

B10-163

Versão não corrigida

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
RELATÓRIO DE TRABALHO DE LICENCIATURA

R.627A

TEMA:

INFLUÊNCIA DE DUAS FORMAS DE NITROGÊNIO  
NO CRESCIMENTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*  
KÜTZ (CYANOPROCARIOTA)

AUTOR: MICHELE NEVES

JUNHO 1996

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
RELATÓRIO DE TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA:

INFLUÊNCIA DE DUAS FORMAS DE NITROGÊNIO  
NO CRESCIMENTO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*  
KÜTZ (CYANOPROCARIOTA)

AUTOR: MICHELE NEVES

SUPERVISOR: dra. AIDATE MUSSAGY

JUNHO 1996

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o contributo de várias pessoas. Sinto-me desta forma obrigada a demonstrar a minha gratidão por todos aqueles que o tornaram possível.

Os meus sinceros agradecimentos dirigem-se à minha supervisora, dra. Aidate Mussagy, que, em qualquer momento, sem a necessidade de encontros pré-estabelecidos, sempre me recebeu transmitindo-me as suas ideias tendo atempadamente lido o meu trabalho em várias ocasiões contribuindo desta forma para o seu melhoramento.

Gostaria também de apresentar os meus agradecimentos ao senhor Mauricio Juma pela ajuda no laboratório, ao dr. Fred de Boer, ao Dr. Henk Doddema e ao dr. Almeida Guissamulo pelo apoio científico e ao meu marido, Paulo Franco, que, em todas as ocasiões e sempre que necessário, se disponibilizaram a apoiar-me na execução deste trabalho.

E à minha mãe um beijo de gratidão por ter tomado tudo isto possível.

## RESUMO

*Microcystis aeruginosa* Kutz, Cyanoprocaríota foi cultivada em laboratório com vista a testar a hipótese segundo a qual o crescimento das algas azuis-verdes é maior na amónia do que no nitrato. Para a verificação desta hipótese procedeu-se à avaliação, em laboratório, do aumento da biomassa em três tratamentos diferentes. Foi feita uma experiência com culturas de banho que teve a duração de 18 dias, durante a qual foi medido o pH e a temperatura ambiente como parâmetros de controle da experiência, e o oxigénio, a clorofila *a* e o biovolume como indicadores do crescimento das algas.

Neste estudo constatou-se que *Microcystis aeruginosa* assimila as duas formas de nitrogénio (nitrogénio como nitrato e nitrogénio como amónia) tendo-se registado maior crescimento no tratamento com nitrato. Este resultado contraria a hipótese inicial que se baseia nas constatações de Blomquist *et al* (1994).

## ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	5
II. OBJECTIVOS	8
III. HIPÓTESE	8
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	8
1. Obtenção do organismo teste	9
2. Meio de cultura	9
3. Desenho experimental	10
4. Tratamento dos dados	12
V. RESULTADOS	12
V.1. Isolamento e cultura	12
V.2. Parâmetros de crescimento	13
V.2.1. Clorofila a	15
V.2.2. Biovolume	16
V.2.3. Oxigénio	17
VI. DISCUSSÃO	18
VII. CONCLUSÕES	23
VIII. CONSIDERAÇÕES CRÍTICAS	23
IX. BIBLIOGRAFIA	24
ANEXO 1	I
ANEXO 2	II
ANEXO 3	III
ANEXO 4	IV
ANEXO 5	VI
ANEXO 6	VIII
ANEXO 7	XI
ANEXO 8	XIII
ANEXO 9	XV
ANEXO 10	XVIII

## I. INTRODUÇÃO

*Microcystis aeruginosa* Kütz, Cyanoprocariota planctónica, forma colónias irregulares em forma e tamanho. As colónias são embebidas em uma camada hialina de mucilagem onde as células são arranjadas de forma compacta (ver figura 1, Anexo 1).

Os membros da classe Cyanoprocariota distinguem-se das outras algas por serem procariotas em comum com as bactérias, isto é, as células caracterizam-se pela ausência de um núcleo organizado, sem membranas nucleares nem cromossomas, sendo contudo capazes de replicação genética. Eles são também os organismos mais pequenos do fitoplâncton, cuja dimensão varia entre 0.2 - 2  $\mu\text{m}$  ( $1 \mu\text{m} = 1/1000 \text{mm}$ ) (Boney, 1989).

Nos últimos anos a literatura relacionada com a dominância das algas azuis-verdes e a formação de blooms tem aumentado rapidamente, não por elas serem um problema hoje em dia - elas já o vêm sendo desde há muito - mas talvez devido a alguns sucessos conseguidos para explicar, pelo menos numa grande extensão, as relações quantitativas entre o fitoplâncton e os nutrientes, e em reconhecer que a eutroficação é um problema de duas faces com dimensões qualitativas que necessitam de ser resolvidas assim como as da biomassa (Shapiro, 1990).

É evidente, através de trabalhos recentes e anteriores, que as Cyanoprocariota, talvez devido ao seu aparecimento no início da história da Terra, desenvolveram inúmeras adaptações para sobreviver, competir e alcançar a dominância, especialmente em ambientes de água doce. Seguem-se alguns exemplos dessas adaptações:

As Cyanoprocariota têm requisitos de energia para manutenção a baixas irradiações médias (Van Liere & Mur, 1986), através da flutuação elas formam camadas superficiais de espuma para tirar vantagem da alta iluminação da superfície durante a qual estão protegidas pela fotooxidação (Pearl *et al*, 1983), podem crescer sob uma ampla faixa de temperatura, desde as que se encontram durante o inverno onde os blooms de *Oscillatoria rubescens* prosperam mesmo abaixo do gelo até àquelas encontradas em primaveras quentes (Brock, 1968). Podem também manter altas taxas de crescimento nas temperaturas do Verão onde outras algas sofrem inibição pela temperatura (Robarts & Zohary, 1987). Muitas têm a capacidade de se movimentarem positiva ou negativamente na coluna de água utilizando-a para atingir a superfície onde o dióxido de carbono e provavelmente o nitrato são mais acessíveis (Pearl & Ustach, 1982), ou afundam para regiões onde os nutrientes tais como o fósforo estão mais disponíveis. Simultaneamente, elas podem sombrear as algas que não têm esta habilidade. Além das

adaptações acima referidas, as Cyanoprocariota, por vários métodos de inibição física e química, resistem à eliminação pelo zooplâncton filtrador (Haney, 1987).

As Cyanoprocariota têm atraído as atenções não só das pessoas que manejam a água e dos cientistas, mas também do público, devido à sua resposta espectacular à eutroficação dos lagos, nomeadamente por formarem grossas camadas, os chamados blooms. As densas populações destas Cyanoprocariota representam sérios problemas de higiene e manejo de água nos reservatórios de água e na superfície da mesma (Kappers, 1984).

Estudos efectuados na Barragem dos Pequenos Libombos no sentido de estudar a qualidade da água concluíram que as Cyanoprocariota do género *Microcystis* são o grupo mais dominante no fitoplâncton dos Pequenos Libombos em certas épocas do ano (Mussagy, 1990).

Tanto as colónias como os filamentos causam extensivos "blooms" sob certas condições podendo ser ou não produtoras de toxinas. O género *Microcystis* tem sido reportado como um género com espécies potencialmente produtoras de toxinas. Estudos sobre este género têm vindo a ser efectuados por variadíssimos autores em algumas partes do mundo: Falconer *et al* (1981) estudaram o envenenamento do fígado dos ratos pela alga azul-verde *Microcystis aeruginosa*; Hughes *et al* (1958) estudaram a toxicidade de uma monocultura de *Microcystis aeruginosa*, também em ratos; Scott *et al* (1981) fizeram estudos sobre a ecologia, o crescimento e a fisiologia de *Microcystis aeruginosa* na África do Sul.

Os "blooms" de Cyanoprocariota nos lagos têm várias implicações ecológicas e de manejo de água, mas continuam a ser objecto de controvérsia limnológica. Uma gama de factores ambientais têm sido identificados para explicar o aparecimento de "blooms" nos lagos em certas épocas do ano. A discussão sobre o crescimento de Cyanoprocariota e sua dominância está quase sempre relacionada com variáveis específicas, físicas, químicas e biológicas mas ainda existe pouco consenso sobre a sua importância relativa na promoção de "blooms".

Com base em vários trabalhos realizados, Shapiro (1990) sugeriu várias hipóteses para explicar o fenómeno da dominância das Cyanoprocariota em ecossistemas de água doce, sendo elas:

1. Hipótese sobre a temperatura da água. As Cyanoprocariota em geral têm uma temperatura ótima maior do que o resto do fitoplâncton com o qual competem a temperaturas acima de 20°C.
2. Hipótese sobre a luz. As Cyanoprocariota requerem menos luz do que o resto do fitoplâncton com o qual competem em ambientes escuros.
3. Hipótese sobre a razão TN/TP: As Cyanoprocariota com ou sem a habilidade de fixar o nitrogénio gasoso são favorecidas por baixas taxas de TN/TP.
4. Hipótese sobre a flutuação: Algumas espécies de Cyanoprocariota são capazes de regular a sua flutuação movendo-se verticalmente em ambientes estáveis, otimizando a sua actividade fotossintética relativa à distribuição vertical dos nutrientes e energia solar.
5. Hipótese sobre a predação pelo zooplâncton. Por várias razões (tamanho da colónia, envelope gelatinoso, toxicidade potencial), o zooplâncton alimenta-se inefectivamente de Cyanoprocariota eliminando o fitoplâncton competidor, permitindo a expansão das Cyanoprocariota.
6. Hipótese sobre o dióxido de carbono/pH. As Cyanoprocariota têm constantes baixas a metade da saturação para o consumo de CO<sub>2</sub> e competem com o resto do fitoplâncton em periodos de baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub> (p. ex. quando o pH é alto e o sistema de CO<sub>2</sub> é dominado por iões de bicarbonato).
7. Estratégia de armazenamento de fósforo. As Cyanoprocariota, capazes de fixar o nitrogénio molecular, adquirem reservas de fósforo do sedimento. O armazenamento interno providencia fósforo suficiente para sustentar o seu crescimento pelágico evitando a competição com o resto do fitoplâncton pelo fósforo, assim como pelo nitrogénio.

Além destas sete hipóteses, Blomqvist, P. *et al* (1994), nos seus estudos realizados em 4 lagos da Suécia, sugeriram ainda uma oitava hipótese, em que "o sucesso das Cyanoprocariota não fixadoras de nitrogénio depende da forma como o nitrogénio inorgânico está presente, sendo o seu desenvolvimento favorecido pela amónia". A energia necessária para assimilar o nitrogénio é menor para NH<sub>4</sub> - N do que para NO<sub>3</sub> - N. Entre as algas azuis-verdes as maiores taxas de crescimento ocorreram com amóniacomo fonte de nitrogénio a diferentes densidades de luz (Wetzel, 1983).

A restauração de lagos requiere um conhecimento dos processos que governam a biologia destas algas nocivas. A informação disponível sobre os requisitos para o crescimento de *M. aeruginosa* é limitada. A maior parte dos pesquisadores focam os seus estudos no aspecto da toxicidade destas algas devido à sua reputação de envenenadora de animais

O presente trabalho é parte de um estudo para tentar explicar e compreender a dinâmica de populações de algas do género *Microcystis* provenientes da Albufeira dos Pequenos Libombos tendo como base a hipótese resultante dos estudos de Blomqvist, P. et al (1994).

## II. OBJECTIVOS

1. Fazer o isolamento e cultura das algas do tipo *Microcystis aeruginosa* em laboratório.
2. Determinar o crescimento das mesmas em termos de pigmentos fotossintéticos e em termos de biomassa.
3. Determinar a produtividade líquida em cada tratamento através do método do oxigénio.

## III. HIPÓTESE

O sucesso das Cyanoprocaríota não fixadoras de nitrogénio (*Microcystis*) depende da forma como a fonte de nitrogénio inorgânico está presente. O seu desenvolvimento é favorecido pela amónia.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios de algas assumem que existe uma relação directa entre o crescimento da espécie teste e a concentração de nutrientes em baixo fornecimento. Eles são normalmente levados a cabo com mais de um nutriente simultaneamente, por exemplo, combinações de nitrogénio e fósforo e podem ser utilizados para (1) identificar as substâncias que limitam o crescimento das algas, (2) determinar a disponibilidade biológica de substâncias nas amostras e

(3) quantificar a resposta biológica a mudanças em concentrações de substâncias na amostra (HMSO, 1990).

### 1. Obtenção do organismo teste (monocultura de *Microcystis*).

Populações naturais do género *Microcystis* derivadas da Albufeira dos Pequenos Libombos foram isoladas e cultivadas em meio de cultura artificial. Para isto, foi feito um arrasto com uma rede de 45 µm de tamanho de malha. Em seguida as algas foram colocadas em meio de cultura e o isolamento foi feito a partir de pipetagens sucessivas para frascos com meio de cultura.

### 2. Meio de Cultura.

As algas cresceram em frascos de vidro de 1000 ml contendo meio de cultura.

O meio de cultura utilizado teve a seguinte composição, de acordo com HMSO (1990):

#### Meio de Nitrato

Reagente	Concentração (mg l <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	75
NaNO <sub>3</sub>	1500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	40
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36
Ácido cítrico	6
Citrato férrico	6
EDTA (sal de dissódio de magnésio)	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2
Solução stock de microelementos	1 ml
Água deionizada	1000 ml

## Meio de Amônia

Reagente	Concentração (mg l <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	75
NH <sub>4</sub> Cl	1500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	40
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36
Ácido cítrico	6
Citrato férrico	6
EDTA (sal de dissódio de magnésio)	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2
Solução stock de microelementos	1 ml
Água deionizada	1000 ml

Solução stock de microelementos	Concentração em g l <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.22
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.39
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.0494

### 3. Desenho Experimental

- Inoculação: foram feitas inoculações com 20 ml da suspensão da monocultura de *Microcystis* para um balão de 800 ml em meios de cultura diferentes com a ajuda de uma seringa.

- Tratamentos:

Para testar o efeito das diferentes formas de nitrogénio no crescimento de *Microcystis aeruginosa* foram feitos os seguintes tratamentos:

- Tipo de tratamento:
1. Meio Básico + Nitrato (controle)
  2. Meio Básico + Amónia
  3. Meio Básico + Nitrogénio combinado

Por cada tratamento houve 4 réplicas e a experiência durou 18 dias.

Os frascos foram colocados aleatoriamente: a mesa foi dividida em 12 quadrados correspondentes aos diferentes frascos, cada um com a sua designação. Foi feito um sorteio no qual se fez combinar a designação de cada frasco com o número de quadrados em que a mesa foi dividida e essa foi a disposição dos frascos desde o início até ao fim da experiência (Anexo 2).

- Condições de cultivo: as algas foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer, permaneceram à temperatura média actual do ambiente onde decorreu a experiência. Sobre os balões foi colocada uma câmara de crescimento que contém lâmpadas fluorescentes (OSRAM L 18W/10) no topo e que fornecem às algas a quantidade de luz necessária para o seu crescimento. O regime de iluminação foi em períodos alternados de mais ou menos 10 horas de luz e 14 horas de escuro porque o fitoplâncton na natureza está exposto a condições de mudanças de luz, tendo o ciclo começado por um período de luz.

- Parâmetros a medir: para medir o crescimento foram tomadas amostras nos diferentes tratamentos de 3 em 3 dias e medidos os seguintes parâmetros:

a. Biomassa das algas através da concentração da clorofila a pelo método espectrofotométrico de Ahlgren e Ahlgren (1976) no espectrofotómetro HITACHI U-1000.

b. Densidade das algas, segundo o método de contagem de colónias em 5 ml de amostra nos diferentes tratamentos. Após a contagem e medição de colónias existentes na subamostra observada ao microscópio invertido em câmaras de sedimentação foi calculado o biovolume e depois convertido em biomassa (Cronberg, 1982). A contagem das colónias foi feita em dez campos alternadamente. Foi calculada uma média de oitenta células por cada quadrado da câmara de contagem. O procedimento para os cálculos do biovolume encontram-se no Anexo 3.

c. Produtividade líquida, através do método do oxigênio (Hutchinson, 1957).

- Cuidados: foi controlado o pH com um potenciômetro e os frascos eram mexidos frequentemente (duas vezes por dia). A temperatura ambiente no local da experiência era também registada diariamente.

#### 4. Tratamento dos dados

Em termos de análise descritiva foi calculada a média e o desvio padrão dos diferentes parâmetros a medir para se poderem comparar as tendências em relação aos diferentes tratamentos.

O teste estatístico utilizado para verificar se há diferenças entre os tratamentos foi o teste de análise de regressão (Sokal e Rohlf, 1987). Este teste permite verificar se o crescimento é ou não significativo em cada tratamento, permite determinar as diferenças entre os tratamentos e permite prever o valor de Y (clorofila a( $\mu\text{g/l}$ )) e biovolume ( $\text{mg/l}$ ) em função de X (tempo(dias)).

## V. RESULTADOS

Através de uma experiência feita entre Março e Abril de 1996 foi feito um teste para se avaliar o efeito de duas formas de nitrogênio inorgânico no crescimento de *M. aeruginosa*. Os resultados obtidos são a seguir apresentados.

### V.1. Isolamento e Cultura

O isolamento foi possível, tendo sido obtida uma cultura não axénica de *Microcystis aeruginosa* que foi possível observar em todos os frascos excepto numa das réplicas do tratamento com nitrogênio combinado, onde foi encontrada uma alga do género *Scenedesmus*, uma *Chlorophyceae* da ordem *Chlorococcales*. Este frasco foi rejeitado para os testes estatísticos tendo estes sido realizados apenas com três réplicas.

O aspecto das algas apresentava-se em forma de colónias e em alguns campos (poucos) foi possível observar células soltas, não muito distanciadas das colónias.

Os valores de temperatura e pH obtidos no decurso da experiência são mostrados na tabela 1.

TABELA 1: Medição da temperatura e do pH.

TRATAMENTO	T <sub>0</sub> pH	T <sub>3</sub> pH	T <sub>6</sub> pH	T <sub>9</sub> pH	T <sub>12</sub> pH	T <sub>15</sub> pH	T <sub>18</sub> pH
MB + NO <sub>3</sub>	7,98	7,88	8,00	8,20	9,68	9,21	10,39
	8,10	8,40	7,97	8,55	9,85	9,25	10,24
	7,86	7,98	7,87	8,20	9,76	9,17	10,38
	7,98	8,00	7,88	8,14	9,90	9,34	10,60
MB + NH <sub>4</sub>	7,84	7,86	7,86	7,53	7,52	7,07	7,21
	7,89	7,97	8,00	7,50	7,63	7,20	7,10
	7,81	8,00	7,88	7,44	7,50	7,16	7,17
	8,01	8,01	7,96	7,46	7,30	7,08	7,06
MB + NO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub>	7,88	8,01	7,92	7,14	7,05	6,61	6,96
	7,92	8,00	8,00	7,96	8,88	8,35	8,99
	8,10	7,92	8,01	7,88	8,85	8,17	9,59
	7,82	8,00	7,96	7,72	8,58	7,86	9,33
TEMPERATURA (°C)	32	28	30	28,5	29	29	28

MB+NO<sub>3</sub> = Meio básico + Nitrato

MB+NH<sub>4</sub> = Meio básico + Amónia

MB+NO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub> = Meio Básico + Nitrogénio combinado

Verifica-se que os maiores valores de pH se registaram no tratamento com nitrato e que este aumentou ao longo do período da experiência, com os maiores valores no último dia. Nos dois restantes tratamentos observou-se uma tendência para a diminuição do pH.

## V.2. Parâmetros de crescimento

A tabela 2 representa as médias e os desvios padrões obtidos dos três parâmetros de crescimento medidos, respectivamente clorofila, biovolume e oxigénio e são também ilustrados os respectivos gráficos (figuras 1,2 e 3).

TABELA 2: Médias e desvios padrões obtidos para os diferentes parâmetros de crescimento nos três tratamentos.

TRATAMENTO		CLOROFILA ( $\mu\text{g/l}$ )	BIOVOLUME ( $\text{mg/l}$ )	OXIGÊNIO ( $\text{mg/l}$ )
<b>M.B. + NO<sub>3</sub></b>	T <sub>0</sub>	96,76 ± 7,13	9,50 ± 2,38	5,08 ± 0,64
	T <sub>3</sub>	298,95 ± 54,39	51,78 ± 18,57	9,70 ± 0,54
	T <sub>6</sub>	717,32 ± 190,57	114,98 ± 9,51	10,35 ± 2,92
	T <sub>9</sub>	864,35 ± 13,15	129,18 ± 13,62	8,03 ± 0,49
	T <sub>12</sub>	1048,34 ± 291,99	154,75 ± 9,03	9,65 ± 0,47
	T <sub>15</sub>	1089,04 ± 201,31	244,61 ± 36,33	6,95 ± 0,13
	T <sub>18</sub>	1305,81 ± 271,63	267,01 ± 26,01	7,83 ± 0,81
<b>M.B. + NH<sub>4</sub></b>	T <sub>0</sub>	93,84 ± 24,95	8,86 ± 4,87	6,08 ± 1,14
	T <sub>3</sub>	160,82 ± 48,76	36,67 ± 18,89	7,75 ± 0,60
	T <sub>6</sub>	275,41 ± 41,21	65,28 ± 6,51	8,40 ± 0,14
	T <sub>9</sub>	350,18 ± 17,46	75,90 ± 11,86	6,93 ± 0,10
	T <sub>12</sub>	535,91 ± 80,79	114,43 ± 36,25	7,20 ± 0,14
	T <sub>15</sub>	592,65 ± 135,01	115,58 ± 25,86	6,28 ± 0,19
	T <sub>18</sub>	890,15 ± 187,20	127,04 ± 32,69	6,98 ± 0,88
<b>M.B. + NO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub></b>	T <sub>0</sub>	91,38 ± 6,82	8,15 ± 5,04	5,93 ± 0,81
	T <sub>3</sub>	157,16 ± 90,47	56,23 ± 22,31	8,68 ± 1,51
	T <sub>6</sub>	346,97 ± 172,73	65,19 ± 26,53	9,08 ± 0,46
	T <sub>9</sub>	379,98 ± 63,07	77,65 ± 16,05	7,10 ± 0,62
	T <sub>12</sub>	466,23 ± 137,22	119,47 ± 12,59	7,55 ± 0,17
	T <sub>15</sub>	511,76 ± 119,75	158,21 ± 44,39	6,15 ± 0,13
	T <sub>18</sub>	718,40 ± 262,52	195,11 ± 97,48	7,05 ± 0,54

## V.2.1. Clorofila a

### Varição da Clorofila ao Longo do Tempo

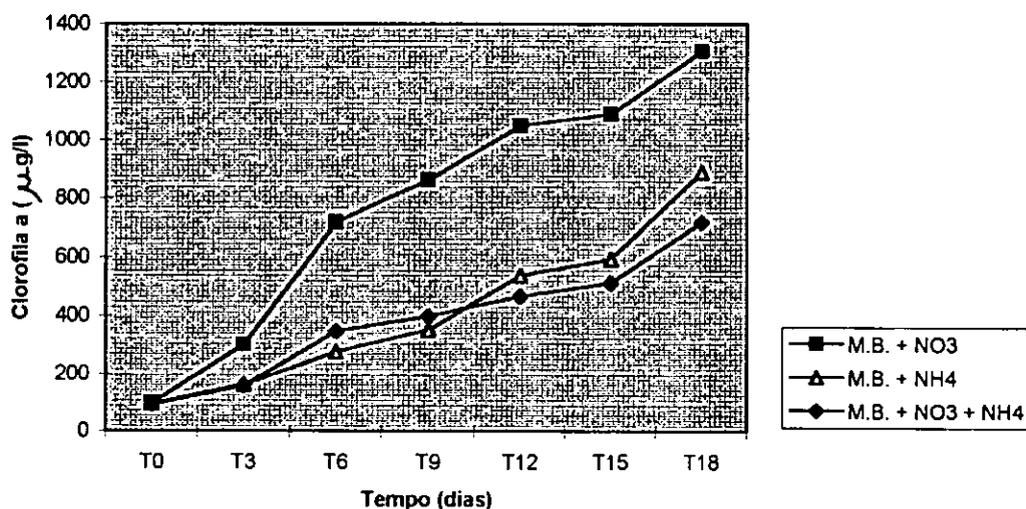


FIGURA 1: Varição da clorofila nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Neste gráfico é possível observar um aumento significativo da quantidade de clorofila nos três tratamentos ( $p < 0.01$ ), sendo maior o aumento no tratamento com nitrato do que nos dois últimos. No anexo 4 é possível verificar os dados brutos com os quais foi feito o teste estatístico.

No meio com nitrato o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de duas vezes em  $T_3$ , de cinco vezes tanto em  $T_6$  como em  $T_9$ , de oito vezes tanto em  $T_{12}$  como em  $T_{15}$  e de dez vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 202.7 X - 28.1 \text{ (Anexo 5)}$$

onde  $Y$  = concentração de clorofila ( $\mu\text{g/l}$ ) e  $X$  = tempo (dias).

No meio com amônia o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de duas vezes em  $T_3$ , de três vezes em  $T_6$ , de quatro vezes em  $T_9$ , de seis vezes tanto em  $T_{12}$  como em  $T_{15}$  e de nove vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 120.1 X - 80.5 \text{ (Anexo 5)}$$

onde  $Y$  = concentração de clorofila ( $\mu\text{g/l}$ ) e  $X$  = tempo (dias).

No meio com nitrogênio combinado o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de duas vezes em  $T_3$ , de quatro vezes tanto em  $T_6$  como em  $T_9$ , de cinco vezes em  $T_{12}$ , de seis vezes em  $T_{15}$  e de oito vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 109.0 X - 0.94 \text{ (Anexo 5)}$$

onde  $Y$  = concentração de clorofila ( $\mu\text{g/l}$ ) e  $X$  = tempo (dias).

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 6):

$$(t_{\text{nitrato} - \text{amônia}} = 0.45, \text{G.L.} = 38, p > 0,05)$$

$$(t_{\text{nitrato} - \text{nitrogênio combinado}} = - 0.26, \text{G.L.} = 38, p > 0,05)$$

$$(t_{\text{amônia} - \text{nitrogênio combinado}} = - 1.20, \text{G.L.} = 38, p > 0,05)$$

### V.2.2. Biovolume

#### Varição do Biovolume ao Longo do Tempo

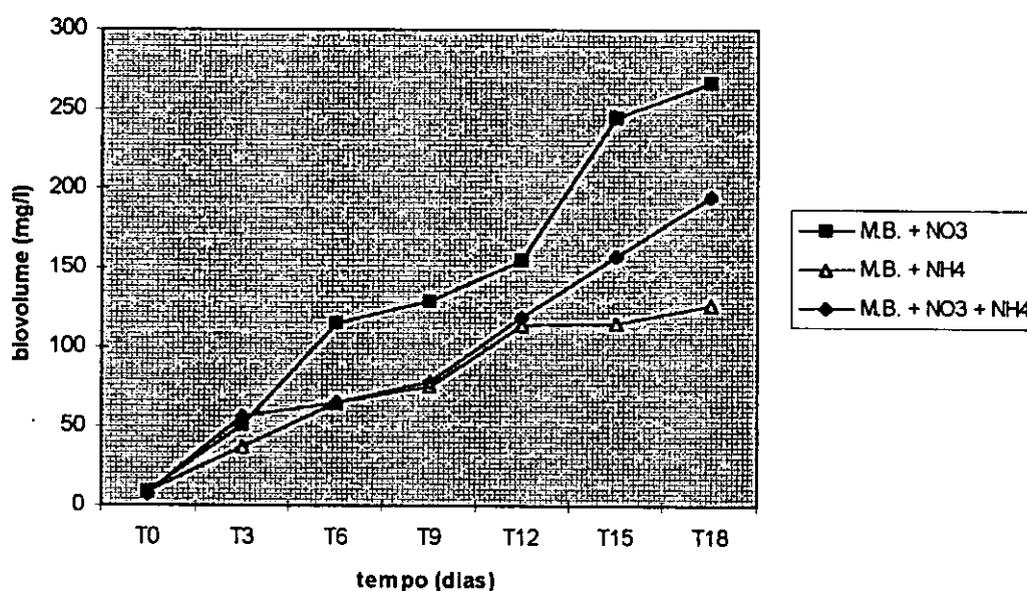


FIGURA 2: Varição do biovolume nos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Neste gráfico observa-se igualmente um aumento significativo ( $p < 0.01$ ) do biovolume ao longo do tempo nos três tratamentos, meio com nitrato, meio com amônia e meio com nitrogênio combinado. No anexo 7 é possível observar os dados brutos com os quais foi feito o teste estatístico.

No meio com nitrato o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de cinco vezes em  $T_3$ , de onze vezes em  $T_6$ , de doze vezes tanto em  $T_9$  como em  $T_{12}$ , de vinte e três vezes em  $T_{15}$  e de vinte e cinco vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 43.3 X - 36.8 \text{ (Anexo 8)}$$

onde  $Y$  = biovolume (mg/l) e  $X$  = tempo (dias).

No meio com amónia o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de quatro vezes em  $T_3$ , de sete vezes em  $T_6$ , de nove vezes em  $T_9$ , de treze vezes tanto em  $T_{12}$  como em  $T_{15}$  e de catorze vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 21.7 X - 10.0 \text{ (Anexo 8)}$$

onde  $Y$  = biovolume (mg/l) e  $X$  = tempo (dias).

No meio de nitrogénio combinado o crescimento foi, em relação a  $T_0$ , de sete vezes em  $T_3$ , de oito vezes em  $T_6$ , de dez vezes em  $T_9$ , de catorze vezes em  $T_{12}$ , de vinte vezes em  $T_{15}$  e de vinte e quatro vezes em  $T_{18}$ . A equação encontrada para esta linha foi

$$Y = 29.01 X - 19.9 \text{ (Anexo 8)}$$

onde  $Y$  = biovolume (mg/l) e  $X$  = tempo (dias).

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 9):

$$(t_{\text{nitrato - amónia}} = - 2.03, \text{ G.L.} = 38, p > 0,05)$$

$$(t_{\text{nitrato - nitrogénio combinado}} = - 2.66, \text{ G.L.} = 38, p > 0,05)$$

$$(t_{\text{amónia - nitrogénio combinado}} = - 1.42, \text{ G.L.} = 38, p > 0,05)$$

### V.2.3. Oxigénio

Variação da Concentração do Oxigénio ao longo do tempo

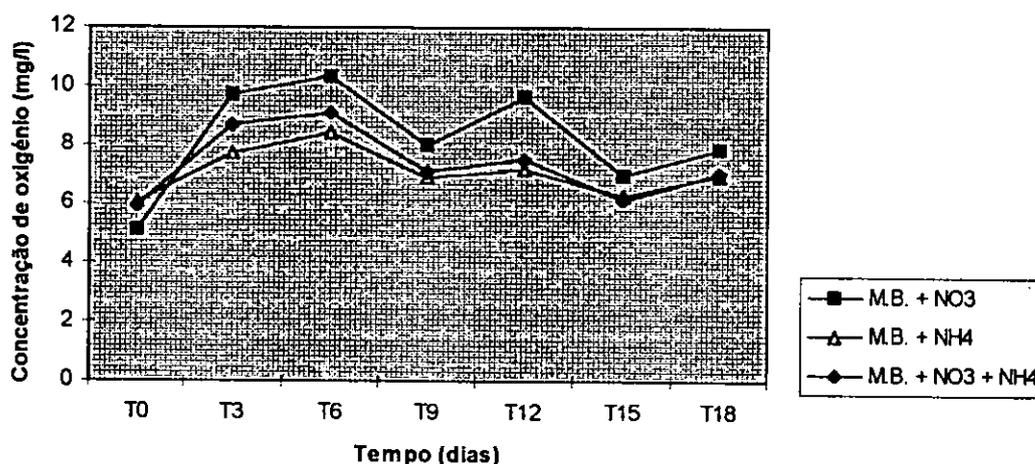


FIGURA 3: Variação do oxigênio em função dos tratamentos ao longo do tempo.

Neste gráfico observa-se um grande aumento da quantidade de oxigênio nos três primeiros dias, seguido de uma diminuição e de um aumento mais ligeiros nos últimos dias.

Este comportamento do oxigênio atribui-se aos três tratamentos, sendo mais atenuado no tratamento com amônia.

## VI. DISCUSSÃO

O crescimento de *Mycrosistis aeruginosa* é influenciado pelo modo como o nitrogênio é fornecido, de acordo com alguns autores, e espera-se que este seja um factor de importante significância para a sucessão de algas nas populações fitoplanctónicas.

As poucas experiências revelaram resultados contraditórios e diversos, nomeadamente os trabalhos de Shapiro (1990), de Blomquist *et al* (1994) e de outros, que mostraram que estas algas têm preferência pela via da amônia em relação à via do nitrato. Contudo, o que se observou nesta experiência não foi de encontro às diferentes conclusões teóricas, a via do nitrato foi a via preferida em relação à da amônia (no respeitante à análise descritiva - figuras 1, 2 e 3, no entanto, os resultados estatísticos mostraram que não houve diferenças significativas entre os três tratamentos - Anexos 6 e 9), o que também, segundo Shapiro (1990), não é tão invulgar tendo já acontecido em experiências anteriores. O crescimento foi bastante significativo em cada recta tanto para a clorofila como para o biovolume, isto é confirmado pelos valores do quadrado de R (Anexos 5 e 8 respectivamente), que mostram que eles estão bem correlacionados.

Resultados obtidos nesta experiência contrariam os resultados teoricamente esperados, porém vários factores podem ter concorrido para o presente resultado.

A maior parte das amostras apresentava-se em forma de colónias com um pH entre 6.61 e 10.60. Apenas um número reduzido de amostras apresentava um pH próximo de 10 (tabela 1). Este factor poderá ter influenciado a forma de apresentação das células, que em experiências anteriores (Kappers, 1984) conduziu à dispersão das mesmas em células individuais, não coloniais. As condições em que se procedeu à contagem confirmaram as expectativas teóricas pois segundo Kappers (1984) as colónias passam a formas individuais a um pH acima de 10.

O pH esteve dentro do intervalo recomendado por Kappers (1984) apenas nos primeiros três dias uma vez que era necessário um grande volume de base para neutralizar as soluções altamente ácidas (por vezes cerca de 10 ml), o que alterava consideravelmente o volume dos frascos, e isto levou a que a tamponização das soluções cessasse até ao fim da experiência, ou seja, na últimas quatro medições. Esta acidez inicial das soluções foi provavelmente provocada pela própria constituição do meio de cultura (capítulo IV. 2), que continha dois ácidos (ácido cítrico e citrato férrico) e uma base ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em concentrações muito baixas (2 mg/l).

Esta variação do pH tem uma relação directa com o dióxido de carbono: o dióxido de carbono existe na água na forma de  $\text{CO}_2$  dissolvido, ácido carbónico e também na forma dos iões  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . Estas formas estão ligadas, entre o pH 4 e o pH 11 através das seguintes reacções:



À medida que a fotossíntese remove o  $\text{CO}_2$  da solução, o ião bicarbonato reage com a água para libertar mais iões  $\text{CO}_2$  e  $\text{CO}_3$ . Os iões de carbonato reagem com a água libertando mais iões OH e então o pH sobe (Shapiro, 1990).

Sabe-se que densas populações de fitoplâncton diminuem o dióxido de carbono e aumentam o pH (Talling 1976) e que na maioria dos lagos as algas azuis-verdes são dominantes apenas nos períodos em que o pH é alto (Jackson 1964). Isto pode sugerir que as algas azuis-verdes podem ter vantagem sob estas condições e nos lagos onde o pH não aumenta significativamente no verão geralmente não ocorre uma predominância de algas azuis-verdes.

A luz tem importância decisiva na taxa de fotossíntese e por isso na taxa de crescimento, que se traduz no aumento da biomassa. O quadro abaixo mostra as diferenças das condições de luz entre a experiência realizada, um estudo comparativo (Kappers, 1984) e a luz solar.

	Luz Solar	Lâmpada Philips (Kappers, 1984)	Lâmpada Osram
Duração	12 horas	Contínua	10 horas
Irradiação	900 W	22 W	18 W
Qualidade	Mais Estável	Menos Estável	Menos Estável

Os raios solares são constituídos por luz visível, raios infra-vermelhos e raios ultra-violeta. Apenas a luz visível atinge a superfície da Terra, os outros dois tipos de raios são absorvidos pelas diferentes camadas da atmosfera, que actuam como filtros. Na faixa da luz visível a luz solar possui menos flutuações (é mais estável) de energia relativa do que a luz de uma lâmpada fluorescente, que produz bastantes oscilações atingindo picos muito mais elevados do que a luz do sol (Figura 1, Anexo 10) (Salisbury e Ross, 1985).

A temperatura média da experiência (29 °C) está sensivelmente acima da média usada em experiências de referência (20 °C) (Kappers, 1984). Não tendo sido determinada a taxa de crescimento populacional só é possível referir índices que estão relacionados com essa taxa, como seja o aumento da clorofila e do biovolume. As variações de temperatura de dia para dia foram de pequena ordem (1 °C) e sucederam gradualmente sendo possivelmente por isso que não se traduziram em alterações nas curvas de crescimento (figuras 1 e 2) dos indicadores de crescimento.

É possível observar na figura 1 um aumento da clorofila *a* nos três tratamentos, tendo o crescimento sido maior no tratamento com nitrato do que no tratamento com amónia. Este facto não vai de encontro aos trabalhos de Blomquist *et al* (1994), de Shapiro (1990), de Kappers (1984) nem ao de Mitchell (1989), porém, tanto Shapiro (1990) como Kappers (1984) referem, nos seus trabalhos, experiências feitas anteriormente por outros autores onde a via do nitrato foi a escolhida em relação à da amónia.

Ainda que se trate da mesma espécie é de esperar que, nas condições ecológicas específicas, existam na população estudada variações genéticas particulares que causam respostas fisiológicas diferentes. É plausível que essas diferenças no metabolismo expliquem diferentes capacidades de adaptação às mudanças ambientais e na capacidade diversa da assimilação de nutrientes.

Resultados similares a este foram encontrados em outras estirpes. Esta diversidade de resposta fisiológica originada pelas diferenças genéticas às diferentes concentrações de nitrato e amónia já foi mencionada por Kappers (1984) quando comparou o trabalho de McLachlan e Gorham (1962) com a estirpe NCR-1 que cresceu bem tanto em nitrato como em amónia, com o de Ward e Wetzel (1980) com a estirpe SS-17 e ainda com o de Yagi *et al* (1981) com a estirpe K-3 de que cresceu igualmente bem em meio de nitrato. Estas três estirpes apresentaram comportamentos diferentes na preferência pela forma de nitrato presente. Nesta experiência a estirpe não foi determinada.

Uma alternativa explicativa para o crescimento maior em nitrato do que em amónia é a forma como a amónia se encontra presente na água. Segundo Wetzel (1983), a amónia pode apresentar-se de duas formas na água,  $\text{NH}_4$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (sendo esta última forma altamente tóxica especialmente para os peixes), dependendo das suas proporções da dinâmica de dissociação que é determinada pelo pH. Wetzel (1983) refere ainda que reportes de um crescimento maior de algumas algas com nitrato como fonte de nitrogénio do que com amónia podem ser, em parte, o resultado da toxicidade do  $\text{NH}_4\text{OH}$  em altos valores de pH que podem prevalecer tanto em culturas como in situ. Esta pode ser uma explicação para justificar o maior crescimento no meio com nitrato do que no meio com amónia, já que se obtiveram os maiores valores de pH (10.39) no tratamento com nitrato (tabela 1).

A interferência das bactérias na tomada de nutrientes em culturas de *Mycrosistis aeruginosa* não é conhecida, podendo ser outro motivo que pode servir de explicação para as diferenças encontradas em relação à preferência pela forma de nitrogénio é o consumo da amónia por parte das bactérias presentes nos frascos, já que não se tratava de culturas axénicas.

Uma outra explicação reside nas concentrações dos nutrientes fornecidos. A literatura indica que a taxa de consumo é mais rápida a baixas concentrações de amónia e aumenta à medida que essas concentrações também aumentam (figura 2, Anexo 1). O mesmo acontece em relação ao nitrato, a taxa de consumo é menor em concentrações baixas. Mas comparando uma linha com a outra, nota-se que a linha da amónia se encontra acima da linha do nitrato quando as concentrações são baixas, e que esta situação se inverte quando se aumenta a concentração dos nutrientes. A altas concentrações de nutrientes a taxa de consumo é maior no nitrato do que na amónia. Mais uma vez se encontra aqui uma relação com o meio de cultura da presente experiência, onde se pode observar que as concentrações de nitrato (1500 mg/l) e de amónia (1500 mg/l) são bastante altas.

Mais uma razão para a preferência pelo nitrato pode ser o facto de ter havido provavelmente um melhor aproveitamento do nitrato durante o período da noite. Zevenboom *et al* (1982) concluíram que a taxa mínima de consumo numa experiência de curta duração com nitrato era maior no período escuro do que no período de luz. Estas observações indicam que o consumo de nitrato em *M. aeruginosa* era restrito sob iluminação contínua (Kappers, 1984). Apesar de a experiência não ter estado sob iluminação contínua, havia 10 horas de luz e 14 horas de escuro, podendo isto sugerir ter havido um melhor aproveitamento do nitrato devido a o período de escuro ter sido maior que o de luz.

Morris *et al* (1971 a) confirmaram o efeito do aproveitamento da amónia em culturas deficientes em nitrogénio de fitoplâncton marinho e indicaram em algumas populações naturais ou semi-naturais de ambientes de baixo nitrogénio inorgânico um aproveitamento positivo da amónia, enquanto isso não se manifestava em áreas onde o nitrogénio inorgânico era abundante.

Reynolds (1984) afirma que as diferentes condições de stress e as consequentes diferenças na necessidade de produção de toxinas induzem a tipos de metabolismo diversos nas populações. Eventualmente, as preferências pela via de aproveitamento de certo nutriente poderão variar em função das respostas de competência, isto é, da necessidade de produção, em maior ou menor escala, de toxinas.

Mudanças na concentração de oxigénio dissolvido durante a experiência também oferecem uma medida de produtividade líquida. Nesta experiência a concentração de oxigénio aumentou em todos os tratamentos nos primeiros três dias de medição notando-se um declínio em todos os tratamentos a partir do quarto dia (figura 3). Este resultado não é coincidente com a biomassa que aumenta tanto em termos de clorofila (figura 1) como em termos de biovolume (figura 2) nos três tratamentos. Estes dados reportam que a diminuição do oxigénio em todos os tratamentos tem a haver com o seu uso (respiração maior que fotossíntese) indicando que em todos os tratamentos as comunidades não são estáticas ocorrendo actividades metabólicas como decomposição aeróbica da biomassa e consumo do oxigénio por parte das bactérias ao longo da experiência.

Resultados obtidos no presente trabalho apontam a possibilidade da existência de estirpes de *Microcystis aeruginosa* com pouca preferência em termos da forma como o nitrogénio está presente, crescendo bem em meio tanto de nitrato como de amónia. Sendo assim, *Microcystis aeruginosa* pode ter uma grande vantagem na sucessão de espécies em ecossistemas naturais com diferentes graus de concentração de amónia e nitrato assegurando que a sua biomassa possa estar sempre elevada em relação a outras espécies de algas, podendo causar blooms.

## VII. CONCLUSÕES

Uma só experiência dificilmente é suficiente para permitir tirar conclusões, devendo as conclusões a seguir apresentadas serem vistas como tendências gerais.

A experiência sugere que:

1. A forma de apresentação das colónias pode depender do pH.
2. As algas do presente estudo utilizaram tanto a amónia como o nitrato como fonte de nitrogénio.
3. A clorofila *a* e o biovolume são bons parâmetros para estimar o crescimento das algas azuis-verdes, contudo o oxigénio não é uma boa medida do crescimento.

## VIII. CONSIDERAÇÕES CRÍTICAS

Futuras experiências são necessárias antes de conclusões definitivas serem dadas para elucidar a influência de nitrogénio na dominância de *Mycrosistis aeruginosa*. Após a realização deste trabalho penso ser útil que em futuras experiências se considerem os seguintes aspectos:

Aumento do número de réplicas e repetição da experiência nas mesmas condições;

Realização de outras experiências com diferentes condições de luz e temperatura uma vez que o crescimento destas algas tem respostas diferentes de acordo com as diferentes condições de luz e temperatura;

Medição das concentrações dos nutrientes e aplicação dos mesmos em diferentes concentrações;

Realização da experiência com uma cultura axénica porque as bactérias são fortes competidoras pelo oxigénio e pelo nitrogénio;

Realização da experiência com algas provenientes de locais diferentes para verificar o efeito do local de proveniência porque dependendo deste os seus requisitos em termos de nutrientes e a concentração interna dos mesmos é diferente.

## IX. BIBLIOGRAFIA

Ahlgren, I. e G. Ahlgren (1976). Metodos de Analisis Quimicos del Agua, 75 pp. Instituto de Limnologia, Uppsala, Suecia.

Blomqvist, P., A. Petterson e P. Hvenstrand (1994) (submetido). Amonium-nitrogen: a Key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems.

Boney, A. D. (1989). Phytoplankton, Second Edition, 118 pp. London, British Library Cataloguing Publication Data.

Brock (1968). In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Impotence Of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Cronberg, G. (1982). Phytoplankton Changes in Lake Trummen Induced by Restoration. Folia Limnologica Scandinavica, vol.18, Edited by Sven Bjorg, Lund.

Falconer, I. R., A. R. B. Jackson, J. Langley e M. T. Runnegar (1981). Liver Pathology in Mice Poisoning by the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*. Aust. J. Biol. Sci., 34: 179-187.

Fowler, J. e L. Cohen (1990). Practical Statistics for Field Biology, 227 pp. Manchester, Open University Press.

Haney (1987). Field Studies on Zooplakton-Cyanobacteria Interactions. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

HMSO. (1990). The Enumeration of Algae, Estimation of Cell Volume, and Use in Bioassays - Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. 44 pp, London.

Hughes, E. O., P. R. Gorham e A. Zehnder (1958). Toxicity of a Unialgal Culture of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 4: 225-236.

Hutchinson, G. E. (1957). A Treatise on Limnology, 1015 pp. New York, John Wiley & Sons, INC.

Jackson, D. F. (1964). Ecological Factors Governing Blue-Green Algal Blooms. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Kappers, F. I. (1984). On Population Dynamics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Academisch Proefschrift, Amsterdam.

McLachlan, J. e P. R. Gorham (1962). Effects of pH and Nitrogen Sources on Growth of *Microcystis aeruginosa*. In: Kappers, F. I. (1984). On Population Dynamics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Academisch Proefschrift, Amsterdam.

Mitchell, S. F. (1989). A Critical Evaluation of the Dark Amonium Enhancement Bioassay for Nitrogen Deficiency in Phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 32: 213-219.

Morris *et al* (1971a) In: Mitchell, S. F. (1989). A Critical Evaluation of the Dark Amonium Enhancement Bioassay for Nitrogen Deficiency in Phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 32: 213-219.

Mussagy, A. (1990). A preliminary study of some physical, chemical and biological components of the Pequenos Libombos reservoir. Tese de Licenciatura. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Pearl e Ustach (1982). Blue-Green Algal Scums: An Explanation for Their O ccurrence During Freshwater Blooms. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Pearl, H. W., J. Tucker e P. T. Bland (1983). Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Reynolds, C. S. (1984). The Ecology of Freshwater Phytoplankton, 384 pp. Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.

Robarts e Zohary (1987). Temperature effects on Photosynthetic Capacity, Respiration, and Growth Rates of Bloom-forming Cyanobacteria. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Salisbury, F. B. e C. W. Ross (1985). Plant Physiology. Third Edition, 540 pp. California, Wadsworth Publishing Company.

Scott, W. E., D. J. Barlow e J. H. Hauman (1981). Studies on the Ecology, Growth and Physiology Toxic *Microcystis aeruginosa* in South Africa. The Water Environment: Algal Toxins and Health. 49-68.

Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. (1987). Introduction to Biostatistics. Second Edition, 363 pp. New York, W. H. Freeman and Company.

Talling, J. F. (1976). The Annual Cycle of Stratification and Phytoplankton Growth in Lake Victoria. In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Van Liere e Mur (1986). In: Shapiro, J. (1990). Current Beliefs Regarding Dominance by Blue-Greens: The Case For The Importance of CO<sub>2</sub> and pH. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 38-54.

Ward, A. K. e R. G. Wetzel (1980). Interactions of Light and Nitrogen Source Among Planktonic Blue-Green Algae. In: Kappers, F. I. (1984). On Population Dynamics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Academisch Proefschrift, Amsterdam.

Wetzel, R. G. (1983). Limnology, Second Edition, 767 pp. Philadelphia, Saunders College Publishing.

Yagi, O., M. Okada, R. Sudo, T. Hagiwara e Y. Takamura (1981). Growth Characteristics of *Microcystis*. In: Kappers, F. I. (1984). On Population Dynamics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Academisch Proefschrift, Amsterdam.

Zevenboom, W., A. F. Post e L. R. Mur (1982). Effects of Growth and Photosynthesis of *Microcystis aeruginosa*; A Comparison with *Aphanizomenon* and *Oscillatoria*. In: Kappers, F. I. (1984). On Population Dynamics of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Academisch Proefschrift, Amsterdam.

## ANEXO 1

Figura 1: Uma colônia de *Microcystis aeruginosa*

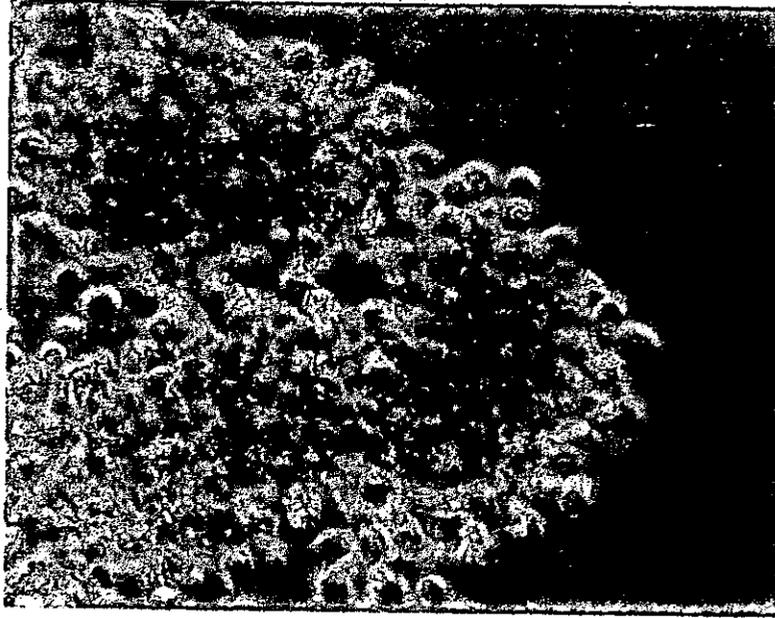
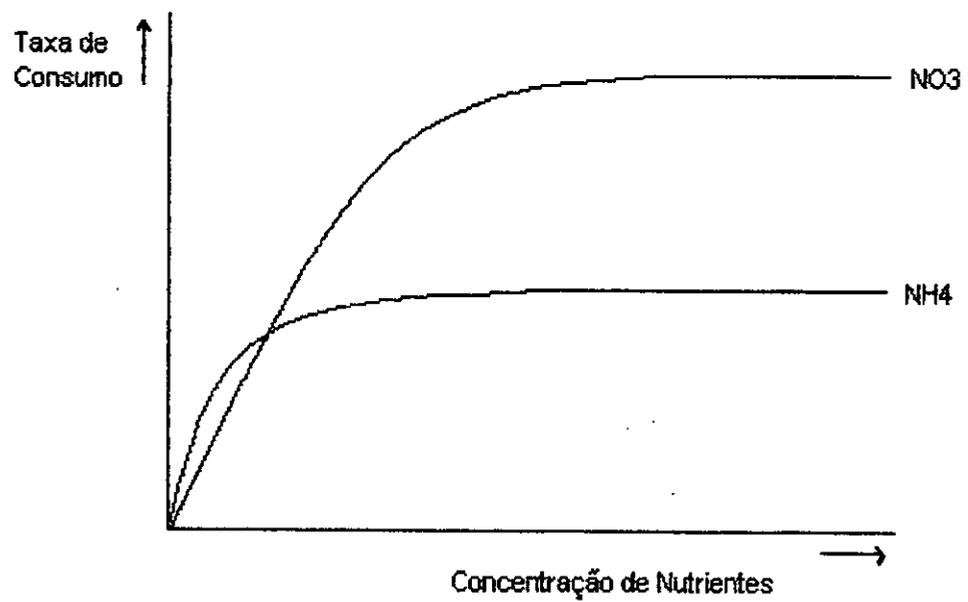


Figura 2: Modelo da relação Concentração de nutrientes X Taxa de Consumo (fonte: comunicação pessoal).



## ANEXO 2

Tabela 1 : Disposição dos frascos na mesa de crescimento.

1 - C <sub>1</sub>	5 - T <sub>2,3</sub>	9 - T <sub>1,3</sub>
2 - T <sub>2,4</sub>	6 - T <sub>2,2</sub>	10 - C <sub>2</sub>
3 - C <sub>3</sub>	7 - T <sub>1,1</sub>	11 - T <sub>1,2</sub>
4 - T <sub>1,4</sub>	8 - T <sub>2,1</sub>	12 - C <sub>4</sub>

Legenda: Os números de 1 a 12 indicam os lugares da mesa onde ficarão os frascos e as letras indicam as designações dos frascos (C<sub>1,2,3,4</sub> são os frascos control - meio básico mais nitrato; T<sub>1,1,1,2,1,3,1,4</sub> são os frascos do tratamento 1 - meio básico mais amónia; T<sub>2,1,2,2,2,3,2,4</sub> são os frascos do tratamento 2 - meio básico mais nitrogénio combinado).

### ANEXO 3

#### Descrição do Cálculo do Biovolume

A ocular apresentava-se dividida em quadrados para permitir a contagem das colónias.

Em cada quadrado cabe uma média de 80 células.

Foram utilizadas câmaras de 5 ml.

Num campo com 400x de ampliação e com uma câmara de 5 ml obtem-se um volume de  $20 \cdot 10^{-6}$  (Comunicação Pessoal).

Para cada amostra foram contados 10 campos alternadamente, nos quais se contaram X quadrados.

10 campos	-----	X quadrados
1 campo	-----	$\bar{x}$ quadrados

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células por litro} = \frac{\bar{x} \cdot 80}{20 \cdot 10^{-6}} = Z \cdot 10^6 \text{ cel/l}$$

$$\text{Biovolume} = Z \cdot 10^6 \cdot 128 \mu\text{m}^3 = N \mu\text{m}^3/\text{l} \cdot 10^6$$

$$(N \mu\text{m}^3/\text{l} \cdot 10^6)/10^9 = N \text{ mg/l}$$

## ANEXO 4

Tabela com os valores da concentração da clorofila para as réplicas (dados brutos).

TRATAMENTO	TEMPO	RÉPLICA	CONC.CLORF. (µg/l)
------------	-------	---------	-----------------------

1	1	1	107,12
1	1	2	92,76
1	1	3	95,70
1	2	1	253,65
1	2	2	371,76
1	2	3	261,29
1	3	1	583,30
1	3	2	998,22
1	3	3	618,40
1	4	1	859,48
1	4	2	848,78
1	4	3	869,86
1	5	1	908,86
1	5	2	1430,12
1	5	3	752,24
1	6	1	1049,59
1	6	2	1380,28
1	6	3	921,36
1	7	1	1180,92
1	7	2	1711,64
1	7	3	1137,18

2	1	1	81,80
2	1	2	64,48
2	1	3	113,27
2	2	1	88,54
2	2	2	193,53
2	2	3	185,84
2	3	1	236,49
2	3	2	320,03
2	3	3	244,54
2	4	1	339,22
2	4	2	331,41
2	4	3	365,10
2	5	1	513,82
2	5	2	636,44
2	5	3	442,32
2	6	1	481,68
2	6	2	752,93
2	6	3	480,06
2	7	1	653,54
2	7	2	1047,42
2	7	3	826,69

3	1	1	86,68
3	1	2	93,87
3	1	3	99,86
3	2	1	226,71
3	2	2	220,96
3	2	3	148,62
3	3	1	494,36
3	3	2	452,33
3	3	3	331,80
3	4	1	405,98
3	4	2	379,73
3	4	3	440,60
3	5	1	536,38
3	5	2	509,27
3	5	3	556,79
3	6	1	590,99
3	6	2	546,16
3	6	3	575,58
3	7	1	958,51
3	7	2	620,44
3	7	3	901,67

## ANEXO 5

### Apresentação das Tabelas da Análise de Regressão Para a Clorofila

Tabela 1: Análise de Regressão Para o Tratamento com Nitrato.

Regressão Estatística						
Múltiplo R	0,897067745					
Quadrado de R	0,804730539					
Quadrado de R Ajustado	0,794453199					
Erro Padrão	209,8976112					
Observações	21					

ANOVA					
	GL	SQ	MQ	F	Significância F
Regressão	1	3449727,163	3449727,163	78,30144133	3,6321E-08
Residual	19	837083,1364	44057,00718		
Total	20	4286810,299			

	Coeficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Mínimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	-28,11095238	102,419547	-0,274468626	0,786686568	-242,4775946	186,2556898
X Variável 1	202,6528571	22,90170694	8,848810164	3,6321E-08	154,7190187	250,5866955

Tabela 2: Análise de Regressão Para o Tratamento com Amónia.

Regressão Estatística						
Múltiplo R	0,923072307					
Quadrado de R	0,852062484					
Quadrado de R Ajustado	0,844276299					
Erro Padrão	105,2324672					
Observações	21					

ANOVA					
	GL	SQ	MQ	F	Significância F
Regressão	1	1211842,639	1211842,639	109,4326015	2,53416E-09
Residual	19	210403,571	11073,87216		
Total	20	1422246,209			

	Coeficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Mínimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	-80,4852381	51,34818622	-1,567440722	0,133515595	-187,9582604	26,9877842
X Variável 1	120,1111905	11,48180349	10,46100385	2,53416E-09	96,07949212	144,1428888

Tabela 3: Análise de Regressão Para o Tratamento com Nitrogénio Combinado.

Regressão Estatística	
Múltiplo R	0,930568058
Quadrado de R	0,86595691
Quadrado de R Ajustado	0,85890201
Erro Padrão	90,18465779
Observações	21

**ANOVA**

	GL	SQ	MQ	F	Significância F
Regressão	1	998322,3054	998322,3054	122,7454638	9,8577E-10
Residual	19	154532,1775	8133,272501		
Total	20	1152854,483			

	Coefficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Mínimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	0,944285714	44,00560706	0,021458304	0,983103817	-91,160537	93,04910843
X Variável 1	109,017381	9,839952877	11,07905519	9,8577E-10	88,42211649	129,6126454

GL: Graus de Liberdade

SQ: Soma dos Quadrados

MQ: Média dos Quadrados

## ANEXO 6

Apresentação dos Cálculos para Verificação das Diferenças Entre os Tratamentos em Relação à Clorofila (Fowler e Cohen, 1990).

Equação para o tratamento com nitrato (N):  $Y = 202,65X - 28,11$

Equação para o tratamento com amônia (A):  $Y = 120,11X - 80,48$

Equação para o tratamento com nitrogênio combinado (NA):  $Y = 109,01X + 0,9$

1. Cálculo da diferença entre os tratamentos nitrato e amônia (N - A).

$$b_N = -28,11 \quad \text{E.P. } b_N = 102,41$$

$$b_A = -80,48 \quad \text{E.P. } b_A = 51,34$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_N$  e  $b_A$

$$(b_N - b_A) = -28,11 - (-80,48) = 52,37$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$\text{E.P. } (b_N - b_A) = \sqrt{\text{E.P. } b_N^2 + \text{E.P. } b_A^2} = \sqrt{102,41^2 + 51,34^2} = 114,55$$

Passo 3: Estimativa de  $t$

$$t = (b_N - b_A) / \text{E.P. } (b_N - b_A) = 52,37 / 114,55 = 0,45$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$\text{g.l.} = (n_N - 2) + (n_A - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

$$t_{\text{tabela}} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{\text{tabela}} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de  $t$  calculado é menor que o valor de  $t$  da tabela para os dois níveis de significância.

2. Cálculo da diferença entre os tratamentos nitrato e nitrogênio combinado (N - NA).

$$b_N = -28,11 \quad \text{E.P. } b_N = 102,41$$

$$b_{NA} = 0,94 \quad \text{E.P. } b_{NA} = 44,00$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_N$  e  $b_{NA}$

$$(b_N - b_{NA}) = -28,11 - (0,94) = -29,05$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$\text{E.P. } (b_N - b_{NA}) = \sqrt{\text{E.P. } b_N^2 + \text{E.P. } b_{NA}^2} = \sqrt{102,41^2 + 44,00^2} = 111,46$$

Passo 3: Estimativa de t

$$t = (b_N - b_{NA}) / \text{E.P. } (b_N - b_{NA}) = -29,05 / 111,46 = -0,26$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$\text{g.l.} = (n_N - 2) + (n_{NA} - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

$$t_{\text{tabela}} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{\text{tabela}} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de t calculado é menor que o valor de t da tabela para os dois níveis de significância.

3. Cálculo da diferença entre os tratamentos amônia e nitrogénio combinado (N - NA).

$$b_A = - 80, 48$$

$$E.P.b_A = 51,34$$

$$b_{NA} = 0.94$$

$$E.P.b_{NA} = 44,00$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_A$  e  $b_{NA}$

$$(b_A - b_{NA}) = - 80, 48 - 0.94 = - 81,42$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$E.P. (b_A - b_{NA}) = \sqrt{E.P.b_A^2 + E.P.b_{NA}^2} = \sqrt{51,34^2 + 44,00^2} = 67,61$$

Passo 3: Estimativa de t

$$t = (b_A - b_{NA}) / E.P.(b_A - b_{NA}) = - 81,42 / 67,61 = -1,20$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$g.l. = (n_N - 2) + (n_{NA} - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

$$t_{tabela} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{tabela} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de t calculado é menor que o valor de t da tabela para os dois níveis de significância.

## ANEXO 7

Tabela com os valores da concentração do biovolume para as réplicas (dados brutos).

TRATAMENTO	TEMPO	RÉPLICA	BIOV. (mg/l)
1	1	1	7,17
1	1	2	7,81
1	1	3	11,01
1	2	1	28,16
1	2	2	48,90
1	2	3	57,34
1	3	1	101,89
1	3	2	115,33
1	3	3	124,42
1	4	1	128,51
1	4	2	112,13
1	4	3	130,69
1	5	1	162,82
1	5	2	150,02
1	5	3	161,79
1	6	1	233,98
1	6	2	202,75
1	6	3	251,90
1	7	1	297,98
1	7	2	246,27
1	7	3	279,04

2	1	1	7,42
2	1	2	9,98
2	1	3	3,20
2	2	1	20,99
2	2	2	57,86
2	2	3	20,48
2	3	1	59,90
2	3	2	60,42
2	3	3	67,07
2	4	1	92,16
2	4	2	64,51
2	4	3	70,66
2	5	1	147,97
2	5	2	87,04
2	5	3	79,36
2	6	1	129,02
2	6	2	128,51
2	6	3	76,80
2	7	1	138,24
2	7	2	144,13
2	7	3	147,46

3	1	1	3,84
3	1	2	6,91
3	1	3	13,70
3	2	1	38,91
3	2	2	48,38
3	2	3	81,41
3	3	1	35,33
3	3	2	74,24
3	3	3	86,02
3	4	1	60,42
3	4	2	80,38
3	4	3	92,16
3	5	1	113,63
3	5	2	109,57
3	5	3	115,20
3	6	1	181,76
3	6	2	107,01
3	6	3	185,86
3	7	1	94,21
3	7	2	202,37
3	7	3	288,77

## ANEXO 8

### Apresentação das tabelas da Análise de Regressão Para o Biovolume

Tabela 1: Análise de Regressão Para o Tratamento com Nitrato.

Regressão Estatística						
Múltiplo R	0,977841856					
Quadrado de R	0,956174695					
Quadrado de R Ajustado	0,9538681					
Erro Padrão	19,47083789					
Observações	21					
ANOVA						
	GL	SQ	MQ	F	Significância F	
Regressão	1	157157,5265	157157,5265	414,5394842	2,30158E-14	
Residual	19	7203,157037	379,1135283			
Total	20	164360,6835				
ANOVA						
	Coeficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Mínimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	-36,83047619	9,50079606	-3,876567391	0,00101574	-56,71587706	-16,94507532
X Variável 1	43,25416667	2,124442583	20,36024273	2,30158E-14	38,80765586	47,70067748

Tabela 2: Análise de Regressão Para o Tratamento com Amónia.

Regressão Estatística						
Múltiplo R	0,925313474					
Quadrado de R	0,856205026					
Quadrado de R Ajustado	0,848636869					
Erro Padrão	18,71762987					
Observações	21					
ANOVA						
	GL	SQ	MQ	F	Significância F	
Regressão	1	39635,95963	39635,95963	113,1325736	1,9307E-09	
Residual	19	6656,643694	350,3496681			
Total	20	46292,60332				
ANOVA						
	Coeficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Mínimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	-10,07095238	9,13326818	-1,102666886	0,283943428	-29,18710832	9,045203554
X Variável 1	21,7222619	2,042260851	10,63637972	1,9307E-09	17,44775949	25,99676432

Tabela 3: Análise de Regressão Para o Tratamento com Nitrogénio Combinado.

Regressão Estatística	
Multiplo R	0,842600854
Quadrado de R	0,709976198
Quadrado de R Ajustado	0,694711788
Erro Padrão	38,99419361
Observações	21

ANOVA

	GL	SQ	MQ	F	Significância F
Regressão	1	70723,48234	70723,48234	46,51186451	1,64529E-06
Residual	19	28890,39557	1520,547135		
Total	20	99613,87791			

	Coefficientes	Erro Padrão	t Estatístico	Valor de P	Minimo 95%	Máximo 95%
Intersecção	-19,87095238	19,02721819	-1,044343539	0,309432373	-59,69539012	19,95348536
X Variável 1	29,01630952	4,25461533	6,819960741	1,64529E-06	20,11129453	37,92132452

GL: Graus de Liberdade

SQ: Soma dos Quadrados

MQ: Média dos Quadrados

## ANEXO 9

Apresentação dos Cálculos para Verificação das Diferenças Entre os Tratamentos em Relação ao Biovolume (Fowler e Cohen, 1990).

Equação para o tratamento com nitrato (N):  $Y = 43,25X - 36,83$

Equação para o tratamento com amônia (A):  $Y = 21,72X - 10,07$

Equação para o tratamento com nitrogênio combinado (NA):  $Y = 29,01X - 19,87$

1. Cálculo da diferença entre os tratamentos nitrato e amônia (N - A).

$$b_N = -36,83 \quad \text{E.P. } b_N = 9,50$$

$$b_A = -10,07 \quad \text{E.P. } b_A = 9,13$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_N$  e  $b_A$

$$(b_N - b_A) = -36,83 - (-10,07) = -26,76$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$\text{E.P. } (b_N - b_A) = \sqrt{\text{E.P. } b_N^2 + \text{E.P. } b_A^2} = \sqrt{9,50^2 + 9,13^2} = 13,17$$

Passo 3: Estimativa de t

$$t = (b_N - b_A) / \text{E.P. } (b_N - b_A) = -26,76 / 13,17 = -2,03$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$\text{g.l.} = (n_N - 2) + (n_A - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

$$t_{\text{tabela}} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{\text{tabela}} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de t calculado é menor que o valor de t da tabela para os dois níveis de significância.

2. Cálculo da diferença entre os tratamentos nitrato e nitrogênio combinado (N - NA).

$$b_N = -36,83$$

$$E.P.b_N = 9,50$$

$$b_{NA} = -19,87$$

$$E.P.b_{NA} = 19,02$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_N$  e  $b_{NA}$

$$(b_N - b_{NA}) = -36,83 - (-19,87) = -16,96$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$E.P. (b_N - b_{NA}) = \sqrt{E.P.b_N^2 + E.P.b_{NA}^2} = \sqrt{9,50^2 + 19,02^2} = 21,26$$

Passo 3: Estimativa de t

$$t = (b_N - b_{NA}) / E.P.(b_N - b_{NA}) = -16,96 / 21,26 = -0,797$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$g.l. = (n_N - 2) + (n_{NA} - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

$$t_{tabela} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{tabela} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de t calculado é menor que o valor de t da tabela para os dois níveis de significância.

3. Cálculo da diferença entre os tratamentos amônia e nitrogénio combinado (N - NA).

$$\begin{array}{ll} b_A = - 10,07 & \text{E.P. } b_A = 9,13 \\ b_{NA} = - 19,87 & \text{E.P. } b_{NA} = 19,02 \end{array}$$

Passo 1: Obtenção da diferença entre  $b_A$  e  $b_{NA}$

$$(b_A - b_{NA}) = - 10,07 - (-19,87) = - 29,94$$

Passo 2: Obtenção do erro padrão (E.P.) da diferença obtida no passo 1

$$\text{E.P. } (b_A - b_{NA}) = \sqrt{\text{E.P. } b_A^2 + \text{E.P. } b_{NA}^2} = \sqrt{9,13^2 + 19,02^2} = 21,09$$

Passo 3: Estimativa de t

$$t = (b_A - b_{NA}) / \text{E.P.}(b_A - b_{NA}) = - 29,94 / 21,09 = - 1,42$$

Passo 4: Cálculo dos graus de liberdade (g. l.)

$$\text{g.l.} = (n_N - 2) + (n_{NA} - 2) = (21 - 2) + (21 - 2) = 38$$

Passo 5: Consulta do apêndice 2 de Fowler e Cohen (1990) a 38 g. l.

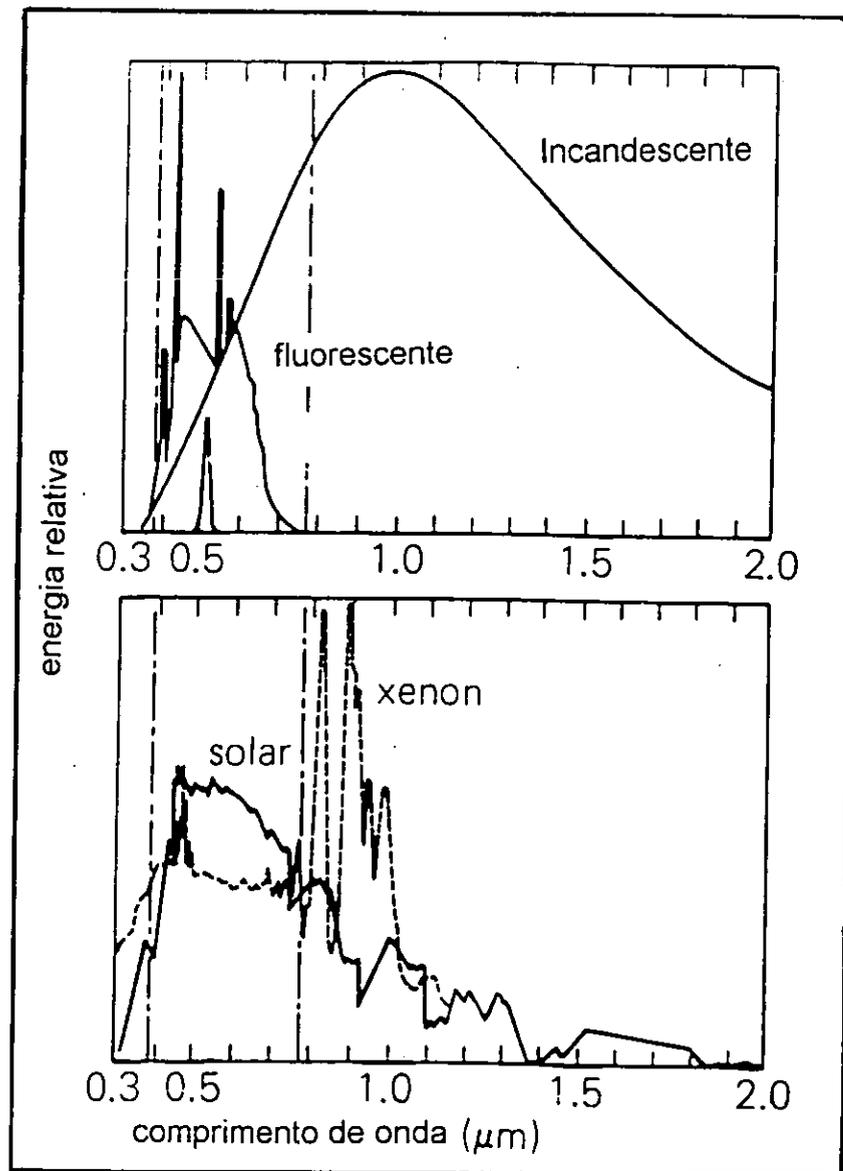
$$t_{\text{tabela}} = 1,697 \text{ ao nível de significância de } 0,01$$

$$t_{\text{tabela}} = 2,042 \text{ ao nível de significância de } 0,05$$

Conclusão: não há diferenças significativas entre os dois tratamentos uma vez que valor de t calculado é menor que o valor de t da tabela para os dois níveis de significância.

ANEXO 10

FIGURA1: Espectros de emissão para várias fontes.



(A partir de Salisbury e Ross (1985)).