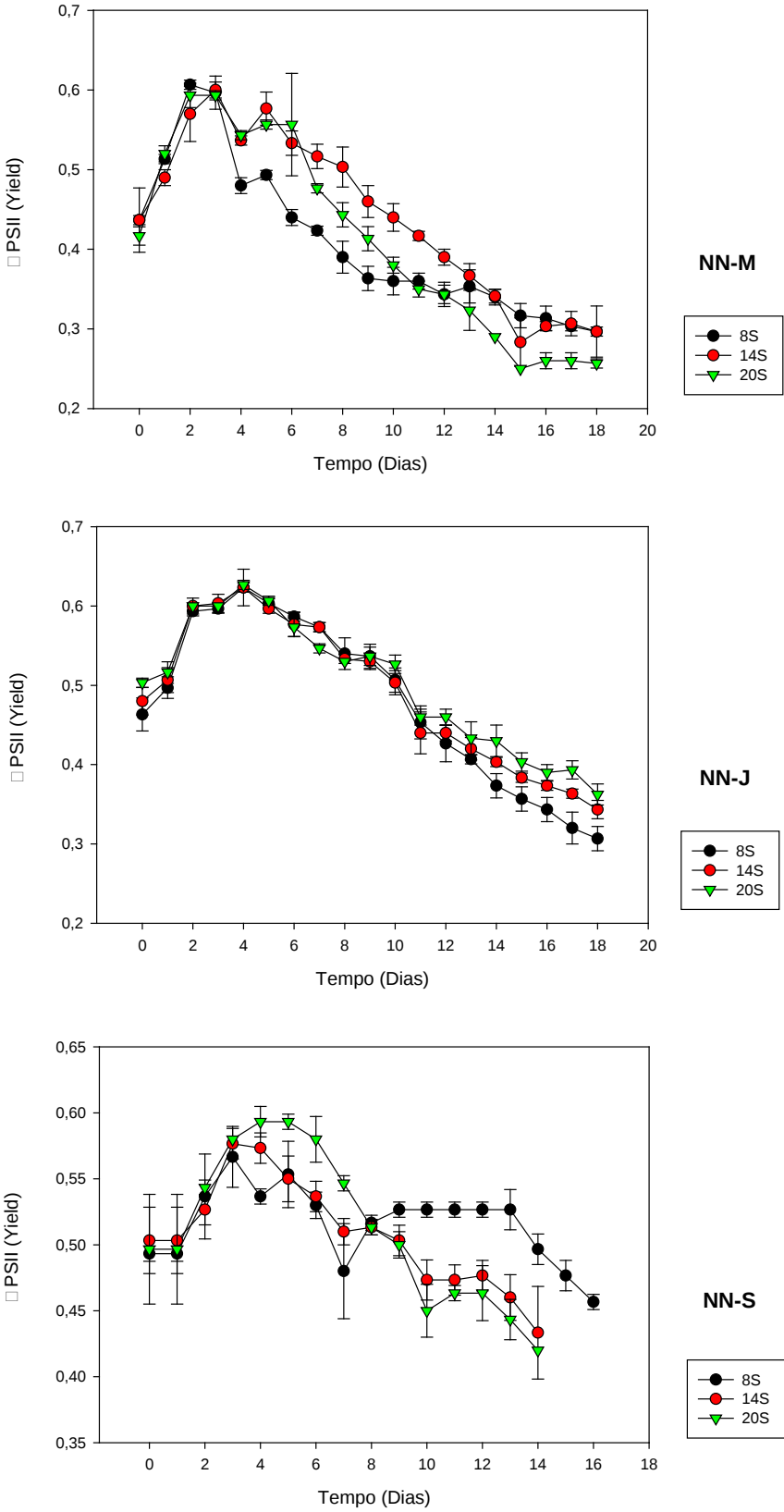


Gráfico 7 - Rendimento quântico (Φ) PSII das cepas de *Nannochloropsis* sp.



10.3 Avaliação do efeito da salinidade sobre as interações entre as cepas de *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp.

10.3.1 Efeito do exsudato de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) sobre o crescimento de *Diacronema* sp (DI).

Foram observadas diferenças entre as taxas de crescimento e R_{max} da cepa de *Diacronema* sp. (DI) cultivada em exsudato de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) nas três salinidades testadas. A taxa de crescimento e R_{max} foram maiores em 8S ($\mu = 0,709$, $F_{2,0} = 6,413$ $p < 0,032$ e $R_{max} = 98,51$, $F_{2,368} p < 0,001$) (Gráfico 7) (Tabela 4).

O crescimento da cepa DI em exsudato de *Nannochloropsis* sp. foi comparado com o crescimento em meio f/2 nas diferentes salinidades estudadas. A razão de resposta para os tratamentos (RR) indicou o efeito negativo da salinidade, que foi incrementado pelo exsudato de *Nannochloropsis* (NN-S) em relação à condição considerada controle (tratamento 14S em meio f/2 puro). (Gráfico 11). Em relação ao rendimento máximo, ocorreu um aumento em seus respectivos valores (8S +3,2; 14S +1,16; 20S +1,5), onde apenas o tratamento 14S com exsudato de NN-S não foi estatisticamente diferente do tratamento 14S em meio f/2 puro ($F_{2,35} = 100,590$ $p < 0,001$).

Gráfico 8 - Taxas de crescimento (μ) e R_{max} de *Diacronema* sp. no exsudato de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) nas salinidades testadas

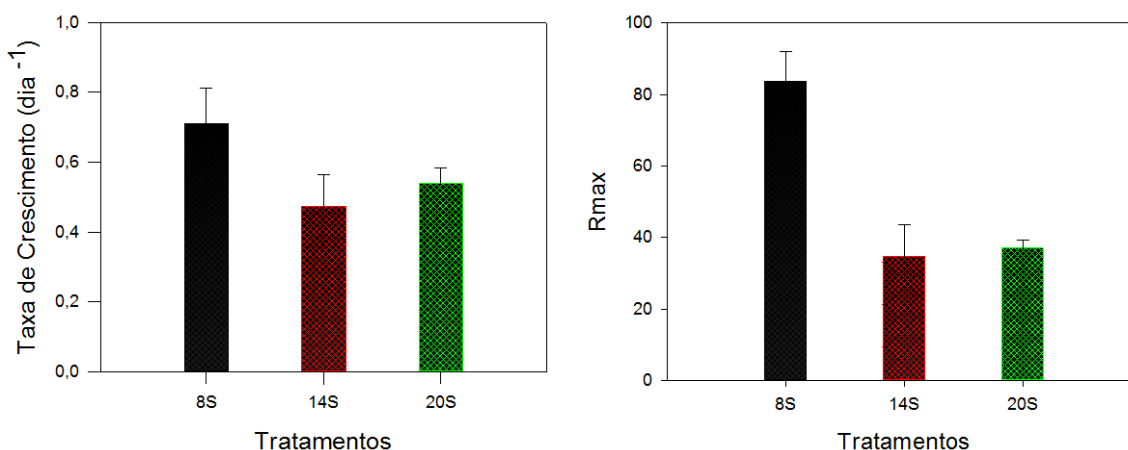
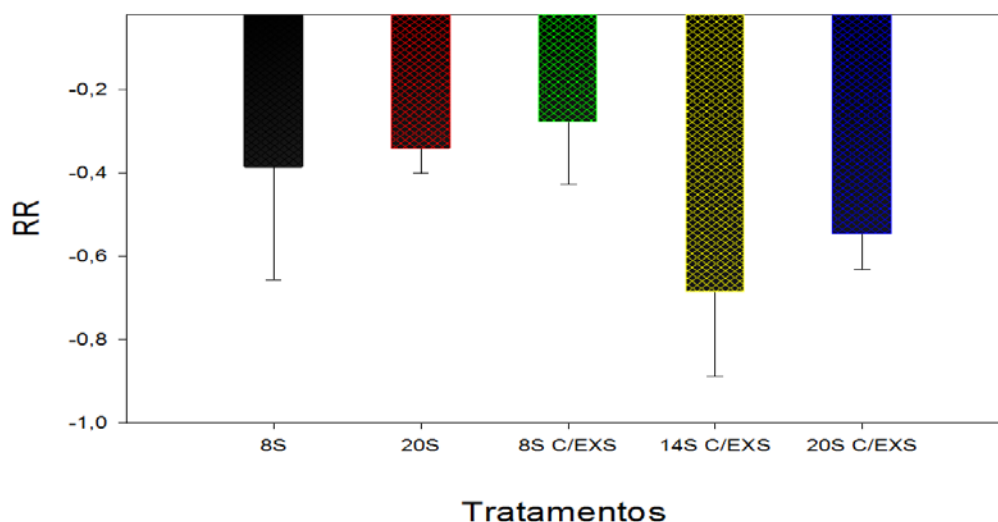


Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos do exsudato de *Nannochloropsis* sp. sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de *Diacronema* sp.

Taxas de crescimento (μ)		Rendimento Máximo (Rmax)	
Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)		Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)	
	DI		DI
8S	A	8S	A
14S	B	14S	B
20S	B	20S	B

Legenda: As letras indicam grupos homogêneos para cada salinidade, de acordo com o teste a posteriori Holm-Sidak ($p < 0,05$).

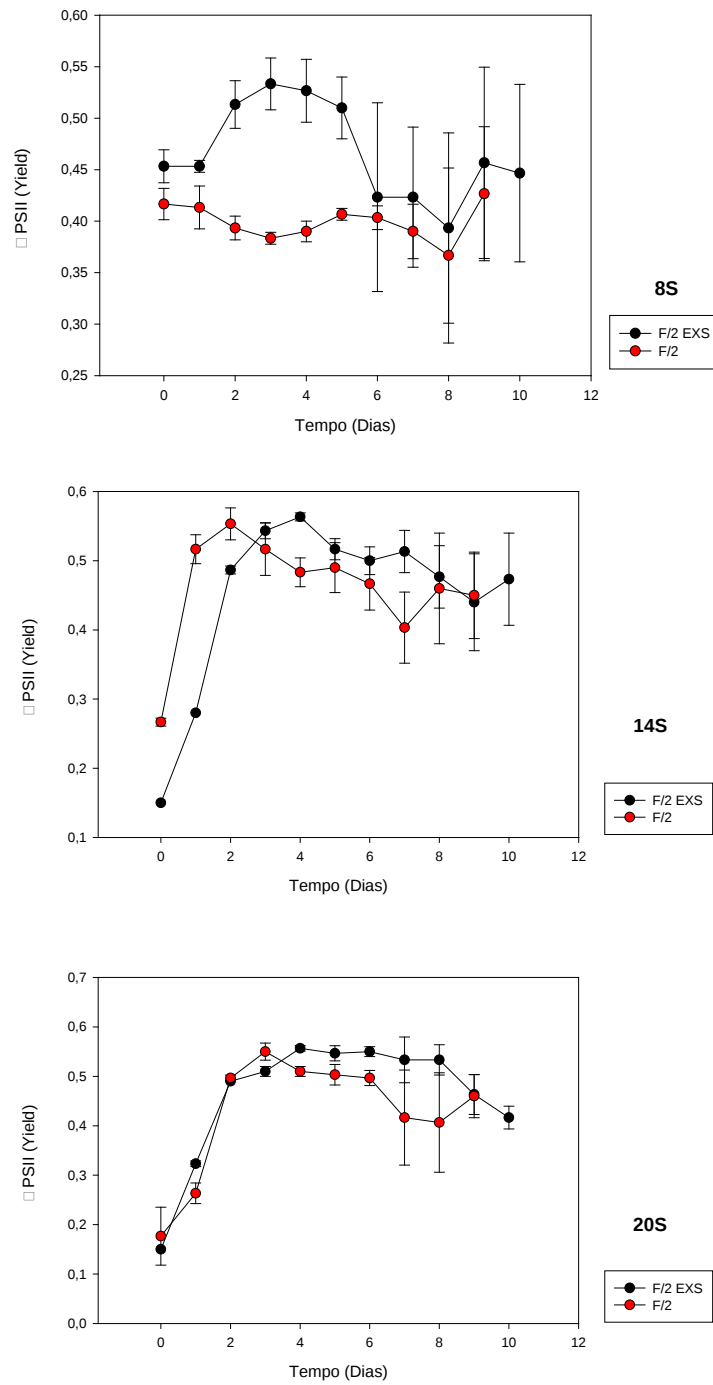
Gráfico 9 - Razão de resposta (RR) entre controle e tratamentos



Legenda: Razão de resposta das taxas de crescimento de *Diacronema* sp. (DI) para os tratamentos com meio f/2 (salinidades 8 e 20) e para o exsudato de *Nannochloropsis* (NN-S) em relação à condição considerada controle (tratamento 14S em meio f/2 puro).

Em relação ao rendimento quântico (Φ) do PSII verificou-se que os valores obtidos nos cultivos contendo exsudato de *Nannochloropsis* sp. tiveram valores relativamente superiores aos cultivos com meio f/2 puro em todas as salinidades (Gráfico 10). Uma maior diferença foi observada no tratamento 8S na fase log.

Gráfico 10 – Comparativo entre rendimento quântico (Φ) PSII para *Diacronema sp.* (DI) em meio f/2 puro e meio f/2 contendo exsudato de *Nannochloropsis sp.* (NN-S).



10.3.2 Efeito do exsudato de *Diacronema* sp. sobre o crescimento de *Nannochloropsis* sp. (NN-S)

Nannochloropsis sp. (NN-S) apresentou maior μ e $R_{\max}$ em 14S (1,225 e 27,66) ($F_{2,0}=14,122$ $p < 0,005$). A menor taxa de crescimento foi observada em 8S e o menor rendimento máximo foi em 20S (Gráfico 13 e Tabela 5).

Gráfico 11 - Efeito do exsudato de *Diacronema* sp. sobre o crescimento de *Nannochloropsis* sp.

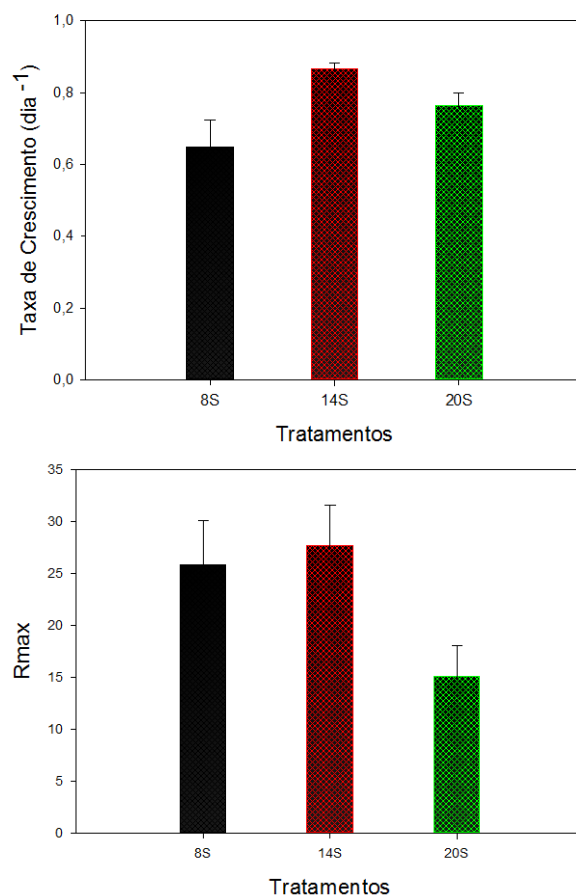


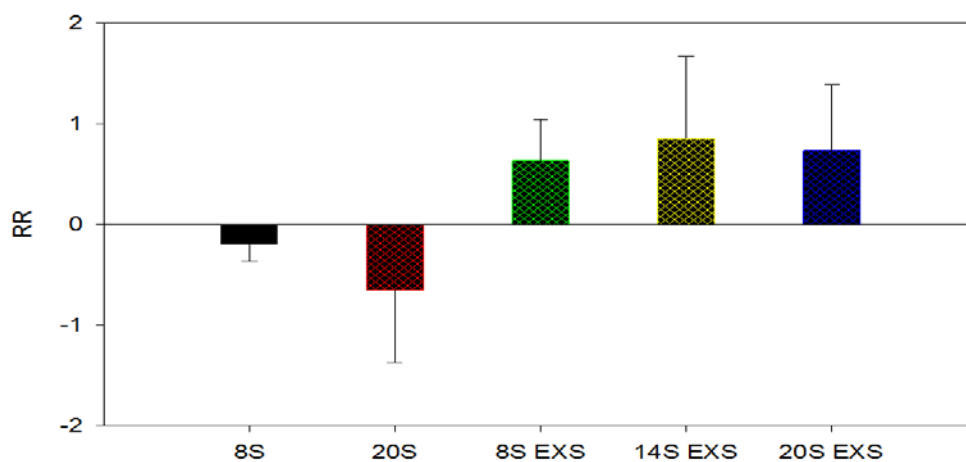
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA One-Way) para os efeitos do exsudato de *Diacronema sp.* sobre a taxa de crescimento e rendimento máximo de *Nannochloropsis sp.*

Taxas de crescimento (μ)		Rendimento Máximo (Rmax)	
Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)		Resultados de Múltiplas Comparações (Holm-Sidak)	
NN-S		NN-S	
8S	A	8S	A
14S	B	14S	A
20S	A	20S	B

Legenda: As letras indicam grupos homogêneos para cada salinidade, de acordo com o teste a posteriori Holm-Sidak ($p < 0,05$).

Considerando o tratamento 14S em meio f/2 puro como controle, foi observado que todos os tratamentos com exsudato apresentaram uma razão de resposta (RR) positiva, diferentemente do que aconteceu com o crescimento da cepa DI no exsudato de NN-S. Os resultados demonstram que o exsudato de DI potencializou o crescimento de NN-S em todos os tratamentos (8S +0,53 ; 14S +0,83 ; 20S +0,70) (Gráfico 12). Em relação ao rendimento máximo, também ocorreu um incremento em seus respectivos valores (8S +4,52 ; 14S +3,37 ; 20S +16,76), quando comparados aos dados obtidos em meio f/2 puro.

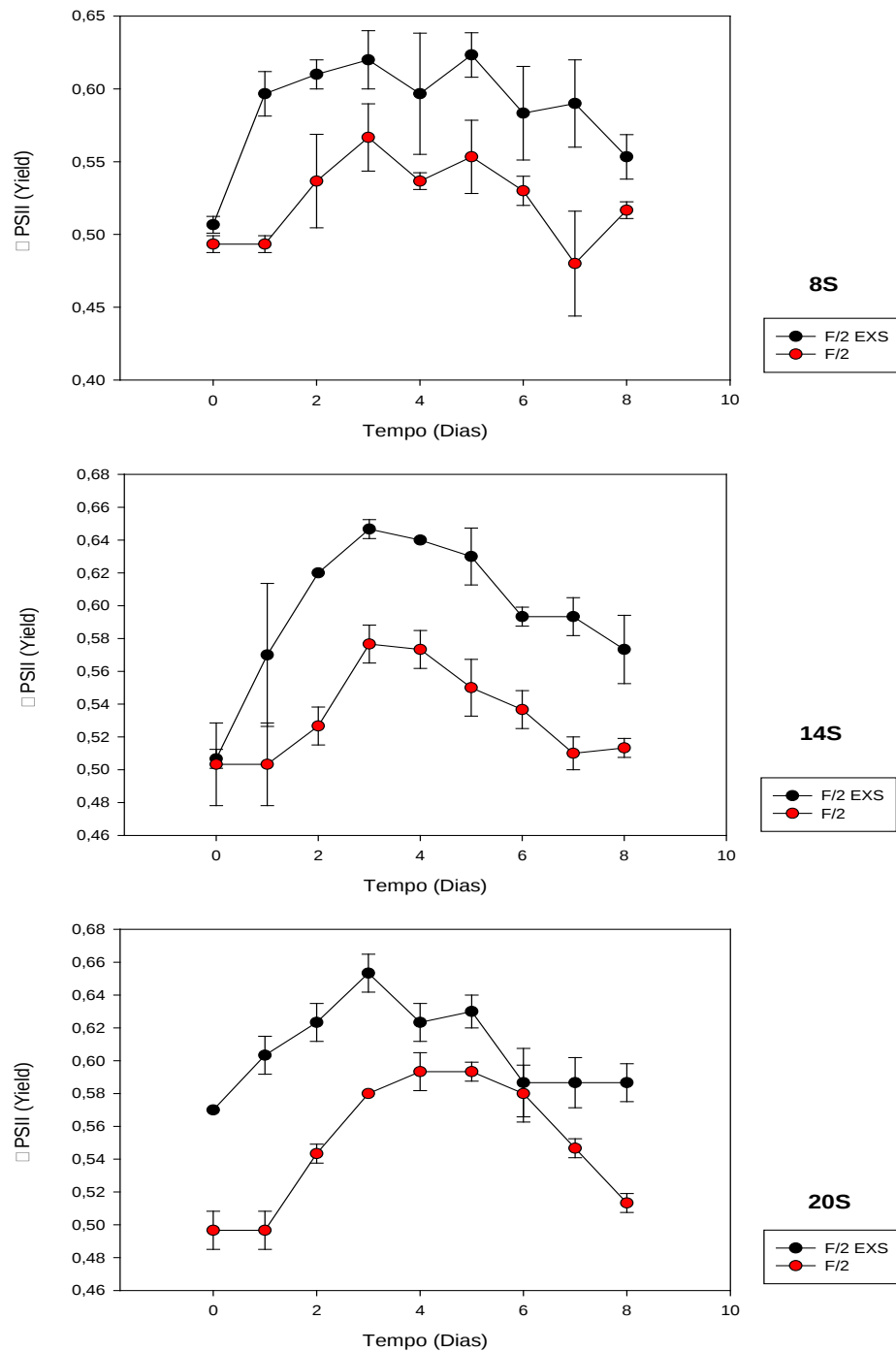
Gráfico 12 - Razão de resposta (RR) entre controle e tratamentos



Legenda: Resposta positiva das taxas de crescimento de *Nannochloropsis sp.* (NN-S) no exsudato de *Diacronema sp.* (Di).

Em relação ao rendimento quântico (Φ) do PSII verificou-se que os valores obtidos nos cultivos contendo exsudato de *Diacronema sp.* tiveram valores superiores aos cultivos com meio f/2 puro em todas as salinidades (Gráfico 15).

Gráfico 13 - Comparativo entre rendimento quântico (Φ) PSII para *Nannochloropsis sp.* (NN-S) em meio f/2 puro e meio f/2 contendo exsudato de *Diacronema sp.* (DI).



10.3.3 Avaliação da atividade fotossintética

A CRL foi utilizada para avaliar o efeito do exsudato de DI sobre a atividade fotossintética de *Nannochloropsis* sp. (NN-S). Foi observado um aumento na resposta do ETR no período após o inóculo no meio com exsudato (Gráfico 14). Ao comparar os valores de ETR obtidos em meio f/2 com o meio f/2 com exsudato ficou evidente a ocorrência de um estímulo no transporte de elétrons (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Demonstrativo das curvas rápidas de luz de *Nannochloropsis* sp. (NN-S).

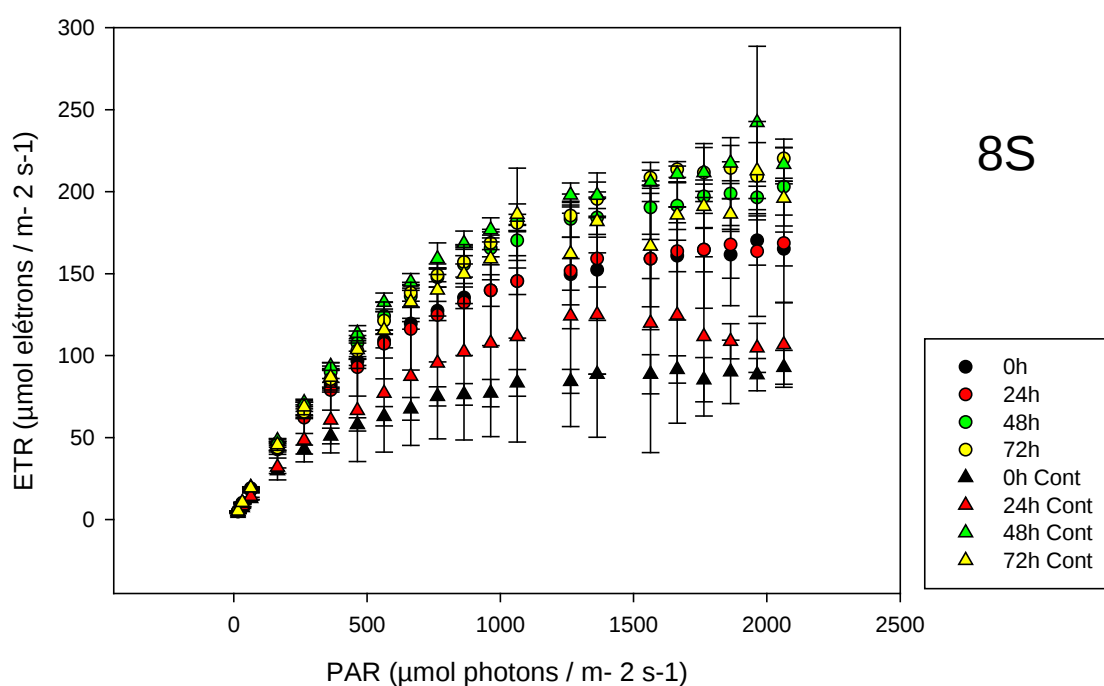
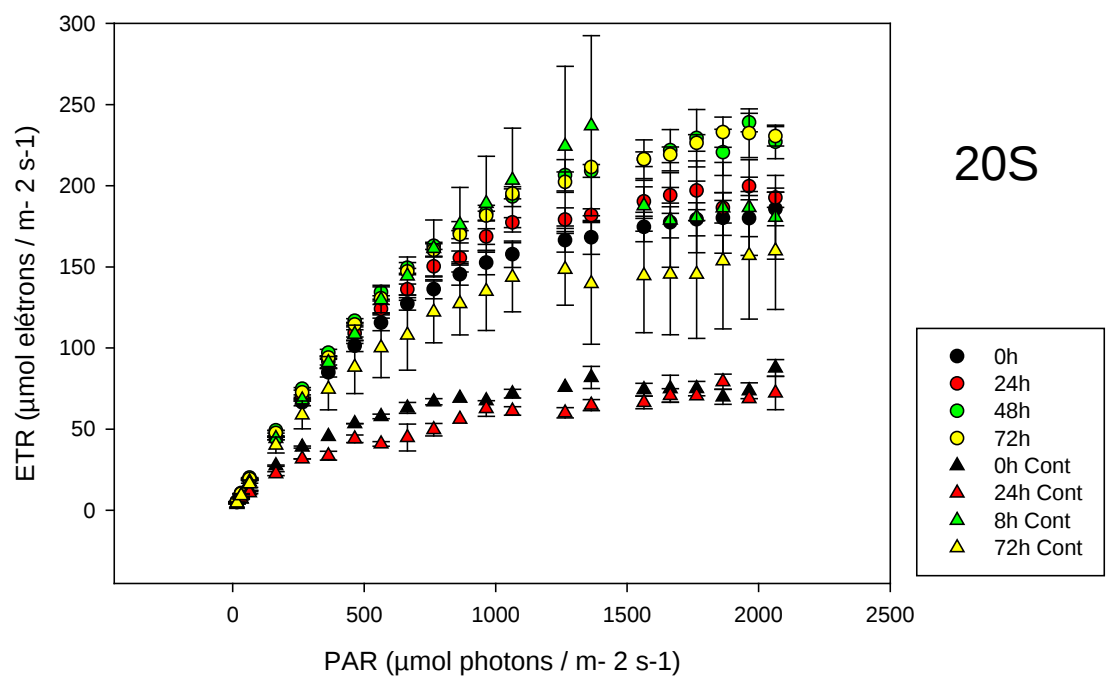
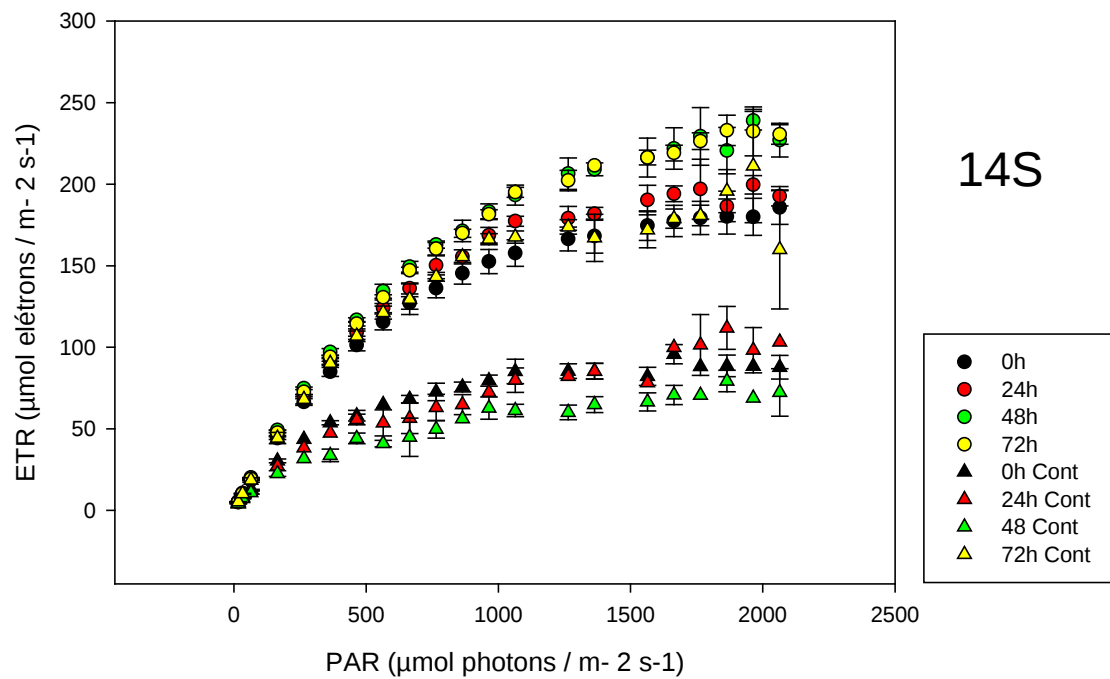
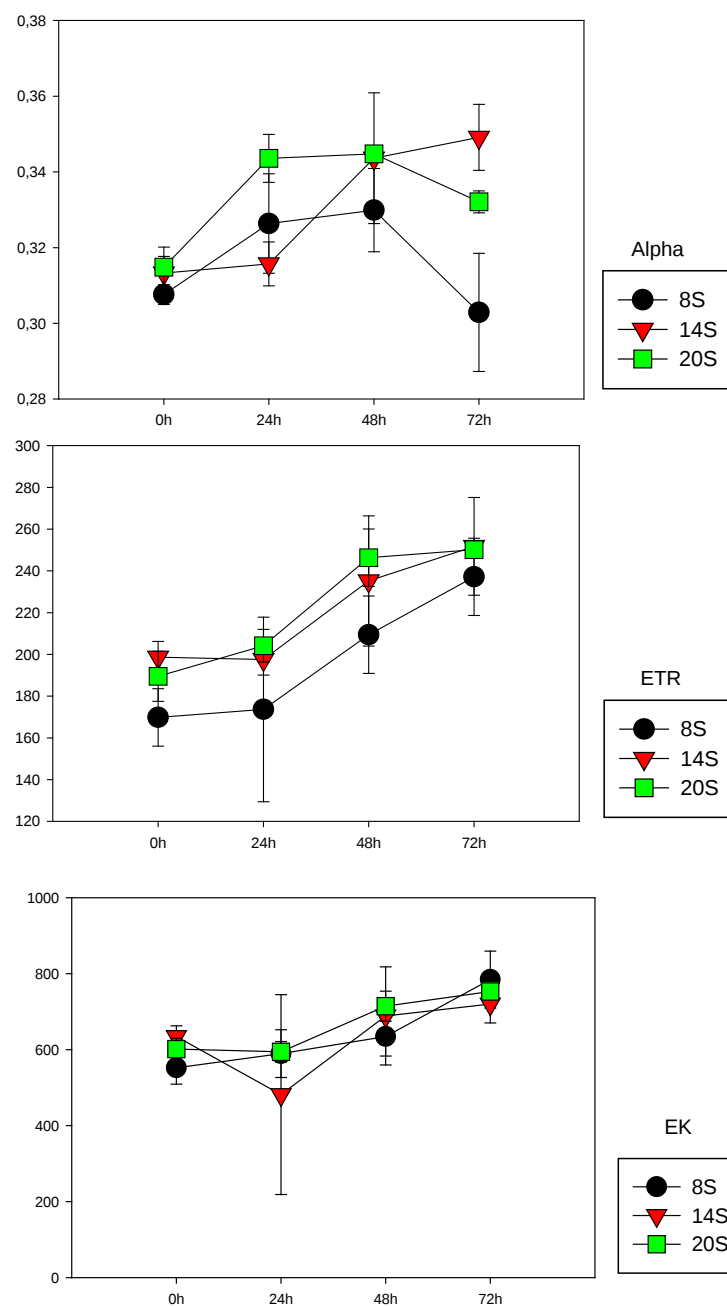


Gráfico 14 - Demonstrativo das curvas rápidas de luz de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) (conclusão).



A eficiência fotossintética (α) sofreu aumento em seus valores após o inóculo. Porém, em 72h há uma queda destes valores, exceto para o tratamento 14S, que permaneceu em crescimento (Gráfico 15). Os valores de ETR_{max} aumentaram significativamente após 48h, sendo menores na salinidade 8S (Gráfico 15). Os valores de E_k não apresentaram diferença entre os tratamentos e sofreram aumento ao longo dos tempos avaliados (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Parâmetros da curva rápida de luz



11 DISCUSSÃO

11.1 Clorofila como medida de crescimento

A contagem manual de células em microscópio, biovolume e a concentração de pigmentos são amplamente usadas para estimar a biomassa algal (SMAYDA 1978 e JEFFREY *et al.* 1997). Entretanto, todos os métodos possuem limitações técnicas. A contagem celular é trabalhosa, requer tempo e amostras bem preservadas. Além disso, a fixação pode alterar o volume celular, dependendo do tipo e concentração do fixador e da espécie que se está trabalhando (MONTAGNES *et al.* 1994). A utilização da clorofila *a*, entretanto, é relativamente mais fácil e rápido de quantificar. Consequentemente, tal técnica é extensivamente utilizada para estimar a biomassa fitoplanctônica (MARISOL e CATALAM 2000).

Contudo, alguns estudos como, por exemplo, o de Wood, Everroad e Wingard (2005) questionam essa metodologia, afirmando que a concentração de clorofila, assim como de proteínas, carboidratos e lipídeos só podem ser usadas como medida de crescimento, quando apresentam uma correlação linear com o número de células. Estudos que correlacionam clorofila *a* com densidade ou biovolume, apresentaram valores de correlação altamente variáveis (JAVORNICKY 1974; NICHOLLS e DILLON 1978; TOLSTOY 1979; DESORTOVA 1981; GRANBERG e HARJULA 1982; KOUREISHEVICH 1983; LOTH 1985; FOY 1987; WHITE *et al.* 1988; VASSILEV *et al.* 1994).

A quota celular de clorofila *a* não variou significativamente durante o crescimento das culturas no experimentos com a cepa DI de *Diacronema* sp., demonstrando que a clorofila *a*, nesse estudo, foi uma variável adequada para se mensurar o crescimento para esta cepa. Entretanto, para as cepas NN-M, NN-J e NN-S, as correlações entre clorofila *a* e densidade celular não puderam ser estabelecidas devido à numerosa presença de grumos (grupos de células), que impossibilitaram a contagem automática, através do Casy®, e até mesmo a contagem manual, com câmara de Neubauer. Bongiovani *et al.* (2013) observaram,

a impossibilidade de contagem celular ao trabalhar com espécies do gênero *Nannochloropsis*, uma vez que suas células, muito pequenas (~2-4µm), em determinadas fases da curva de crescimento, tornavam a contagem impossível. Contudo, existem na literatura artigos que avaliaram crescimento e não utilizaram luz como variável de tratamento, e sim a clorofila *a* como referência para o cálculo de taxa de crescimento (BONGIOVANI *et al.* 2013; PAL *et al.* 2011), como é o caso do presente estudo, onde a variável de interesse testada foi salinidade, o que não inviabiliza a clorofila *a* como medida de crescimento.

11.2 Avaliação dos efeitos da salinidade sobre o crescimento de *Diacronema* sp. e *Nannochloropsis* sp.

Espécies fitoplanctônicas consideradas oleoginosas, ou seja, espécies que sintetizam e armazenam grande quantidade de lípideos e ácidos graxos, possuem capacidade diferenciada no ajuste interno para suportar a pressão osmótica, por meio de compostos regulatórios (ex.: AGPIs e lípideos), tornando-os mais resistentes à variação de salinidade (PAL *et al.* 2011). Tanto *Nannochloropsis* sp. quanto *Diacronema* sp. são espécies com tal característica (RODOLFI *et al.* 2008; CHIU *et al.* 2009; SHAH *et al.* 2014).

Espécies dos gêneros *Nannochloropsis* e *Diacronema* se classificam geralmente como eurihalinas, devido à sua capacidade de suportar o estresse salino (PAL 2011). As cepas NN-M e NN-J não apresentaram diferenças significativas em suas taxas de crescimento em relação às salinidades testadas, entretanto, a variação de salinidade resultou em redução das taxas de crescimento das cepas DI (menor μ em 8S e 20S) e NN-S (menor μ em 20S).

Brand (1984), testou a tolerância à variação de salinidade (baseado em taxa de crescimento) de 46 espécies fitoplanctônicas marinhas, salobras e de água doce. O autor encontrou uma ampla tolerância nas espécies de ambientes costeiros/salobro, refletindo a característica de seus habitats de origem. Porém, é importante ressaltar que em salinidades elevadas o crescimento de microalgas é

suspenso devido à acumulação de solutos específicos que atuam como osmoprotetores para estabilizar enzimas do metabolismo (FÁTIMA *et al.* 2007).

Em células que possuem parede, o mecanismo de tolerância contra o estresse salino é a osmorregulação, realizada com ajuda da pressão de turgor, que é a distensão da camada protoplásmica e da parede da célula pelo conteúdo líquido, enquanto nas células livres de parede, é realizada por vacúolos contráteis. Neste último caso, a célula aumenta a concentração interna de solutos e íons quando a concentração no meio externo é maior. Da mesma forma, a concentração interna desses solutos diminui quando a concentração externa diminui. (LEE 2012).

Durante os experimentos não foi observado qualquer tipo de alteração morfológica nas espécies estudadas, fato que, associado ao conhecimento das características gerais das duas classes (Eustigmatophyceae e Pavlovophyceae) permite afirmar que a dormência não é o mecanismo utilizado pelas cepas estudadas em situação de estresse salino, como ocorre em Dinophyceae (LEE 2012).

Existem poucos estudos na literatura que avaliaram o crescimento de espécies de *Diacronema* em relação à salinidade. Para cepas marinhas de *Diacronema lutheri* (antes *Pavlova lutheri*) o crescimento ótimo foi observado em torno da salinidade 35 (SHAH 2014; PEI *et al.* 2011). Enquanto cepas de *D. vlkianum*, isoladas de ambientes salobros e marinhos, apresentam melhor crescimento em salinidades entre 25 e 35 (ARMADA *et al.* 2013). Em nosso estudo a cepa de *Diacronema sp.* obteve melhor crescimento na salinidade 14. Estes resultados contrastantes podem refletir diferenças fisiológicas entre espécies do gênero e/ou estar relacionados ao ecossistema de origem das cepas.

Alguns estudos tem demonstrado que espécies de *Nannochloropsis* podem crescer em um amplo intervalo de salinidade (BOUSSIBA *et al.* 1987; FISHER *et al.* 1998) e possuem tolerância para salinidade acima de 34, porém apresentam melhor desenvolvimento em ambientes com salinidade mediana (PAL *et al.* 2011). Testes com variação na salinidade, entre 13,5 e 81 de NaCl, mostraram que valores acima de 27 afetaram o crescimento, fotossíntese e fluorescência de uma cepa de *Nannochloropsis sp.* (ROLDÁN *et al.* 2013). Outros estudos com espécies marinhas de *Nannochloropsis* também registraram o crescimento máximo em salinidade 30

(KHATOON *et al.* 2014), especialmente quando associada a temperaturas de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ (CHO *et al.* 2007).

Estes resultados demonstram que cepas marinhas testadas de *Nannochloropsis* sp. apresentam ampla tolerância à salinidade, ou seja, são eurihalinas, mas preferem valores de salinidade intermediárias ($\cong 30$). As cepas de *Nannochloropsis* NN-M e NN-J demonstraram ter maior tolerância ou serem mais adaptadas à flutuação de salinidade do que as demais, uma vez que a variação de crescimento em função da salinidade não apresentou diferença estatística significativa. Confirmando a classificação de eurihalina para *Nannochloropsis* sp. Entretanto, a cepa *Nannochloropsis* NN-S apresentou redução significativa da taxa de crescimento em salinidade 20. Esta redução no crescimento pode ser explicada pela redução nos valores de ΦPSII , demonstrando que a salinidade interferiu na eficiência do PSII. Roldán *et al.* (2014), avaliando a resposta fisiológica de *Nannochloropsis* sp. para 4 salinidades distintas, observaram redução dos valores de ΦPSII (-88,16%) no tratamento de maior salinidade ($54 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$). A diminuição de ΦPSII pela adição de NaCl pode estar relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados para inibir o metabolismo celular. Este aumento de ROS pode afetar não só a eficiência do PSII, mas também seu mecanismo de reparação (HENLEY *et al.* 2002; AFFENZELLER *et al.* 2009).

Quando comparamos o rendimento máximo das culturas (R_{max}) com as taxas de crescimento (μ), observamos que para a cepa DI esses valores foram diretamente proporcionais, porém para as cepas NN-M, NN-J e NN-S (exceto no tratamento 20S) os valores foram inversamente proporcionais. Sabe-se que enquanto μ possibilita uma avaliação da velocidade de incremento exponencial da população, o R_{max} permite inferir sobre a capacidade de produzir biomassa em determinadas condições de cultivo (MARINHO e AZEVEDO 2007). Esses dados possibilitam interpretar qual tipo de estratégia foi utilizada pelas cepas estudadas nas diferentes condições testadas. Organismos que investem primariamente seu metabolismo para um rápido desenvolvimento vão apresentar maior μ e menor R_{max} . Por outro lado, menores taxas de crescimento e maiores valores de R_{max} representariam organismos que investem primariamente na estocagem de compostos orgânicos e tendem a crescer mais lentamente (ODUM 1988; MARINHO e AZEVEDO 2007).

Considerando esta abordagem, Marinho e Azevedo (2007) estudaram o crescimento de duas cepas de espécies planctônicas de uma represa eutrófica, uma cianobactéria (*Microcystis aeruginosa*) e uma diatomácea (*Aulacoseira distans*), sob condições de limitação de nutrientes. Em seus testes, os autores verificaram que *M. aeruginosa* apresentou μ e $R_{\max}$ diretamente proporcionais, enquanto para *A. distans* os valores registrados de μ e $R_{\max}$ foram inversamente proporcionais às condições testadas. Os autores atribuíram essa situação à cinética de absorção de nutrientes, sendo que *A. distans* se mostrou mais rápida na absorção de nutrientes com valores de μ mais elevados e baixo $R_{\max}$, diferindo dos resultados e, consequentemente, da estratégia de *M. aeruginosa*.

A Lagoa Rodrigo de Freitas (de onde foram isoladas as cepas estudadas) é um sistema eutrófico e a disponibilidade de nutrientes não deve ser um fator limitante ao crescimento e também, provavelmente, não foi nos experimentos realizados, não há como afirmar qual estratégia seria a mais eficiente para aquele ambiente e qual medida (μ ou $R_{\max}$) é mais adequada para avaliar quais cepas estariam mais adaptadas as condições de flutuação de salinidade. Entretanto, levando em consideração que o estresse salino altera a quantidade e a composição de solutos que atuam como osmoprotetores e que estes são necessários para estabilizar enzimas do metabolismo (FATMA *et al.* 2007), e que processos como fixação de carbono, fotossíntese e síntese de pigmentos são prejudicados (STEIPIEN e KLOBUS 2006; PAL *et al.* 2011). Dessa forma uma medida adequada para definição do êxito das resposta e estratégias à flutuação de salinidade, além da estabilidade no crescimento, é uma proporcionalidade entre taxa de crescimento e rendimento máximo, uma vez que grandes variações entre esses valores podem refletir alterações negativas do metabolismo celular.

Os resultados dos efeitos da salinidade sobre o crescimento demonstram a variabilidade interespecífica e intraespecífica nas respostas fisiológicas das cepas aqui avaliadas. É válido ressaltar que as quatro cepas aqui estudadas foram isoladas de uma laguna costeira eutrófica tropical, o que explicaria em parte, a diferença entre os valores ótimos de salinidades aqui obtidos e os apontados na literatura, como sendo relacionadas a diferenças ecofisiológicas entre cepas de ambientes salobro e marinho. Dependendo da região geográfica, diferentes cepas têm preferências distintas para com a salinidade. Salinidade ótima pode ser uma

função de condições imediatas a partir do qual a cepa foi inicialmente isolada (CUCCHIARI *et al.* 2008).

11.3 Avaliação do efeito da salinidade sobre as interações entre as cepas de *Nannochloropsis* sp. e *Diacronema* sp.

A alelopatia é considerada, em geral, uma importante estratégia de competição direta entre espécies, uma vez que a produção e excreção de biomoléculas afetam direta ou indiretamente o crescimento, sobrevivência e/ou reprodução de outros organismos, conferindo vantagem competitiva sobre outras espécies (LEGRAND *et al.* 2003; IAS 1996; CEMBELLA 2003; GRANÉLI & HANSEN, 2006; ROY *et al.* 2013). Este processo geralmente implica em interação negativa, mas também pode promover um efeito estimulatório ao crescimento de outros organismos (SUIKKANEN *et al.* 2005).

Embora os ecossistemas terrestres tenham sido o foco da maioria das pesquisas, a alelopatia ocorre também em ecossistemas aquáticos (EINHELLIG 1995), e têm sido apontados por desempenhar um importante papel na variabilidade planctônica, competição e formação de florações (PRATT 1966; KEATING 1977; 1978; RICE 1984; WOLFE 2000; RENGEFORS e LEGRAND 2001; VARDI *et al.* 2002; FIGUEREDO *et al.* 2007). Alguns grupos de algas, especificamente, têm em seu histórico registros de atividades alelopáticas e são, na maioria das vezes, foco de parte dos estudos que avaliam esse tipo de interação: primnesiofíceas (FISTAROL *et al.* 2003; GRANÉLI e JOHANSSON 2003), dinoflagelados (FISTAROL *et al.* 2004; WU *et al.* 1998), algas verdes (CHIANG *et al.* 2004) e cianobactérias (SUIKKANEN *et al.* 2004; 2005; FISTAROL *et al.* 2003). Muitos são os autores que defendem a ideia de que, em geral, fatores que promovam estresse para a célula atuem estimulando ou potencializando sua atividade aleloquímica (VON ELERT e JÜTTNER 1997; RENGEFORS e LEGRAND 2001; GRANÉLI & JOHANSSON 2003). Apesar do grande conteúdo sobre o assunto em questão, os registros de atividade alelopática envolvendo os gêneros *Nannochloropsis* e *Diacronema* são escassos, possivelmente devido a problemática

de identificação de espécies desses gêneros, que impossibilita o correto registro do processo.

Pelo fato das duas espécies terem tamanho e formato da célula semelhantes, o que impossibilitaria ou dificultaria uma correta contagem celular, a utilização de exsudatos ao invés de um experimento de competição em bicultura foi adotado neste estudo. A metodologia seguida nos permitiu comprovar a existência de atividade alelopática, segundo conceito de SUIKKANEN *et al.* (2005), entre *Nannochloropsis* sp. (NN-S) e *Diacronema* sp. (DI), além de demonstrar que a ação das salinidades testadas, como fator estressante, não estimula diretamente o processo de produção/ação do metabólito.

Nos testes com exsudato, o filtrado de *Diacronema* sp. (DI) estimulou o crescimento de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) nas três salinidades testadas, chegando a dobrar a taxa de crescimento no tratamento 14S. Estes resultados, no entanto, diferem do estudo de Yamasaki *et al.* (2015) que observaram inibição do crescimento de *Nannochloropsis* sp. por exsudatos de *Diacronema lutheri*, obtido de culturas sobre variação de temperatura. As diferentes variáveis testadas como fator de estresse (temperatura X salinidade) podem explicar os distintos resultados obtidos neste estudo e por Yamasaki e colaboradores (2015).

Outra possível explicação para este estímulo ao crescimento poderia ser atribuída a resquícios de matéria orgânica dissolvida existentes no exsudato, provenientes do metabolismo celular. Estes, associados a adição de estoques antes da segunda fase do experimento poderiam ter resultado em concentrações finais de fosfato orgânico e inorgânico no exsudato, maiores do que controle, determinando um crescimento maior.

Além da avaliação da taxa de crescimento, o rendimento quântico do (Φ PSII) também foi mensurado. Ao comparar os valores de Φ PSII entre controle e tratamentos para *Diacronema* sp. (DI) e *Nannochloropsis* sp. (NN-S) nota-se que os valores obtidos nos tratamentos com exsudato foram superiores, demonstrando uma resposta fisiológica distinta destas espécies quando crescidas em meio com exsudato da espécie concorrente. Apesar da semelhança nesses dados, as respostas obtidas através da taxa de crescimento foram bem distintas. Uma possível explicação para este fato é que as avaliações realizadas neste trabalho estão

relacionadas ao transporte de elétrons no PSII, o que não necessariamente resulta em fixação de carbono com aumento de biomassa.

O estímulo promovido pelo exsudato de DI em NN-S pode ser inicialmente explicado/justificado com o incremento dos valores de ΦPSII , o que não ocorre para a inibição de crescimento promovida pelo exsudato de NN-S em DI, apesar da semelhança nos dados de ΦPSII . Em testes de salinidade com *Synechococcus*, além da interferência no PSII foi verificada uma inibição do transporte de elétrons no PSI (ALLAKHVERDIEV *et al.* 2000).

Em relação ao R_{max} , os exudatos de DI e NN-S promoveram aumento de valores, entretanto em proporções bem distintas. O incremento do R_{max} de DI chegou a ser 3,2 vezes maior em 8S, enquanto NN-S foi 16,8 vezes maior em 20S. Tais dados sugerem que a interferência do exsudato de NN-S agiu de modo a minimizar não só a velocidade de crescimento, mas também a capacidade de produção de biomassa de *Diacronema* sp. (DI).

A CRL, nos testes de interação, foi usada apenas para avaliar o desempenho da cepa NN-S. Em meio f/2 puro foi observado que o transporte de elétrons aumenta com o passar do tempo, possivelmente refletindo a fase exponencial da cultura. O mesmo também ocorreu nos cultivos com exsudato de DI. Contudo, ao comparar as taxas de transporte nos dois tratamentos, observa-se um significativo aumento no tratamento com exsudato para todas salinidades testadas, promovendo também o aumento do ΦPSII , R_{max} e μ da cepa NN-S, quando crescida no exsudato de DI. Ou seja, foi observado um estímulo alelopático na capacidade fotossintética de NN-S pelo exsudato de DI.

Na avaliação dos parâmetros da CRL, foi observado um aumento de α , ETR_{max} e EK com o passar do tempo para todas as salinidades. Compostos químicos com ação alelopática podem ser degradados, ou ainda, a própria espécie inicialmente afetada pode se adaptar ao aleloquímico (VON ELERT e JÜTTNER 1996; GRANÉLI e JOHANSSON 2003).

Em nossa hipótese consideramos que diferentes respostas ecofisiológicas frente à salinidade e interações mediadas por aleloquímicos podem estar relacionadas com a ocorrência/dominância de *Diacronema* sp. e *Nannochloropsis* sp. em florações na Lagoa Rodrigo de Freitas, o que foi confirmado por este estudo.

Em síntese, os resultados deste estudo evidenciaram que *Diacronema* sp. tem preferência por condições mesohalinas (salinidade 14) e tem seu crescimento afetado frente à dinâmica de variação da salinidade relacionada ao aporte de águas marinhas e de água doce dos tributários. Por outro lado, a variabilidade intraespecífica de *Nannochloropsis* sp. demonstra ser relevante na adaptação desta espécie ao ambiente, sendo que duas das três cepas estudadas apresentam tolerância à variação de salinidade observada na laguna (eurihalinas).

Nosso estudo também demonstrou a existência de interação biótica entre cepas das espécies estudadas que podem ser caracterizadas como interações alelopáticas. *Nannochloropsis* sp. (NN-S) parece produzir e liberar moléculas que inibem o crescimento de *Diacronema* sp. (DI), além de ser estimulada pelo seu exsudato. Apesar destas evidências terem sido observadas em condições experimentais de laboratório, os mecanismos observados podem ser extrapolados para o campo. Assim, as interações alelopáticas podem influenciar na dinâmica das populações destas espécies no ambiente natural.

CONCLUSÃO

- A clorofila *a*, nesse estudo, foi uma variável adequada para mensurar as taxas de crescimento. Com base nesses dados, foi possível identificar as prováveis estratégias em situações de flutuação de salinidade.
- A salinidade representa um das variáveis que pode controlar as populações de *Diacronema* sp. e *Nannochloropsis* sp. na Lagoa Rodrigo de Freitas.
- As cepas NN-M e NN-J suportaram maior amplitude de variação de salinidade (eurialinas) e teriam maior capacidade de adaptação à alteração de salinidade no ambiente. Por outro lado, as cepas DI e NN-S, que tiveram seu crescimento afetado pela variação de salinidade, estariam restritas a um menor intervalo de flutuação de salinidade (estenohalinas), ou seriam fortemente afetadas por essa variação no ambiente.
- O rendimento quântico do PSII da cepa *Nannochloropsis* sp. NN-S foi afetado na maior salinidade testada e possivelmente foi a causa de redução da taxa de crescimento desta cepa nesta condição.
- *Nannochloropsis* sp. apresenta variabilidade intraespecífica na resposta fisiológica à variação da salinidade.
- As cepas NN-S e DI apresentam atividade aleloquímica, que foi demonstrado por inibição (exsudato de NN-S) e estímulo (exsudato de DI) das taxas de crescimento da espécie concorrente.

- Foi verificada uma tendência de aumento dos valores dos parâmetros da CRL durante o decorrer do experimento com NN-S, dando a ideia de atenuação da ação do aleloquímico com o tempo.
- Os efeitos do estímulo aleloquímico ao crescimento de *Nannochloropsis* sp. (NN-S) estiveram relacionados ao incremento da atividade fotossintética, contudo, a inibição de *Diacronema* sp. (DI) não parece estar diretamente relacionada com a atividade do PSII.

REFERÊNCIAS

- ADIR N, ZER H, SHOCHAT S, OHAD I (2003) Photoinhibition a historical perspective. *Photosynth Res* 76:343–370. doi:10.1023/A:1024969518145
- AFFENZELLER M.J, DAREHSHOURI A, ANDOSCH A, LUTZ C, LUTZ-MEINDL U. (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *J Exp Bot* 60:939–954
- ANTIA, N. J. & CHENG J.Y. 1982. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae, *British Phycological Journal*, 17:1, 39-50, DOI: 10.1080/00071618200650061
- ALLAKHVERDIEV SI, MURATA N (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803.
- ALLAKHVERDIEV SI, SAKAMOTO A, NISHIYAMA Y, MURATA N (2000a) Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*: Contribution of water channels. *PlantPhysiol* 122:1201–1208. doi:10.1104/pp.122.4.1201
- ALLAKHVERDIEV SI, SAKAMOTO A, NISHIYAMA Y, INABA M, MURATA N (2000b) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol* 123:1047–1056. doi:10.1104/pp.123.3.1047
- ANDERSEN RA, BRETT RW, POTTER D (1998) Phylogeny of the Eustigmatophyceae based up on 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist* 149: 61—74
- ANDREOLI C, BRESCIANI E, MORO I, SCARABEL L (1999) A survey on a persistent greenish bloom in the Comacchio lagoons (Ferrara, Italy). *Bot Mar* 42(5):467–479
- ANTIA N.J., BISALPUTRA T, CHENG J.Y. & KALLEY J.P. 1975. Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloris oculala* and *Monallantus salina* in the Eustigmatophyceae. *Journal of Phycology* 11: 339-343.
- ARMADA, I., I. HACHERO-CRUZADO, N. MAZUELOS, J.L. RÍOS, M. MANCHADO, AND J.P. CAÑAVATE. 2013. Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* 95: 224–233.
- ARO E-M, VIRGIN I, ANDERSSON B (1993) Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143:113–134. doi:10.1016/0005-2728(93)90134-2

AZAM, F., D.C. SMITH, G.F. STEWARD, AND Å. HAGSTRÖM. 1993. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology* 28:167–179.

BABICA, P.; BLÁHA, L. & MARSÁLEK, B. 2006. Exploring the natural role of Microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.* 42: 9 - 20.

BACHVAROFF, T.R., ADOLF, J. E. AND PLACE, A. R. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (DINOPHYCEAE): toxin profiles, pigments, and growth characteristics. *J. Phycol.* 45, 137–153. 2009.

BECKER, V. 2002. Variação da estrutura e da biomassa fitoplanctônica na Lagoa Itapeva (litoral norte do Rio Grande do Sul) em função da hidrodinâmica. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 125p.

BARNES, R.S.R. 1980. Coastal Lagoons. The natural history of a neglected habitat. Cambridge University Press, Cambridge, CA. 100p.

BEHRENS, P.W., (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* 35: 215-226

BENDIF, M., PROBERT, I., HERVÉ, A., BILLARD, GOUX, C.D., LELONG, C., CADORET, J.P., AND VÉRON, B. 2011. Integrative Taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A Reassessment. *Protist*, Vol. 162, 738–761, November 2011 - <http://www.elsevier.de/protis>

BERNARDO, J.M., COSTA, A.M. & CANCELA DA FONSECA, L. 2006. Ocorrência e implicações dos fenômenos de estratificação em Lagoas Costeiras Fechadas - Estudos de caso. *Actas do 1º Seminário sobre Sistemas Lagunares Costeiros*. Lisboa, Portugal. <http://w3.ualg.pt/~jdias/GESTLIT/papers/06_%20Bernardo.pdf> .

BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1657:23–32. doi:10.1016/j.bbabbio.2004.

BLUMWALD E, WOLOSIN JM, PACKER L (1984) Na⁺/H⁺ exchange in the cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Biochem Biophys Res Commun* 22:452–459. doi:10.1016/0006-291X(84)90497-2

BONGIOVAN, N., POPOVICH, C., MARTÍNEZ, A. M., FREIJE, H., CONSTENIA, D., E LEONARDI, P. 2013. In vivo measurements to estimate culture status and eutral lipid accumulation in *Nannochloropsis oculata* CCLA 978: implications for biodiesel oil studies. *Algological Studies* 142 (2013), p. 3–16

BOUSSIBA S, VONSHAK A, COHEN Z, AVISSAR Y, RICHMOND A (1987) Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12:37–47

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. JONES, R.L. (eds). *Biochemistry & Molecular*

BRAND, L. E., 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, 18:543-556.

CALBET, A., BERTOS, M., FUENTES-GRÜNEWALD, C., ALACID, E., FIGUEROA, R., RENOM, B. AND GARCÉS, E. Intraspecific variability in *Karlodinium veneficum*: Growth rates, mixotrophy, and lipid composition. *Harmful Algae* 10, 654–667. 2011.

CALJON, A.G. 1983. Brackish-water phytoplankton of the Flemish lowland. *Developments in Hydrobiology*, 48: 1-272.

CALJON, A. 1987. Phytoplankton of a recently landlocked brackish-water of a Lake Tanganika: a systematic account. *Hydrobiologia*, 153: 31-54, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00005503>

CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Compreendendo o estresse abiótico in vitro. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. Recife. MXM Gráfica e Editora. 2005. Parte.V, cap.29, p.325-335.

CARVALHO, A.P., PONTES, I., GASPAR, H., MALCATA, F.X., 2006. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 358–366

CARVALHO AP, MONTEIRO CM, MALCATA FX (2009) Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J Appl Phycol* 21:543–552

CASTRO, N. O. & MOSER, G. A. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais *Oecologia Australis* 16(2): 235-264, Junho 2012 <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2012.1602.05>

CEMBELLA A.D. 2003 Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia* 42, 420–44

CHANGPENG, Y., HEPING, Y, YUFENG, Y. 2014. Allelopathic inhibition of photosynthesis in the red tide-causing marine alga, *Scrippsiella trochoidea* (Pyrrophyta), by the dried macroalga, *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Sea Research* 90 (2014) 10–15

CHANGPENG, Y., ZHANG M., YUFENG, Y. 2013. Inhibition of photosynthesis in the microalga *Chaetoceros curvisetus* (Bacillariophyta) by macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. Vol. 31 No. 6, P. 1174-1180, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-013-2093-3>

CHIANG, I.-Z.; WUANG, W.-Y.; WU, J.-T. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, v. 40, p. 474-480, 2004.

- CHIU, S. Y., C. Y. KAO, M. T. TSAI, S. C. ONG, C. H. CHEN, AND C. S. LIN. 2009. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology* 100:833–838.
- COUTTEAU P, CASTELL JD, ACKMAN RG, SORGELOOS P: The use of lipid emulsion as carriers for essential fatty acids in bivalves: a test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J Shellfish Res* 15, 259–264 (1996)
- CREMEN MCM, MARTINEZ-GOSS MR, CORRE VL, AZANZA RV (2007) Phytoplankton bloom in commercial shrimp ponds using greenwater technology. *J Appl Phycol* 19(6):615–624
- DESORTOVÁ, B. (1981) Relationship between chlorophyll a concentration and phytoplankton biomass in several reservoirs in Czechoslovakia. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.*, 66, 153–169.
- DOMINGOS, P.; CARMOUZE, J. . Influence des intrusions de masses d'air polaires sur le phytoplancton et le metabolisme d'une lagune tropicale. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale*, Paris, France, v. 24, n.4, p. 257-267, 1993.
- DOMINGOS, P., GOMORA, G.A., SAMPAIO, G.F., SOARES, M.F. & SOARES, F.F.L. 2012. Eventos de mortandade de peixes associados a florações fitoplanctônicas na lagoa Rodrigo de Freitas: Programa de 10 anos de monitoramento. *Oecologia Australis* 16(3): 441-466.
- DOMINGOS, P.; MENEZES, M. (1998) Taxonomic remarks of planktonic phytoflagellates in a hypertrophic tropical lagoon (Brazil). *Hydrobiologia*, v.369/37, p.297-313, 1998.
- ESTEVEZ, F.A. & FURTADO, A.L.S. 2011, *Fundamentos de Limnologia*. 3ª Ed. Editora Interciência, Rio de Janeiro, RJ. Cap. 5: 103p, 10:167-172p, 21:375-443 e 27:625-655p.
- ESTEVEZ, F. A. (Ed.). *Ecologia de lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*. UFRJ, Rio de Janeiro, RJ. 464p.
- EINHLLING, F. A. 1995. Allelopathy: Current Status e Future Goals. In: *Allelopathy: organisms, processes and applications*. Einhlling, F. A. Inderjit & Dakshini, K. M. M. (Eds.) American Chemical Society, 1-24.
- FALKOWSKI, P. G. The role of phytoplankton photosynthesis in globalbiogeochemical. *Photosynthesis Research* v. 39, n. pp. 235-258, 1994.
- FALKOWSKI, P.G. & RAVEN, J.A. *Aquatic Photosynthesis*. 2nd ed., PrincetonUniversity Press, United Kigdom. 2007, 484p.
- FATMA, T., KHAN, M.A., CHOUDHARY, M., 2007. Impact of environmental pollution on cyanobacterial proline content. *J. Appl. Phycol.* 19, 625e629.

FAWLEY MW, DOUGLAS CA, STEWART KD, MATTOX KR (1990) Light-harvesting pigment-protein complexes of the Ulvophyceae (Chlorophyta): characterization and phylogenetic significance. *J Phycol* 26: 186—195

FAWLEY MW, FAWLEY KP (2004) A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *J Phycol* 40: 223—225

FAWLEY MW, FAWLEY KP (2005) Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia* 44: 35—48

FAWLEY MW, FAWLEY KP, BUCHHEIM MA (2004) Molecular diversity among communities of freshwater microchlorophytes. *Microb Ecol* 48: 489—499

FAWLEY MW, QIN M, YUN Y (1999) The relationship between *Pseudosourfieldia marina* and *Pycnococcus provasolii* (Prasinophyceae, Chlorophyta): evidence

FIETZ A, BLEIß W, HEPPELE D, KOPPITZ H, KRIENITZ L, NICKLISCH A (2005) First record of *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton from Lake Baikal. *J Phycol* 41: 780—790

FIGUEREDO, C. C., GIANI, A.; BIRD, D. 2007. Does allelopathy contribute to *Cylindropermopsis raciborskii* bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology*, v. 43, p. 256-265, 2007.

FISTAROL, G. O., LEGRAND, C. & GRANE´LI, E. 2003. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255:115–25.

FISTAROL, G.O. *et al.* Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 35, p. 45-56, 2004.

FLYNN, K.J. 2008. Attack is not the best form of defense: lessons from harmful algal bloom dynamics. *Harmful Algae*, 8: 129-139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.007>

FULGENCIO, Paulo César. Glossário Vade Mecum: Administração Pública, Ciências Contábeis, Direito, Economia e Meio Ambiente. Rio de Janeiro: Mauad, 2007.

GARCÉS, E.; MASÓ, M.; VILA, M. & CAMP, J. 2000. HABs events in the Mediterranean Sea: Are they increasing? A case study the last decade in the NW Mediterranean and the genus *Alexandrium*. *Harmful Algal News*, 20: 1-11.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.

GRANÉLI, E. & JOHANSSON, N. 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. *Harmful Algae*, 2: 135-145, [http://dx.doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00006-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00006-4)

GRANÉLI E, HANSEN P.J. 2006. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In: Granéli E, Turner TJ (eds.) *Ecology of Harmful Algae*. Springer- Verlag, Berlin, 189–201

GRANÉLI, E.; WEBERG, M. & SALOMON, P.S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8: 94-102, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.011>

GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 22, p. 313-339, 2003.

GROSS, A., HABERKORN, H., GOÏC, N. HÉGARET H., SOUDANT, P. *et al.* 2011. A New Insight into Allelopathic Effects of *Alexandrium minutum* on Photosynthesis and Respiration of the Diatom *Chaetoceros neogracile* Revealed by Photosynthetic-performance Analysis and Flow Cytometry *Microb Ecol* (2011) 62:919–930 DOI 10.1007/s00248-011-9889-5

GUIHÉNEUF F, FOUQUERAY M, MIMOUNI V, ULMANN L, JACQUETTE B, TREMBLIN G (2010) Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J Appl Phycol* 22:629–638

GUIHÉNEUF F, ULMANN L, TREMBLIN G, MIMOUNI V (2011) Lightdependent utilization of two radiolabelled carbon sources, sodium bicarbonate and sodium acetate, and relationships with long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in the microalga *Pavlova lutheri* (Haptophyta). *Eur J Phycol* 46(2):143–152

GUSCHINA IA, HARWOOD JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res* 45:160–186

HAGEMANN M, ERDMANN N (1997) Environmental stresses. In: Rai AK (ed) *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 156–221

HIBBERD, D.J., 1981. Notes to the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Estigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym *Xanthophyceae*). *Botanical J. Linnean Society*, 82:3-119

JANSEN, I.; KARDINNAL, W. E. A.; MEIMA, M.; FASTNER, J.; VISSER, P. M. & ZWART, G. 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3979–387.

JEFFREY, S.W., MANTOURA, R.F.C. & WRIGHT, S. W. (eds) (1997) *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. Unesco, Paris.

- KANEKO T, SATO S, KOTANI H, TANAKA A, ASAMIZU E, NAKAMURA Y *et al.* (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3:109–136.
doi:10.1093/dnares/3.3.109
- KANESAKI Y, SUZUKI I, ALLAKHVERDIEV SI, MIKAMI K, MURATA N (2002) Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem*
- KARLSON B, POTTER D, KUYLENSTIERNA M, ANDERSEN RA (1996) Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35: 253—260
- KEATING, K.T. 1977. Allelopathic influence on blue-green algae bloom sequence in a eutrophic lake. *Science*, v. 196, p. 885-887, 1977.
- KEATING, K.T. 1978. Blue-green algae inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure. *Science*, v. 199, p. 971-973, 1978.
- KEES, V. L.; LATASA, M.; ESTRADA, M. Pigment signatures and phylogenetic relationships of the pavlovophyceae (haptophyta) *J. Phycol.* 39, 379–389 (2003)
- KHATOON H, RAHMAN N. A., BANERJEE S., HARUN N., SULEIMAN S. S., ZAKARIA N. H., LANANAN F. (2014), Composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- KHOZIN-GOLDBERG I, BIGOGNO C, SHRESTHA P, COHEN Z (2002) Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae). *J Phycol* 38:991–994
- KJERFVE, B.R. & MAGILL, K.E. 1989. Geographic and hydrodynamic characteristics of shallow coastal lagoons. *Marine Geology*, 88: 187-199,
[http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227\(89\)90097-2](http://dx.doi.org/10.1016/0025-3227(89)90097-2)
- KRIENITZ L, HEPPELLE D, STICH HB, WEILER W (2000) *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39:219—227
- KÖRNER, S. & NICKLISCH, A. 2002. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J. Phycol.* 38:862–71.
- LAWRENCE, E., JACKSON, A.R.W., AND JACKSON, J.M., 1998, Eutrophication, *in* Longman Dictionary of Environmental Science: London, England, Addison Wesley Longman Limited, p. 144-145.

LEÃO, P. N., PEREIRA, A. R., LIU, WT., NG, J., PEVZNER, P. A. *et al.* 2010. Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *PNAS.*, 107 (25): 11183–11188.

LEE, R.E., 1980. *Phicology*. Cambridge University Press, Cambridge, CB 478p.

LEFLAIVE, J., TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*. v. 52, p. 99-214, 2007.

LEGRAND, C.; RENGEFORS, K.; FISTAROL, G. O. & GRANÉLI, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42 (4): 406-419.

LUBIÁN L. M. __, OLIMPIO MONTERO, IGNACIO MORENO-GARRIDO, I. EMMA HUERTAS, CRISTINA SOBRINO, MANUEL GONZ´ALEZ-DEL VALLE & GRISELDA PAR´ES. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable Pigments. *Journal of Applied Phycology* 12: 249–255, 2000.

LEFÈVRE, M. & NISBET, M. 1948. Sur la sécrétion, par certaines espèces d'Algues de substances inhibitrices d'autres espèces d'Algues. *C. R. Acad. Sci.* 226:107–9.

LEFLAIVE, J., TEN-HAGE, L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*. v. 52, p. 99-214, 2007.

LEU, E., KRIEGER-LISZKAY, A., GOUSSIAS, C. & GROSS, E. M. 2002. Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiol.* 130:2011–8.

LEWIS, W. M., Jr. 1986. Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae. *The American naturalist.*, 127 (2): 184-194.

LORET, P., TENGs, T., VILLAREAL, T.A., SINGLER, H., RICHARDSON, B., MCGUIRE, P., MORTON, S., BUSMAN, M. AND CAMPBELL, L. No difference found in ribosomal DNA sequences from physiologically diverse clones of *Karenia brevis* (Dinophyceae) from Gulf of Mexico. *Journ. Plank. Res.* 24. 7, 735-739. 2002.

LUBIÁN LM, ESTABLER R (1982) Comparative study of the pigment composition in several strains of *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) during its growth in culture. *Inv. Pesq.* 46: 379–389.

MÄLKKI, P. 1999. Brackish water ecosystems: introduction. Pp. 1-2. In: P. Mälkki (ed.). *Proceedings of International Council for the Exploration of the Sea (ICES) Symposium*. Helsinki, Finland. *ICES Journal Marine of Science*, 56 Supplement

MASÓ, M. & GARCÉS, E. 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*, 53: 620-630, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.006>

- MARINHO, M.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. 2007. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquat Ecol* DOI 10.1007/s10452-007-9118-y
- MENDES, L. B. B. & VERMELHO, A.AB. 2013. Biotechnology for Biofuels 2013, 6:152 <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/152>
- MENEZES, M., BRANCO, S., GUIMARÃES, R.R., SOUSA, V.L.M., SOUZA, C.A., SILVA, W.J., DOMINGOS, P. & GÔMORA, G. 2012. Composição florística de cianobactérias do canal do Piraquê, Lagoa Rodrigo de Freitas, sudeste do Brasil. *Oecologia Australis* 16(3): 421-440.
- MOESTRUP Ø (1994) Economic Aspects: "Blooms", Nuisance Species, and Toxins. In Green JC, Leadbeater BSC (eds) *The Haptophyte Algae. The Systematics Association Special Volume 51*. Oxford University Press, Oxford, pp 265–285
- MOHAMED, Z. A. Allelopathic activity of *Spirogyra* sp.: stimulating bloom formation and toxin production by *Oscillatoria agardhii* in some irrigation canals, Egypt. *Journal of Plankton Research*. v. 24, p. 137–141, 2002.
- MOHANTY P, ALLAKHVERDIEV SI, MURATA N (2007) Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and the repair of photosystem II. *Photosynth Res* 94:217–224. doi:10.1007/s11120-007-9184-y
- MONTAGNES, D.J.S., BERGES, J.A., HARRISON, P.J. e TAYLOR, F.J.R. (1994) Estimating carbon, nitrogen, protein and chlorophyll *a* from volume in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1044–1060.
- MULDERIJ, G., SMOLDERS, A. J. P., DONK, E. V. Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biology*. v. 51, p. 554-561, 2006.
- MURATA N, TAKAHASHI S, NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1767:414–421. doi:10.1016/j.bbabi.2006.11.019
- NAKAMURA T, YUDA R, UNEMOTO T, BAKKER EP (1998) KtrAB, a new type of bacterial K⁺ -uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *JBacteriol* 180:3491–3494
- NILSEN, E.T.; ORCUTT, D.M. *The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors*. New York, John Wiley and Sons, Inc, 1996.
- NISHIYAMA Y, ALLAKHVERDIEV SI, MURATA N (2005) Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. *Photosynth Res* 84:1–7. doi:10.1007/s11120-004-6434-0

- NIXON, S. W. (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* Volume 41, Issue 1, pages 199-219 DOI: 10.1080/00785236.1995.10422044
- OSMOND, C.B.; AUSTIN, M.P.; BERRY, J.A.; BILLINGS, W.D.; BOYER, J.S.; DACEY, J.W.H. Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*, v. 37, p. 38-48, 1987.
- OSTRANDER, E.A., JONG, P.M., RINE, J. AND DUVK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 15; 89 (8): 3419–3423. 1992.
- PAL, D., KHOZIN-GOLDBERG, I., COHEN, Z., & BOUSSIBA, S. 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) 90:1429–1441 DOI 10.1007/s00253-011-3170-1
- PAITHOONRANGSARID K, SHOUMSKAYA MA, KANESAKI Y, SATOH S, TABATA S, LOS DA (2004) Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J Biol Chem* 279:53078–53086. doi:10.1074/jbc.M410162200
- POMEROY L. R., PETER J. leB. WILLIAMS, FAROOQ AZAM , AND JOHN E. HOBIE. 2007 . The Microbial Loop. *Oceanography* Vol. 20, No. 2
- PETRUCCIO, M. M. 1998. Caracterização das lagoas Imboassica, Cabiúnas, Comprida e Carapebus a partir da temperatura, salinidade, condutividade, alcalinidade, O₂ dissolvido, pH, transparência e material em suspensão. Pp. 91-105.
- PRATT, R., DANIELS, T. C., EILER, J. J., GUNNISON, J. B., KUMLER, W. D., ONETO, J. F., SPOEHP, H. A., HARDIN, G. J., MILNER, H. W., SMITH, J. H. C. & STRAIN, H. H. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science* 99:351–2.
- PRATT, D. M. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olithodiscus luteus* in Naragansett Bay and in culture. *Limnology and Oceanography*, v. 11, p. 447-455. 1966.
- PRATT, D. M. 1966. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olithodiscus luteus* in Naragansett Bay and in culture. *Limnology and Oceanography*, v. 11, p. 447-455.
- PRINCE, E.K., MYERS, T.L., KUBANEK, J., 2008. Effects of harmful algal blooms on competitors: allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Limnol. Oceanogr.* 53 (2), 531–541.
- PRITCHARD, D.W. 1967. What is a estuary: physical standpoint. In: *Estuaries*. Pp 3-5. (G.H.Lauff, ed). American Association for the Advancement of Science. Publication 83. Washington DC.

- POWLES SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol* 35:15–44. doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.000311
- PTACNIK, R.; OLLI, K.; LEHTINEN, S.; TAMMINEN, T. & ANDERSEN, T. 2011. Does plankton diversity peak at intermediate salinities? Comment on Telesh *et al.* (2011). *Marine Ecology Progress Series*, 432: 291-292, <http://dx.doi.org/10.3354/meps09216>
- RAINUZZO JR, REITAN KI, OLSEN Y: The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103–115 (1997)
- RAGHOTHAMA, K. G. & KARTHIKEYAN, A.S. (2005) Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, 274 37-49.
- RALPH, P. J. AND. GADEMANN., R. 2005. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity". *Aquatic Botany*, v. 82, n. 3, pp. 222-237.
- RAVEN, H.P, EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal* 6ª edição, Rio de Janeiro – RJ. Editora Guanabara. 2001. 906p.
- REID, D. F. The Role Osmotic Stress (Salinity Shock) in Protecting the Great Lake from Ballast – Associated Aquatic Invaders – Thecnical Report
- RENGEFORS, K. & LEGRAND, C. 2001. Toxicity in *Peridinium aciculiferum*—an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnology and Oceanography*. v. 46, p. 1990-1997, 2001.
- REYNOLDS, CS. *The Ecology of Phytoplankton* , Cambridge University Press, 2006.
- RICE, E. L. 1984. Allelopathy, ed. 2. Academic Press, New York, 1984. 424 p.
- RODOLFI, L., G. C. ZITTELLI, L. BARSANTI, G. ROSATI, AND M. R. TREDICI. 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering* 20:243–248.
- RODOLFI, L., G. C. ZITTELLI, N. BASSI, G. PADOVANI, N. BIONDI, G. BONINI, AND M.R. TREDICI. 2008. Microalgae for oil: Stress selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102:100–112.
- RODOLFI L, CHINI ZITTELLI G, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, TREDICI MR (2009) Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102: 100–112
- ROSMAN, P. C. C., 2012. LIGAÇÃO LAGOA-MAR, UMA NECESSIDADE. *Oecologia Australis* 16(3): 651-693, Setembro 2012
<http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2012.1603.17>

ROY J.S, POULSON-ELLESTAD K.L, SEIG R.D, POULIN R.X, KUBANEK J. 2013. Chemical ecology of the marine plankton. *Nat Prod Rep* 30, 1364–1379

SEDMAK, B. e ELERS`EK, T. 2005. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microb. Ecol.* 50:298–305.

SEN, M.A. T., KOÇER, M. T., 2005. Studies on Growth of Marine Microalgae in Batch Cultures: III *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyta). *Asian Journal of Plants Sciences* 4(6); 642-644

SCHLEGEL, I., DOAN, N. T., CHAZAL, N. DE & SMITH, G. D. 1999. Antibiotic activity of new cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 10:471–9.

SHAH S. M. U., RADZIAH C. C., IBRAHIM S., LATIFF F., OTHMAN M. F., AND ABDULLAH M. A. 2014. Effects of photoperiod, salinity and pH on cell growth and lipid content of *Pavlova lutheri*. *Ann Microbiol* (2014) 64:157–164 DOI 10.1007/s13213-013-0645-6

SHOUMSKAYA MA, PAITHOONRANGSARID K, KANESAKI Y, LOS DA, ZINCHENKO VV, TANTICHAROEN M *et al.* (2005) Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J Biol Chem* 280:21531–21538. doi:10.1074/jbc.M412174200

SIMIONATO, D., MARYSE A.B., ROCCA, N., JOUHET, J., FINAZZI, G., MOROSINOTTO, T. (2013) - The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Journals.ASM.org* Volume 12 Number 5 *Eukaryotic Cell* p. 665–676

SIEBURTH, J. M. 1960. Acrylic acid, an “antibiotic” principle in *Phaeocystis* blooms in Antarctic waters. *Science* 132:676–7.

SJÖQVIST, C.O. AND KREMP, A. Genetic diversity affects ecological performance and stress response of marine diatom populations. *The ISME - International Society for Microbial Ecology*, Journal advance online publication, 1–12. 2016. doi:10.1038/ismej.2016.44

SKOVGAARD, A. & HANSEN, P. J. 2003. Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins. *Limnol. Oceanogr.* 48:1161–6.

SMAYDA, T.J. (1978) From phytoplankters to biomass. In Sournia, A. (ed.), *Phytoplankton Manual*. Unesco, Paris, pp. 273–279

- SMITH, V.H. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 43: 148-153, doi: 10.1139/f86-016
- SOARES, M. F., DOMINGOS, P., SOARES, F. F. L. E TELLES, L. F. R. (2012). 10 Anos de monitoramento da qualidade ambiental das águas da lagoa Rodrigo de Freitas. *Oecologia Australis* 16(3): 581-614, Setembro 2012
<http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2012.1603.15>
- SOLÉ, J.; GARCÍA-LADONA, E.; RUARDIJ, P. & ESTRADA, M. 2005. Modelling allelopathy among marine algae. *Ecological Modelling*, 183: 373-384,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.08.021>
- SOLÉ, J.; GARCÍA-LADONA, E. & ESTRADA, M. 2006. The role of selective predation in harmful algal blooms. *Journal of Marine Systems*, 62: 46-54,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmarsys.2006.04.002>
- SOLOVCHENKO A, KHOZIN-GOLDBERG I, DIDI-COHEN S, COHEN Z, MERZLYAK M (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J Appl Phycol* 20:245–251
- STEPIEN P. e KLOBUS G (2005) Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol Plantarum* 125:31–40
- STEPIEN P, KLOBUS G (2006) Water relations and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. leaves under salt stress. *Biol Plantarum* 50:610–616
- SUDA S, ATSUMI M, MIYASHITA H (2002) Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceânica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41: 273–279
- SUIKKANEN, S., FISTAROL, G. O. & GRANE´LI, E. 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308:85–101.
- SUIKKANEN, S.; FISTAROL, G. O.; GRANÉLI, E. Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community. *Marine Ecology Progress Series*, v. 287, p. 1-9, 2005.
- SUKENIK, A., ESHKOL, R., LIVNE, A., HADAS, O., ROM, M., *et al.* 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism. *Limnol. Oceanogr.*, 47(6): 1656–1663.
- TAKAHASHI S, MURATA N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci* 13:178–182. doi: 0.1016/j.tplants.2008.01.005
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal* 3ª edição, Porto Alegre –RS. Artmed 2004, 722p.

TAYLOR, W. A. (1934). Significance of extreme or intermittent conditions in distribution of species and management of natural resources, with a restatement of Liebig's law of the minimum. *Ecology*, 15: 374-379.

TELESH, I.V.; SCHUBERT, H. & SKARLATO, S.O. 2011. Revisiting Remane's concept: evidence for high plankton diversity and a protistan species maximum in the horohalinicum of the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 421: 1-11
<http://dx.doi.org/10.3354/meps08928>

TILMANN, U., ALPERMANN, T.L., PURIFICAÇÃO, R.C., KROCK, B. AND CEMBELLA, A. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 8, 759-769. 2009.

TOLSTOY, A. (1979) Chlorophyll *a* in relation to phytoplankton volume in some Swedish lakes. *Arch. Hydrobiol.*, 85, 133–151.

TONON T, HARVEY D, LARSON TR, GRAHAM IA (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15–24.

TORGAN, L.C. 1997. Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica na laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil, em um ciclo anual. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 284p.

VARDI, A., SCHATZ, D., BEERI, K., MOTRO, U., SUKENIK, A., LEVINE, A. & KAPLAN, A. 2002. Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake. *Curr. Biol.* 12:1767–72.

VIA-ORDORIKI, L., FASTNER, J., KURMAYER, R. , HISBERGUES M. , DITTMANN, E. , KOMAREK, J. , ERHARD, M. & CHORUS, I. 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27:592–602.

VOLKMAN JK, BROWN MR, DUNSTAN GA, JEFFREY SW (1993) The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. *J Phycol* 29: 69-78 Apt KE, Behrens PW (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* 35: 215—226

VON ELERT, E.; JÜTTNER, F. Factors influencing the allelopathic activity of the planktonic cyanobacterium *Trichormus doliolum*. *Phycologia*, v. 35, p. 68-73, 1996.

VON ELERT, E. & JÜTTNER, F. Phosphorus limitation and not light controls the extracellular release of allelopathic compounds by *Trichormus doliolum* (Cyanobacteria). *Limnology and Oceanography*. v. 42, p. 1796-1802, 1997

VOOREN, G.V., LE GRAND, F., LEGRAND, J., CUINÉ, S., PELTIER, G., E PRUVOST, J. 2012. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology* 124 (2012) 421–432

YAMASAKI† Y., SHUNSAKU MII, TAKASHI M. 2015. Growth inhibition of the haptophyte *Dicranema lutheri* by selfgrowth Inhibitors 63 (3) 209–218

YOSHIDA, M., YOSHIDA, T., TAKASHIMA, Y., KONDO, R. & HIROISHI, S. 2005. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. *Environ. Toxicol.*, 20: 229–234.

WILSON, A. E., SARNELLE, O., NEILAN, B. A., SALMON, T. P., GEHRINGER, M. M., & HAY, M. E. 2005. Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6126–6133.

WILSON, A.E., WILSON, W.A. & HAY, M.E. 2006. Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.*, 72, 7386–7389.

WOLFE, G.V. The chemical defence ecology to marine unicellular plankton: constraints, mechanisms and impacts. *Biological Bulletin*, v. 198, p. 225-244, 2000.

WOOD A.M, EVERROAD RC, WINGARD LM (2005) Chapter 18: Measuring growth rates in microalgal cultures. In: A AR, editor. *Algal culturing techniques*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 269–285.

WU, J. T.; KUO-HUANG, L. L.; LEE, J. Algicidal effect of *Peridinium bipes* on *Microcystis aeruginosa*. *Current Microbiology*, v. 37, p. 257, 261, 1998.

ZHANG, Y., KLAPPER, R., LOHBECK, K.T., BACH, L.T., SCHULZ, K.G., REUSCH, T.B.H. AND RIEBESELL, U. Between- and within-population variations in thermal reaction norms of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Limnol. Oceanogr.*, 59(5), 1570–1580. 2014.

ZHEKISHEVA M, BOUSSIBA S, KHOZIN-GOLDBERG I, ZARKA A, COHEN Z (2002) Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J Phycol* 38:325–331