

Rodrigo Silva Chagas de Oliveira

**EFEITO DO EXSUDATO DE *Scenedesmus obliquus*
(TURPIN) KÜTZING, 1833 (CHLOROPHYCEAE) NO
CRESCIMENTO E EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE
Pseudokirchneriella subcapitata (KORSHIKOV) F.HINDÁK, 1990
(CHLOROPHYCEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do Grau
de Licenciado em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rubi
Rörig
Coorientadora: Bacharela Ana
Gabriela Itokazu Canzian Da Silva

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Oliveira, Rodrigo

Efeito do exsudato de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, 1833 (Chlorophyceae) no crescimento e em parâmetros fotossintéticos de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák, 1990 (Chlorophyceae)/ Rodrigo de Oliveira ; orientador, Leonardo Rubi Rörig ; coorientadora, Ana Gabriela Itokazu Canzian Da Silva . - Florianópolis, SC, 2017.

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. I. Rörig, Leonardo Rubi. II. Itokazu Canzian Da Silva , Ana Gabriela. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Rodrigo Silva Chagas de Oliveira

**EFEITO DO EXSUDATO DE *Scenedesmus obliquus* (TURPIN)
KÜTZING, 1833 (CHLOROPHYCEAE) NO CRESCIMENTO E
EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE *Pseudokirchneriella*
subcapitata (KORSHIKOV) F.HINDÁK, 1990
(CHLOROPHYCEAE)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Licenciado, e aprovado em sua forma final pelo
Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 30 de Janeiro de 2017.

Prof., Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Leonardo Rubi Rörig
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Bacharela Ana Gabriela Itokazu Canzian Da Silva
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. José Bonomi Barufi
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Maria Cecília Miotto
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Luana dos Santos de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa, melhor amiga e futura bióloga Lua Lobo Baptista, por me apoiar, me auxiliar e me fazer companhia até quando tive que fazer experimentos no laboratório sábado à noite. Agradeço aos meus pais, Marcelo Chagas de Oliveira e Denize Maria da Silva Chagas de Oliveira por apoiarem minhas decisões e meus sonhos de biólogo desde criança, dando o carinho e o amor que um filho precisa para poder seguir acreditando em si mesmo. Meu irmão, Gabriel Chagas de Oliveira, merece agradecimentos nesse trabalho pelas vezes que ficamos jogando jogos de computador ou tocando violão/teclado/ukulele, porque sem esses momentos eu não teria cabeça alguma para escrever TCC. Aos meus amigos biólogos e futuros biólogos Andressa de Lima, Gabriel da Silva Pescador, Guilherme Burg Mayer, Nícolas da Rosa e Silva, agradeço pelas conversas, pelos finais de semana na praia, pelas risadas e zoeiras. Agradeço ao meu orientador Leonardo Rubi Rörig e à minha co-orientadora Ana Gabriela Itokazu Canzian Da Silva que disponibilizaram o tempo e paciência para me auxiliar nessa etapa final da minha graduação.

Por fim, agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses seis anos de graduação. Agradeço tanto aos que mantenho contato quanto aos que perdi nas curvas da estrada.

RESUMO

Scenedesmus obliquus é uma microalga verde de distribuição cosmopolita conhecida por ser resistente a variações ambientais, possuir um crescimento robusto, muitas vezes se sobressaindo em relação a outras espécies em experimentos com sistemas de cultivo aberto do tipo rampa e *raceway*. O objetivo deste trabalho foi verificar se essa vantagem sobre outras espécies se deve à atividade alelopática que *S. obliquus* pode estar exercendo no seu meio. Para isso, quatro réplicas de 100 mL e um cultivo de 1,5 L de uma cepa de *S. obliquus* foram mantidos em crescimento em meio Bold's Basal (BBM) ao longo de 44,5 dias. Nesse período, foram analisadas a clorofila-a *in vivo*, a turbidez e a concentração celular em períodos de tempo que variaram entre a cada 24 e a cada 96 horas. Em seguida, o cultivo de 1,5 L foi filtrado em fase de crescimento estacionária tardia gerando aproximadamente 1 L de exsudato. O experimento de toxicidade de exsudato foi montado com quatro réplicas dos tratamentos que consistiram em: (1) exsudato+BBM (com metade da concentração dos nutrientes) na proporção de 1:1; e (2) exsudato (puro). Como controle, foi utilizado o BBM com metade dos nutrientes. A alga teste utilizada foi a microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. Os dados foram coletados no instante 0 e a cada 24 horas, durante 4 dias. Os dados analisados foram clorofila-a *in vivo*, turbidez, concentração celular e rendimento quântico efetivo (Φ). No último dia de experimento uma curva de luz foi elaborada. Com os dados obtidos da curva, foram calculados os valores de rendimentos quânticos máximo (F_v/F_m) e efetivo, além da dissipação de energia não-fotoquímica não-regulada; a dissipação de energia não-fotoquímica e regulada. Com o experimento da curva de crescimento, se constatou que o crescimento de *S. obliquus* se comporta de forma cíclica: com fases de crescimento exponencial (log) e estacionárias que se repetiam ao longo dos dias. Os resultados do experimento de toxicidade mostraram que a presença do exsudato afetou positivamente o crescimento da alga teste ao longo dos quatro dias de experimento. A presença de exsudato também possui um efeito positivo no rendimento quântico efetivo da alga teste. Quanto à curva de luz, o controle demonstrou uma integral definida de F_v/F_m menor que a dos outros dois tratamentos. Conclui-se que provavelmente o exsudato possuía mais nutrientes do que se esperava, o que resultou em uma resposta em eficiência fotossintética e crescimento celular maior da alga teste quando na presença do exsudato do que no controle.

Palavras-chave: *Alelopátia. Scenedesmus. Exsudato.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Variação da concentração celular (células/mL) de <i>Scenedesmus obliquus</i> ao longo de 44,5 dias – Cultivo de 150 mL.....	21
Figura 2 – Detalhamento da variação da concentração celular (células/mL) nos primeiros 16,5 dias de cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> – Cultivo de 150 ml.....	22
Figura 3 – Variação da concentração celular (células/mL) de <i>Scenedesmus obliquus</i> ao longo de 44,5 dias – Cultivo de 1,5 L.....	23
Figura 4 – Detalhamento da variação da concentração celular (células/mL) nos primeiros 19,5 dias de cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> – Cultivo de 1,5 L.....	23
Figura 5 – Taxa de crescimento diário de <i>Scenedesmus obliquus</i> – Cultivo de 150 mL.....	25
Figura 6 – Taxa de crescimento diário de <i>Scenedesmus obliquus</i> – Cultivo de 1,5 L.....	25
Figura 7 – Variação de Clorofila-a in vivo ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i>	26
Figura 8 – Variação de turbidez ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i>	27
Figura 9 – Regressão entre clorofila-a in vivo e células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i> – cultivo de 150 mL.....	28
Figura 10 – Regressão entre clorofila-a in vivo e células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i> – cultivo de 1,5 L.....	28
Figura 11 – Regressão Turbidez e Células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i> – cultivo de 150 mL.....	29
Figura 12 – Regressão Turbidez e Células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo <i>Scenedesmus obliquus</i> – cultivo de 1,5 L.....	29

Figura 13 – Concentração celular dos cultivos de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ao longo de 4 dias nos diferentes tratamentos	31
Figura 14 – Clorofila-a in vivo dos cultivos de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ao longo de quatro dias, nos diferentes tratamentos	32
Figura 15 – Turbidez dos cultivos de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ao longo de quatro dias nos diferentes tratamentos.....	33
Figura 16 – Variações do Rendimento Quântico Efetivo dos cultivos de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ao longo do tempo (A - médias de cada tratamento) e entre cada tratamento (B – médias de cada tempo).....	34
Figura 17 - Dissipação de energia dos cultivos de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> em cada tratamento no quarto (último) dia de experimento	35
Figura 18 – Valor do rendimento quântico máximo (Fv/Fm) em cada tratamento (A). Relação da integral definida do rendimento quântico efetivo (ΦII), dissipação de energia não-fotoquímica e não-regulada (ϕNO); dissipação de energia não-fotoquímica e regulada (ϕNPQ) com cada tratamentos BBM (B, C e D, respectivamente)	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 CEPA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	16
2.2 MEDIÇÃO DE TURBIDEZ, CLOROFILA-A <i>IN VIVO</i> E CONTAGEM CELULAR.....	16
2.3 EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO	16
2.4 EXPERIMENTO DE TOXICIDADE DO EXSUDATO	17
2.5 FLUORIMETRIA DE PULSO DE AMPLITUDE MODULADA – PAM.....	18
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO	21
3.2 EXPERIMENTO DE TOXICIDADE DO EXSUDATO	30
3.2.1 Medidas Ao Longo do Experimento	30
3.2.2 Medidas da Curva de Luz.....	34
4. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE A	43

1. INTRODUÇÃO

O fitoplâncton é uma categoria ecológica que compreende seres vivos fotossintetizantes com capacidade de se manter em suspensão na coluna d'água, porém sem capacidade (ou com deficiência) de locomoção nessa coluna, sendo quase sempre microscópicos (LOURENÇO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2015). Esse fitoplâncton pode possuir uma grande diversidade e abundância de algas. As espécies que compõem o fitoplâncton estão entre os organismos mais abundantes do planeta (HORNE, 1994).

Entretanto, essa diversidade do fitoplâncton está sujeita a variações ao longo do tempo dependendo de diversos fatores bióticos e abióticos como turbulência (RODRIGUES, E. H. C. *et al.*, 2015), predação (LYNCH; SHAPIRO, 1981) e disponibilidade de nutrientes (MIYAZAKI; TAKEYAA; TOGASHI, 2000; LEGRAND *et al.*, 2003). A disponibilidade de nutrientes ou outros recursos atua gerando uma competição entre as espécies. Assim, em ambientes onde recursos como nitrogênio e luz são limitantes, essa competição pode acarretar na diminuição de uma população e até, em casos extremos, na sua extinção local, alterando a composição do fitoplâncton.

O fitoplâncton é a base do fluxo de carbono no ecossistema aquático, já que o dióxido de carbono é fixado pelo processo de fotossíntese seguindo na teia trófica (CASTRO; MOSER, 2012). Assim, como diz LEGRAND *et al.* (2003), a composição de espécie e a biomassa do fitoplâncton são parâmetros fundamentais na ecologia da teia alimentar de um ecossistema. Dessa forma, compreender as interações no nível do fitoplâncton ajuda a entender todo o ecossistema que ele faz parte.

No fitoplâncton, um fenômeno que pode ser considerado uma estratégia competitiva seria a produção e liberação por determinadas espécies de substâncias que diminuem o crescimento de outras espécies possíveis competidoras (LEGRAND *et al.*, 2003; GRANÉLI; SALOMON; FISTAROL, 2008). Esse fenômeno é chamado de alelopatia.

O termo alelopatia foi cunhado por Molisch (1973), fisiologista botânico austríaco que utilizou as palavras gregas “*allelon*”, que significa “mútuo”, e “*pathos*” que pode ser traduzido para “dano”, para descrever o efeito que uma planta pode causar em outra, no caso do trabalho de Molisch, foi o efeito do etileno na colheita de frutos (INDERJIT; DUKE, 2003). Foi só em 1996 que a Sociedade

Internacional de Alelopatia alterou o conceito de alelopatia para caracterizá-lo como qualquer processo que envolva metabólitos secundários produzidos não só por plantas, mas por algas, bactérias e fungos, que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos ou agrícolas (LEGRAND *et al.*, 2003). Em outras palavras, o conceito abrange efeitos positivos e negativos, mas apesar de alguns autores levarem em consideração os efeitos positivos (GRANELI; SALOMON; FISTAROL, 2008; LORENZO; GONZÁLEZ, 2010), outros autores consideram apenas as influências negativas como alelopáticas (LEGRAND *et al.*, 2003; MEINERS *et al.*, 2013).

A alelopatia em algas já é conhecida desde antes dos anos 20 por Harder (1917) que percebeu autoinibição em culturas antigas de *Nostoc punctiforme* (Kutz.) Hariot (WOLFE; RICE, 1979; INDERJIT; DAKSHINI, 1994). Segundo Inderjit e Dakshini (1994), os químicos alelopáticos liberados por algas podem operar de quatro formas: (1) afetando o crescimento de outra alga (LEGRAND *et al.*, 2003), (2) inibindo o crescimento dela mesma (PRATT; FONG, 1940), (3) influenciando o crescimento de outros microorganismos (CHETSUMON *et al.*, 1998), e (4) afetando o crescimento de plantas derivadas (GLEASON; CASE, 1986). Já foi detectada alelopatia em várias espécies de cianobactérias (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007), dinoflagelados (PRINCE *et al.*, 2008), diatomáceas (XU *et al.*, 2015) e clorofíceas (LEFÈVRE; NISBET, 1948 *apud* LEGRAND *et al.*, 2003; JORGENSEN, 1962 *apud* LEGRAND *et al.*, 2003).

O gênero *Scenedesmus* Meyen (1829) compreende algas verdes coloniais fitoplanctônicas de águas continentais, amplamente distribuídas e termos latitudinais e fisiográficos por todo mundo em diversos climas (GUIRY; GUIRY, 2016). Esse gênero é definido morfológicamente como células elípticas ou fusiformes agrupadas em cenóbio formado por 2, 4 ou 8 células, contudo, células isoladas também são comuns (AN; FRIEDEL; HEGEWALD, 1999). Porém, a formação de colônias não está apenas vinculada às informações genéticas, mas também competição e predação, como foi mostrado em ZHU *et al.* (2015), onde há uma maior tendência a formação de colônias na presença de metabólitos de predadores zooplanctônicos, como resposta de defesa. Este é um gênero de alga importante, pois além da grande amplitude de locais onde se pode encontrá-lo, com frequência constitui parte dominante na biomassa do fitoplâncton de um ecossistema (AN; FRIEDEL; HEGEWALD, 1999).

A espécie *Scenedesmus obliquus* segue a mesma distribuição ampla do seu gênero, estando presente em quase todos os continentes e em diversos climas. Essa espécie é cultivada pelo Laboratório de Cultivo de Algas da UFSC (LCA - UFSC) para experimentos de avaliação da eficiência de sistemas de cultivo, já que é robusta em termos de crescimento e resistência a variações ambientais e contaminação. Em experimentos com sistemas de cultivo aberto do tipo rampa e *raceway*, a espécie *S. obliquus* naturalmente se tornava dominante (Prof. Dr. Roberto Bianchini Demer, LCA – UFSC, comunicação pessoal).

O presente trabalho tem como objetivo verificar se a espécie *Scenedesmus obliquus* exerce atividade alelopática no seu meio, dessa forma, interferindo no crescimento e no metabolismo de outras algas. Para isso se utilizou a espécie *Pseudokirchmeriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák como teste. A alga verde *P. subcapitata* foi escolhida por ser uma espécie padrão utilizada em testes de toxicidade recomendados por instituições internacionais como a USEPA (United States Environmental Protection Agency) e a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) (BRITO, 2011).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEPA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de *Scenedesmus obliquus* utilizada nesse trabalho foi isolada e cedida pelo Laboratório de Cultivo de Algas (LCA - UFSC), crescendo em meio de cultura IMR. Essa cepa passou por um período de aclimação ao meio de cultura utilizado no Laboratório de Ficologia (LAFIC), o Bold's Basal Medium (BBM) (ANDERSEN, 2005) e às condições da sala de cultivo. A sala de cultivo de microalgas do LAFIC possui temperatura controlada de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. A cepa foi mantida em frascos erlenmeyer de 125 mL, com volume de cultivo de 100 ml sob as condições já mencionadas pelo período de um mês para aclimação.

2.2 MEDIÇÃO DE TURBIDEZ, CLOROFILA-A *IN VIVO* E CONTAGEM CELULAR

Essas variáveis foram medidas para estimar a biomassa e o crescimento celular da alga nos diferentes tratamentos. As variáveis foram medidas a partir de coletas que consistiam em: retirar 3 mL de cada cultivo para as medições de clorofila-a *in vivo* e turbidez com o fluorímetro Trilogy Laboratory Fluorometer (Turner Designs); e fixar esses 3 mL de cultivo com lugol para contagem celular com Câmara de Neubauer.

2.3 EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO

Após o período de aclimação, foram feitas quatro réplicas de 150 mL de cultivo em erlenmeyers de 250 mL e um cultivo de 1,5 L em uma garrafa de vidro graduada de 5 L. Esses frascos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e luz citadas acima. O cultivo de 1,5 L foi aerado continuamente durante o experimento, enquanto as réplicas de 150 mL foram agitadas manualmente uma vez por dia. Foram feitas coletas de dados inicialmente a cada 24 horas, aumentando o tempo até o máximo de 96 horas entre uma coleta e outra, totalizando 21 coletas ao longo de 44 dias. Os parâmetros analisados foram: contagem celular, turbidez, clorofila-a *in vivo*, segundo metodologia descrita no item 2.2. As coletas de dados se prolongaram até a fase estacionária tardia de crescimento.

Os dados do cultivo de 150 mL foram analisados em 4 réplicas verdadeiras, o que possibilita a análise de variância. Assim, em relação ao cultivo de 150 mL, foram calculados os valores de desvio padrão para os dados de concentração celular, turbidez e clorofila-a *in vivo*. Além disso, para entender melhor o comportamento do crescimento dos dois cultivos ao longo dos 44 dias foram calculados as taxas de crescimento entre cada ponto sucessivo de coleta através da Equação 1, onde: cel_f e cel_i correspondem à concentração de células por mL de cultivo final e inicial, respectivamente; e " $T_f - T_i$ " à variação de tempo em dias.

$$\mu = \left(\frac{\ln cel_f - \ln cel_i}{T_f - T_i} \right) \quad (1)$$

Adicionalmente, foi gerado o tempo de duplicação populacional dos cultivos (TD), dado pela equação 2, onde μ_{exp} é a taxa de crescimento exponencial.

$$TD = \frac{\ln 2}{\mu_{exp}} \quad (2)$$

Os dados de clorofila-a *in vivo* e turbidez foram individualmente relacionados com a concentração celular por meio de regressão linear, calculando-se o valor de R^2 com o programa Microsoft Office Excel para saber se há uma relação entre essas variáveis (clorofila-a *in vivo* e concentração celular; turbidez e concentração celular).

2.4 EXPERIMENTO DE TOXICIDADE DO EXSUDATO

Após obter os dados sobre o crescimento de *S. obliquus*, o cultivo de 1,5 L foi filtrado com filtro GF/F (0,7 μm de porosidade) resultando em aproximadamente 1 L de filtrado. Foi optado por se utilizar um cultivo em fase estacionária de crescimento, pois foi assumido que nesse estágio a alga já liberou diversos metabólitos diferentes que estariam acumulados no meio, podendo o possível composto alelopático estar entre eles.

Esse filtrado, considerado como exsudato do cultivo, foi utilizado para dois tratamentos: (1) o exsudato puro; (2) o exsudato diluído na proporção 1:1 no meio BBM com metade dos nutrientes (BBM). Como controle, se utilizou o meio BBM com metade dos

nutrientes (sem exsudato). Assim, foram inoculados 65 mL de cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata* em crescimento exponencial sobre 85 mL de cada um dos 3 tratamentos (incluindo o controle) em frascos erlenmayer boca-larga de 250 mL, resultando em um volume de 150 mL de cultivo.

O experimento foi montado dessa forma, pois foi tomado como premissa que o exsudato puro e o meio BBM sem diluição possuem uma concentração de nutrientes diferentes. Assim, se o meio BBM sem diluição fosse usado como controle, *P. subcapitata* poderia crescer mais nesse meio simplesmente pelo fato de haver mais nutrientes nele. Tal condição poderia mascarar algum efeito tóxico do exsudato. A opção de fazer um tratamento com BBM adicionado ao exsudato foi uma forma de produzir uma concentração de nutrientes ainda mais próxima da situação do controle.

O experimento foi mantido sob 24 horas de luz por dia na sala de cultivo por três dias. As variáveis foram medidas no instante que o experimento foi montado (dia 0), e a cada 24 horas. As variáveis medidas foram: concentração celular, clorofila-a *in vivo*, turbidez e rendimento quântico efetivo (ϕ II). A turbidez, a clorofila-a *in vivo* e a concentração celular, foram obtidas como especificado na seção 2.2. O ϕ II foi obtido por fluorimetria de pulso de amplitude modulada.

2.5 FLUORIMETRIA DE PULSO DE AMPLITUDE MODULADA – PAM

A medição de fluorescência por um fluorímetro de pulso de amplitude modulada (PAM) fornece diversos parâmetros que podem caracterizar o estado do metabolismo fotossintético (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007). A utilização do rendimento quântico do fotossistema II (FSII) é uma estratégia na análise biológica já que esse fator indica a capacidade da alga de converter energia luminosa em energia química (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002). Dessa forma, o PAM foi utilizado no presente estudo para medição de diversos rendimentos quânticos.

Cada amostra permaneceu um minuto sob condição de luz actínica com radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $50 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Após esse período, foi aplicado por 0,8 segundos um intenso pulso de saturação com PAR de $172 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$. Durante o pulso de saturação, o FSII é fechado e qualquer energia extra

capturada por esse sistema não poderá ser usada no processo fotoquímico, sendo emitido como fluorescência (F'_m). Assim, F'_m representa o valor de fluorescência máxima obtida em um fotossistema que, antes do pulso de saturação, estava parcialmente aberto (sob a condição de luz actínica). O valor de ϕ_{II} foi calculado a partir dos valores de fluorescência obtidos durante o período de luz actínica (F) e durante o pulso de saturação (F'_m) pela Equação 3 (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008).

$$\phi_{II} = \frac{F'_m - F}{F'_m} \quad (3)$$

No último dia de experimento, uma curva de luz foi feita. A curva de luz foi o processo de expor a amostra a nove ciclos. Cada ciclo consistiu em emitir na amostra: 20 segundos de luz actínica, e ao fim desse período, um pulso de saturação (por 0,8 segundos). No primeiro ciclo, o valor do PAR foi 0, ou seja, não houve emissão de luz actínica, porém a cada ciclo, o PAR da luz actínica foi aumentado seguindo os seguintes valores: 0, 22, 34, 50, 76, 113, 172, 258, 367.

Antes do início da curva de luz, as amostras foram deixadas 10 minutos no escuro para que o FSII se abra totalmente fazendo com que quando o primeiro pulso de saturação seja aplicado, o valor da fluorescência máxima (F_m) possa ser obtido. Ao se calcular o rendimento quântico nesse ponto com a equação 3, se tem o rendimento quântico máximo (F_v/F_m). A fluorescência (F) foi obtida durante os períodos de luz actínica. Durante os pulsos de saturação (com exceção do primeiro), o valor de fluorescência obtido é o F'_m .

Com os valores de F , F_m e F'_m , foram calculados o rendimento quântico efetivo (ϕ_{II}); a dissipação de energia não-fotoquímica e não-regulada (ϕ_{NO}); e dissipação de energia não-fotoquímica e regulada (ϕ_{NPQ}). O valor de ϕ_{NO} se refere à fração de energia que é passivamente dissipada como calor e fluorescência (principalmente pelo fechamento dos centros de reação do FSII), enquanto o valor de ϕ_{NPQ} corresponde à fração de energia dissipada na forma de calor por meio do regulado mecanismo não-fotoquímico fotoprotetor (SCHERNER, F.; BONOMI BARUFI; HORTA, 2012). Para o cálculo desses parâmetros de dissipação (ϕ_{NO} e ϕ_{NPQ}), foram utilizadas as Equações 4 e 5 (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008). Assim, com os valores dos rendimentos quânticos e dissipações de energia, foi montado um único gráfico de dispersão de energia para todos os tratamentos. Para cada

variável, a integral definida foi calculada utilizando a regra do trapézio (SCHERNER, FERNANDO *et al.*, 2013).

$$\varphi_{NO} = \frac{F}{F_m} \quad (4)$$

$$\varphi_{NPQ} = \frac{F}{F'_m} - \frac{F}{F_m} \quad (5)$$

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram calculadas as médias entre as réplicas (quando presentes) e, com os valores de média e variância, foi testada a homogeneidade das variâncias para cada variável. Após comprovada a homogeneidade, os dados foram testados via ANOVA. O teste *post-hoc* de comparação múltipla de Tukey foi aplicado com o objetivo de saber se os valores de cada variável dependente são estatisticamente diferentes entre si.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO

Observando as Figura 1 e 3, nota-se que o crescimento de *S. obliquus* parece atingir, pelo menos, três fases de crescimento mais elevado seguidos de estabilização no crescimento. Assim, para entender o perfil de crescimento da alga, apenas a primeira fase de crescimento elevado foi considerada como fase log.

A Figura 1 mostra como o cultivo de *Scenedesmus obliquus* se comportou ao longo de 44 dias, a partir das médias das concentrações celulares das quatro réplicas de 150 mL. Com o detalhamento do crescimento nos primeiros 16,5 dias (Figura 2) foi possível determinar que a fase lag de crescimento ocorre do dia 0 ao dia 3,5, seguida pela fase log que compreende o intervalo de tempo entre os dias 3,5 e 12,5, que, por sua vez, é seguida pela fase estacionária entre os dias 12,5 e 16,5.

Somente após mais de 40 dias de crescimento foi possível notar alguma queda em número de células, porém dado o desvio padrão, podemos considerar que a curva estava estabilizada nesse ponto, caracterizando apenas mais uma fase estacionária tardia. É possível ver na Figura 1 que o ponto máximo de concentração celular foi pouco maior que 4×10^7 células/mL.

Figura 1 – Variação da concentração celular (células/mL) de *Scenedesmus obliquus* ao longo de 44,5 dias – Cultivo de 150 mL.

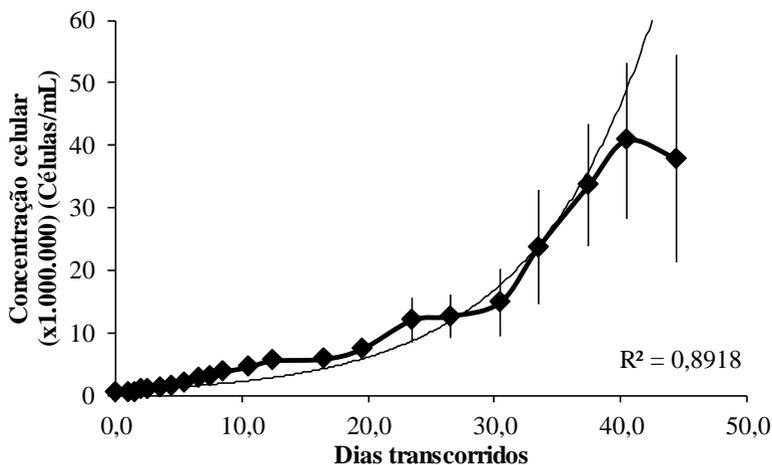
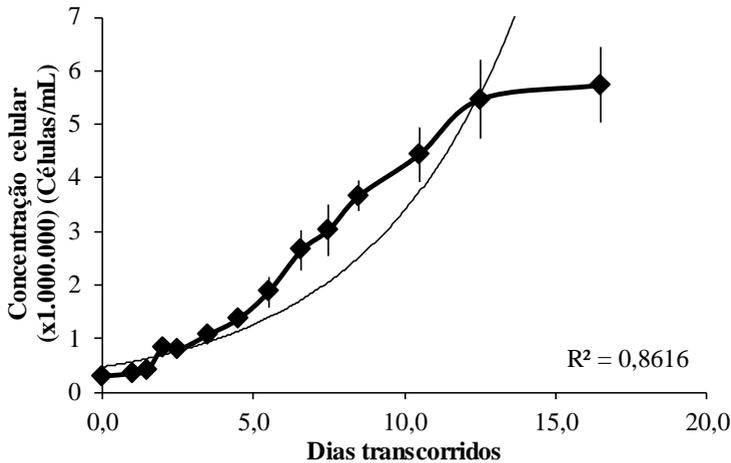


Figura 2 – Detalhamento da variação da concentração celular (células/mL) nos primeiros 16,5 dias de cultivo de *Scenedesmus obliquus* – Cultivo de 150 mL.



Na Figura 3, os dados de crescimento foram retirados do cultivo de 1,5 L de *S. obliquus*. O fato de não haver réplicas impossibilita a geração de desvio padrão. Na Figura 4 podemos analisar o detalhamento da variação da concentração celular nos primeiros 19,5 dias. Assim, constata-se que a fase a lag teve duração de 3,5 dias. A fase log seguiu do fim da fase lag ao dia 16,5. Apesar disso, pode-se identificar também um momento de diminuição na concentração de células, semelhante ao do cultivo de 150 mL, o que pode ser interpretada também apenas como outra fase estacionária tardia. Essa diminuição se dá antes do dia 40 e a partir de uma concentração bem maior, sendo o ponto máximo de concentração celular aproximadamente 6×10^7 células/mL. Podemos associar a concentração máxima maior do cultivo 1,5 L ao fato do cultivo de 1,5 L ter sido aerado, havendo maior entrada de CO_2 no sistema e aumentando a área de troca gasosa do sistema, possibilitando uma maior eficiência na fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

Figura 3 – Variação da concentração celular (células/mL) de *Scenedesmus obliquus* ao longo de 44,5 dias – Cultivo de 1,5 L.

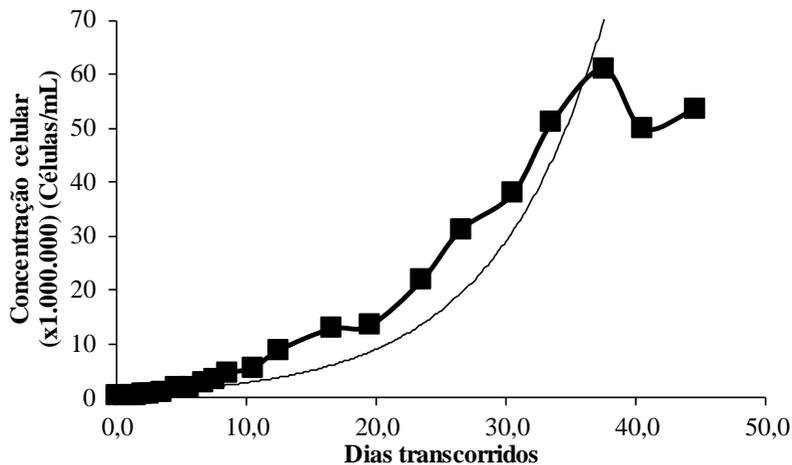
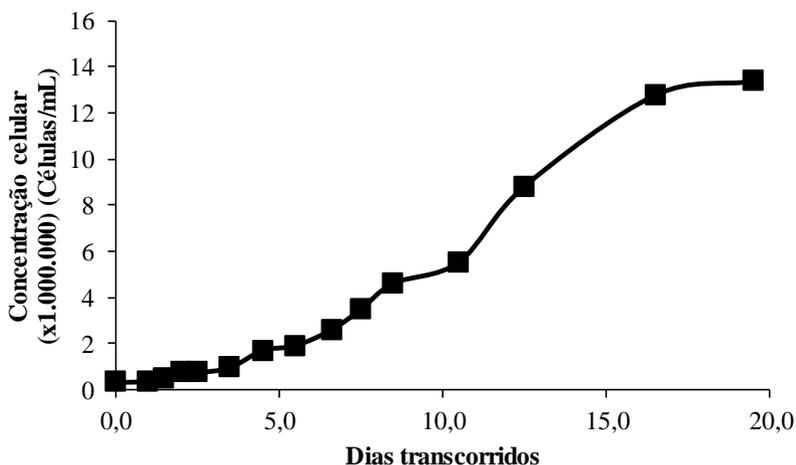


Figura 4 – Detalhamento da variação da concentração celular (células/mL) nos primeiros 19,5 dias de cultivo de *Scenedesmus obliquus* – Cultivo de 1,5 L.



Os dados relacionados à concentração celular dos dois cultivos podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Durações das fases de latência (Lag) e de crescimento logarítmico (Log), taxa de crescimento exponencial (μ_{exp}) e tempo de duplicação (TD) para os cultivos de 150 mL e de 1,5 L.

Tipo de Cultivo	Fase Lag (dias)	Fase Log (dias)	μ_{exp}	TD
150 mL	3,5	9	0,1737	3,99
1,5 L	3,5	13	0,1680	4,13

Analisando de outra forma o perfil de crescimento de *S. obliquus*, podemos ver que as taxas de crescimento diário (Figuras 5 e 6) variam muito de um dia ao outro nos dois cultivos. Porém, a linha de tendência nas Figuras 5 e 6 indicam um decréscimo nas taxas ao longo do tempo. Isso aponta a localização da fase log (onde os valores da taxa de crescimento diário tendem a serem maiores) perto do início do experimento.

Quanto à clorofila-a *in vivo*, na Figura 7, nota-se que houve uma queda no cultivo de 1,5 L pouco antes do dia 25, porém após o dia 30 os valores voltam a crescer e posteriormente a se estabilizar. No cultivo de 150 mL, no mesmo ponto (pouco antes dos 25 dias), também houve uma queda, porém muito menos acentuada.

Figura 5 - Taxa de crescimento diário de *Scenedesmus obliquus* – Cultivo de 150 mL.

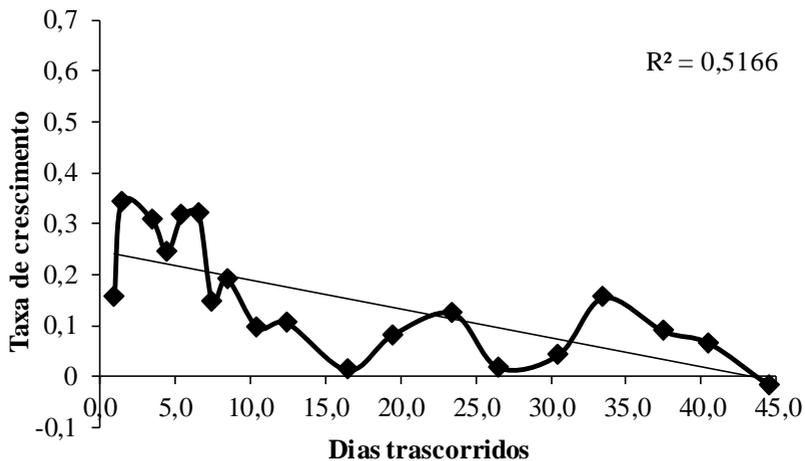


Figura 6 - Taxa de crescimento diário de *Scenedesmus obliquus* – Cultivo de 1,5 L.

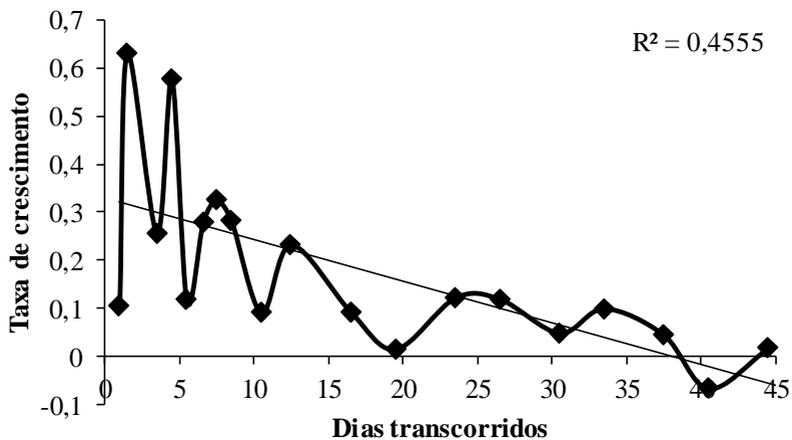
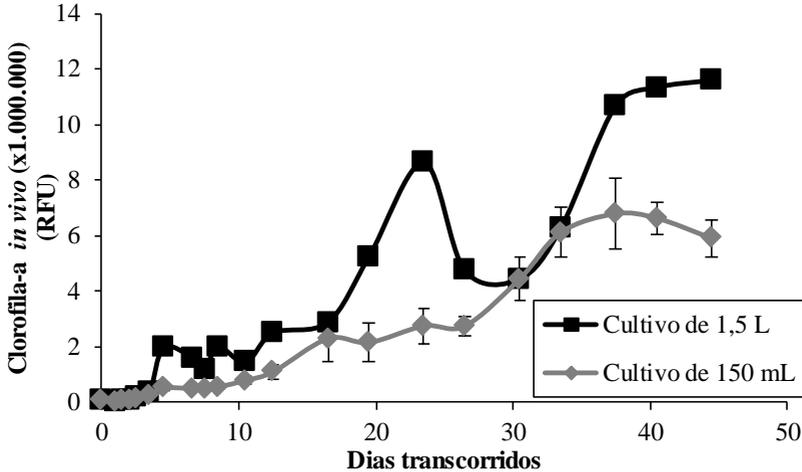


Figura 7 – Variação de Clorofila-a *in vivo* ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus*.



Em relação à turbidez, o comportamento dos cultivos de 150 mL e de 1,5 L foi semelhante como pode ser visto na Figura 8. Porém, a turbidez no cultivo de 150 mL sobe rapidamente a partir do dia 30, enquanto que no cultivo de 1,5 L, após uma fase inicial de valores baixos de turbidez (também presente no cultivo de 150 mL), mantém uma taxa de aumento de turbidez relativamente estável.

Para entender melhor o comportamento do crescimento de *Scenedesmus obliquus*. As variáveis “turbidez” e “clorofila-a *in vivo*” foram relacionadas com a concentração celular. Tanto na Figura 9 quanto na Figura 10 pode-se ver que os valores de R^2 suportam uma correlação diretamente proporcional entre a clorofila-a *in vivo* e a concentração celular tanto no cultivo de 150 mL e no cultivo de 1,5 L, respectivamente. O mesmo pode ser concluído quanto à relação da turbidez com a concentração celular, como se pode observar nas Figuras 9 e 10. Dessa forma, é possível se utilizar a turbidez e, principalmente, a clorofila-a *in vivo* para se estimar a concentração celular dessa espécie.

Obter dados fisiológicos do cultivo como concentração, clorofila-a *in vivo* e turbidez ao longo do crescimento desse cultivo fornece dados muito mais consistentes quanto à fisiologia da alga do que se fosse feito com apenas uma amostra de cultivo (em um dado momento) e se diluísse para calcular as correlações, pois ao longo de cada fase do cultivo (lag, log, estacionária, decaimento) a célula pode possuir volumes diferentes, o que pode influenciar em diversas variáveis

fisiológicas. Dessa forma, a coleta de dados ao longo de vários dias implica que essas variações fisiológicas ao longo do tempo estejam contempladas nos valores obtidos. A clorofila-a também pode variar em função do estado fisiológico ou do momento do dia em que se coleta a amostra. Como ela se baseia na fluorescência, há momentos do ciclo celular em que ocorre síntese mais intensa de clorofila-a, assim como momentos em que a fluorescência é mais intensa ou mais fraca, em função de fotoaclimação diária. Já a turbidez, que se relaciona simplesmente a presença de partículas em suspensão que interferem na passagem da luz, mostra comportamento mais linear, sem eventuais picos e oscilações relacionados à fluorescência.

Figura 8 – Variação de turbidez ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus*.

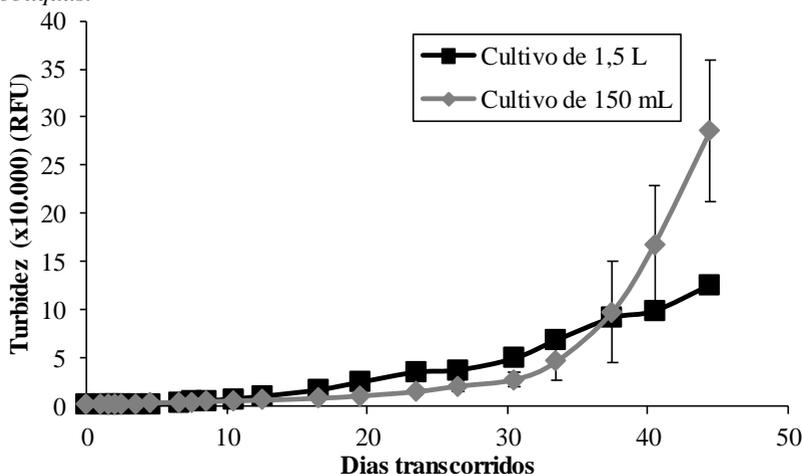


Figura 9 – Regressão entre clorofila-a *in vivo* e células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus* – cultivo de 150 mL.

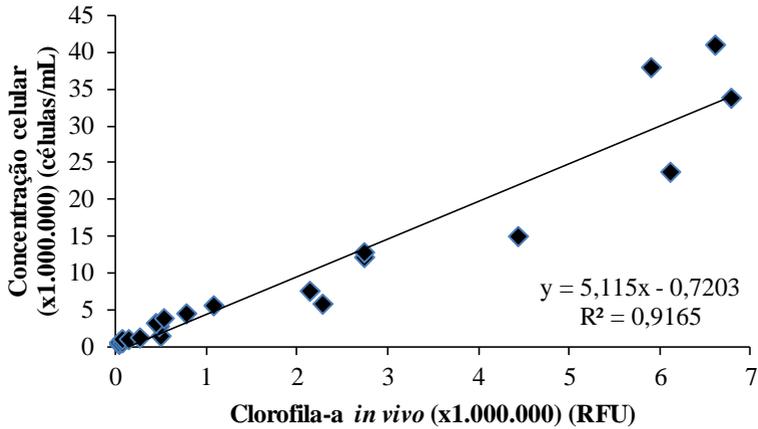


Figura 10 – Regressão entre clorofila-a *in vivo* e células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus* – cultivo de 1,5 L.

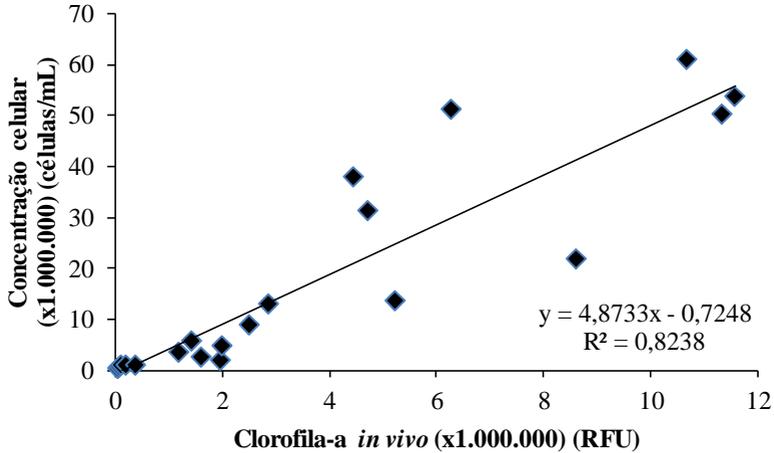


Figura 11 – Regressão Turbidez e Células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus* – cultivo de 150 mL.

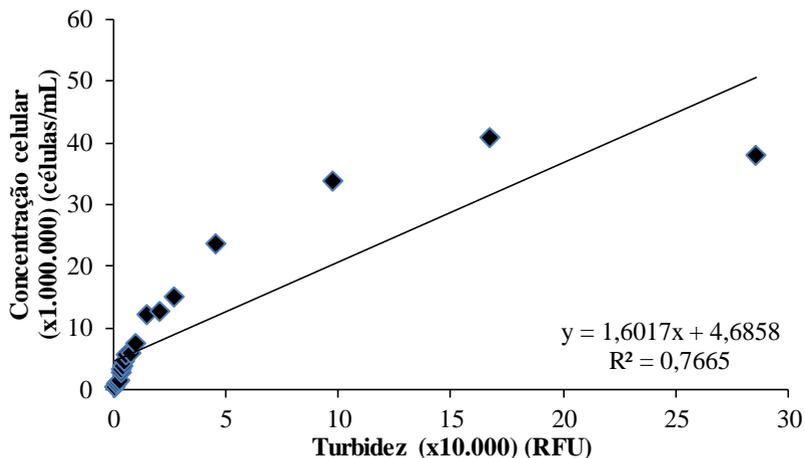
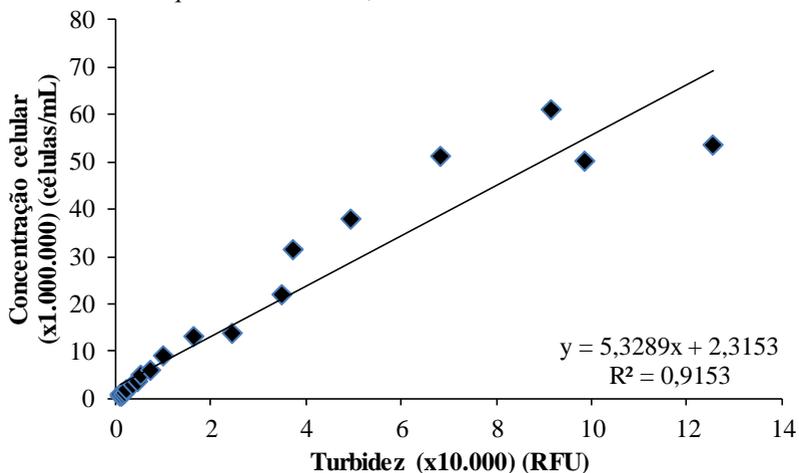


Figura 12 – Regressão Turbidez e Células/mL ao longo de 44,5 dias de cultivo *Scenedesmus obliquus* – cultivo de 1,5 L.



Como ao fim do experimento da curva de crescimento, o cultivo de 1,5 L foi utilizado para se obter o exsudato utilizado no experimento de toxicidade, se pode afirmar que o exsudato foi retirado de um cultivo de *S. obliquus* em fase estacionária tardia.

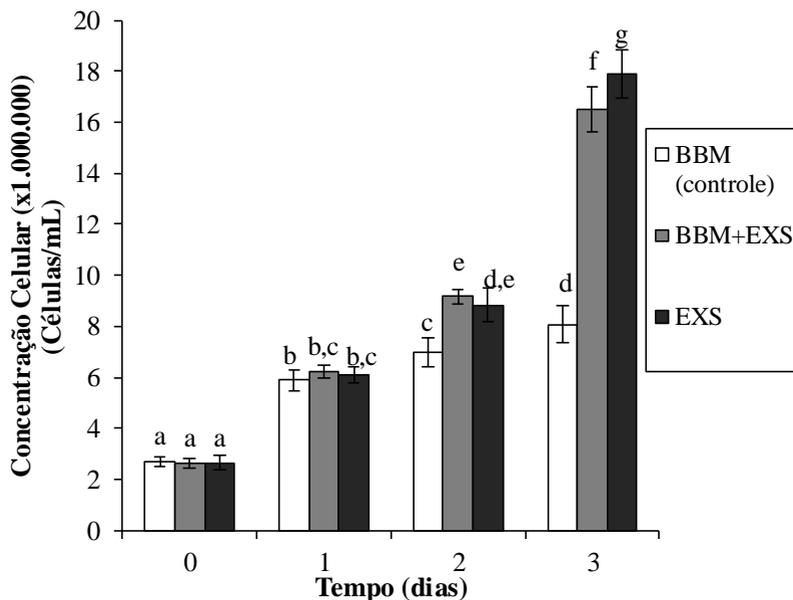
3.2 EXPERIMENTO DE TOXICIDADE DO EXSUDATO

3.2.1 Medidas Ao Longo do Experimento

O resultado do teste ANOVA indica que, com exceção de Φ II, todas as variáveis dependentes sofrem efeito interação estatisticamente significativa das variáveis independentes ao mesmo tempo. Para a variável Φ II, as variáveis independentes têm influência sobre ela apenas de forma separada (Apêndice A).

Na Figura 13, percebemos que a concentração celular aumentou nos três tratamentos ao longo do experimento. O aumento foi menos expressivo no tratamento BBM (controle), ao passo que foi muito expressivo nos tratamentos BBM+EXS (meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1) e EXS (exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*). A concentração celular final (máxima) do tratamento BBM chega a ser próximo de duas vezes menor do que a dos outros dois tratamentos. Isso nos indica que a presença do exsudato possui um efeito positivo no crescimento populacional de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Figura 13 – Concentração celular dos cultivos de *Pseudokirchneriella subcapitata* ao longo de quatro dias nos tratamentos EXS, BBM+EXS e BBM.



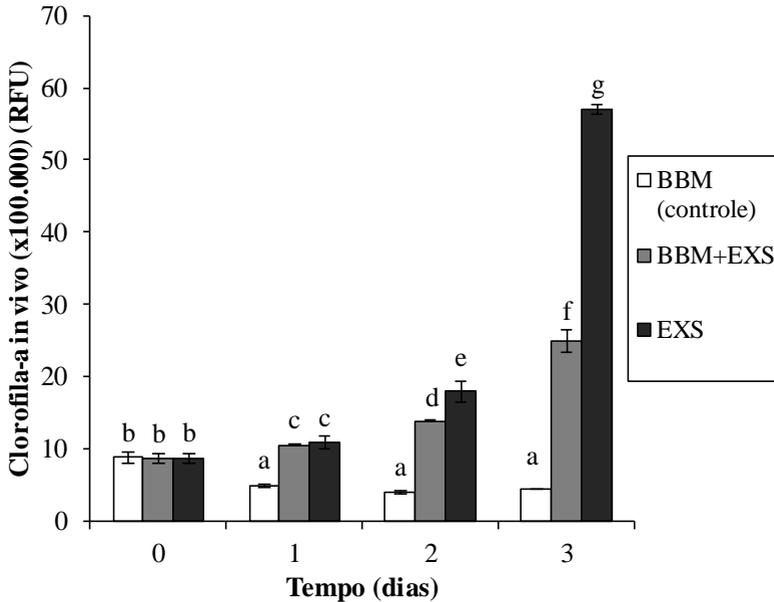
Nota:

Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

EXS: exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*; BBM+EXS: meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1.

Na Figura 14, pode-se ver que a partir do dia 1 os valores de clorofila-a *in vivo* para os tratamentos possuem alguma diferença estatística. O tratamento BBM (controle) sofre uma queda que se estabiliza até o final do experimento. Já para os tratamentos BBM+EXS e EXS, os valores de clorofila-a *in vivo* crescem ao longo do experimento, sendo o tratamento EXS com o crescimento maior, alcançando o valor máximo de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ no dia 3. Esse valor máximo de clorofila-a *in vivo* do tratamento EXS é aproximadamente 2 e 6 vezes maior que os valores máximos dos tratamentos BBM+EXS e BBM, respectivamente. Portanto, assim como no crescimento populacional, a presença do exsudato parece influenciar o valor de clorofila-a *in vivo* de forma diretamente proporcional.

Figura 14 – Clorofila-a *in vivo* dos cultivos de *Pseudokirchneriella subcapitata* ao longo de quatro dias nos tratamentos EXS, BBM+EXS e BBM.



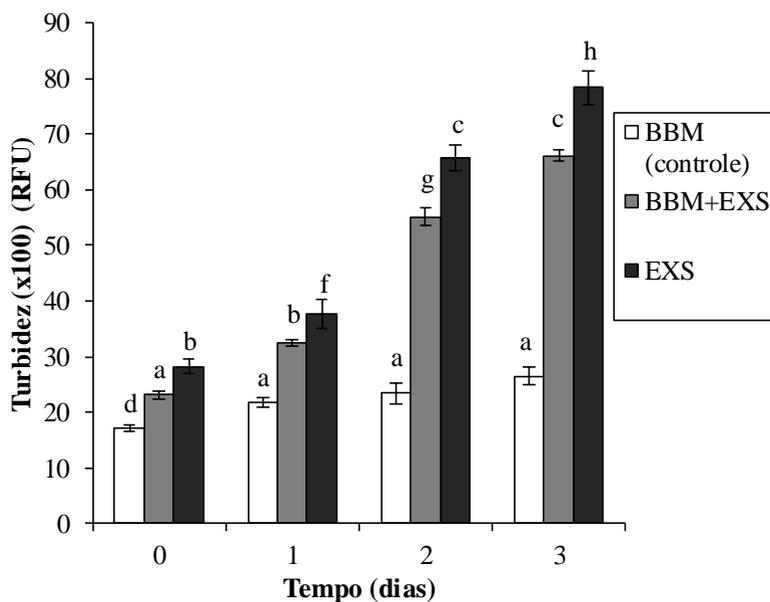
Nota:

Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

EXS: exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*; BBM+EXS: meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1.

Quanto à turbidez, a Figura 15 mostra que os valores iniciais (dia 0) para cada tratamento são diferentes. Observando o dia 0, nota-se que a presença do exsudato deixa o meio mais turvo. A turbidez de todos os tratamentos teve a tendência de aumentar ao longo do experimento e a presença de exsudato pareceu causar uma maior velocidade nesse aumento. No tratamento BBM (controle), que não possui exsudato, a turbidez aumentou pouco menos de 1000 RFU, não chegando nem a duplicar o valor do dia 0. No tratamento BBM+EXS, a turbidez aumentou cerca de 4000 RFU, quase triplicando o valor da turbidez no dia 0. O mesmo ocorreu em EXS, a turbidez do dia 3 chega próximo de três vezes o valor da turbidez do dia 0.

Figura 15 – Turbidez dos cultivos de *Pseudokirchneriella subcapitata* ao longo de quatro dias nos tratamentos EXS, BBM+EXS e BBM.



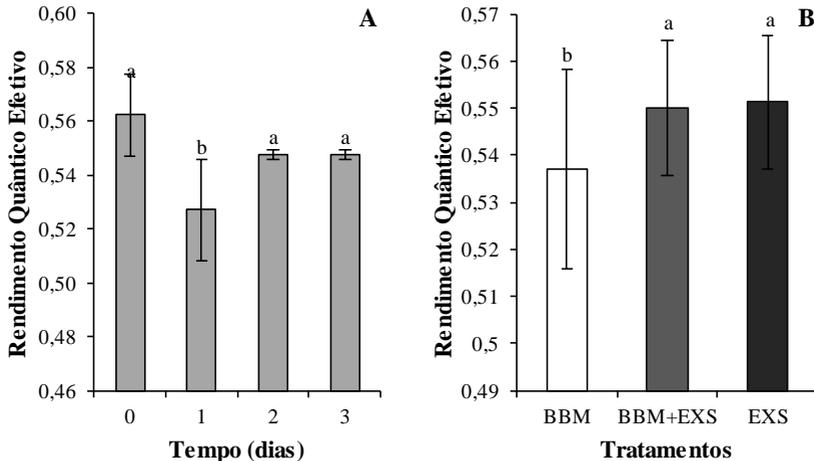
Nota:

Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

EXS: exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*; BBM+EXS: meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1.

A presença de exsudato também parece estar ligada a maiores valores de rendimento quântico efetivo, como se pode notar na Figura 16-B, onde os tratamentos com exsudato (BBM+EXS e EXS) possuem um valor de rendimento maior que o tratamento BBM.

Figura 16 – Variações do Rendimento Quântico Efetivo dos cultivos de *Pseudokirchneriella subcapitata* ao longo do tempo (A - médias de cada tratamento) e entre cada tratamento (B – médias de cada tempo).



Nota:

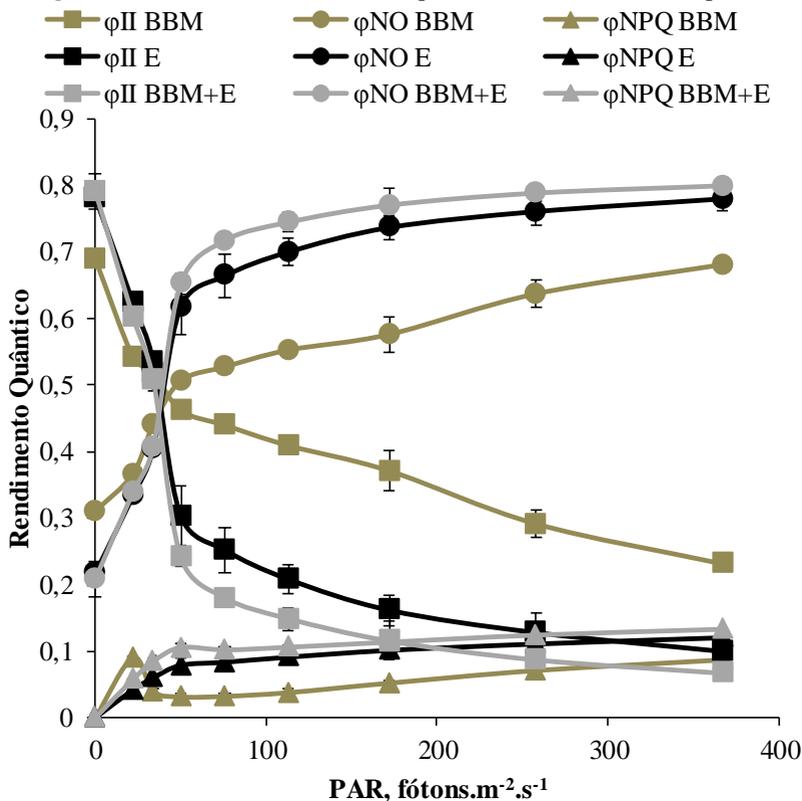
Letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

EXS: exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*; BBM+EXS: meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1.

3.2.2 Medidas da Curva de Luz

A distribuição de energia ao longo da curva de luz foi diferente em cada um dos tratamentos. Porém o tratamento BBM foi o que demonstrou um comportamento mais diferente em relação aos outros dois. Podemos ver na Figura 17 que o valor de ϕ_{II} de BBM, apesar de iniciar abaixo dos outros tratamentos, sofre uma queda menos acentuada, se mantendo acima dos valores de ϕ_{II} dos outros tratamentos desde o valor de PAR 50 $\text{fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Isso mostra que ao longo de maior parte da curva, a parcela de energia luminosa que estava sendo utilizada pelo PSII para conversão em energia química era mais alta do que nos outros tratamentos. Paralelamente, na Figura 17 é possível ver que a curva de ϕ_{NO} do tratamento BBM se mantém abaixo das curvas de ϕ_{NO} dos outros tratamentos a partir do PAR 50 $\text{fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (mesmo valor em que a curva de ϕ_{II} de BBM começa a se manter acima das outras curvas de ϕ_{II}). Segundo Klughammer e Schreiber (2008), valores altos de ϕ_{II} e da razão ϕ_{NPQ}/ϕ_{NO} indicam uma regulação bem-sucedida do aparato fotossintético.

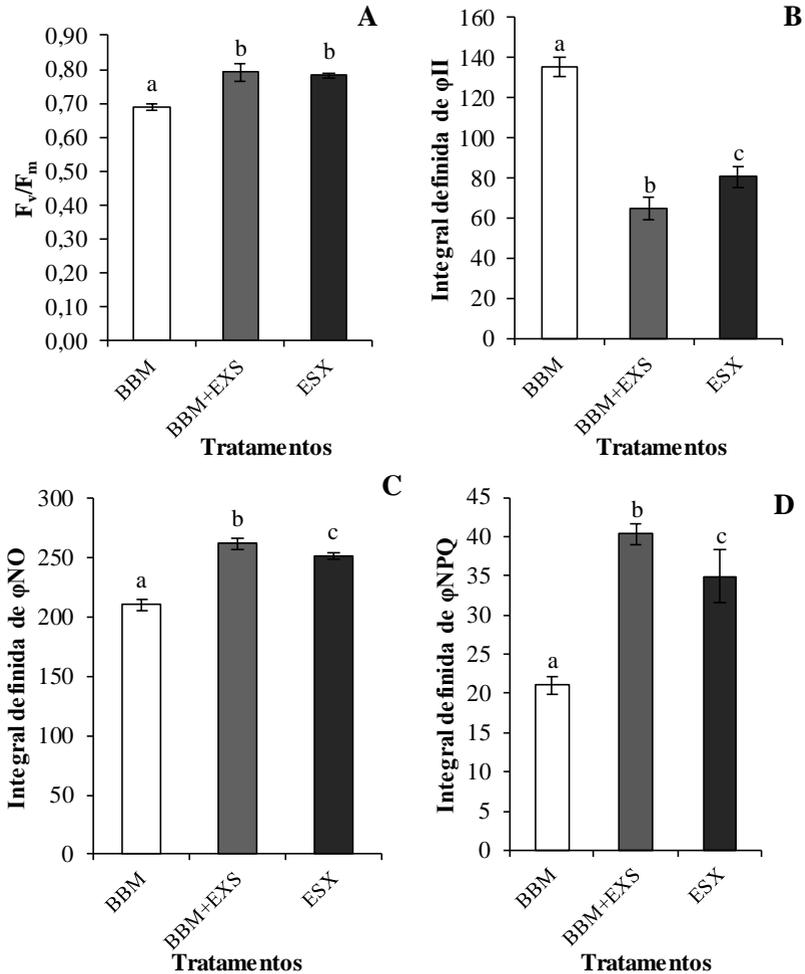
Figura 17 - Dissipação de energia dos cultivos de *Pseudokirchneriella subcapitata* em cada tratamento no quarto (último) dia de experimento.



Com o resultado do teste ANOVA (Apêndice A), podemos afirmar que as integrais definidas das variáveis são influenciados pelos tratamentos. Dessa forma, foi possível relacionar essas variáveis com os tratamentos na Figura 18.

A mesma análise de Φ_{II} , ϕ_{NO} e ϕ_{NPQ} feita na Figura 17 pode ser feita na Figura 18. Assim, nota-se que o valor da integral definida de Φ_{II} é maior no tratamento BBM do que nos outros dois tratamentos. Consequentemente, os valores de ϕ_{NO} e ϕ_{NPQ} para o controle são menores que os dos outros tratamentos. Os valores de F_v/F_m , apesar de parecidos, possui diferença estatisticamente significativa entre o controle e os outros dois tratamentos. Sendo o controle com o menor valor de F_v/F_m , demonstrando uma menor performance fotossintética da alga na ausência do exsudato.

Figura 18 – Valor do rendimento quântico máximo (F_v/F_m) em cada tratamento (A). Relação da integral definida do rendimento quântico efetivo (ΦII), da dissipação de energia não-fotoquímica e não-regulada (ϕNO); e da dissipação de energia não-fotoquímica e regulada (ϕNPQ) com cada tratamentos BBM (B, C e D, respectivamente).



Nota:

EXS: exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*; BBM+EXS: meio BBM com exsudato do cultivo de *Scenedesmus obliquus*, na proporção 1:1.

4. CONCLUSÕES

Em relação ao crescimento *Scenedesmus obliquus*, a alga mostrou diversas fases de crescimento logarítmico intercalados por fases estacionárias. Estudos mais aprofundados são necessários para entender esse comportamento cíclico na curva de crescimento dessa alga.

Quanto ao experimento de toxicidade do exsudato de *S. obliquus*, a presença de exsudato (puro ou diluído em meio BBM) parece não influenciar negativamente no crescimento da alga teste (*Pseudokirchneriella subcapitata*), pelo contrário, pareceu influenciar positivamente o crescimento desta. Algumas causas podem ser apontadas para o fenômeno. Uma delas é a presença de carga residual de nutrientes no exsudato, ou seja, muitos nutrientes ainda estavam presentes no meio quando o cultivo de *S. obliquus* foi filtrado e esses nutrientes influenciaram positivamente o crescimento da alga teste.

Outra explicação para o maior crescimento da alga teste sob a presença de exsudato é a possível maior concentração de amônia nesse exsudato. Essa amônia viria da decomposição celular que ocorreu no cultivo de *S. obliquus* que já estava em fase estacionária tardia (SANTORO, 2016). A atividade de bactérias no cultivo é possível pelo fato dele não estar em condição axênica. Assim, essa amônia, se presente, apesar de poder ser tóxica em valores altos, pôde ter servido como fonte de nitrogênio para a alga teste, promovendo um crescimento maior dessa alga em comparação ao controle (RODRIGUES, M. S., 2008).

Outra hipótese pode ser levantada em relação à influência do exsudato no crescimento da alga teste: a presença de fatores de crescimento como fitoquelantes e fitormônios no exsudato. Os fitoquelantes são peptídeos produzidos por plantas, fungos e algas que se ligam a metais auxiliando na sua absorção (AHNER; KONG; MOREL, 1995). Peptídeos como esses podem ter sido produzidos por *S. obliquus* e se acumulado no exsudato, auxiliando a absorção de metais pela alga teste, estimulando seu crescimento mais acelerado em relação ao controle.

Uma última hipótese a ser levantada é a de estímulo externo ou estresse que pode ter faltado para a *S. obliquus* produzir seus alelopáticos, já que é conhecido que algumas algas só produzem alelopáticos na presença de fator estressante como falta de nutrientes (GRANÉLI; SALOMÓN; FISTAROL, 2008).

Assim, com os resultados obtidos, não foi possível observar atividade alelopática da alga verde *Scenedesmus obliquus* sobre *Pseudokirchneriella subcapitata*. Porém mais experimentos podem ajudar a entender o fenômeno.

O co-cultivo da *S. obliquus* com a alga teste é uma forma de se entender a influência direta de uma alga sobre a outra. Outro teste que pode ser feito é a filtração do cultivo de *S. obliquus* em diferentes fases de crescimento para fazer o experimento de toxicidade de exsudato, pois já foi visto que a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* durante a fase de crescimento log (FIGUEREDO; GIANI; BIRD, 2007).

REFERÊNCIAS

AHNER, B. A.; KONG, S.; MOREL, F. M. M. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnology and Oceanography*, v. 40, n. 4, p. 649–657, jun. 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1995.40.4.0649>>.

AN, S. S.; FRIEDEL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparison. *Plant Biology*, v. 1, p. 418–428, 1999.

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

BRITO, N. R. B. Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. p. 75, 2011.

CASTRO, N. O. DE; MOSER, G. A. D. O. FLORAÇÕES DE ALGAS NOCIVAS E SEUS EFEITOS AMBIENTAIS. v. 16, n. 2, p. 235–264, 2012.

CHETSUMON, A. *et al.* Broad spectrum and mode of action of an antibiotic produced by *Scytonema* sp. TISTR 8208 in a seaweed-type bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70–72, n. 1, p. 249–256, mar. 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02920141>>.

FIGUEREDO, C. C.; GIANI, A.; BIRD, D. F. Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology*, v. 43, n. 2, p. 256–265, 2007.

GLEASON, F. K.; CASE, D. E. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. *Plant physiology*, v. 80, n. 4, p. 834–7, abr. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16664727>>.

GRANELI, E.; SALOMON, P. S.; FISTAROL, G. O. The role of allelopathy for harmful algae bloom formation. *NATO Security through Science Series C: Environmental Security*, p. 159–178, 2008.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. . *AlgaeBase*. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. Algal allelopathy. *The Botanical Review*, v. 60, n. 2, p. 182–196, 1994.

INDERJIT; DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, v. 217, n. 4, p. 529–539, 2003.

JORGENSEN, E. G. Antibiotic Substances from Cells and

Culture Solutions of Unicellular Algae with Special Reference to some Chlorophyll Derivatives. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 530–545, jul. 1962. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08056.x>>.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, v. 1, n. 1, p. 27–35, 2008. Disponível em: <<http://www.walz.com/>>.

LEFÈVRE, M.; NISBET, M. Sur la secretion, par certaines espèces d'algues de substances inhibitrices d'autre espèces d'algues. v. 226, p. 107–109, 1948.

LEGRAND, C. *et al.* Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, v. 42, n. 4, p. 406–419, 2003. Disponível em: <<http://www.phycologia.org/doi/abs/10.2216/i0031-8884-42-4-406.1>>.

LORENZO, P.; GONZÁLEZ, L. Alelopatía : una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas*, v. 19, n. 1, p. 79–91, 2010. Disponível em: <<http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/57/53>>.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.

LYNCH, M.; SHAPIRO, J. Predation, enrichment, and phytoplankton community structure. 1981.

MEINERS, S. J. *et al.* Developing an ecological context for allelopathy. *Plant Ecology*, v. 213, n. 12, p. 1861–1867, 2013.

MIYAZAKI, T.; TAKEYAA, K.; TOGASHI, T. Effects of Ammonium Concentration and Dilution on the Competition between the Cyanobacterium *Microcystis novacekii* and the Green Alga *Scenedesmus*. *Swrcb2.Swrcb.Ca.Gov*, 2000. Disponível em: <http://swrcb2.swrcb.ca.gov/water/water_issues/programs/bay_delta/deltaflow/docs/exhibits/sfwc/spprt_docs/sfwc_exh3_miyazaki.pdf>.

PRATT, R.; FONG, J. Studies on *Chlorella vulgaris* II. Further Evidence that *Chlorella* Cells form a Growth-Inhibiting Substance.

American Journal of Botany, v. 27, n. 6, p. 431, jun. 1940. Disponível em: <<http://links.jstor.org/sici?sici=0002-9122%28194006%2927%3A6%3C431%3ASOCVIF%3E2.0.CO%3B2-6&origin=crossref>>.

PRINCE, E. K. *et al.* Competing phytoplankton undermines allelopathy of a bloom-forming dinoflagellate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 275, n. 1652, p. 2733–2741, 7 dez. 2008. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2008.0760>>.

RODRIGUES, E. H. C. *et al.* Variação Temporal Do Fitoplâncton Em Um Rio Tropical Pré-Amazônico (Rio Pindaré, Maranhão, Brasil). *Ciência e Natura*, v. 37, n. 2, p. 241–251, 2015. Disponível em: <<http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaenatura/article/view/14855>>.

RODRIGUES, M. S. Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio. p. 149, 2008.

SANTORO, A. B. *No Title*. Disponível em: <http://lcc-ead.nutes.ufrj.br/constructore/objetos/Intera%E7%E3o_bacteria_meio_ambiente.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2017.

SCHERNER, F. *et al.* Salinity critical threshold values for photosynthesis of two cosmopolitan seaweed species: Providing baselines for potential shifts on seaweed assemblages. *Marine Environmental Research*, v. 91, p. 14–25, 2013.

SCHERNER, F.; BONOMI BARUFI, J.; HORTA, P. A. Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: Evidence of selection of pollution-tolerant species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 11, p. 2380–2390, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.012>>.

WOLFE, J. M.; RICE, E. L. Allelopathic interactions among algae. *Journal of Chemical Ecology*, v. 5, n. 4, p. 533–542, 1979.

XU, N. *et al.* Ability of the marine diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pungens* to inhibit the growth of co-occurring phytoplankton via allelopathy. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 74, n. 1, p. 29–41, 12 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.int-res.com/abstracts/ame/v74/n1/p29-41/>>.

ZHU, X. *et al.* Grazer-induced morphological defense in *Scenedesmus obliquus* is affected by competition against *Microcystis aeruginosa*. *Nature Publishing Group*, n. February, p. 1–10, 2015.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep12743>>.

APÊNDICE A

Tabela 3 – Resultado dos testes ANOVA com as variáveis independentes: Tempo e Tratamento e variáveis dependentes Clorofila-a *in vivo* (Chla), Turbidez, Concentração Celular (Cél.), Rendimento Quântico Efetivo (Φ II), Dissipação de Energia Não-fotoquímica e Não-regulada (ϕ NO); Dissipação de Energia Não-fotoquímica e Regulada (ϕ NPQ); e Rendimento Quântico Máximo (Fv/Fm).

	GL	Chla SS	Chla MS	Chla F	Chla p
Intercept	1	1,01E+14	1,01E+14	1,72E+04	0,00E+00
Tratamento	2	2,63E+13	1,31E+13	2,23E+03	0,00E+00
Tempo	3	3,31E+13	1,10E+13	1,87E+03	0,00E+00
Tratamento *Tempo	6	3,51E+13	5,86E+12	9,93E+02	0,00E+00
Erro	36	2,12E+11	5,90E+09	-	-
TOTAL	47	9,48E+13	-	-	-

	GL	Turbidez SS	Turbidez MS	Turbidez F	Turbidez p
Intercept	1	7,54E+08	7,54E+08	2,70E+04	0,00E+00
Tratamento	2	7,82E+07	3,91E+07	1,40E+03	0,00E+00
Tempo	3	8,84E+07	2,95E+07	1,05E+03	0,00E+00
Tratamento *Tempo	6	2,66E+07	4,44E+06	1,59E+02	0,00E+00
Erro	36	1,01E+06	2,79E+04	-	-
TOTAL	47	1,94E+08	-	-	-

	GL	Cel SS	Cel MS	Cel F	Cel p
Intercept	1	2,92E+15	2,92E+15	1,01E+04	0,00E+00
Tratamento	2	8,67E+13	4,34E+13	1,50E+02	0,00E+00
Tempo	3	8,42E+14	2,81E+14	9,73E+02	0,00E+00
Tratamento *Tempo	6	1,50E+14	2,50E+13	8,68E+01	0,00E+00
Erro	36	1,04E+13	2,88E+11	-	-
TOTAL	47	1,09E+15	-	-	-

Continua

Continuação

	GL	Φ II SS	Φ II MS	Φ II F	Φ II p
Intercept	1	1,43E+01	1,43E+01	6,13E+04	0,00E+00
Tratamento	2	1,98E-03	9,90E-04	4,23E+00	2,23E-02
Tempo	3	7,47E-03	2,49E-03	1,07E+01	3,70E-05
Tratamento *Tempo	6	2,80E-03	4,70E-04	2,00E+00	9,11E-02
Erro	36	8,41E-03	2,30E-04	-	-
TOTAL	47	2,07E-02	-	-	-

	GL	fv/Fm SS	fv/Fm MS	fv/Fm F	fv/Fm p
Intercept	1	6,83E+00	6,83E+00	2,34E+04	0,00E+00
Tratamento	2	2,56E-02	1,28E-02	4,39E+01	2,30E-05
Erro	9	2,63E-03	2,92E-04	-	-
TOTAL	11	2,83E-02	-	-	-

	GL	ID Φ II SS	ID Φ II MS	ID Φ II F	ID Φ II p
Intercept	1	1,05E+05	1,05E+05	3,81E+03	0,00E+00
Tratamento	2	1,10E+04	5,49E+03	2,00E+02	0,00E+00
Erro	9	2,48E+02	2,75E+01	-	-
TOTAL	11	1,12E+04	-	-	-

	GL	ID Φ NO SS	ID Φ NO MS	ID Φ NO F	ID Φ NO p
Intercept	1	6,99E+05	6,99E+05	4,22E+04	0,00E+00
Tratamento	2	5,90E+03	2,95E+03	1,78E+02	0,00E+00
Erro	9	1,49E+02	1,66E+01	-	-
TOTAL	11	6,05E+03	-	-	-

Continua

Continuação

	GL	ID Φ NPQ SS	ID Φ NPQ MS	ID Φ NPQ F	ID Φ NPQ p
Intercept	1	1,24E+04	1,24E+04	2,56E+03	0,00E+00
Tratamento	2	7,93E+02	3,96E+02	8,19E+01	2,00E-06
Erro	9	4,36E+01	4,84E+00	-	-
TOTAL	11	8,36E+02	-	-	-

Notas: ID - Integral definida; GL – Grau de liberdade.