

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO BACTÉRIAS-MACROALGAS
EM AMBIENTE MARINHO E DO SEU POTENCIAL USO
NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO AMBIENTAL**

MARIA CRISTINA DA SILVA MAURAT

Orientadora: D^{ra}. Odete Rocha

**Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências.**

São Carlos

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M453aa

Maurat, Maria Cristina da Silva.

.....Análise da associação bactéria-macroalgas em ambiente marinho e do seu potencial uso na avaliação ambiental / Maria Cristina da Silva Maurat. -São Carlos UFSCar, 2004.

151 p.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Biologia marinha. 2. Ecotoxicologia. 3. Bioindicadores. 4. Macroalgas. 5. Poluição marinha. 6. Associação Bactéria-alga. 7. *Champia parvula*. I. Título.

CDD: 574.92 (20ª)

As minhas amigas, *Cristina Falcão* e
Leila Kraus, pelo apoio para conclusão
deste trabalho.

Beira-Mar

(Zé Ramalho)

**Eu entendo a noite como um oceano
Que banha de sombras o mundo de sol
Aurora que luta por um arrebol
De cores vibrantes e ar soberano
Um olho que mira nunca o engano
Durante o instante que vou contemplar
Além, muito além onde quero chegar
Caindo a noite me lanço no mundo
Além do limite do vale profundo
Que sempre começa na beira do mar
É na beira do mar**

**Oi! Por dentro das águas há quadros e sonhos
E coisas que sonham o mundo dos vivos
Há peixes milagrosos, insetos nocivos
Paisagens abertas, desertos medonhos
Oi! Léguas cansativas, caminhos tristonhos
Que fazem o homem se desenganar
Há peixes que lutam para se salvar
Daqueles que caçam no mar revoltoso
E outros que devoram com gênio assombroso
As vidas que caem na beira do mar**

**E até que a morte eu sinta chegando
Prossigo cantando beijando o espaço
Além do cabelo que desembaraço
Invoco as águas a vir inundando
Pessoas e coisas que vão arrastando
Do meu pensamento já podem lavar
No peixe de asas eu quero voar
Sair do oceano de tez poluída
Cantar um galope fechando a ferida
Que só cicatriza na beira do mar**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Odete Rocha, minha orientadora e amiga, pela compreensão e amizade nos momentos mais difíceis, sem sua ajuda e apoio não teria conseguido. Muito obrigada por tudo.

À Mirian Crapez, minha co-orientadora, pelo incentivo, amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao Labtox - Laboratório de Análise Ambiental Ltda, pelo apoio financeiro e logístico para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, pelo apoio na realização deste estudo e pela amizade e atenção no período em que estive neste departamento.

À amiga (quase irmã) Marcia Reynier pelo apoio nos bons e maus momentos.

À grande amiga Cristina Falcão pela presença e carinho em todas as etapas destes 21 anos de amizade.

À Leila Kraus, que segurou a barra no Labtox para a finalização deste trabalho.

A toda equipe do Labtox, Néia, Carina, Desideria, Cristiane e Ana Luisa pela ajuda e apoio nos momentos complicados.

Ao Gustavo pela ajuda na coleta do material biológico.

Ao Marcelo Felício e Priscila R. da Silva pela amizade, alegria e ajuda nas coletas, no laboratório e na arrumação das fotos.

À Viviane Luiz, pela amizade, pelas fotos e por segurar a barra no laboratório nos feriados e fins de semana para que eu tivesse o tempo livre para trabalhar na tese.

À Darcy Maurat e Ana Maria Maurat pelo apoio e carinho em todos os momentos. Amo vocês. Agora com certeza poderemos curtir mais a casa da Ilha.

À amiga Graça Bispo pela amizade, dicas e ajuda na leitura das bactérias.

Ao Rafael pela confecção das fotos das algas.

Ao Fabio de Oliveira da Petrobras / CENPES pela ajuda nas horas de sufoco.

À Cristina pela ajuda e atenção dispensada no preparo das soluções de nutrientes.

Ao amigo Carlos, pela ajuda na impressão e encadernação do trabalho.

À Millipore, em especial ao Sebastião pela ajuda na obtenção dos filtros para contagem das bactérias.

À Renata Bampi pela ajuda na obtenção das referências bibliográficas.

À equipe do Laboratório de Hidrobiologia da UFRJ, pela atenção e auxílio na análise das amostras de nutrientes.

À equipe do Laboratório de Microbiologia da UFF pela atenção, carinho e ajuda inestimável.

Aos amigos Mario Sérgio e Marcia Leite, que sempre estiveram por perto levantando o astral. Agora teremos mais tempo para o chopp.

Aos amigo da UFSCAR, pelos bons momentos durante o período em que estive em São Carlos, em especial a Ana Cristina Marroquim e Alexandre Bittar.

Ao Zé pela inspiração.

Ao Gildo pela tranqüilidade.

Ao Armando pelo companheirismo durante as madrugadas.

SUMÁRIO

- Lista de figuras.....	i
- Lista de tabelas.....	v
- Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
- Lista de símbolos.....	ix
- Resumo.....	xi
- Abstract.....	xiii
<i>1 - INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
1.1 - <i>Objetivos.....</i>	<i>5</i>
<i>2- METODOLOGIA.....</i>	<i>7</i>
2.1 - Primeira etapa: Avaliação da biomassa bacteriana adsorvida ao talo de seis espécies de algas marinhas bentônicas.....	8
2.1.1 - Área de estudo.....	8
2.1.2 - Macroalgas provenientes do campo.....	10
2.1.3 - Coleta e avaliação da biomassa bacteriana no perifiton das seis espécies de macroalgas.....	14
2.1.4 - Avaliação da biomassa bacteriana na coluna d'água e no sedimento.....	15
2.1.5 - Cálculo da biomassa bacteriana.....	16
2.2 - Segunda etapa: Exposição de <i>Champia parvula</i> a diferentes combinações de fatores: concentrações de nitrato e fosfato, concentrações de zinco e presença ou ausência de bactérias.....	17
2.2.1 - <i>Champia parvula</i>	17
2.2.1.1 - Características biológicas da espécie.....	17
2.2.1.2 - Cultivo em laboratório.....	18
2.2.2 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> a três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.....	21

2.2.3 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> a concentrações de nutrientes correspondentes a três níveis de trofia (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico) e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.....	23
2.2.4 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> em meios enriquecidos com nitrato e fosfato e concentrações de zinco, separadamente, com e sem a presença de bactérias.....	26
2.2.5 - Concentrações de nitrato e fosfato.....	26
2.2.5.1 - Solução estoque de Nitrato ($N-NO_3^- = 10 \text{ mM}$).....	26
2.2.5.2 - Solução estoque de Fosfato ($P-PO_4^{3-} = 10 \text{ mM}$).....	27
2.2.6 - Concentrações de zinco.....	28
2.2.7 - Mistura Nitrato/fosfato/zinco.....	28
2.2.8 - Variáveis físicas e químicas.....	30
2.2.9 - Análise estatística dos dados.....	30
3- RESULTADOS.....	32
3.1 - Avaliação da biomassa bacteriana adsorvida ao talo de algas marinhas na Praia da baleia (área controle) e na Praia de Boa Viagem (área impactada).....	32
3.2 - Crescimento de <i>Champia parvula</i> exposta a diferentes combinações de fatores: concentrações de nitrato e fosfato e concentrações de zinco, com e sem presença de bactérias.....	37
3.2.1- Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i> exposta em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.....	37
3.2.2 - Mortalidade dos talos de <i>Champia parvula</i> em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.....	39
3.2.3 - Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i> em três níveis de trofia (oligotróficos) com a presença de bactérias (Teste de referência preliminar)	41

3.2.4 - Mortalidade dos talos de <i>Champia parvula</i> em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.....	42
3.2.5 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> em concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente eutrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.....	43
3.2.5.1 - Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i>	44
3.2.5.2 - Mortalidade do talo de <i>Champia parvula</i>	46
3.2.6 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> a concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente mesotrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.....	47
3.2.6.1 - Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i>	47
3.2.6.2 - Mortalidade do talo de <i>Champia parvula</i>	49
3.2.7 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> a concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente oligotrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.....	50
3.2.7.1- Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i>	50
3.2.7.2 - Mortalidade do talo de <i>Champia parvula</i>	52
3.2.8 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> em meios enriquecidos com nitrato e fosfato, com e sem a presença de bactérias (testes de referência).....	55
3.2.8.1- Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i>	55
3.2.8.2- Mortalidade do talo de <i>Champia parvula</i>	57
3.2.9 - Exposição dos talos de <i>Champia parvula</i> em meios enriquecidos com zinco, com e sem a presença de bactérias (testes de referência).....	60
3.2.9.1 - Taxa de crescimento do talo de <i>Champia parvula</i>	60
3.2.9.2 - Mortalidade do talo de <i>Champia parvula</i>	63
3.2.10 - Biomassa bacteriana.....	64

3.2.10.1-	Biomassa bacteriana aderida ao talo de <i>Champia parvula</i> ...	64
3.2.10.1.1	- Ambiente Eutrófico.....	64
3.2.10.1.2	- Ambiente Mesotrófico.....	65
3.2.10.1.3	- Ambiente Oligotrófico.....	66
3.2.10.1.4	- Experimentos com Nitrato e Fosfato (Testes de referência).....	67
3.2.10.1.5	- Experimentos com zinco.....	68
3.2.10.2	- Biomassa bacteriana disponível na coluna d'água.....	69
3.2.10.2.1	- Ambiente Eutrófico.....	69
3.2.10.2.2	- Ambiente Mesotrófico	70
3.2.10.2.3	- Ambiente Oligotrófico.....	71
3.2.10.2.4	- Experimentos com Nitrato e Fosfato (Testes de referência).....	72
3.2.10.2.5	- Experimentos com zinco.....	73
3.2.11	- Análise físico e química.....	75
4	- <i>DISCUSSÃO</i>	76
5	- <i>CONCLUSÕES</i>	90
6	- <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	92
7	- <i>ANEXOS</i>	102

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Localização das estações de coleta na Baía de Guanabara.....09
- Figura 2: Espécies de algas marinhas bentônicas utilizadas no estudo.....12
- Figura 3: Cultivo de *Champia parvula* (C. Agardh) Harvey em laboratório.....20
- Figura 4: Delineamento dos experimentos preliminares com *Champia parvula* que avaliaram, três níveis de trofia (oligotrofia) em combinação com concentrações de zinco, com a presença de bactérias.....29
- Figura 5: Delineamento dos experimentos com *Champia parvula* que avaliaram, três níveis de trofia (oligotrófico, mesotrófico e eutrófico) em combinação com concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....31
- Figura 6: Biomassa bacteriana, na coluna d'água, sedimento e macroalgas na Praia da Baleia (área controle).....34
- Figura 7: Biomassa bacteriana, na coluna d'água, sedimento e macroalgas na Praia de Boa Viagem (área impactada).....35
- Figura 8: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes combinações de concentrações de nitrato e fosfato, simulando ambiente oligotrófico, associadas a presença de zinco, com a presença de bactérias.....39
- Figura 9: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com a presença de bactérias.....42

- Figura 10: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, com e sem a presença de bactérias.....45
- Figura 11: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente mesotrófico, com e sem a presença de bactérias.....48
- Figura 12: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com e sem a presença de bactérias.....51
- Figura 13: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, em combinação com zinco, com a presença de bactérias.....54
- Figura 14: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, em combinação com zinco, sem a presença de bactérias.....54
- Figura 15: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, com a presença de bactérias.....58
- Figura 16: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, sem a presença de bactérias.....59

- Figura 17: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, com a presença de bactérias.
.....61
- Figura 18: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, sem a presença de bactérias.
.....62
- Figura 19: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *Champia parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, com as diferentes combinações de zinco.....65
- Figura 20: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *Champia parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente mesotrófico, com as diferentes combinações de zinco.....66
- Figura 21: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *Champia parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com as diferentes combinações de zinco.....67
- Figura 22: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *Champia parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico.....68
- Figura 23: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *Champia parvula* submetidos às concentrações de zinco.....69
- Figura 24: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente eutrófico.....70

Figura 25: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente mesotrófico.....	71
Figura 26: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente oligotrófico.....	72
Figura 27: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, mesotrófico e oligotrófico.....	73
Figura 28: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações de zinco.....	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Diferentes concentrações de nitrato e fosfato, referente a ambientes oligotróficos utilizadas na primeira série de experimentos e a razão nitrogênio/fósforo correspondente.....23
- Tabela 2: Concentrações de nitrato e fosfato, referentes a ambientes marinhos oligotróficos, mesotróficos e eutróficos, utilizadas na segunda série de experimentos.....24
- Tabela 3: Valores de biomassa bacteriana e número total de células bacterianas adsorvidas aos talos de diferentes espécies de macroalgas, por contagem direta em microscópio de epifluorescência.....33
- Tabela 4: Valores de biomassa bacteriana e número total de células bacterianas no sedimento e na coluna d'água, obtidos por contagem direta em microscópio de epifluorescência.....36
- Tabela 5: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato e zinco, com a presença de bactérias.....37
- Tabela 6: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações referentes a ambientes oligotróficos associadas a diferentes concentrações de zinco.....40
- Tabela 7: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato, com a presença de bactérias.....41

- Tabela 8: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* expostos a diferentes concentrações de nitrato e fosfato, equivalentes a ambientes oligotróficos, sem o acréscimo de zinco.....43
- Tabela 9: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a concentrações de ambiente eutrófico, com e sem a presença de bactérias.....45
- Tabela 10: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente eutrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....46
- Tabela 11: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a concentrações de ambiente mesotrófico, com e sem a presença de bactérias.....48
- Tabela 12: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente mesotrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....49
- Tabela 13: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle dos talos de *C. parvula* submetidos a concentrações de ambiente oligotrófico, com e sem a presença de bactérias.....51
- Tabela 14: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente oligotrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....52

- Tabela 15: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato, com e sem a presença de bactérias.....56
- Tabela 16: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações referentes a ambientes eutróficos, mesotróficos e oligotróficos, sem o acréscimo de zinco, com e sem a presença de bactérias....57
- Tabela 17: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *C.parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....61
- Tabela 18: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com diferentes concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.....63
- .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CECA - Comissão Estadual de Controle Ambiental

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

DP - Desvio padrão

EPA - U. S. Environmental Protection Agency

FEEMA - Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente

NT - Norma Técnica

OD - Oxigênio dissolvido

PES - Provasoli enriched seawater

LISTA DE SÍMBOLOS

Zn – Zinco

P-PO₄³⁻ – Ortofosfato

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Hz – Hertz

ZnSO₄.7H₂O – Sulfato de zinco heptahidratado

KNO₃ – Nitrato de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

N-NO₃⁻ - Nitrato

mL - mililitro

mL.L⁻¹ – Mililitro por litro

g – grama

mg.L⁻¹ – Miligrama por litro

mg/L – Miligrama por litro

mg.Zn.L⁻¹ – Miligrama de zinco por litro

µgC.cm⁻³ – Micrograma de carbono por centímetro cúbico

M – Molar

mM – Milimolar

µM – Micromolar

µm – Micrômetro

µg.L⁻¹ – Micrograma por litro

m³/s – Metro cúbico por segundo

g.L⁻¹ – Grama por litro

N/P – Razão nitrogênio / fósforo

‰ – Partes por mil

% - Porcentagem

°C – Grau centígrado

rpm – Rotação por minuto

> - maior do que

RESUMO

Nas áreas costeiras um aumento na quantidade de nutrientes, particularmente nitrogênio e fósforo, tem levando à eutrofização com alterações pronunciadas nos ecossistemas. O enriquecimento por nutrientes nos ambientes costeiros é freqüentemente acompanhado pela entrada de poluentes, como os metais pesados. A utilização de macroalgas e de bactérias heterótrofas para diagnósticos ambientais abordando as alterações causada pela interação de nutrientes e metais pesados, tem mostrado ser uma ferramenta eficiente fornecendo informações altamente relevantes para o controle da poluição. O presente estudo teve como objetivos comparar a biomassa bacteriana presente na coluna d'água e aderida ao talo de macroalgas e ao sedimento da Praia da Baleia, Angra dos Reis/RJ (região controle) e da Praia de Boa Viagem, Niterói/RJ (região impactada) que tem como principal impacto o aporte de esgoto doméstico, e avaliar os efeitos da eutrofização associados a diferentes concentrações de zinco em *Champia parvula* e na microbiota acompanhante, através de experimentos de laboratório. A biomassa bacteriana foi determinada por filtração em membrana nuclepore, por desagregação com agitação mecânica e por sonificação. Os experimentos de laboratório foram crônicos, semi-estáticos, com renovação da solução teste a cada 72 horas e tiveram duração de 15 dias. Foram realizados experimentos em que a biomassa bacteriana natural presente na coluna d'água e na macroalga foi mantida e experimentos em que esta biomassa bacteriana foi removida pela aplicação de antibiótico. Ao término dos experimentos a taxa de crescimento, a mortalidade e a alteração morfológica das frondes da macroalga, nas diferentes concentrações de nutrientes e zinco, foram avaliadas e comparadas com o controle (meio padrão). A biomassa bacteriana, nos

testes de laboratório, foi avaliada na coluna d'água e nos talos da macroalga no início e após 72 horas de experimentação. Os maiores valores estimados de biomassa bacteriana das amostras de água, sedimento e macroalgas foram observados na Praia de Boa Viagem. A avaliação da biomassa bacteriana nos diferentes substratos indicou uma relação direta com o estado trófico do ambiente, sendo registrados nas amostras de água ($0,198 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$), sedimento ($1,29 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$) e macroalgas ($0,038 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$) da área impactada, valores superiores ao da área controle. Nos experimentos de laboratório, as concentrações de zinco e dos nutrientes interferiram no crescimento, mortalidade e morfologia de *C. parvula* e, assim como os macronutrientes, as bactérias influenciaram a acumulação de zinco pela macroalga, afetando o seu crescimento.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; bioindicadores; associação bactéria-alga; macroalgas; poluição marinha; *Champia parvula*.

ABSTRACT

In the last decades the increase in the amount of nutrients, particularly nitrogen and phosphorus, introduced into the sea, has brought an accelerated eutrophication of the coastal marine ecosystems, and great changes in water, sediment and biotic communities. Nutrient enrichment is usually associated to other pollutants, as the heavy metals. The use of macroalgae and heterotrophic bacteria has been considered an efficient tool in environmental diagnosis when focusing these two types of pollution. The aim of the present study was to compare the biomass of bacteria in the water column, attached to the macroalgae and in the sediment of Praia da Baleia (Angra dos Reis/RJ), a region used as control and of Praia de Boa Viagem (Niterói/RJ), a region where the main impact is from domestic sewage effluents evaluating the effect of the eutrophication associated to different concentrations of zinc on *Champia parvula* and accompanying microorganisms by using laboratory experimentation. Methods involved filtration of samples on nuclepore filters, detachment of bacteria by mechanical shaking and ultrasounding, then cell enumeration by epifluorescence and the use of conversion factors to calculate biomass as organic carbon. The highest bacteria biomass in the water, sediment and macroalgae was obtained for in Praia de Boa Viagem. The evaluation of bacteria biomass in different substrates has shown a direct correlation with the trophic state of the environment, with mean values of $0,198 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ in the water; of $1,29 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ in sediment and $0,038 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$ in the macroalgae at the area impacted, values higher than those found in the control area. Chronic and semi-estatic toxicity tests were also performed along 15 days in order to determine growth rates, mortality, and morphological changes in the fronds of the macroalgae *Champia parvula*, grown on different combinations of nutrients levels, zinc concentrations and presence or absence of bacteria. Laboratory experiments evidenced that zinc and nutrient concentrations interfere with growth, mortality and morphology of *C. parvula* and also that macronutrients and bacteria probably influenced the accumulation of zinc by the macroalgae, thus influencing its growth.

Key-words: Ecotoxicology; bioindicators; bacteria-algae association; macroalgae; marine pollution; *Champia parvula*.

1 - INTRODUÇÃO

A intensa poluição, à qual têm sido submetidos os ecossistemas costeiros marinhos, tem prejudicado a pesca comercial, provocado a destruição dos manguezais, acarretando o assoreamento de inúmeras áreas e conseqüentemente a perda da qualidade de água, trazendo prejuízos econômicos e danos ecológicos severos.

A poluição orgânica, caracterizada por efluentes com altos teores de carbono, nitrogênio e fósforo (Marques Jr. *et al*, 2002), é certamente o tipo mais comum de poluição aquática, estando presente em efluentes domésticos, industriais e sendo também freqüentemente oriunda de atividades agro-pecuárias. O aumento da poluição orgânica tem levado a eutrofização, provocando mudanças significativas nos ecossistemas costeiros (Magnusson *et.al.*, 1994; Pihl, *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999).

A eutrofização é um processo que se caracteriza pela entrada excessiva de nutrientes no sistema, sendo apontada como uma das principais causas de mudanças estruturais e funcionais em ecossistemas pelágicos e bênticos (Peckol & Rivers, 1995; Pihl *et al*, 1996; Paranhos, *et al*, 1998; Marques Jr. *et al*, 2002).

No ambiente costeiro, o enriquecimento por nutrientes é freqüentemente acompanhado pela entrada de outros poluentes, destacando-se entre eles, os metais pesados, que vêm tendo seus ciclos geoquímicos alterados devido às atividades antropogênicas (Ferreira *et al*, 2000). A interação dos metais pesados com os macro-nutrientes é ainda pouco entendida, entretanto, estudos recentes têm evidenciado que os macro-nutrientes influenciam marcadamente a acumulação de metais nos organismos marinhos (Lee *et al*, 2001).

Os metais se distribuem na água, no sedimento e nos organismos através de processos físicos, químicos e biológicos (Amado *et al*, 1994). No entanto, as concentrações de metais pesados disponíveis em um determinado ambiente, quando avaliados apenas na água e/ou no sedimento, podem não refletir o grau de toxicidade dessas substâncias. O dano potencial dos metais, para os ambientes e para o metabolismo dos organismos, pode ser medido com maior exatidão quando suas concentrações são avaliadas nos organismos (Carvalho *et al*, 1991; Lozano *et al*, 2003).

Tanto a eutrofização quanto a contaminação por metais são os dois tipos de alterações que têm afetado a maioria dos ambientes costeiros sendo, por essa razão, de grande importância a abordagem ecotoxicológica na avaliação dos efeitos destes contaminantes e de sua interação sobre diversas comunidades, destacando-se entre elas as algas marinhas bentônicas e as bactérias (Mcglathery, 1992; Riquelme *et al*, 1997; Haritonidis & Malea, 1999; Lozano *et al*, 2003).

Alguns autores têm chamado a atenção para a necessidade de considerar a influência dos níveis de nutrientes nos ambientes e da flora bacteriana epífita na análise da concentração de metais em macroalgas, enfatizando que estas variáveis devem ser consideradas na interpretação de dados de programas de biomonitoramento nas regiões costeiras marinhas (Riquelme *et al*, 1997; Lee *et al*, 2001).

Avaliar o impacto de poluentes no sistema aquático utilizando a comparação de parâmetros qualitativos e quantitativos das comunidades de macroalgas, biomassa e distribuição das espécies na presença e ausência do efeito da poluição, têm fornecido informações altamente relevantes para o controle da poluição (Mitchell *et al*, 1990; Gorostiaga & Diez, 1996; Correa *et al*, 1999).

As macroalgas, pela importância ambiental e econômica, têm sido utilizadas com frequência em estudos de avaliação dos efeitos dos poluentes em ambientes marinhos (Nassar *et al*, 1989; Mcglathery, 1992; Rivers & Peckol, 1995). A redução da diversidade algácea, em ambientes impactados, tem sido amplamente citada, sendo muitas as espécies já sugeridas como potenciais indicadores de poluição (Gorostiaga & Diez, 1996; Teixeira & Jorge, 2001).

As bactérias heterótrofas também constituem uma eficiente ferramenta na realização de diagnósticos ambientais, pois desempenham papel fundamental na diagênese da matéria orgânica, sendo também bioacumuladoras e biomarcadoras (Crapez *et al*, 1996; Deming & Baross, 1993; Künnis, 1991). Segundo Meyer-Reil (1994), as bactérias respondem às flutuações ambientais através de mudanças na distribuição espacial, no tamanho celular e biomassa (Peters, 1987) assim como na composição dos grupos fisiológicos.

A interação entre bactérias e outros organismos tem sido reportada para quase todos os grupos taxonômicos de plantas e animais no ambiente marinho (Prieur, 1991), podendo ser as bactérias o primeiro componente a ser afetado pelas alterações das condições ambientais.

Esta interação tem revelado uma importante função de defesa química, protegendo o hospedeiro de predadores, competidores e outros microrganismos patogênicos. Destas interações, a que ocorre entre as bactérias e a superfície dos talos das macroalgas parece ser de grande importância ecológica (Corre & Prieur, 1990; Sakami, 1996; Weinberger *et al*, 1997), podendo o processo de colonização ser influenciado por diversos fatores (Gi-Turnes *et al*, 1989; Prieur, 1991; Wahl *et al*, 1994).

A biomassa bacteriana nos diferentes estratos do ambiente é um dos principais parâmetros que deve ser levado em conta quando se estuda a comunidade bacteriana aquática. A atividade microbiana na superfície dos sedimentos pode disponibilizar nutrientes e alterar drasticamente a química da coluna d'água (Bell & Ahlgren, 1987; Riquelme *et al*, 1997).

Apesar dos avanços recentes no desenvolvimento de novas metodologias, para os estudos microbiológicos (marcadores isotópicos, marcadores genéticos, aquisição de imagens de alta resolução, medições automáticas), muitos problemas metodológicos são ainda observados na quantificação da biomassa bacteriana da coluna d'água e bêntica. A adsorção de bactérias ao sedimento e à superfície de outros organismos dificulta a sua quantificação e diferentes metodologias utilizadas na dissociação das mesmas muitas vezes não permitem a comparação entre os trabalhos.

Entre os diferentes métodos de dissociação que vêm sendo testados, o ultra-som tem sido um dos mais eficientes para a desagregação de bactérias adsorvidas à superfície, provocando alterações mínimas nas células bacterianas (Epstein & Rossel, 1995; Epstein *et al*, 1997; Mohammadi *et al*, 1993).

1.1- OBJETIVOS

Este estudo teve como principais objetivos:

- Analisar a associação de bactérias com macroalgas marinhas em ambientes tropicais costeiros sujeitos a diferentes graus de eutrofização e poluição por zinco visando um melhor entendimento deste tipo de interação biótica.
- Avaliar se a quantidade de bactérias aderida aos talos das macroalgas pode ser considerada um indicador do grau de deterioração ambiental.

Para tanto foram sugeridas as seguintes hipóteses:

- Em uma dada localidade, a densidade de bactérias aderidas ao talo das macroalgas é uma relação inter-específica, variando com a espécie de alga.
- A densidade bacteriana aderida ao talo de macroalgas está diretamente associada ao nível de poluição do ambiente, similarmente ao que se observa para as bactérias presentes nos compartimentos coluna d'água e sedimento, em ambientes marinhos.
- A biomassa bacteriana aderida ao talo das macroalgas é influenciada pela concentração dos macronutrientes nitrogênio e fósforo, disponíveis na água circundante.

- Para uma dada concentração de nutrientes, a presença de zinco acarreta uma redução da biomassa bacteriana aderida ao talo das macroalgas, devido à toxicidade do mesmo às bactérias.

2 - METODOLOGIA

O planejamento experimental foi dividido em duas etapas:

A primeira etapa teve por meta quantificar a biomassa bacteriana adsorvida ao talo de seis espécies de algas marinhas bentônicas, ao sedimento e disponível na coluna d'água, de duas áreas em diferentes estados tróficos, assim como a biomassa adsorvida ao talo de *Champia parvula* (Rhodophyta) proveniente de cultivo em laboratório.

A segunda etapa, teve por meta avaliar em laboratório o comportamento da macroalga *Champia parvula*, proveniente de cultivo, submetida a três diferentes níveis de nutrientes que, com base nas informações existentes na literatura (Rast et al, 1989), corresponderiam a diferentes estados tróficos (oligotrófico, mesotrófico e eutrófico) do ambiente marinho, através de variações nas concentrações de nitrato e fosfato e associadas a três concentrações distintas de zinco. Nesta etapa foram realizados dois tipos de teste:

1) Na primeira fase foram definidas as concentrações do ambiente oligotrófico, combinadas a três concentrações de zinco, tendo por meta avaliar as concentrações mínimas de nitrato e fosfato que poderiam ser utilizadas nos testes, considerando-se que fosfato e nitrato são nutrientes limitantes (Paranhos, 1996), e em concentrações muito baixas poderiam levar a uma alta mortalidade e à deterioração dos talos, causando assim a perda total do teste; 2) Na segunda fase, foram utilizadas nos testes valores de concentrações estimados na primeira série de experimentos e valores encontrados na literatura para os três níveis de eutrofização (Rast et al, 1989; Smith et al, 1999), sendo que nesta etapa em uma série de experimentos as biomassas bacterianas dos talos da macroalga e da coluna d'água foram mantidas, e em outra série de experimentos estas biomassas foram retiradas com emprego de antibiótico.

Paralelamente a estes testes foram realizados os de referência. Estes, por sua vez, consistiram na exposição dos talos de *C. parvula* a concentrações de nitrato e fosfato definidas nas duas séries de testes, sem a adição de zinco, e testes onde apenas foram avaliadas as concentrações de zinco previamente definidas no estudo.

2.1 - Primeira etapa: Avaliação da biomassa bacteriana adsorvida ao talo de seis espécies de algas marinhas bentônicas

2.1.1 - Área de Estudo

As algas foram obtidas através de coletas aleatórias em uma extensão de 100 m, na faixa do mediolitoral e infralitoral (Coutinho, 2002) em duas localidades distintas: Praia da Baleia - Angra dos Reis/RJ (23°00' - 23°10' S / 44°10' - 44°20' W) (área controle) e Praia de Boa Viagem - RJ, localizada na Baía de Guanabara (23°40'7'' - 23°56'3'' S / 43°16' - 43°17'4'' W) (área impactada) (Figura 1).

A Praia da Baleia (área controle), localizada na Baía de Ilha Grande, pode ser considerada como não degradada pois, por ser afastada dos grandes condomínios e de difícil acesso por terra, não sofre grande interferência antrópica.

A Praia de Boa Viagem (Niterói) situada na enseada de Jurujuba, na ponta leste da Baía de Guanabara, é considerada uma região moderadamente degradada, e tem como um dos seus principais problemas o aporte de esgoto doméstico que chega à praia sem nenhum tratamento prévio, com uma vazão total de 0,03 m³/s (Wahl *et al*, 1994).

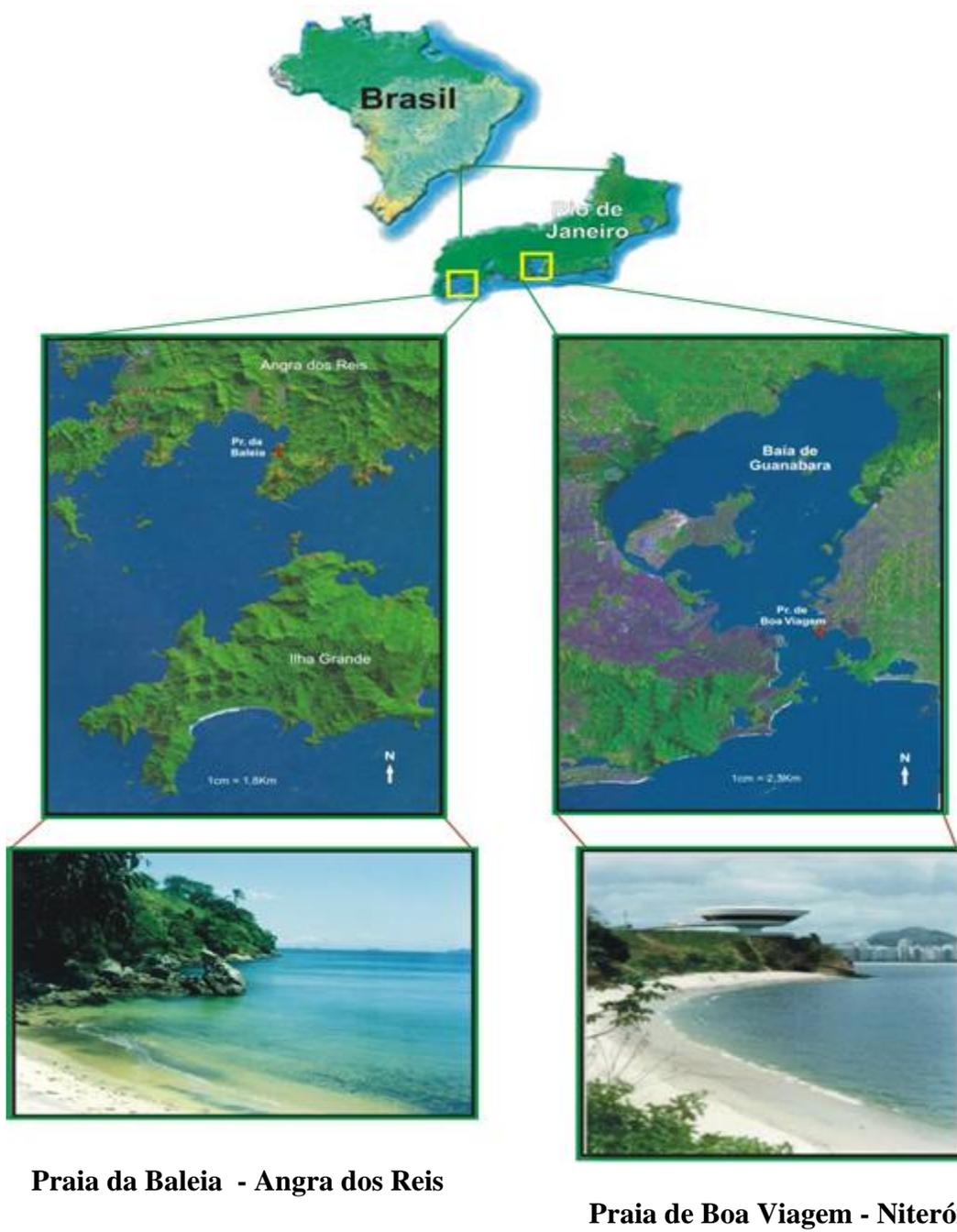


Figura 1: Localização das estações de coleta na Baía de Guanabara.

2.1.2 -- *Macroalgas provenientes do campo*

As espécies de macroalgas, foram selecionadas em função da estrutura e morfologia do talo, com o objetivo de avaliar a adsorção das bactérias aos diferentes tipos de talos (Figura 2). As espécies selecionadas estão listadas a seguir, seguindo a classificação de Wynne (1998):

Chlorophyta

Ulvophyceae

Ulvales

Ulvaceae

Enteromorpha flexuosa (Wulfen) J. Agardh

Ulva fasciata Delile

Cladophorales

Cladophoraceae

Cladophora vagabunda (L.) C. Hoek

Bryopsidales

Codiaceae

Codium decorticatum (Woodw.) M. Howe

Rhodophyta

Florideophycidae

Gigartinales

Phylloporaceae

Gymnogongrus griffithsiae (Turner) Mart.

Rhodymeniales

Champiaceae

Champia parvula (C.Agardh) Harv.



Champia parvula



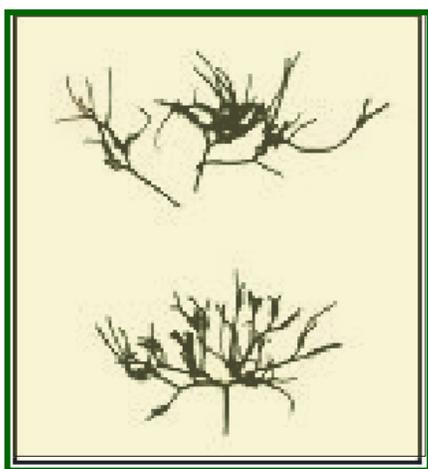
Enteromorpha flexuosa



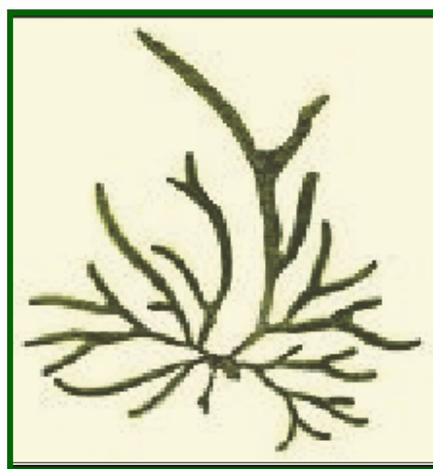
Ulva fasciata



Cladophora vagabunda



Gymnogongrus griffithsiae



Codium decorticatum

Figura 2: Espécies utilizadas no presente estudo.

As diferentes características morfológicas e estruturas dos talos das espécies utilizadas neste estudo são as seguintes (Joly, 1965):

- Talo foliáceo, de consistência membranácea, irregularmente lobado, com lobos expandidos em forma de fita, talo multicelular..... *Ulva fasciata*

- Fronde regularmente tubulosa achatada, pelo menos nas porções superiores, crescendo em densos tufos, talo multicelular..... *Enteromorpha flexuosa*

- Talo filamentosos, abundantemente ramificado, de organização unisseriada*Cladophora vagabunda*

- Talo filamentosos, cenocítico, constituído de uma porção basal rizoidal e de uma porção ereta ramificada, consistência esponjosa..... *Codium decorticatum*

- Talo ereto, abundantemente ramificado, dicotomias próximas, ramos comprimidos com ápices cilíndricos, crescendo em densos tufos emaranhados pelo entrelaçamento de ramos. Talo de consistência rígida.....*Gymnogongrus griffithsiae*

- Plantas crescendo em tufos globóides, talo cilíndrico, segmentado, pouco constricto, abundantemente ramificadas,*Champia parvula*

2.1.3 - Coleta e avaliação da biomassa bacteriana no perifíton das seis espécies de macroalgas

Os procedimentos de coleta e o manuseio do material biológico foram realizados utilizando-se luva cirúrgica, sendo os talos das algas cortados a aproximadamente 1 a 2 cm de distância da base com auxílio de uma tesoura, evitando-se assim a interferência de contaminação oriunda do substrato arenoso na determinação do número de bactérias. Após a coleta, os exemplares foram mantidos à temperatura ambiente e transportados vivos para o laboratório. No laboratório o material foi triado, eliminando-se as espécies acompanhantes e os detritos. Para cada espécie de macroalga foram realizadas dez subamostras que foram, em seguida, pesadas em balança analítica e levadas para o ultrassom para dissociação das bactérias.

A metodologia para extração de bactérias das macroalgas foi adaptada de Epstein & Rossel (1995). Testes preliminares foram realizados visando definir a biomassa algácea suficiente para a extração das bactérias, o tempo de exposição ao sonicador e a diluição necessária para a contagem das células bacterianas no microscópio de epifluorescência. Dois gramas do talo de cada espécie das macroalgas foram colocados em erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de água do mar previamente filtrada e esterilizada em autoclave (121°C por 30 minutos), sendo então levados ao sonicador (Bransonic 3210 – 50/60Hz) por 5 minutos. Para cada espécie foram realizadas 10 determinações (réplicas).

Após a filtração, alíquotas de 2 mL de cada amostra foram fixadas com solução de formaldeído a 8% de forma a atingir a concentração final de 4%, e mantidas resfriadas (2° C) até a verificação da biomassa bacteriana. A biomassa bacteriana foi obtida por contagem em microscópio de epifluorescência (Axiosp 1 Zeiss), após a filtração da amostra em filtro de 0,2 µm de malha, utilizando-se laranja de acridina como fluorocromo.

2.1.4 - Avaliação da biomassa bacteriana na coluna d'água e no sedimento

A coleta na coluna d'água foi realizada na camada sub-superficial (30cm – 1m), e imediatamente após a coleta 20 mL de água foi filtrada em membrana Millipore 0,22µm, em laboratório.

As amostras de sedimento foram coletadas na interface água/sedimento. Para o cálculo da biomassa de bactérias, 1g de sedimento foi acondicionado em frasco erlenmeyer de 250 mL com 9 mL de água deionizada, sendo a desagregação das bactérias realizadas por agitação mecânica, durante 30 minutos a 200 rpm (Deming & Baross, 1993). Após este procedimento, uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi retirada e diluída em 3,5 mL de água deionizada, sendo o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº 1.

Para a fixação, coloração e análise microscópica da biomassa bacteriana na coluna d'água e no sedimento, foi realizado o mesmo procedimento descrito para a avaliação das bactérias associadas aos talos das macroalgas.

2.1.5 - Cálculo da biomassa bacteriana

A contagem de células bacterianas presentes nos talos das macroalgas, na coluna d'água e no sedimento, foi realizada segundo o procedimento descrito por Kepner & Pratt (1994). O cálculo de biomassa bacteriana expressa em carbono foi realizado multiplicando-se o valor do número de bactérias determinado através da contagem em microscópio de epifluorescência e aplicação da Fórmula 1, pela constante proposta por Carlucci *et al* (1986) (Fórmula 2).

Fórmula 1:

$$\text{Número de células.cm}^{-3} = X. A. d. 1/a. 1/n. 1/V$$

Em que:

X = média aritmética do número de células das réplicas

A = área do filtro

d = diluição

a = área do campo do microscópio

n = número de campos contados

V = volume da amostra filtrada

Fórmula 2:

$$C \text{ biomassa} = N^{\circ} \text{ de células} \times 1,2 \times 10^{-8} \mu\text{g C cm}^{-3}$$

Para a análise estatística dos resultados foi feita uma análise de variância utilizando-se os testes de Tukey ($p > 0,05$) ou t de Student.

*2.2 - Segunda etapa: Exposição de *Champia parvula* a diferentes combinações de fatores: concentrações de nitrato e fosfato, concentrações de zinco e presença ou ausência de bactérias.*

*2.2.1 - *Champia parvula**

A espécie *Champia parvula* foi utilizada neste estudo, por ser uma espécie para a qual existem normas padronizadas pela EPA (U.S. Environmental Protection Agency) para teste ecotoxicológicos, havendo na literatura diversas citações sobre o efeito de poluentes sobre esta espécie (Weber et al, 1988; Schimmel et al, 1989, Morrison et al, 1989; Maurat, 1996).

2.2.1.1. - Características biológicas da espécie

Champia parvula ocorre na região tropical e temperada do atlântico ocidental, e se caracteriza por apresentar crescimento em tufo mais ou menos globóides, de cor rósea amarelada com extremidades mais vermelhas, medindo em altura, de 3 a 10 cm. O talo desta espécie apresenta ramificação abundante em vários planos, com muitas anastomoses

entre os ramos. Os ramos são de secção cilíndrica com extremidades distintamente atenuadas e ligeiramente recurvadas na direção do eixo (Joly, 1965; Diaz-Piferrer, 1977).

Esta espécie ocorre frequentemente na franja do infralitoral dos costões rochosos, em baías calmas de fundo areno-lodoso, sendo observada no Brasil na faixa litorânea do Ceará a Santa Catarina (Joly, 1965; Cordeiro-Marino, 1978; Oliveira Filho, 1977). A ocorrência desta espécie para o litoral do Rio de Janeiro é citada por Taylor (1931), Joly & Braga (1966), Pedrini (1980) e Falcão *et al* (1992).

Steele & Thursby (1988), comentam que esta espécie é de ocorrência comum em muitas partes do mundo, sendo encontrada no México, Estados Unidos, Caribe, França, Espanha, Coreia e Austrália.

2.2.1.2 - *Cultivo em laboratório*

A espécie *Champia parvula* (Figura 3) utilizada para o cultivo foi coletada na Praia da Baleia (área controle). Após a coleta, os exemplares foram mantidos em água do mar na temperatura ambiente e transportados para o laboratório, onde foram triados e mantidos como estoque, em condições controladas de laboratório.

Para a manutenção em cultivo, talos de *C. parvula* estéreis foram observados sob microscópio estereoscópico, e fragmentos apicais com aproximadamente 1 cm de comprimento foram extirpados dos talos limpos. Em seguida, estes fragmentos foram mantidos em frascos de erlenmeyer com 1.000 mL de volume, contendo 800 mL de água do mar natural proveniente da área controle, previamente filtrada em membrana de filtro Millipore de 0,45 µm de malha e enriquecida com meio de cultura PES (Provasoli, 1968) (Anexo 16), a uma proporção de 1 mL/L de água do mar. Esses frascos foram mantidos no

laboratório sob temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidade de $34 \pm 1\%$, fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro e aeração constante. O meio de cultura dos estoques foi trocado semanalmente, para a manutenção do bom estado fisiológico das algas.

A metodologia para extração das bactérias de *Champia parvula* de cultivo foi a mesma citada no item 2.1.3 para as macroalgas provenientes do campo.



Figura 3: Cultivo de *Champia parvula* (C. Agardh) Harvey em laboratório.

Os talos de *C. parvula* provenientes de cultivo em laboratório foram submetidos a diferentes níveis de trofia do ambiente marinho (oligotrófico, mesotrófico, eutrófico) através de variações nas concentrações de nitrato e fosfato, combinadas à diferentes concentração de zinco.

2.2.2 - Exposição dos talos de *Champia parvula* a três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.

Os diferentes níveis de nitrato e fosfato, referentes a ambiente oligotrófico testados, nestes testes preliminares, foram baseados em valores encontrados na literatura (Rast *et al*, 1989; Smith *et al*, 1999), mantendo-se a razão N/P variando de 25 a 26 (Tabela 1; Figura 4).

Nestes experimentos as três diferentes concentrações de nitrato (0,016; 0,8 e 1,61 μM) e fosfato (0,0006; 0,032 e 0,065 μM) avaliadas foram obtidas através de uma solução estoque de 100 μM (Item 2.2.4), sendo mantida a biomassa bacteriana natural dos talos de *C. parvula* e da água de diluição.

Os testes foram crônicos, com duração de 15 dias, semi-estáticos, com renovação da solução a cada 72 horas, sendo mantidos no laboratório sob temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de 33 ± 1 parte por mil, fotoperíodo de 12:12 horas luz e escuro e sem aeração. A água do mar utilizada na diluição foi filtrada em 0,45 μm e os talos de *Champia parvula* retirados do cultivo em laboratório no dia do início do teste. Paralelamente a cada teste foi

realizado um controle com meio padrão (Provasoli, 1968) adicionado em água do mar livre de contaminantes. A composição do meio padrão está descrita no anexo 16.

O procedimento consistiu na exposição de 5 fragmentos apicais medindo aproximadamente 1 cm de comprimento, às diferentes concentrações testadas, em frasco Beckers de 400 mL contendo 200 mL da solução. Foram efetuadas 5 réplicas por concentração. Para cada nível de trofia foram realizados três experimentos.

A biomassa algácea, das diferentes concentrações testadas, foi avaliada no início e no término dos testes, sendo realizadas comparações entre as diferentes concentrações e entre estas e o controle.

Em todos os experimentos, foram calculadas a taxa de crescimento de *Champia parvula* nos diferentes tratamentos, assim como a diferença percentual entre as médias dos diferentes tratamentos e o cultivo em meio padrão (controle).

A taxa de crescimento foi calculada através da seguinte equação:

$$\mathbf{F - I \times 100 \div I = Taxa \ de \ crescimento(\%)}$$

Onde: F = Biomassa final (após 15 dias de teste)

I = Biomassa inicial

Tabela 1: Diferentes concentrações de nitrato e fosfato, referente a ambientes oligotróficos utilizadas na primeira série de experimentos e a razão nitrogênio/fósforo correspondente.

	OLIGOTRÓFICO (μM)	OLIGOTRÓFICO (μM)	OLIGOTRÓFICO (μM)
NO_3^-	1,61	0,8	0,016
PO_4^{3-}	0,065	0,032	0,0006
N:P	25	25	26

2.2.3 - Exposição dos talos de *Champia parvula* a concentrações de nutrientes correspondentes a três níveis de trofia (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico) e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.

Os níveis de nitrato e fosfato testados foram baseados em valores encontrados na literatura para diferentes níveis tróficos de ambientes marinhos (Rast *et al*, 1989; Smith *et al*, 1999), mantendo-se uma razão N/P =16 (Tabela 2; Figura 5).

Nestes experimentos, as concentrações de nitrato (1 μM ; 100 μM e 500 μM) utilizadas nos três níveis de trofia (eutrófico, mesotrófico e oligotrófico) foram obtidas através de

soluções estoques de 100 μ M, 1.000 μ M e 5.000 μ M e as de fosfato (0,06 μ M; 6,25 μ M e 31,25 μ M) a partir de soluções estoques de 200 μ M e 1.000 μ M (Item 2.2.4).

Tabela 2: Concentrações de nitrato e fosfato, referentes a ambientes marinhos oligotróficos, mesotróficos e eutróficos, utilizadas na segunda série de experimentos, e a razão nitrogênio/fósforo correspondente.

	EUTRÓFICO (μ M)	MESOTRÓFICO (μ M)	OLIGOTRÓFICO (μ M)
NO ₃ ⁻	500	100	1
PO ₄ ³⁻	31,25	6,25	0,06
N:P	16	16	16

Nesta fase, os experimentos tiveram variações quanto a biomassa bacteriana presente nos talos da macroalga e da coluna d'água. Em uma primeira etapa foram realizados experimentos em que foi mantida a biomassa bacteriana dos talos da macroalga e da coluna d'água e em uma segunda etapa realizados experimentos em que a biomassa bacteriana foi retirada, do talo da macroalga pelo tratamento com antibiótico, e da coluna d'água por filtração em Membrana Millipore de 0,22 μ m de malha.

Para os experimentos com bactérias, a água do mar utilizada na diluição foi filtrada em 0,45 μ m e os talos de *Champia parvula* retirados do cultivo em laboratório no dia do início do teste.

Nos experimentos em que se verificou o efeito dos nutrientes e do zinco sem bactérias, a água do mar foi filtrada em 0,22 μ m e os talos das macroalgas foram

submetidos ao tratamento descrito a seguir, para a determinação da concentração de penicilina que seria eficiente na retirada das bactérias dos talos.

Talos de *Champia parvula*, provenientes do cultivo em laboratório, foram expostos a 4 diluições (1%; 5%; 7% e 10%) de penicilina (Benzilpenicilina Benzatina - 1.200.000) por 1 hora. Em seguida, os talos foram retirados da solução de penicilina e colocados em solução de baceptona (1g / 500 mL de água do mar filtrada em 0,22 µm) por 6 horas. Após este período, as amostras foram conservadas em formol e mantidas refrigeradas até a leitura em microscópio de epifluorescência. A leitura em microscópio de epifluorescência mostrou que a exposição dos talos de *C. parvula*, por 1 hora, na solução de Benzilpenicilina benzatina a 5% (1:200.000) foi suficiente para eliminação das bactérias. Portanto, esta solução de penicilina a 5% foi utilizada nos experimentos em que se fazia necessário a retirada das bactérias dos talos da macroalga.

Nos experimentos com bactérias, a biomassa bacteriana presente na coluna d'água foi avaliada no início e após 72 horas e a biomassa presente nos talos de *C. parvula*, no início e ao término do experimento (15 dias).

As amostras de água a serem avaliadas, quanto à biomassa bacteriana, foram obtidas pela diluição de 2 mL de cada concentração em 2 mL de formaldeído a 4%. Para as amostras de *C. parvula*, 2g foram preservadas adicionando-se a 2 mL de formaldeído a 4%.

As concentrações de nitrato e fosfato da coluna d'água, foram obtidas no início e após 72 horas de teste, nas duas séries de experimento (com bactérias e sem bactérias).

A metodologia utilizada na realização dos experimentos foi a mesma descrita anteriormente para a exposição dos talos de *Champia parvula* a três níveis de oligotrofia (Item 2.2.1).

*2.2.4 - Exposição dos talos de *Champia parvula* em meios enriquecidos com nitrato e fosfato e concentrações de zinco, separadamente, com e sem a presença de bactérias.*

Os testes de referência tiveram por objetivo verificar os efeitos do nitrato, fosfato e zinco isoladamente, no crescimento de *C. parvula*. Portanto, foram realizados testes em que foi avaliado o efeito da mistura das concentrações de nitrato e fosfato e testes em que apenas foram avaliados os efeitos das concentrações de zinco definidas para o estudo.

Estes testes foram realizados em paralelo aos demais testes, seguindo as mesmas concentrações (Tabelas 1 e 2) e metodologias aplicadas nestes testes (Item 2.2.1 e 2.2.2).

2.2.5 - Concentrações de nitrato e fosfato

2.2.5.1 - Solução estoque de Nitrato ($N-NO_3 = 10 \text{ mM}$)

Para a obtenção da solução estoque de nitrato, nos testes preliminares e definitivos, 1,011g de nitrato de potássio (KNO_3) foi pesado e seco por 1 hora em estufa a 110° C , sendo em seguida resfriado em dessecador. Após o resfriamento, o nitrato de potássio foi dissolvido em água destilada e diluído a 1.000 mL. Esta solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada e mantido em refrigerador até sua utilização (Paranhos, 1996).

A partir da solução estoque de nitrato foram obtidas três soluções distintas, utilizadas na obtenção das concentrações de nitrato definidas para duas séries de experimentos.

- Solução 1 (100 μM): 1 mL da solução estoque / 100 mL de água do mar.
- Solução 2 (1.000 μM): 10 mL da solução estoque/ 100 mL de água do mar.
- Solução 3 (5.000 μM): 50 mL da solução estoque/ 100 mL de água do mar.

2.2.5.2 - Solução estoque de Fosfato ($P\text{-PO}_4^{3-} = 10 \text{ mM}$)

Para a obtenção da solução estoque de fosfato, nos testes preliminares e definitivos, 1,361g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foi seco por 2 horas em estufa a 110°C , sendo em seguida resfriado em dessecador. Após o resfriamento, o fosfato de potássio foi dissolvido em água destilada contendo 2,0 mL de H_2SO_4 4,5 M e diluído em 1.000 mL. Esta solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada e mantido em refrigerador até sua utilização (Paranhos, 1996).

A partir da solução estoque de fosfato foram obtidas três soluções distintas, utilizadas na obtenção das concentrações de fosfato definidas para as duas séries de experimentos.

- Solução 1 (100 μM): 1 mL da solução estoque / 100 mL de água do mar.
- Solução 2 (200 μM): 2 mL da solução estoque / 100 mL de água do mar.
- Solução 3 (1.000 μM): 10 mL da solução estoque / 100 mL de água do mar.

2.2.6 - Concentrações de zinco

Para a obtenção das concentrações de zinco a serem utilizadas nos experimentos, diluiu-se 0,4398g de zinco na forma de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) em 1.000 mL de água destilada, resultando em uma solução inicial de 100 mgZn.L^{-1} . As concentrações utilizadas nos experimentos foram as seguintes: $0,1 \text{ mgZn.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mgZn.L}^{-1}$ e 1 mgZn.L^{-1} .

Os valores de zinco foram selecionados com base nos valores estipulados na Resolução CONAMA nº-20 de 18 de junho de 1986 que estabelece para águas de Classe 5 o limite de zinco de $0,17 \text{ mg/L}$ e na NT-202.R-10, Deliberação CECA nº 1007 de 04 de dezembro de 1986 que estabelece os critérios e padrões para o lançamento de efluentes líquidos para o Estado do Rio de Janeiro, e determina como limite no lançamento de efluentes líquidos $1,0 \text{ mg/L}$ de zinco.

2.2.7- Mistura Nitrato/fosfato/zinco

Para a implementação dos testes preliminares e definitivos foi realizado um modelo fatorial, com 2 fatores e três níveis.

Na primeira série de testes foram avaliadas concentrações de nitrato e fosfato correspondentes a ambiente oligotróficos, associadas a concentrações de zinco e a bactérias, simulando três diferentes condições (Tabela 1, Figura 4):

- 1^a Ambiente oligotrófico com concentração de zinco ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) dez vezes inferior ao estabelecido na legislação estadual.

- 2^a Ambiente oligotrófico com concentração de zinco ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) duas vezes inferior a estabelecida na legislação estadual.

-3^a Ambiente oligotrófico com a concentração de zinco ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) determinada pela legislação, como limite para lançamento em efluentes líquidos.



Figura 4: Delineamento dos experimentos com *Champia parvula* que avaliaram, três níveis de trofia (oligotrofia) em combinação com concentrações de zinco, com a presença de bactérias.

Na Segunda série de testes foram avaliadas concentrações de nitrato e fosfato correspondentes a ambientes oligotróficos, mesotróficos e eutróficos, associadas como na primeira série de testes, às três concentrações de zinco definidas pela legislação.

No entanto, diferente do realizado na primeira série, estes testes avaliaram tanto o efeito destas associações com a presença da biomassa bacteriana natural do talo das algas e da

coluna d'água, quanto o efeito após a retirada da biomassa bacteriana por antibiótico e filtração (Tabela 2; Figura 5).

2.2.8 - Variáveis físicas e químicas

Em todos os experimentos, medidas de oxigênio dissolvido, pH e salinidade foram tomadas no início e na renovação da solução-teste, a cada 72 horas, sendo realizado o acompanhamento dos parâmetros tanto das soluções que entravam, quanto das que eram descartadas do teste (Anexo 15).

2.2.9 - Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos resultados foi aplicada análise de variância utilizando-se os testes de Tukey ou t de Student e Dunnetts Test.

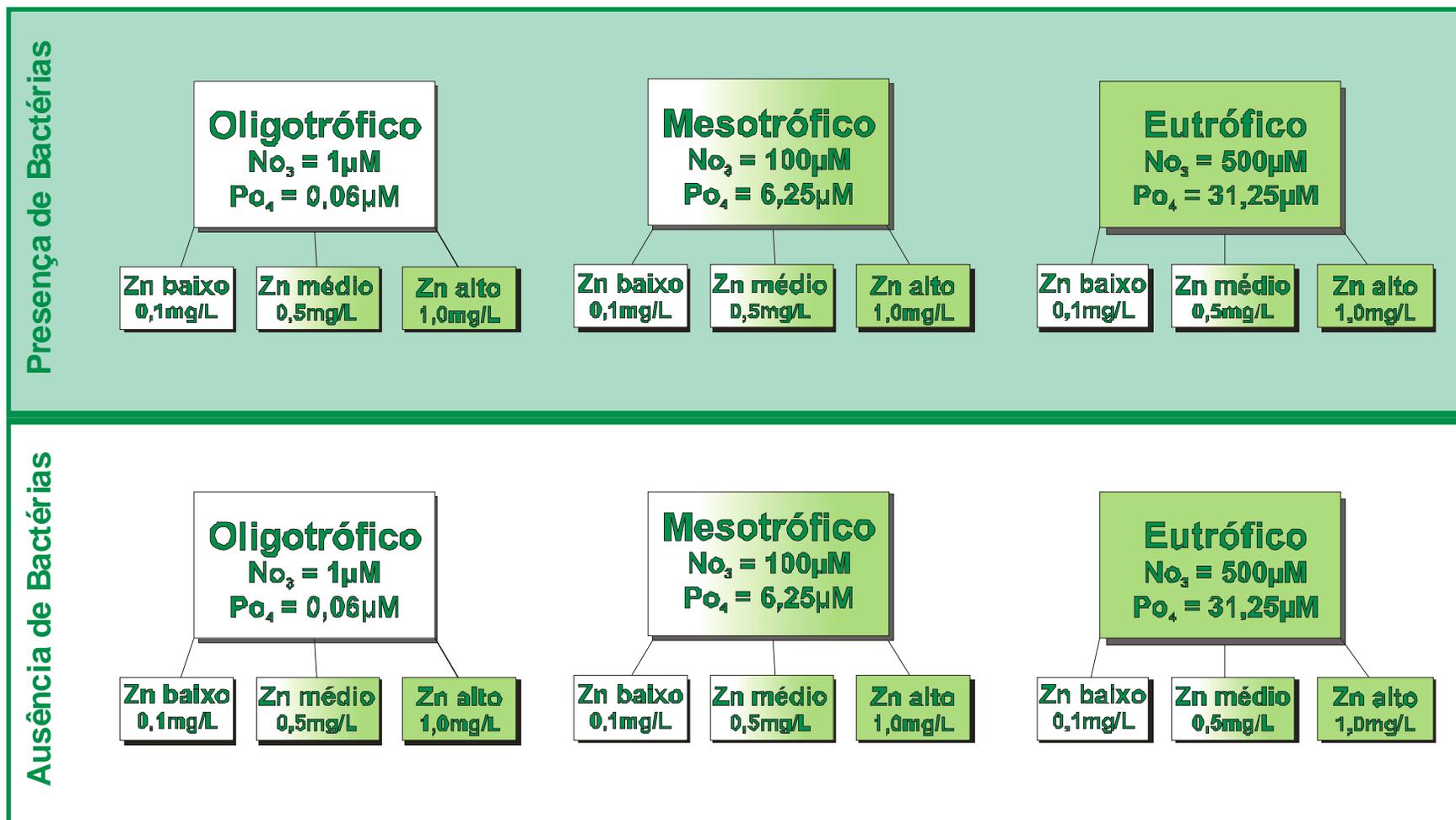


Figura 5: Delineamento dos experimentos com *Champia parvula* que avaliaram, três níveis de trofia (oligotrófico, mesotrófico e eutrófico) em combinação com concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

3 - RESULTADOS

3.1 - Avaliação da biomassa bacteriana adsorvida ao talo de algas marinhas na Praia da Baleia (área controle) e na Praia de Boa Viagem (área impactada).

Na Praia da Baleia (área controle), a quantificação da biomassa bacteriana associada ao talo das espécies resultou em biomassas médias de $0,007 \pm 0,001 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$ para *Enteromorpha flexuosa*, de $0,008 \pm 0,001 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$ para *Ulva fasciata*, de $0,006 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$ para *Cladophora vagabunda* e de $0,005 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$ para *Champia parvula* (Tabela 3).

Os resultados revelaram diferença significativa apenas entre a biomassa de bactérias associadas às espécies *Ulva fasciata* e *Champia parvula* ($p = 0,017$; $F = 6.201$). Pela comparação da biomassa bacteriana nos três compartimentos avaliados (macroalgas, água e sedimento), observou-se que a biomassa bacteriana do sedimento ($0,118 \pm 0,004 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$) foi significativamente diferente da biomassa contida na coluna d'água ($0,007 \pm 0,001 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$) e nos talos das macroalgas ($0,0065 \pm 0,001 \mu\text{gC} \cdot \text{cm}^{-3}$) para esta área ($p < 0,0001$; $F = 4264,9$) (Figura 6). Resultado semelhante foi observado, nesta área, quanto ao número de células bacterianas, ocorrendo no sedimento uma densidade bacteriana cerca de 17 vezes superior ao observado na água e nas macroalgas (Anexos 1 a 2).

Tabela 3: Valores de biomassa bacteriana e número total de células bacterianas adsorvidas aos talos de diferentes espécies de macroalgas, por contagem direta em microscópio de epifluorescência.

MACROALGAS	PRAIA DA BALEIA		PRAIA DE BOA VIAGEM	
	<i>Biomassa</i> $\mu\text{gC.cm}^{-3}$	Nº total de células $\mu\text{gC.cm}^{-3}$	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$	Nº total de células $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
C. parvula (cultivo)	0,0568 ***	$4,7 \times 10^6$	-	-
E. flexuosa	0,007	$5,4 \times 10^5$	0,037	3×10^6
<i>U. fasciata</i>	0,008 **	$6,5 \times 10^5$	0,036	3×10^6
<i>C. vagabunda</i>	0,006	$5,4 \times 10^5$	0,038	$2,8 \times 10^6$
<i>C. parvula</i>	0,005 **	$4,1 \times 10^5$	-	-
<i>G. griffithisae</i>	-	-	0,043	$3,5 \times 10^6$
<i>C. decorticatum</i>	-	-	0,038	$3,1 \times 10^6$
Média	0,0065	$5,35 \times 10^5$	0,038 *	$3,08 \times 10^6$ *

* Significativamente diferente em relação a área controle.

** Diferença significativa entre as espécies.

*** Significativamente diferente em relação a *C. parvula* oriunda do campo.

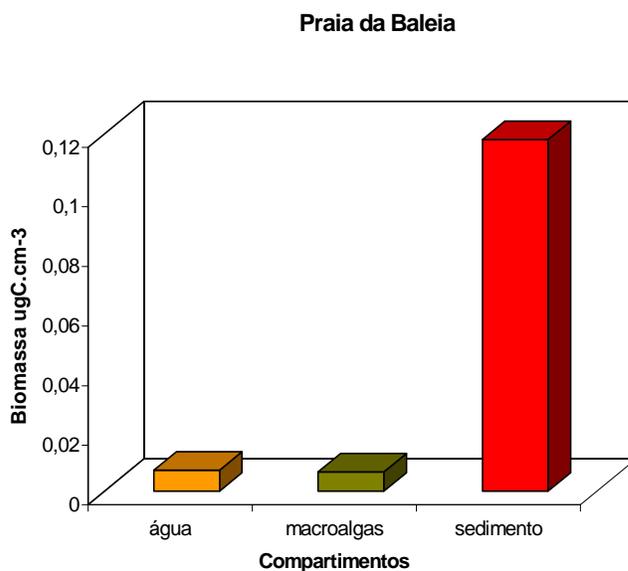


Figura 6: Biomassa bacteriana, na coluna d'água, sedimento e aderida ao talo de macroalgas na Praia da Baleia (área controle).

Na Praia de Boa Viagem (área impactada), a biomassa bacteriana associada às macroalgas foi de $0,037 \pm 0,005 \mu\text{gC.cm}^{-3}$ para *Enteromorpha flexuosa*, de $0,036 \pm 0,007 \mu\text{gC.cm}^{-3}$ para *Ulva fasciata*, de $0,043 \pm 0,004 \mu\text{gC.cm}^{-3}$ para *Gymnogongrus griffithsae*, de $0,038 \pm 0,004 \mu\text{gC.cm}^{-3}$ para *Codium decorticans* e de $0,038 \pm 0,005 \mu\text{gC.cm}^{-3}$ para *Cladophora vagabunda* (Tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas na biomassa bacteriana associada a estas espécies de macroalgas ($p = 0,08$; $F = 2.181$).

A análise da biomassa bacteriana nos três compartimentos avaliados revelou que a biomassa associada às macroalgas ($0,038 \pm 0,006 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) ($p < 0,01$) diferiu significativamente da biomassa contida na água ($0,198 \pm 0,015 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) e no sedimento ($1,29 \pm 0,114 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) (Figura 7), sendo observado o mesmo resultado quanto ao número de células bacterianas (Anexos 3 a 4).

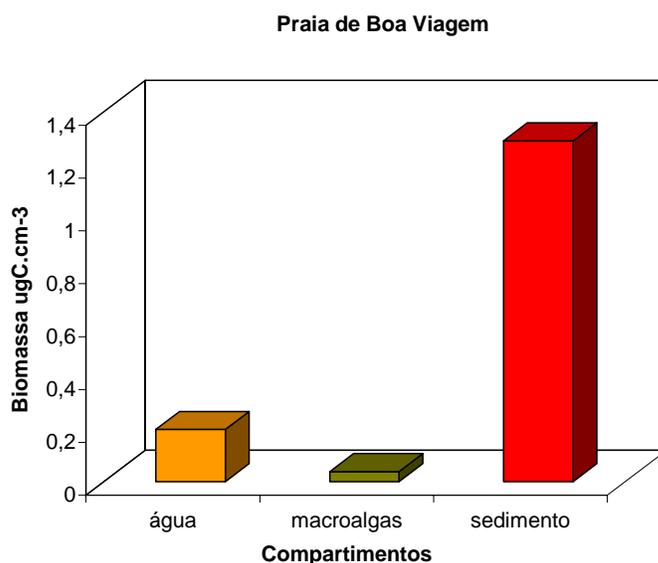


Figura 7: Biomassa bacteriana, na coluna d'água, sedimento e aderidas ao talo de macroalgas na Praia de Boa Viagem (área impactada).

A biomassa bacteriana média adsorvida aos talos das macroalgas da Praia da Baleia ($0,0065 \pm 0,001 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) teve diferença significativa ($p = < 0,0001$; $F = 4364,9$) em relação à biomassa bacteriana média observada na Praia de Boa Viagem ($0,038 \pm 0,006 \mu\text{gC.cm}^{-3}$), sendo a biomassa bacteriana média da Praia da Baleia uma ordem de grandeza inferior à da Praia de Boa Viagem.

Os resultados relativos à biomassa bacteriana do sedimento ($p= 0,000012$; $F= 763,88$) e da água ($p= 0,000005$; $F= 632,91$) das duas áreas, separadamente, também indicaram diferenças significativas, observando-se, tanto na água quanto no sedimento, uma maior biomassa bacteriana nas amostras da Praia de Boa Viagem (Tabela 4).

Para a biomassa bacteriana dos talos de *Champia parvula* provenientes do cultivo em laboratório ($0,0568 \pm 0,004 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) registrou-se, em relação à biomassa bacteriana dos talos provenientes do campo ($0,005 \pm 0,0004 \mu\text{gC.cm}^{-3}$), diferença significativa ($p = 0,000057$; $F = 140.5405$), sendo observado um valor médio de biomassa dez vezes superior nos talos das algas de cultivo (Tabela 3; Anexo 5).

Tabela 4: Valores de biomassa bacteriana e número total de células bacterianas no sedimento e na coluna d'água, obtidos por contagem direta em microscópio de epifluorescência.

	PRAIA DA BALEIA		PRAIA DE BOA VIAGEM	
	<i>Biomassa</i> $\mu\text{gC.cm}^{-3}$	Nº total de células $\mu\text{gC.cm}^{-3}$	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$ **	Nº total de células $\mu\text{gC.cm}^{-3}$ **
<i>Água</i>	0,007	$5,8 \times 10^5$	0,198	$1,65 \times 10^7$
Sedimento	0,118	$1,0 \times 10^7$	1,29	$1,07 \times 10^8$

** Diferença significativa em relação a Praia da Baleia (controle).

3.2 - Crescimento de *Champia parvula* exposta a diferentes combinações de fatores: concentrações de nitrato e fosfato e concentrações de zinco, com e sem presença de bactérias.

3.2.1 - Taxa de crescimento do talo de *C. parvula* em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.

A Tabela 5, representa a taxa de crescimento obtida nos experimentos preliminares onde foram avaliados os efeitos das concentrações de nitrato e fosfato correspondentes a ambientes oligotróficos, associadas a concentrações de zinco determinadas em função do limite estabelecido na legislação ambiental (Tabela 1).

Tabela 5: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle), dos talos de *C. parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato e zinco, com a presença de bactérias.

Zinco mg.L ⁻¹	OLIGOTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 1,61 μ M PO ₄ ³⁻ = 0,065 μ M		OLIGOTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 0,8 μ M PO ₄ ³⁻ = 0,032 μ M		OLIGOTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 0,016 μ M PO ₄ ³⁻ = 0,0006 μ M	
	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de crescimento (%)	%
1	2,5 \pm 0,0021*	-96,07	20,77 \pm 0,0060	-67,7	-9,29 \pm 0,0067	-114,6
0,5	-11,54 \pm 0,0007*	-118,13	-14,38 \pm 0,0081	-122,6	-16,43 \pm 0,0046	-125,82
0,1	-2,14 \pm 0,0038 *	-103,37	-23,13 \pm 0,0068	-136,34	-33,33 \pm 0,0035*	-152,4
Controle	63,64 \pm 0,0035					

* Diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05)

A taxa de crescimento observada após 15 dias, em todas as concentrações testadas foi inferior a obtida para os talos cultivados em meio padrão (controle) (Figura 8; Anexo 6).

As diferentes concentrações de nutrientes correspondentes a ambiente oligotrófico resultaram em uma diferença percentual de -67,77% a -152,4% na taxa de crescimento em relação àquela obtida no cultivo em meio padrão (controle), não sendo observada diferença significativa entre os três níveis representativos de ambiente oligotrófico testados ($p > 0,05$).

As maiores taxas de crescimento foram observadas nas concentrações mais altas ($\text{NO}_3^- = 1,61\mu\text{M}$ e $\text{PO}_4^{3-} = 0,065\mu\text{M}$) e intermediárias ($\text{NO}_3^- = 0,8\mu\text{M}$ e $\text{PO}_4^{3-} = 0,032\mu\text{M}$) de nutrientes associadas a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco.

Analisando a Tabela 5, apenas quanto ao efeito da quantidade de zinco associada às diferentes concentrações de nitrato e fosfato, observa-se que a concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ resultou em maior diferença percentual no crescimento do talo, em relação àquele do talo cultivado em meio padrão (controle), acarretando uma redução de 103,37% a 152,4%.

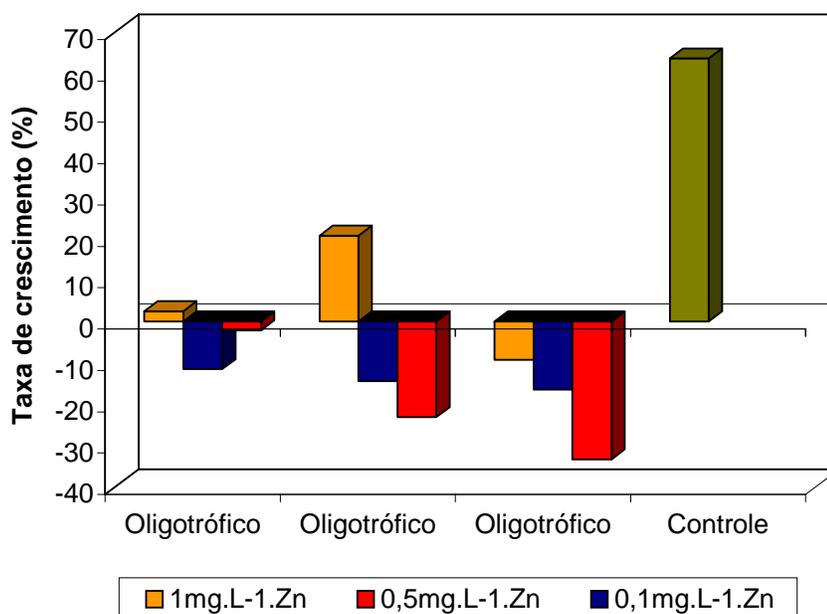


Figura 8: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes combinações de concentrações de nitrato e fosfato, simulando ambiente oligotrófico, associadas à presença de zinco, com a presença de bactérias.

3.2.2 - Mortalidade dos talos de *Champia parvula* em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias

A Tabela 6 contém os dados relativos à porcentagem de mortalidade dos talos de *C. parvula* nos testes realizados nas combinações citadas anteriormente. O percentual de mortalidade foi inversamente proporcional a concentração de zinco, com valores elevados

quando estas concentrações estavam associadas a concentração de $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de zinco e valores reduzidos quando associadas a $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ de zinco.

Em relação ao observado no cultivo realizado em meio padrão (controle), a mortalidade foi aproximadamente duas vezes maior nos experimentos com $0,5\text{ mg.Zn.L}^{-1}$ e cerca de três vezes maior nos experimentos com $0,1\text{ mg.Zn.L}^{-1}$.

Tabela 6: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações referentes a ambientes oligotróficos associadas a diferentes concentrações de zinco.

	NITRATO ; FOSFATO (μM)	ZINCO (mg.L^{-1})	MORTALIDADE (%)
Oligotrófico	1,61 ; 0,065	1,0	14 ± 14
		0,5	$18 \pm 8,5$
		0,1	$46 \pm 3,1$
Oligotrófico	0,8 ; 0,032	1,0	$22 \pm 8,5$
		0,5	$36 \pm 33,9$
		0,1	$50 \pm 42,4$
Oligotrófico	0,016 ; 0,0006	1,0	20 ± 17
		0,5	$36 \pm 39,6$
		0,1	$46 \pm 48,1$
		Controle	$12 \pm 2,8$

3.2.3 - Taxa de crescimento do talo de *Champia parvula* em três níveis de trofia (oligotróficos) com a presença de bactérias (Teste de referência preliminar)

Nos testes de referência preliminares, os talos de *C. parvula* expostos às concentrações de 1,61 e 0,8 μM de nitrato e 0,065 e 0,032 μM de fosfato tiveram taxas de crescimento similares, como indicam os valores próximos, com a diferença percentual em relação ao cultivo em meio padrão (controle) variando de -122,9 a -125,4% (Tabela 7; Anexo 7).

Nos experimentos em que foram avaliados os menores níveis de nitrato (0,016 μM) e fosfato (0,0006 μM), o crescimento dos talos foi aproximadamente 1,5 vezes maior que o observado nas demais concentrações. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os três tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 9).

Tabela 7: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle), dos talos de *C. parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato, com a presença de bactérias.

OLIGOTRÓFICO		%
NO ₃ ⁻ = 1,61 μM PO ₄ ³⁻ = 0,065 μM	-60,0 \pm 0,002*	-122,9
NO ₃ ⁻ = 0,8 μM PO ₄ ³⁻ = 0,032 μM	-66,67 \pm 0,002*	-125,4
NO ₃ ⁻ = 0,016 μM PO ₄ ³⁻ = 0,0006 μM	-40,0 \pm 0,001*	-115,2
Controle	262,5 \pm 0,013	

* Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$)

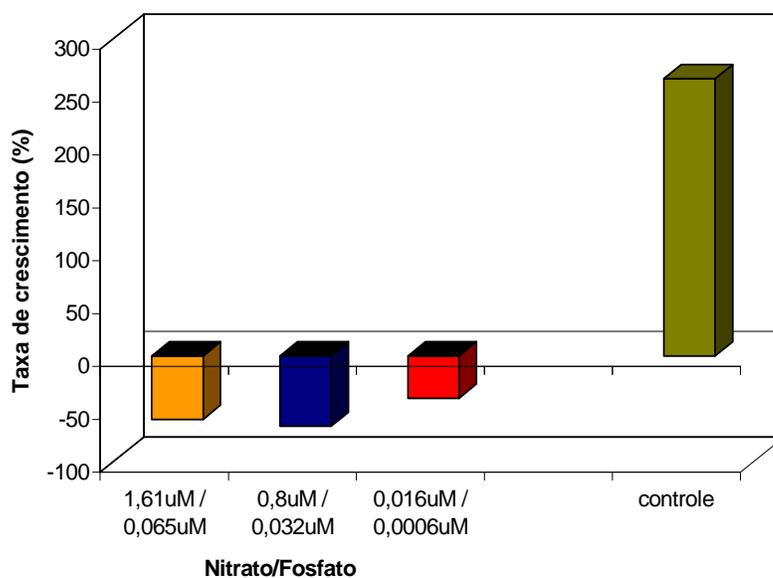


Figura 9: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com a presença de bactérias.

3.2.4 - Mortalidade dos talos de *Champia parvula* em três níveis de trofia (oligotróficos) e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.

As porcentagens de mortalidade, nos experimentos em que as frondes das algas estiveram submetidas às condições de ambiente oligotrófico, foram elevadas. Os valores variaram de 44 a 66,7%, com o valor mais elevado sendo observado nos experimentos em

que os talos da macroalga foram submetidos as maiores concentrações de nitrato e fosfato (Tabela 8).

Tabela 8: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* expostos a diferentes concentrações de nitrato e fosfato, equivalentes a ambientes oligotróficos, sem o acréscimo de zinco.

	NITRATO ; FOSFATO (μM)	MORTALIDADE (%)
Oligotrófico	1,61 ; 0,065	66,7 \pm 6,1
Oligotrófico	0,8 ; 0,032	62,7 \pm 16,2
Oligotrófico	0,016 ; 0,0006	44 \pm 6,9
Controle		12 \pm 4

3.2.5 - *Exposição dos talos de Champia parvula em concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente eutrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.*

A Tabela 9, mostra o resultado dos experimentos onde foram avaliados os efeitos sobre o crescimento dos talos das macroalgas de concentrações de nitrato e fosfato, correspondentes a ambientes eutróficos, associadas às três diferentes concentrações de zinco definidas com base na legislação ambiental (Tabela 2). Os dados brutos estão apresentados no Anexo 8.

3.2.5.1 - Taxa de Crescimento do talo de Champia parvula

A taxa de crescimento da alga cultivada em meio padrão (controle), nos experimentos com bactérias associados a 1,0 e 0,5 mg.L⁻¹ de zinco, foi aproximadamente duas vezes inferior ao observado nos experimentos sem a presença de bactérias.

Nos experimentos com bactérias a maior taxa de crescimento foi observada na associação com a concentração de 0,1 mg.Zn.L⁻¹ e a menor na associação com 1,0 mg.Zn.L⁻¹ (Tabela 9; Figura 10), no entanto as taxas de crescimento não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

A maior diferença percentual em relação ao cultivo realizado em meio padrão (controle), nos experimentos com bactérias ocorreu na associação de 1,0 mg.Zn.L⁻¹ e nos experimentos sem bactérias na associação com 0,1 mg.Zn.L⁻¹.

Nos experimentos sem bactérias, a maior taxa de crescimento ocorreu nos talos submetidos as concentrações associadas a concentração de 0,5 mg.L⁻¹, apresentando uma diferença percentual de 2,58% em relação ao cultivo realizado em meio padrão (controle).

Na concentração de 0,1 mg.Zn.L⁻¹, a taxa de crescimento foi semelhante nos dois tipos de teste (Figura 10).

Tabela 9: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo realizado em meio padrão (controle), dos talos de *C.parvula* submetidos a concentrações de ambiente eutrófico, com e sem a presença de bactérias.

Zinco mg.L ⁻¹	EUTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 500 μ M PO ₄ ³⁻ = 31,25 μ M			
	Experimentos com bactérias		Experimentos sem bactérias	
	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de crescimento (%)	%
1	233,33 \pm 0,018	-56,59	685,71 \pm 0,028	-32,55
0,5	388,89 \pm 0,035	-27,65	1.042,9 \pm 0,038	2,58
0,1	422,22 \pm 0,060	-21,45	433,33 \pm 0,009	- 57,38
Controle	537,50 \pm 0,048		1.016,67 \pm 0,004	

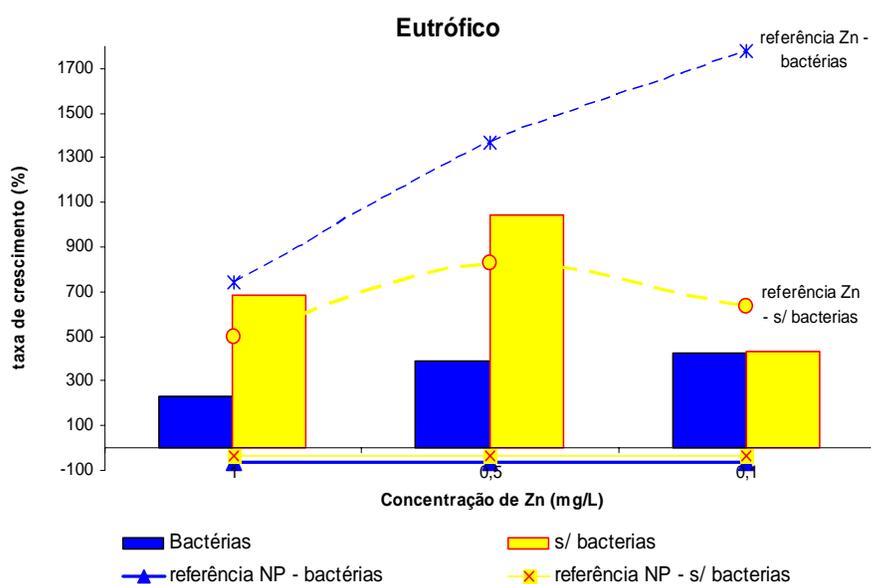


Figura 10: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, com e sem a presença de bactérias.

3.2.5.2 - Mortalidade do talo de *Champia parvula*

No ambiente eutrófico com a presença de biomassa bacteriana (Tabela 10), a mortalidade variou de 2,6% a 14,6%, com os maiores valores sendo observados na associação com 0,1 mg.Zn.L⁻¹.

Os experimentos sem bactérias evidenciaram baixas taxas de mortalidade (porcentagens), com o maior valor sendo observado na associação com 0,1 mg.Zn.L⁻¹.

Tabela 10: Porcentagem de mortalidade (média ± desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente eutrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

	NITRATO ; FOSFATO (μM)	ZINCO (mg.L⁻¹)	MORTALIDADE (%)
Experimentos com Bactérias	500 ; 31,25	1,0	2,6 ± 2,3
		0,5	6,6 ± 8,3
		0,1	14,6 ± 22
Controle			0
Experimentos sem Bactérias	500 ; 31,25	1,0	0
		0,5	0
		0,1	6,6 ± 4,6
Controle			1,3 ± 2,3

3.2.6 - Exposição dos talos de *Champia parvula* a concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente mesotrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.

3.2.6.1 - Taxa de crescimento do talo de *Champia parvula*

No ambiente mesotrófico, os experimentos com bactérias apresentaram nas concentrações associadas a 0,1 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de zinco um aumento na taxa de crescimento em relação ao controle de 3,65% e 35,55%, respectivamente (Tabela 11).

A taxa de crescimento do cultivo em meio padrão (controle), nos experimentos com bactérias, foi aproximadamente duas vezes inferior ao observado nos experimentos sem bactérias, sendo a maior taxa de crescimento, nos dois experimentos, observado na associação com 0,5 mg.Zn.L⁻¹ (Figura 11).

A maior diferença percentual, em relação ao cultivo em meio padrão (controle), ocorreu na associação com 1,0 mg.Zn.L⁻¹ nos testes com bactérias e na associação com 0,1 mg.Zn.L⁻¹, nos testes sem bactérias.

As taxas de crescimento obtidas nos experimentos sem bactérias foram significativamente diferente do obtido no cultivo em meio padrão (controle) (p<0,01).

Os resultados obtidos neste nível de eutrofização, nos experimentos sem bactérias, indicaram valores de taxa de crescimento de 3 a 14 vezes inferior ao observado nos experimentos que continham bactérias (Figura 11). Os dados brutos estão apresentados no Anexo 9.

Tabela 11: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle), dos talos de *C. parvula* submetidos a concentrações de ambiente mesotrófico, com e sem a presença de bactérias.

Zinco mg.L ⁻¹	MESOTRÓFICO			
	NO ₃ ⁻ = 100 μ M		PO ₄ ³⁻ = 6,25 μ M	
	Experimentos com bactérias		Experimentos sem bactérias	
	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de crescimento (%)	%
1	237,5 \pm 0,014	-55,81	83,33 \pm 0,008*	-91,8
0,5	728,57 \pm 0,059	35,55	171,43 \pm 0,021*	-82,67
0,1	557,14 \pm 0,056	3,65	33,33 \pm 0,005*	- 96,72
Controle	537,5 \pm 0,048		1.016,67 \pm 0,004	

* significativamente diferente do controle (P < 0,01)

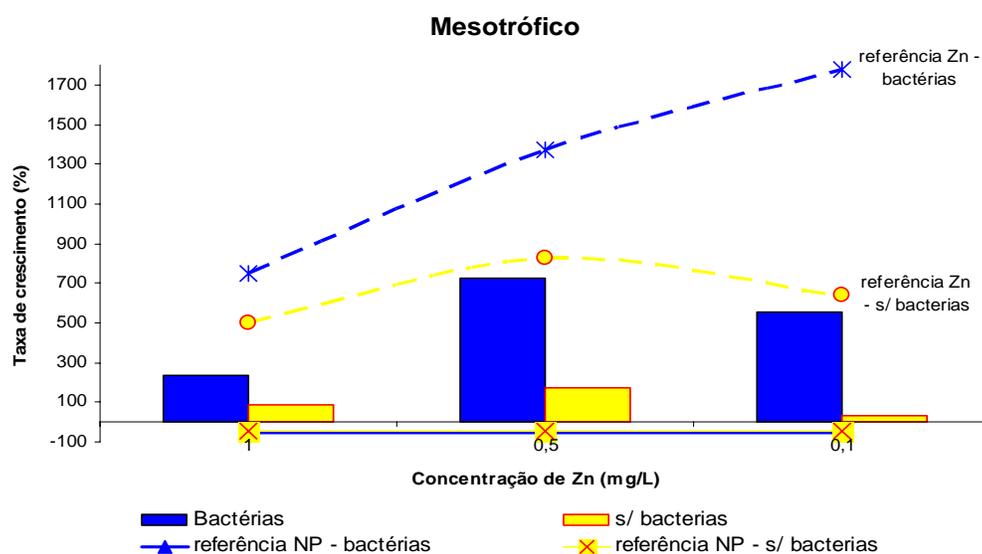


Figura 11: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrogênio e fósforo equivalentes a ambiente mesotrófico, com e sem a presença de bactérias.

3.2.6.2 - Mortalidade do talo de *Champia parvula*

Nos experimentos com bactérias, a mortalidade variou de 5,3% a 20%, com o maior valor sendo observado na associação com 0,1 mg.Zn.L⁻¹ (Tabela 12).

A porcentagem de mortalidade foi mais elevada nos experimentos sem bactérias, variando de 46% a 62,6%.

No controle, apesar da mortalidade ter sido maior nos experimentos sem bactérias, não chegou a ser significativa, com valor médio inferior a 2%.

Tabela 12: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes realizados sob concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente mesotrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

	NITRATO ; FOSFATO (μ M)	ZINCO (mg.L ⁻¹) 1)	MORTALIDADE (%)
Experimentos com Bactérias	100 ; 6,25	1,0	5,3 \pm 6,1
		0,5	6,6 \pm 8,3
		0,1	20 \pm 14,4
Controle			0
Experimentos sem Bactérias	100 ; 6,25	1,0	46 \pm 20,5
		0,5	62,6 \pm 16,2
		0,1	62,6 \pm 15,1
Controle			1,3 \pm 2,3

3.2.7 - *Exposição dos talos de Champia parvula a concentração de nutrientes correspondente ao nível de trofia de um ambiente oligotrófico e três níveis de zinco, com e sem a presença de bactérias.*

3.2.7.1 - *Taxa de crescimento dos talos de Champia parvula*

No ambiente oligotrófico, as taxas de crescimento dos talos de *C. parvula* foram maiores nos experimentos sem bactérias, variando de 285,71% a 614,3% (Tabela 13). A menor taxa de crescimento (142,86%) foi observada nos experimentos com bactérias associados a 1 mg.L⁻¹.de zinco.

A maior diferença percentual em relação ao cultivo em meio padrão (controle), nos dois tipos de experimentos, foi encontrada na associação com 1mg.Zn.L⁻¹, e as maiores taxas de crescimento na associação com 0,5 mg.Zn.L⁻¹ (Figura 12).

A taxa de crescimento do controle dos experimentos com bactérias foi aproximadamente duas vezes inferior àquela observada nos experimentos sem bactérias. Os dados brutos estão apresentados no Anexo 10.

Tabela 13: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle) dos talos de *C. parvula* submetidos a concentrações de ambiente oligotrófico, com e sem a presença de bactérias.

	OLIGOTRÓFICO			
	$\text{NO}_3^- = 1 \mu\text{M}$		$\text{PO}_4^{3-} = 0,06 \mu\text{M}$	
	Experimentos com bactérias		Experimentos sem bactérias	
Zinco mg.L^{-1}	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de crescimento (%)	%
1	$142,86 \pm 0,012$	-73,42	$285,71 \pm 0,016$	-71,9
0,5	$228,57 \pm 0,026$	-57,48	$614,3 \pm 0,035$	-39,6
0,1	$147,62 \pm 0,017$	-72,54	$471,4 \pm 0,027$	-53,63
Controle	$537,5 \pm 0,048$		$1.016,67 \pm 0,004$	

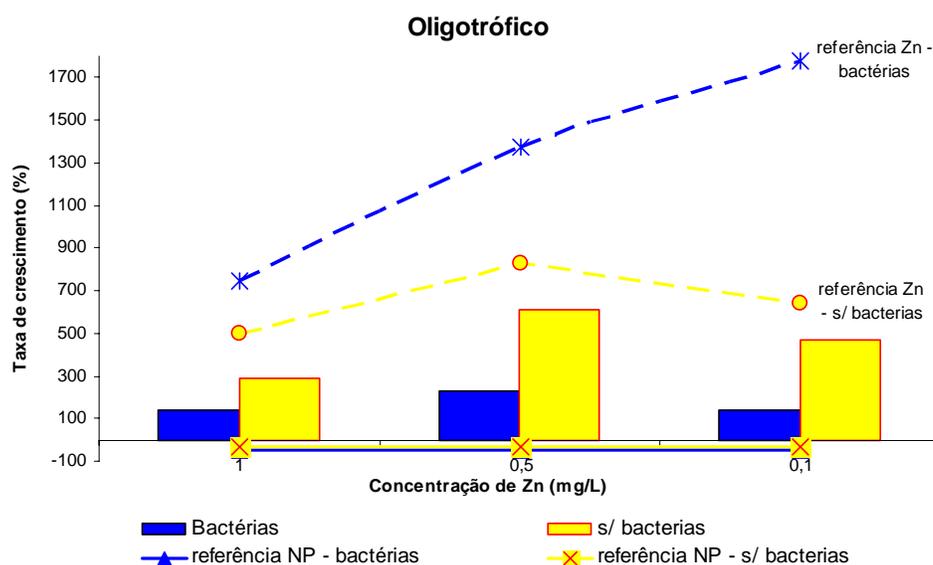


Figura 12: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com e sem a presença de bactérias.

3.2.7.2 - Mortalidade dos talos de *Champia parvula*

A mortalidade variou de 16 a 21,3%, nos experimentos com bactérias e de 20 a 34,6% nos experimentos sem bactérias.

A maior porcentagem de mortalidade (34,6%) foi observada na associação com a concentração de 0,5 mg.Zn.L⁻¹, nos testes sem bactérias (Tabela 14).

Tabela 14: Porcentagem de mortalidade (média ± desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações de nitrato e fosfato referentes a ambiente oligotrófico, associadas a concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

	NITRATO ; FOSFATO (μM)	ZINCO (mg.L⁻¹)	MORTALIDADE (%)
Experimentos com Bactérias	1 ; 0,06	1,0	16 ± 21,2
		0,5	20 ± 12
		0,1	21,3 ± 16,7
	Controle		0
Experimentos sem Bactérias	1 ; 0,06	1,0	20,0 ± 25
		0,5	34,6 ± 22
		0,1	26,6 ± 33,3
	Controle		1,3 ± 2,3

A Figura 13 apresenta uma comparação da taxa de crescimento do talo das algas submetidos aos três diferentes estados tróficos nos experimentos com bactérias.

A maior redução na taxa de crescimento, em relação ao controle, ocorreu nos experimentos que simularam um ambiente oligotrófico.

Nos três níveis de estado trófico, a menor taxa de crescimento foi observada na combinação com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco.

As frondes submetidas ao ambiente mesotrófico, na presença de bactérias, tiveram as maiores taxas de crescimento em relação os demais ambientes, independente da quantidade de zinco, com a combinação com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ resultando em crescimento 1,3 vezes superior ao observado no cultivo em meio padrão (controle).

Nos experimentos sem bactérias, o ambiente mesotrófico apresentou as menores taxas de crescimento (Figura 14).

As frondes submetidas às concentrações de ambiente eutrófico tiveram as maiores taxas de crescimento, exceto na combinação com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco onde o crescimento das frondes foi próximo do observado no ambiente oligotrófico. A taxa de crescimento foi superior a do controle na combinação com $0,5 \text{ mg.Zn.L}^{-1}$.

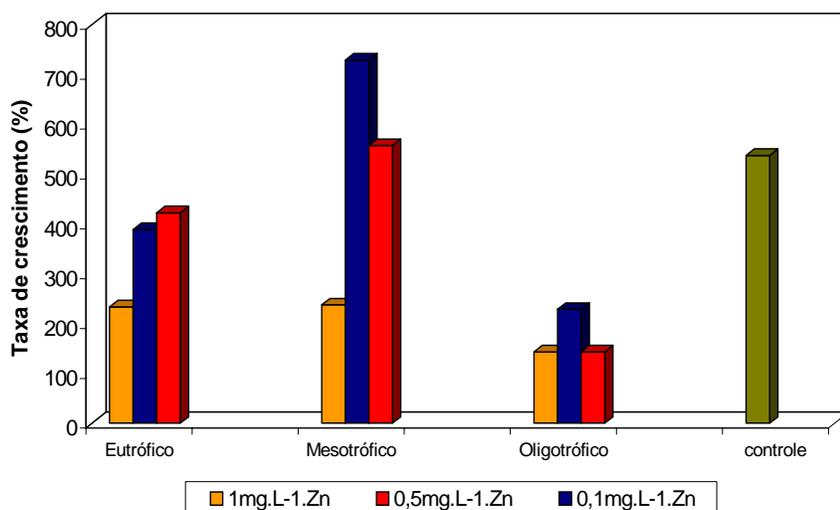


Figura 13: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, em combinação com zinco, com a presença de bactérias.

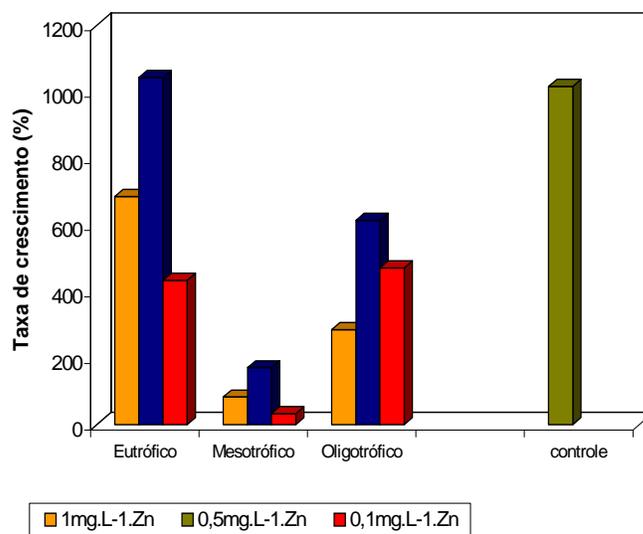


Figura 14: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutróficos, mesotróficos e oligotróficos em combinação com zinco, sem a presença de bactérias.

Nestes três ambientes (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico), os talos de *C. parvula* mostraram alteração na morfologia em função da concentração de zinco adicionada no teste, sendo observado tanto nos experimentos com bactérias, quanto nos experimentos sem bactérias um menor número de ramificação quando as concentrações de nitrato e fosfato estavam combinadas com a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco.

3.2.8 - Exposição dos talos de Champia parvula em meios enriquecidos com nitrato e fosfato, com e sem a presença de bactérias (testes de referência).

3.2.8.1 - Taxa de crescimento dos talos de Champia parvula

A Tabela 15 apresenta os resultados das taxas de crescimento e porcentagens de crescimento relativo, obtidas nos experimentos em que foram avaliadas apenas as diferentes concentrações de nitrato e fosfato, correspondentes a ambientes eutróficos, mesotróficos e oligotróficos, sem a combinação com o zinco.

As taxas de crescimento foram significativamente diferente do cultivo em meio padrão (controle) tanto nos testes com bactérias ($p < 0,05$) quanto nos testes sem bactérias ($p < 0,01$). Entretanto, a avaliação dos valores de crescimento de cada tratamento (com bactérias e sem bactérias) separadamente, não indicou diferença significativa entre suas médias ($p > 0,05$).

Nos três tratamentos (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico), a taxa de crescimento obtida nos testes com bactérias foi aproximadamente 2 vezes inferior àquela observada nos testes sem bactérias (Figuras 15 e 16).

A diferença percentual em relação ao controle variou de -107,1 a -110,7% nos testes com bactérias e de -103,7 a 104,8% nos testes sem bactérias. Os dados brutos estão apresentados no Anexo 11.

Tabela 15: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle), dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato, fosfato, com e sem a presença de bactérias.

	Experimentos com Bactérias		Experimentos sem Bactérias	
	Taxa de crescimento (%)	%	Taxa de Crescimento (%)	%
EUTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 500 μM PO ₄ ³⁻ = 31,25 μM	-66,67 \pm 0,001*	-110,7	-33,33 \pm 0,001*	-103,7
MESOTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 100 μM PO ₄ ³⁻ = 6,25 μM	-55,56 \pm 0,001*	-108,9	-42,86 \pm 0,002**	-104,8
OLIGOTRÓFICO NO ₃ ⁻ = 1 μM PO ₄ ³⁻ = 0,06 μM	-44,4 \pm 0,001*	-107,1	-33,33 \pm 0,001*	-103,7
Controle	625,0 \pm 0,04		900,0 \pm 0,04	

* Diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05)

**Diferença significativa em relação ao controle (p < 0,01)

3.2.8.2 - Mortalidade dos talos de *Champia parvula*

As porcentagens de mortalidade foram elevadas tanto nos testes com bactérias como nos testes sem bactérias (Tabela 16).

Os testes com bactérias resultaram em uma variação na porcentagem de mortalidade dos talos de 49,3% a 68%, com os maiores valores sendo observados no ambiente eutrófico e os menores no ambiente oligotrófico.

As porcentagens de mortalidade, nos testes sem bactérias, variaram de 50,7% a 58,7%, com o menor menor valor ocorrendo no ambiente eutrófico.

No controle, apenas ocorreu mortalidade no testes sem bactérias, no entanto, esta não foi significativa, atingindo apenas 8% das frondes de *C. parvula*.

Tabela 16: Porcentagem de mortalidade (média \pm desvio padrão) dos talos de *C. parvula* nos testes com concentrações referentes a ambientes eutróficos, mesotróficos e oligotróficos, sem o acréscimo de zinco, com e sem a presença de bactérias.

	NITRATO ; FOSFATO (μM)	MORTALIDADE (%)	
		Experimentos com Bactérias	Experimentos sem Bactérias
Eutrófico	500 ; 31,25	68 \pm 0	50,7 \pm 2,3
Mesotrófico	100 ; 6,25	54,7 \pm 4,6	57,3 \pm 11,5
Oligotrófico	1 ; 0,06	49,3 \pm 9,2	58,7 \pm 16
Controle		0	8 \pm 4

Nos experimentos de referência, com a presença de bactérias, ocorreu um aumento gradativo na taxa de crescimento dos níveis mais altos de nitrato e fosfato para os níveis mais baixos, não sendo observado, no entanto, diferença significativa entre os valores médios de crescimento dos três ambientes ($p > 0,05$) (Figura 15).

Nos experimentos sem a presença de bactérias, a taxa de crescimento foi semelhante nos três ambientes avaliados (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico) (Figura 16).

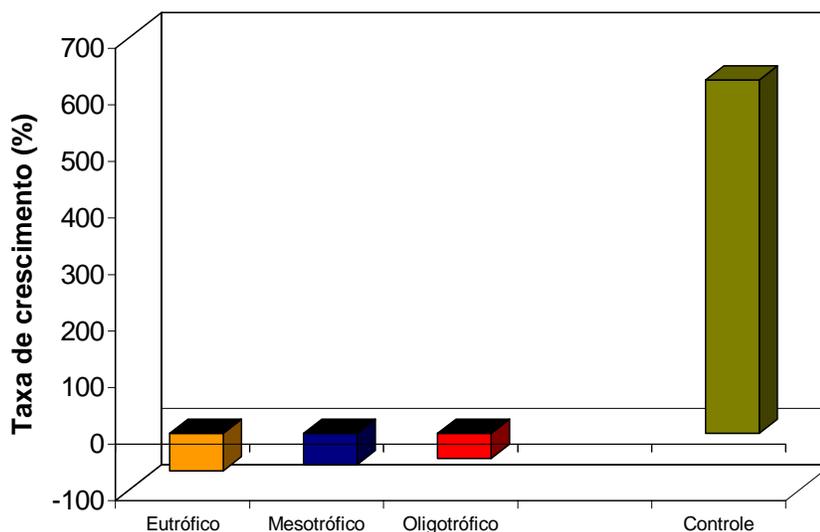


Figura 15: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, com a presença de bactérias.

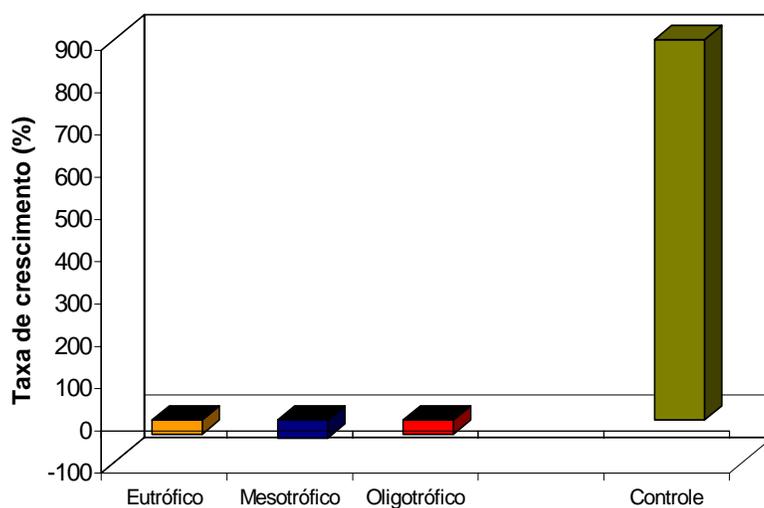


Figura 16: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico, sem a presença de bactérias.

Nos experimentos, em que foram avaliadas apenas concentrações de nitrato e fosfato, os talos de *C. parvula* apresentaram alteração na morfologia, nos três diferentes níveis de eutrofização, quando estes estavam combinados a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco. A exposição das algas a esta combinação levou a frondes menores e menos ramificadas .

3.2.9 - Exposição dos talos de *Champia parvula* em meios enriquecidos com zinco, com e sem a presença de bactérias (testes de referência).

3.2.9.1 - Taxa de crescimento de *Champia parvula*

Nos experimentos com bactérias, a maior taxa de crescimento foi observada na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e a menor na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Em relação ao cultivo em meio padrão (controle), a taxa de crescimento nas concentrações de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram, respectivamente, um aumento de 105,1% e 58,46% (Tabela 17; Figura 17).

Embora, nos testes com bactérias, o crescimento na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ tenha sido 13,99% inferior ao observado no obtido no cultivo em meio padrão (controle), a diferença entre as médias não foi significativa ($p > 0,05$).

Nos testes sem bactérias, a maior taxa de crescimento foi observada na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e a menor na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Os maiores aumentos na taxa de crescimento em relação ao cultivo em meio padrão (controle), ocorreram nas concentrações de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (231,4%) e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (155,0%), sendo observado para estas duas concentrações diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$; $p < 0,05$) (Tabela 17; Figura 18).

A taxa de crescimento obtida no cultivo em meio padrão (controle), nos testes com bactérias, foi cerca de 3,5 vezes superior ao observado no controle dos testes sem bactérias.

Os dados brutos estão apresentados no Anexo 12.

Tabela 17: Taxa de crescimento (média \pm desvio padrão) e diferença percentual de crescimento em relação ao controle, dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

ZINCO (mg.L ⁻¹)	Experimentos com Bactérias		Experimentos sem Bactérias	
	Taxa de Crescimento (%)	%	Taxa de Crescimento (%)	%
1,0	745,5 \pm 0,055	-13,99	500,0 \pm 0,013	100,0
0,5	1.370,0 \pm 0,037	58,08	828,6 \pm 0,007**	231,4
0,1	1.777,8 \pm 0,051	105,1	637,5 \pm 0,016*	155,0
Controle	866,7 \pm 0,036		250,0 \pm 0,01	

Diferença significativa em relação ao controle: * (p < 0,05) ** (p < 0,01)

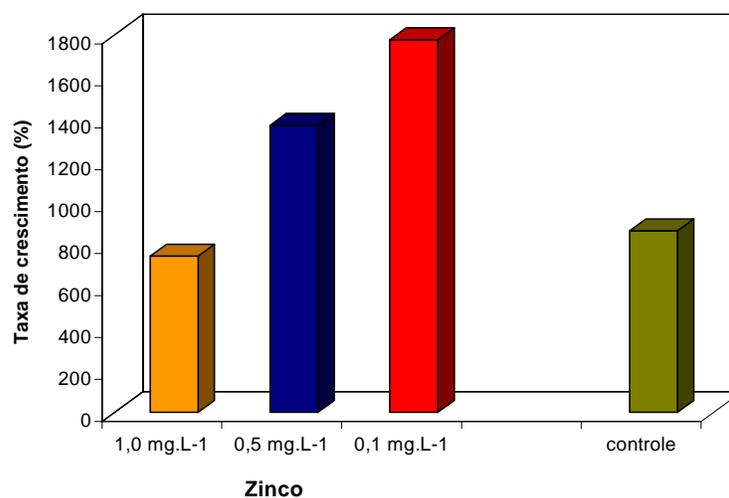


Figura 17: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, com a presença de bactérias.

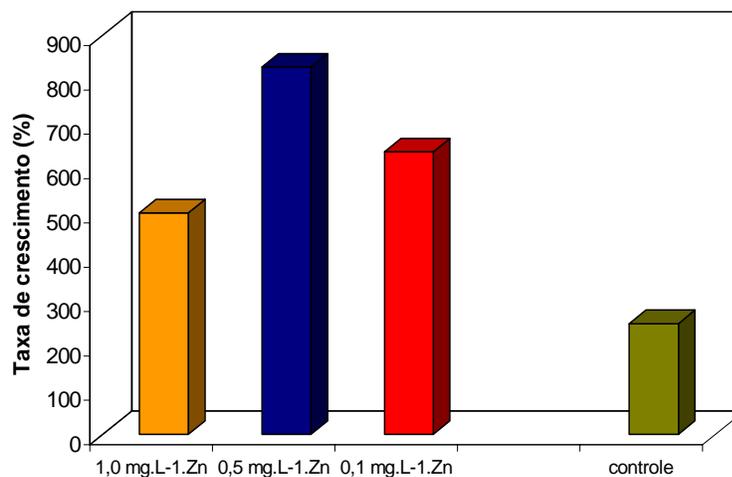


Figura 18: Valores médios da taxa de crescimento dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de zinco, sem a presença de bactérias.

Nos experimentos com bactérias a morfologia apresentou alteração em função do aumento da concentração de zinco, observando-se na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ frondes com crescimento reduzido e ramificações mais curtas. Nos experimentos sem bactérias, a morfologia se mostrou menos alterada, não sendo notada diferença marcante entre as frondes expostas as três concentrações de zinco.

3.2.9.2 - Mortalidade dos talos de *Champia parvula*

Nos experimentos com bactérias o percentual de mortalidade das frondes nas três concentrações avaliadas foi inexpressivo, variando de 0 a 1,3% (Tabela 18).

Nos experimentos sem bactérias, a porcentagem de mortalidade variou de 5,3% a 18,3%, com o maior valor sendo observado nos experimentos com 0,1 mg.L⁻¹.

Tabela 18: Porcentagem de mortalidade (média ± desvio padrão) dos talos de *Champia parvula* nos testes com diferentes concentrações de zinco, com e sem a presença de bactérias.

ZINCO (mg.L ⁻¹)	MORTALIDADE (%)	
	Experimentos com Bactérias	Experimentos sem Bactérias
1,0	0	6,6 ± 0
0,5	1,3 ± 2,3	5,3 ± 5,7
0,1	0	18,3 ± 8,5
Controle	4 ± 6,9	16 ± 5,7

3.2.10 - *Biomassa bacteriana*

3.2.10.1 - *Biomassa bacteriana adsorvida ao talo de Champia parvula*

A biomassa bacteriana obtida nos talos de *Champia parvula* e nas diferentes concentrações dos experimentos está descrita no Anexo 13. Em todas as amostras prevaleceram bactérias em forma de bastonetes, não sendo observado cocos ou espirilos.

3.2.10.1.1 - *Ambiente eutrófico*

No ambiente eutrófico não ocorreu diferença significativa entre a média obtida no cultivo em meio padrão (controle) e a observada nos testes com as três variações de zinco ($p > 0,05$) (Figura 19), não sendo também observada diferença entre as médias dos três tipos de soluções avaliadas no teste.

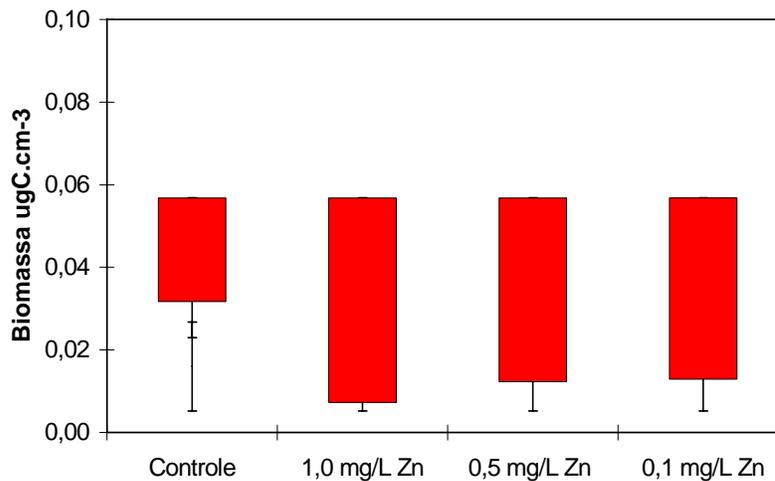


Figura 19: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *C. parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, com as diferentes combinações de zinco.

3.2.10.1.2 - Ambiente mesotrófico

No ambiente mesotrófico (Figura 20), a biomassa bacteriana média dos três tipos de solução variou de 0,03 a 0,04, não apresentando diferença significativa em relação do cultivo em meio padrão (controle) ($p > 0,05$).

As médias das biomassa bacterianas dos três tratamentos também não apresentaram diferença significativa entre elas ($p > 0,05$), com o menor valor sendo observado na associação com 1,0 mg.L⁻¹.

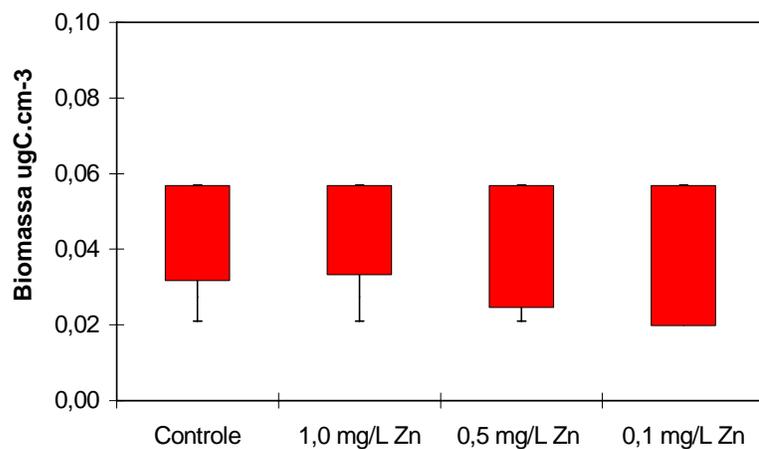


Figura 20: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *C. parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente mesotrófico, com as diferentes combinações de zinco.

3.2.10.1.3 - Ambiente oligotrófico

No ambiente oligotrófico, a média da biomassa bacteriana não mostrou diferença significativa do controle (meio padrão) em nenhuma das soluções avaliadas, com os maiores valores de biomassa ($0,07 \mu\text{gC.cm}^{-3}$) sendo observados na associação com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 21).

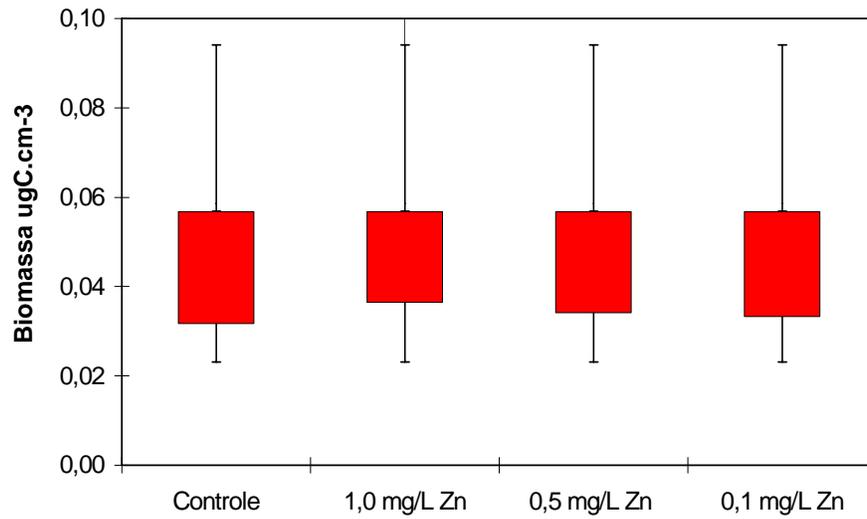


Figura 21: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *C. parvula* submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente oligotrófico, com as diferentes combinações de zinco.

3.2.10.1.4 - Experimentos com nitrato e fosfato (Testes de referência)

A biomassa bacteriana dos talos da macroalga, nos três ambientes (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico) foi aproximadamente 3 vezes superior ao observado no controle ($p < 0,001$) (Figura 22).

Nos três ambientes, a biomassa variou de 0,089 a 0,098 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$, não havendo diferença significativa entre suas médias ($p > 0,05$).

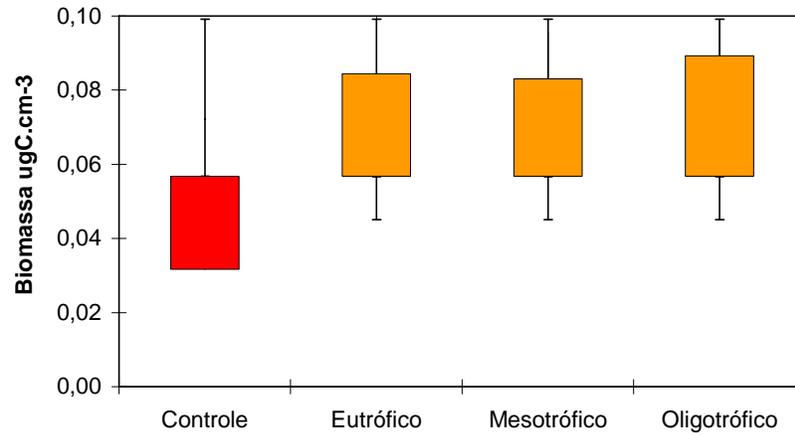


Figura 22: Variação da biomassa bacteriana, nos talos de *C. parvula*, submetidos às concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambientes eutrófico, mesotrófico e oligotrófico.

3.2.10.1.5 - Experimentos com zinco

Nos experimentos com zinco, não foi observada diferença significativa entre o controle e as diferentes concentrações avaliadas, assim como entre as concentrações, com suas médias variando de 0,035 a 0,038 $\mu\text{gC.cm}^{-3}$ ($p > 0,05$) (Figura 23).

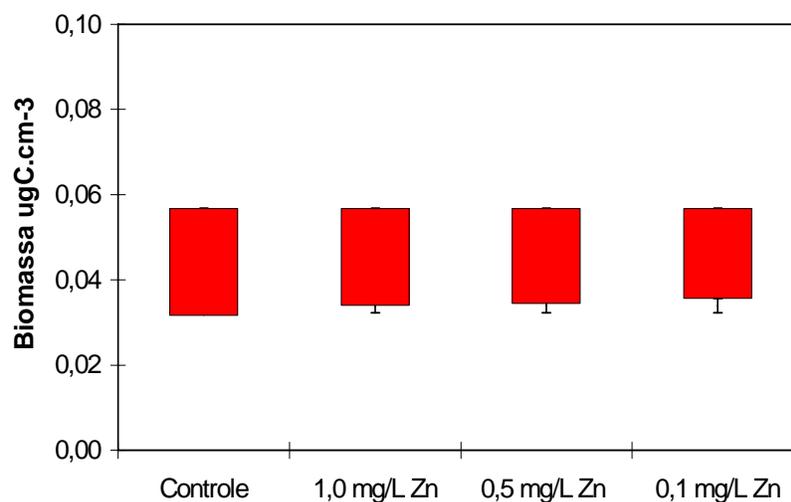


Figura 23: Variação da biomassa bacteriana nos talos de *C. parvula*, submetidos às diferentes concentrações de zinco.

3.2.10.2 - Biomassa bacteriana disponível na coluna d'água

3.2.10.2.1 - Ambiente eutrófico

A biomassa bacteriana quando exposta a ambiente eutrófico associado a 0,5 mg.L⁻¹ de zinco apresentou crescimento semelhante ao do controle ($p > 0,05$). No entanto, quando as concentrações de nitrato e fosfato estiveram associadas a 1,0 mg.L⁻¹ e a 0,1 mg.L⁻¹ de zinco, a biomassa foi de 4 a 5 vezes inferior ao observado no controle ($p < 0,001$) (Figura 24).

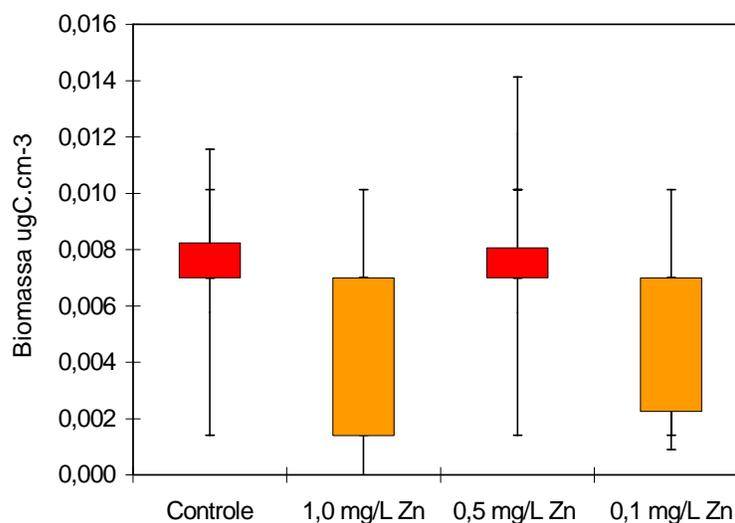


Figura 24: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente eutrófico.

3.2.10.2.2 - Ambiente mesotrófico

No ambiente mesotrófico houve redução de 60 a 80% na biomassa em relação ao controle (meio padrão), independente da concentração de zinco associada ($p < 0,001$) (Figura 25). Entretanto, não foi observada diferença entre as médias das três soluções avaliadas ($p > 0,05$).

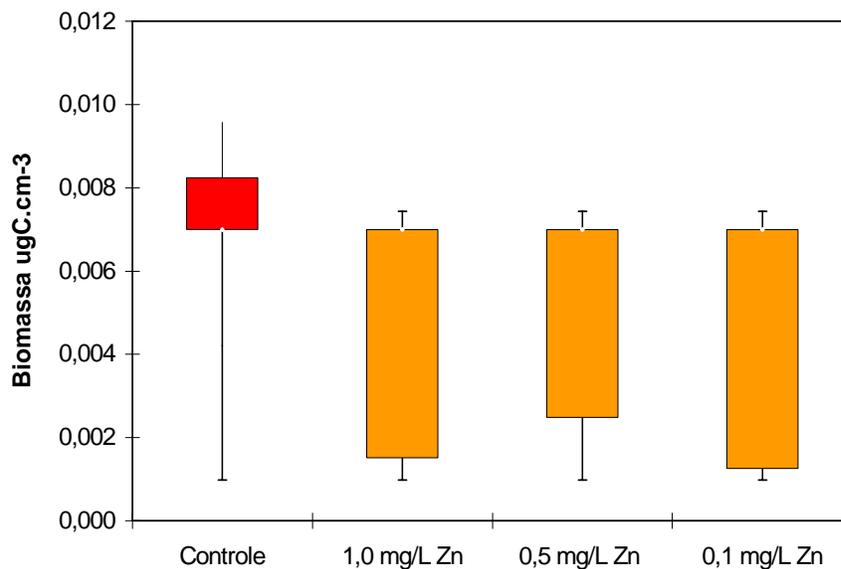


Figura 25: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente mesotrófico.

3.2.10.2.3 - Ambiente oligotrófico

As concentrações de ambiente oligotrófico apresentaram redução de 78,65% na biomassa bacteriana em relação ao meio de cultivo padrão (controle), quando associada a 1,0 mg.Zn.L⁻¹ ($p < 0,001$) e de 42,69% quando associada a 0,1 mg.Zn.L⁻¹ ($p < 0,001$). A associação com a concentração de 0,5 mg.Zn.L⁻¹ não mostrou diferença do controle ($p > 0,05$) (Figura 26).

No entanto, a biomassa bacteriana média apresentou diferença significativa ($p < 0,001$) em relação as diferentes associações do ambiente oligotrófico com zinco, com a maior média sendo observada na associação com $0,5 \text{ mg.Zn.L}^{-1}$ ($0,0079 \text{ } \mu\text{gC.cm}^{-3}$).

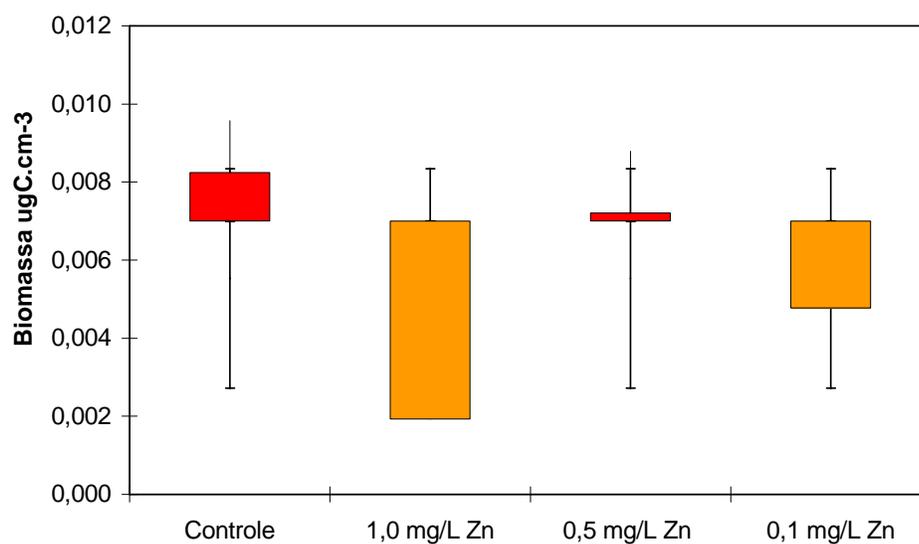


Figura 26: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações equivalentes a ambiente oligotrófico.

3.2.10.2.4 - Experimentos com nitrato e fosfato (Testes de referência)

Nestes experimentos, os valores de biomassa variaram de $0,0096$ a $0,012 \text{ } \mu\text{gC.cm}^{-3}$, não sendo observada diferença significativa entre os três níveis de eutrofização avaliados.

No entanto, foi observada diferença significativa entre o controle e os ambientes mesotrófico e oligotrófico ($p < 0,05$) (Figura 27).

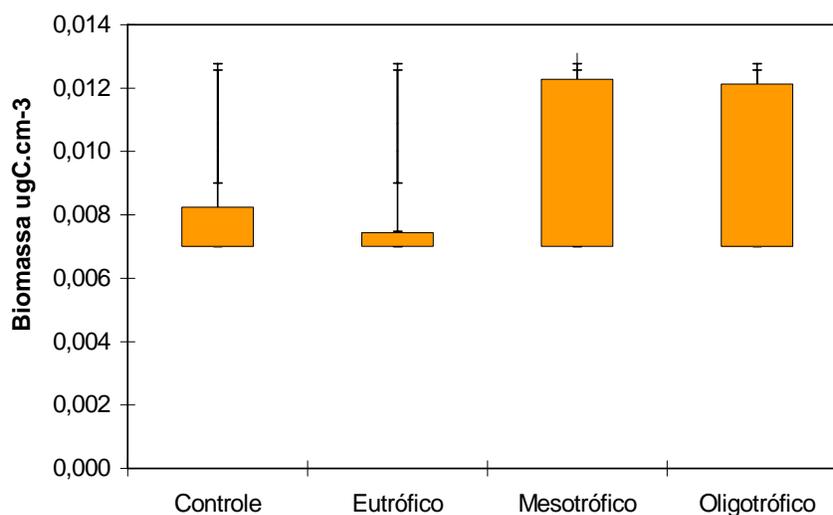


Figura 27: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com concentrações de nitrato e fosfato equivalentes a ambiente eutrófico, mesotrófico e oligotrófico.

3.2.10.2.5 - Experimentos com zinco

A biomassa bacteriana, nestes experimentos, variou de 0,005 a 0,01 μ gC.cm⁻³, sendo observado na concentração de 0,5 mg.L⁻¹.Zn um valor de biomassa 79,59% superior ao

observado no cultivo em meio padrão (controle) ($p < 0,001$). A biomassa média, desta concentração, foi de 4 a 8 vezes superior as concentrações de 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹, sendo observada diferença significativa entre elas ($p < 0,001$).

As concentrações de 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$), embora tenha sido observado um aumento de 12,4% e uma redução de 43,8%, respectivamente em comparação com o controle (meio padrão) (Figura 28). Os dados brutos estão apresentados no Anexo 14.

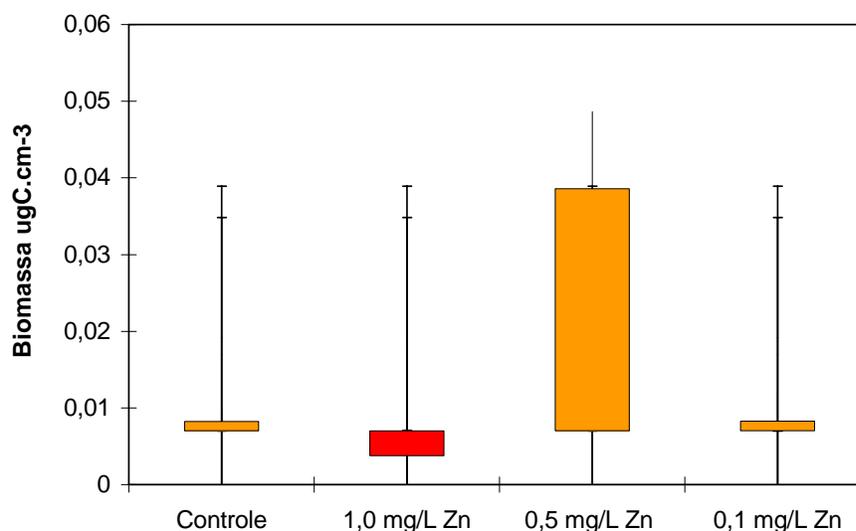


Figura 28: Variação da biomassa bacteriana na coluna d'água, nos experimentos com diferentes concentrações de zinco.

3.2.11 - Variáveis físicas e químicas

Os valores das variáveis medidas (OD, pH e salinidade) em todos os testes estiveram dentro dos limites aceitáveis (Anexo 15).

O valor de oxigênio dissolvido esteve sempre acima de $4,0 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$, sendo no geral observado um aumento no oxigênio nas amostras após 72 horas de teste, o pH variou de 7,0 a 8,0, e a salinidade de 31 a 36 ‰.

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação da biomassa bacteriana adsorvida ao talo de algas marinhas na Praia da Baleia (área controle) e na Praia de Boa Viagem (área impactada).

No ecossistema marinho, as bactérias assumem um importante papel, servindo, muitas vezes como indicador do estado trófico do ambiente. Na análise de diferentes estratos do ambiente marinho, o maior número de bactérias está geralmente adsorvido ao sedimento (Epstein & Rossel, 1995). No entanto, este número sofre variação entre os ambientes, tanto pelo aporte de matéria orgânica, quanto pelo consumo dos heterótrofos (Bispo *et al*, 2001), sendo a concentração bacteriana e sua atividade usualmente mais elevadas em ambientes impactados, sujeitos a eutrofização (Barbosa, 1991; Cavari & Colwell, 1988; Künnis, 1991).

No presente estudo a maior densidade e biomassa bacteriana foram encontradas nas amostras de sedimento das duas áreas estudadas, quando comparadas com os compartimentos água e talo das macroalgas. Também, similar ao padrão descrito na literatura e corroborado pelo presente trabalho, é o fato da biomassa bacteriana nas áreas impactadas, mais eutróficas, serem mais elevadas, uma ordem de grandeza superior a da área controle. Um padrão semelhante foi observado nas amostras da coluna d'água, com o valor de biomassa bacteriana da área impactada (Praia de Boa viagem) sendo cerca de 28 vezes superior ao observado na área controle (Praia da Baleia).

A biomassa bacteriana observada no sedimento ($1,29 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$) e na coluna d'água ($0,198 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$), refletiram a influência do aporte de esgoto doméstico na Praia

de Boa Viagem, mostrando ser a biomassa bacteriana uma ferramenta eficaz na avaliação do estado trófico dos diferentes compartimentos do ambiente marinho.

Bispo (2001), avaliando o número de bactérias no sedimento da Praia de Boa Viagem registrou uma variação de densidade de $4,9 \times 10^5$ bactérias g^{-1} no inverno para $7,0 \times 10^8$ bactérias g^{-1} no verão. Segundo o autor, a diferença da ordem de 10^3 células nesta região durante o verão, deve-se à somatória das bactérias autóctones heterótrofas à elevada densidade de coliformes fecais, proveniente do aporte de esgoto *in natura*.

Um outro tipo de interação que ocorre com as bactérias e parece ser de grande importância ecológica, é sua agregação à superfície dos tecidos animais e vegetais. Esta agregação pode ser essencial para os organismos de ambientes marinhos e dulcícolas, tornando-os menos vulneráveis a microrganismos patogênicos e beneficiando o desenvolvimento de grupos específicos de bactérias (Gil-Turnes *et al*, 1989; Johnson, *et al*, 1991; Provasoli & Pintner, 1980).

Neste estudo, a avaliação da biomassa bacteriana aderida às diferentes espécies, indicou a existência de diferença significativa apenas entre as espécies *U. fasciata* e *C. parvula* da área controle, sugerindo que a adsorção das bactérias não depende primariamente da morfologia e da estrutura do talo, podendo estar tanto diretamente relacionada à densidade bacteriana disponível na coluna d'água como ao ciclo vital da alga.

A diferença de uma ordem de grandeza observada, entre a biomassa bacteriana média aderida aos talos das espécies de macroalgas avaliadas da área controle ($0,0065 \mu gC.cm^{-3}$) e na área impactada ($0,038 \mu gC.cm^{-3}$) sugere haver uma relação direta com a densidade bacteriana disponível na coluna d'água.

Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Corre & Prieur (1990) que sugerem que o número de bactérias da fronde da macroalga *Laminaria digitata*, seria controlada pelas condições ambientais, pela densidade bacteriana na coluna d'água e por aspectos relacionados à biologia algácea e ao estágio do ciclo vital.

O alto valor de biomassa bacteriana aderida ao talo de *C. parvula* oriunda de cultivo ($0,0568 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$) pode ser explicado por ser este um sistema fechado, onde não ocorre predação, sendo portanto maior a disponibilidade de fontes de carbono para as bactérias na coluna d'água.

No presente estudo, na área impactada não foi observada uma relação direta entre a densidade bacteriana disponível na coluna d'água e aquela aderida aos talos das macroalgas. O valor de biomassa observado na amostra de água foi aproximadamente cinco vezes superior à média do valor observado nas amostras de macroalgas. Na Praia da Boa Viagem, a biomassa bacteriana está concentrada no material particulado, seja no sedimento ou na coluna d'água com alta incidência de floculação marinha (Crapez, 2002), criando um nicho propício à manutenção da biomassa bacteriana. Este resultado também pode sugerir que deve haver um ponto de saturação na densidade de bactérias aderidas por unidade de superfície no talo das macroalgas, e que embora a adsorção tenha sido superior nesta área, ela não refletiu o real estado trófico do ambiente.

As algas marinhas, em função das interações que ocorrem quando as bactérias as utilizam como substrato para fixação, podem ser utilizadas como uma ferramenta na avaliação de efeitos de poluentes no ambiente marinho. Corre & Prieur (1990), verificaram que *Laminaria digitata* era colonizada pela comunidade bacteriana resultando em

incrementos de densidade, diversidade e atividade metabólica à medida que os tecidos jovens se tornavam maduros ou envelheciam.

A biomassa bacteriana média aderida aos talos das macroalgas da Praia da Baleia ($0,0065 \pm 0,001 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$) foi significativamente diferente ($p = < 0,0001$; $F = 4364,9$) da biomassa bacteriana média observada na Praia de Boa Viagem ($0,038 \pm 0,006 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$), sendo o valor médio de biomassa bacteriana aderida aos talos das macroalgas da Praia da Baleia uma ordem de grandeza inferior aquele obtido para as macroalgas da Praia de Boa Viagem.

Os resultados relativos à biomassa bacteriana do sedimento ($p= 0,000012$; $F= 763,88$) e da água ($p= 0,000005$; $F= 632,91$) das duas áreas, separadamente, também indicaram diferenças significativas, observando-se, tanto na água quanto no sedimento, uma maior biomassa bacteriana nas amostras da Praia de Boa Viagem.

Os testes estatísticos confirmam diferença significativa entre as áreas controle e impactada, sustentando que o emprego de número e biomassa bacterianos são avaliações relevantes e consistentes para evidenciar o estado trófico do ambiente, utilizando distintos substratos marinhos.

4.2 - *Exposição de *Champia parvula* a diferentes combinações de fatores: concentrações de nitrato e fosfato, três níveis de zinco e presença ou ausência de bactérias.*

4.2.1 - *Crescimento dos talos de *Champia parvula* expostos a três níveis concentrações de ambiente oligotrófico e três níveis de zinco, com a presença de bactérias.*

A atividade humana tem causado impactos profundos nos ciclos biogeoquímicos globais, afetando profundamente a qualidade da água e alterando os ecossistemas marinhos (Smith *et al*, 1999).

Durante a última década, um aumento na quantidade de nutrientes, particularmente nitrogênio e fósforo tem levado a mudanças nas comunidade de macroalgas, influenciando no seu crescimento, biomassa e composição específica (Magnusson *et al*, 1994; Smith *et al*, 1999).

As espécies de macroalgas têm apresentado em função da concentração de nutrientes a que estão expostas, resposta diferenciada em relação ao crescimento, indicando a existência de uma faixa limite para a absorção, e que concentrações superiores ou inferiores aos limites estabelecidos nesta faixa podem provocar efeito adverso no crescimento (Peckol & Rivers, 1995).

Amado *et al*, 1994, citam que a deficiência de elementos essenciais abaixo de uma determinada concentração ótima para o crescimento pode constituir em um fator limitante para o desenvolvimento das macroalgas.

Neste estudo, a redução drástica da taxa de crescimento dos talos que foram submetidos às concentrações mais baixas de nitrato ($0,016 \mu\text{M}$) e fosfato ($0,0006\mu\text{M}$), indica que as concentrações de nutrientes utilizadas no teste atuaram como um fator limitante, influenciando no crescimento de *C. parvula*.

O fato do crescimento das macroalgas ser diferenciado em função da espécie e da concentração de nutrientes a que são expostas, indica que a determinação, no presente trabalho, de valores considerados médios para as faixas de nutrientes estabelecidas para os diferentes níveis de eutrofização foi o procedimento mais coerente.

A literatura cita que, mudanças na composição bioquímica sob diferentes regimes de nutrientes pode resultar em diferentes potenciais de bioacumulação de metais pesados em macroalgas. Em relação ao zinco, ocorre uma menor acumulação quando as macroalgas estão expostas a baixas concentrações de nitrato (Lee & Wang, 2001).

No presente estudo, as maiores taxas de crescimento nas concentrações de nitrato ($1,61$ e $0,8 \mu\text{M}$) e fosfato ($0,065$ e $0,032 \mu\text{M}$) quando combinadas a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco, indicam a ocorrência de uma menor absorção do zinco devido aos baixos níveis de nutriente, reduzindo o efeito tóxico que esta concentração de zinco poderia causar, confirmando assim, a influência de macronutrientes na concentração de metais em macroalgas.

Os resultados, obtidos nos testes onde se avaliou o efeito das concentrações de nitrato e fosfato correspondendo a três diferentes níveis de ambiente oligotrófico, sugere que nutrientes abaixo de uma determinada concentração passa a ser um fator limitante,

uma vez que quando avaliadas isoladamente estas concentrações resultaram em baixas taxas de crescimento.

No entanto, nos experimentos de referência, onde as frondes foram expostas às concentrações de nitrato e fosfato sem a combinação com zinco, ocorreu um aumento gradual de 6% a 30% na mortalidade dos talos em função da maior disponibilidade destes nutrientes. Segundo Amado *et al* (1994), as algas necessitam de metais-traços, como o zinco, para o seu metabolismo e crescimento. Portanto, os baixos níveis de nitrato e fosfato disponíveis podem ter sido limitantes para o metabolismo e crescimento do talos, levando a uma resposta diferenciada daquelas observadas nos experimentos em que estas concentrações estiveram associadas ao zinco.

*4.2.2 - Crescimento dos talos de *Champia parvula* expostos concentrações de nutrientes correspondentes a três níveis de trofia (eutrófico, mesotrófico, oligotrófico) e três níveis de zinco, com e sem presença de bactérias.*

A quantidade de nitrogênio e fósforo disponíveis no ambiente aquático influenciam fortemente o crescimento das macroalgas, com alguns estudos atribuindo o aumento na biomassa a altas quantidades de nutrientes provenientes de efluentes domésticos (Tewari & Joshi, 1988).

No presente trabalho, a maior redução na taxa de crescimento das frondes, nos experimentos com a presença de bactérias, ocorreu no ambiente oligotrófico ($N = 1,0 \mu M$ e $P = 0,06 \mu M$), indicando que a disponibilidade de nutrientes foi um fator limitante para o crescimento de *C. parvula*. O efeito no crescimento das macroalgas dos níveis de

nutrientes representando diferentes graus de eutrofização, avaliado nestes experimentos, em ordem crescente, foi o seguinte: ambiente mesotrófico > ambiente eutrófico > ambiente oligotrófico. Tewari & Joshi (1988) em estudos realizados *in situ*, para avaliar o efeito de efluentes industriais e domésticos em macroalgas, obtiveram resultado semelhante, com os maiores valores de biomassa das espécies de rodofíceas ocorrendo no ambiente mesotrófico.

Nos experimentos sem bactérias, a resposta obtida foi inversa, com o ambiente mesotrófico apresentando os menores valores de taxa de crescimento. O efeito dos diferentes níveis de eutrofização, nestes experimentos, foi em ordem crescente o seguinte: ambiente eutrófico > ambiente oligotrófico > ambiente mesotrófico. Thusby & Steele (1984), observaram que *Champia parvula* foi menos sensível ao As (V) sobre condições eutróficas, apresentando crescimento semelhante ao observado no controle quando exposta a concentrações de As (V) combinadas a 4,5 µM de fosfato.

As macroalgas assumem um importante papel na distribuição de nutrientes no ecossistema, uma vez que durante o crescimento, devido a sua alta taxa de absorção, elas funcionam como filtro retendo grande quantidades de nutrientes (Martins *et al*, 1999).

Os resultados referentes ao crescimento das macroalgas, obtidos nos experimentos sem bactérias, no presente estudo, revelaram valores de taxa de crescimento duas a três vezes superior àquela observada nos experimentos com bactérias, mostrando que a absorção de nutrientes foi maior nestes experimentos. No entanto, essa maior absorção pode ter levado a uma saturação de nutrientes, uma vez que, as maiores porcentagens de mortalidade foram observadas nos experimentos sem a presença de bactérias.

Observou-se assim, que a presença de bactérias pode controlar as quantidades de nutrientes e de substâncias interferentes ou nocivas que estejam disponíveis na coluna d'água para absorção pelas macroalgas.

As algas necessitam de metais para o seu metabolismo e crescimento, sendo consideradas um bom indicador na avaliação de metais pesados em áreas costeiras devido a sua capacidade de acumulação (Haritonidis & Malea, 1999; Lozano *et al* , 2003). No entanto, a partir de determinado limite de concentração, estas substâncias podem produzir efeitos tóxicos. Segundo Lobban *et al* (1985), o zinco pode limitar o crescimento da fronde de macroalgas, em baixas concentrações, e ser tóxico em altas concentrações.

Estudos mostram que o crescimento de *Sargassum filipendula* foi reduzido em 50% após 30 dias de contaminação por $10\mu\text{g.L}^{-1}$ de zinco, não havendo qualquer crescimento quando esta espécie foi exposta a concentração de $1.000\mu\text{g.L}^{-1}$ (Amado *et al*, 1994).

Lee *et al* (2001), citam que a espécie *Ulva fasciata* quando submetida as concentrações de $100\mu\text{M}$ de nitrato apresentaram uma acumulação de zinco cerca de 1,2 vezes maior que o observado em $10\mu\text{M}$ de nitrato.

No presente estudo, os experimentos com bactérias, independente do nível de eutrofização, resultaram nas menores taxas de crescimento na combinação com $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ de zinco, comprovando a predominância do efeito tóxico do zinco no crescimento das macroalgas e, não ocorrendo portanto uma redução na acumulação do zinco quando as algas estiveram expostas a níveis baixos de eutrofização.

Alguns trabalhos mostram que o biofilme bacteriano pode absorver os metais pesados, com várias bactérias sendo citadas como organismos tolerantes e capazes de

acumular metal na célula (Correa *et al*, 1999). Baseado na sua capacidade de acumulação, as bactérias podem agir como filtro, diminuindo a quantidade de metal que atinge a macroalga (Riquelme *et al*, 1997).

No entanto, nos experimentos realizados neste estudo, as bactérias não atuaram como filtro, não protegendo a macroalga da concentração mais elevada de zinco a que esta foi submetida, contribuindo para ampliar o efeito tóxico da associação de nutrientes com metais pesados.

Assim, o melhor desenvolvimento dos talos esteve relacionado ao ambiente mesotrófico, que sugere que as concentrações de nutrientes não eram limitantes, ou seja, concentrações que não correspondem nem a valores extremos, nem a valores muito reduzidos.

Estudos realizados por Holmes *et al* (1991), mostraram que as bactérias epífitas em *Gracilaria sordida* estavam envolvidas na absorção de zinco e contribuíram para o valor total de zinco acumulado pela macroalga. O grau em que a bactéria contribui para a concentração de metal depende da espécie de macroalga e do íon metálico (Johnson, 1991).

Estes resultados explicam o observado, neste estudo, nos experimentos sem bactérias onde, o efeito do zinco no crescimento da macroalga não foi muito acentuado, com a combinação dos nutrientes com os valores mais elevados de zinco (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹), na maior parte dos experimentos, resultando em altas taxas de crescimento.

Riquelme *et al* (1997), em estudos realizados com amostras de *Enteromorpha compressa* sem a camada de bactérias, observaram uma diminuição significativa na absorção do cobre em relação as amostra em que a cobertura de bactérias foi mantida.

Comparando os níveis de eutrofização das duas variações dos experimentos (com bactérias e sem bactérias), quanto à influência da concentração de zinco utilizada, observa-se que as concentrações de nitrato e fosfato combinadas a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco resultaram nas maiores taxas de crescimento, com exceção do resultado obtido no ambiente eutrófico, em que a maior taxa foi observada na combinação com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em relação à morfologia observa-se que, as concentrações de nitrato e fosfato combinadas a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco resultaram nas maiores alterações, com as algas apresentando ramificações mais curtas e em menor número. Resultado semelhante foi citado por Maurat (1996), que observou efeito no crescimento de *C. parvula* a partir da concentração de $1,04 \text{ mg.L}^{-1}$.

Estes resultados, referentes à toxicidade do zinco, ressaltam a importância da realização de estudos para determinação dos limites de substâncias a serem lançadas no ambiente aquático, pois indica que o valor de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco determinado pela NT-202.R-10, Deliberação CECA nº 1007 de 04 de dezembro de 1986 (FEEMA, 1986), para lançamento de efluentes líquidos para o Estado do Rio de Janeiro, pode não estar levando à proteção dos organismos presentes no ambiente aquático.

Nos testes de referência com concentrações de nitrato e fosfato combinadas a bactérias, ocorreu um efeito semelhante ao obtido nos testes onde apenas foram testadas concentrações de ambiente oligotrófico, com um aumento gradativo na taxa de crescimento dos níveis mais altos de nitrato e fosfato para os níveis mais baixos, comprovando o efeito da quantidade excessiva de nutrientes no crescimento das algas.

Nos experimentos de referência sem a presença de bactérias, o efeito das diferentes concentrações de nitrato e fosfato no crescimento do talo da macroalga foi semelhante. Pela comparação dos valores de taxa de crescimento obtidos, nestes dois tipos de

experimentos, observamos que o menor efeito no crescimento ocorreu nos experimentos sem bactérias, comprovando mais uma vez, que a presença de bactérias e seus polímeros extracelulares acaba ampliando o efeito dos nutrientes sobre as algas, devido a uma maior absorção.

Com relação à mortalidade, observaram-se valores elevados nos dois tipos de teste (com bactérias e sem bactérias), no entanto, enquanto nos experimentos com bactérias ocorreu um aumento gradual na mortalidade dos talos de 10 a 20%, do ambiente oligotrófico para o ambiente eutrófico, nos experimentos sem bactérias os valores de mortalidade não apresentaram grande diferença, com a menor porcentagem sendo observada no ambiente eutrófico

Nos experimentos de referência com zinco, tanto nos experimentos com bactérias quanto nos experimentos sem bactérias, a concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ foi a que mais afetou o crescimento de *C. parvula*, com a média de crescimento das frondes submetidas a esta concentração sendo aproximadamente duas vezes inferior ao observado nas demais concentrações.

A taxa de crescimento teve um aumento expressivo em relação ao controle nas concentrações de $0,5 \text{ mg.Zn.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.Zn.L}^{-1}$, para os dois tipos de experimentos, indicando que estas quantidades de zinco não chegaram a ser limitantes, atuando como nutriente, impulsionando assim o crescimento dos talos.

A comparação entre os experimentos com presença e ausência de bactérias, em relação as taxas médias de crescimento, mostra resultado oposto ao obtido nos experimentos com nitrato e fosfato. Nestes experimentos, as taxas médias de crescimento, onde não havia presença de bactérias, foram de 2 a 3 vezes inferiores ao observado nos experimentos com bactérias. Em relação à mortalidade, embora as porcentagens, nos

experimentos sem bactérias, possam ser consideradas baixas, elas foram de 4 a 18 vezes superiores ao observado nos experimentos com bactérias.

4.2.3 - *Biomassa bacteriana*

As bactérias crescem em quase todos os habitats marinhos e são importantes componentes estruturais nos processos biogeoquímicos (Riquelme *et al*, 1997).

No presente estudo, a biomassa bacteriana adsorvida ao talo de *C. parvula*, nos três ambientes avaliados (eutrófico, mesotrófico e oligotrófico) em combinação com zinco, não teve diferença significativa. Resultado semelhante foi observado nos experimentos de referência com zinco.

Observa-se portanto, que a associação dos nutrientes com o zinco levou a estabilização da biomassa bacteriana, não interferindo no desenvolvimento da biomassa bacteriana aderida ao talo da macroalga.

As bactérias heterótrofas reciclam todas as formas de nitrogênio ambientais, utilizando tanto a respiração aeróbia quanto a anaeróbia, com todas as formas fixadas de nitrogênio inorgânico, nos oceanos, sendo oxidadas a nitrato por bactérias (Falkowski, 1997; Codispoti, 1997; Crapez, 2000).

Nos testes de referência com nitrato e fosfato, realizados no presente estudo, a biomassa bacteriana triplicou em relação ao controle, indicando que as bactérias utilizaram o nitrato e o fosfato como nutrientes.

A biomassa bacteriana disponível na coluna d'água, ao contrário do observado no talo das macroalgas, mostrou diferença na distribuição nos três níveis de eutrofização avaliados.

Nos ambientes eutrófico e oligotrófico, a biomassa bacteriana obtida no controle foi próxima da observada na combinação com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco. Holmes *et al* (1991), também observou elevada biomassa bacteriana associada à superfície de macroalgas, mesmo quando estas estavam submetidas a elevadas concentrações de zinco (5 mg.L^{-1}).

No entanto, no ambiente mesotrófico, o efeito sobre a biomassa bacteriana foi maior, ocorrendo redução de 60 a 80% na biomassa, independente da concentração de zinco avaliada.

Nos testes de referência com nitrato e fosfato, não houve diferença entre a biomassa bacteriana dos três ambientes.

Nos testes de referência com zinco, observou-se na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ uma biomassa 79,59% superior à do controle (meio padrão), provavelmente em função das bactérias da coluna d'água bem como do biofilme do talo algáceo, terem sequestrado o zinco, disponibilizando-o para o vegetal.

Microrganismos podem remover os metais de solos, sedimentos e coluna d'água, pois desenvolveram mecanismos de resistência, tornando-os inócuos. Eles utilizam diferentes sistemas de defesa como a exclusão, compartimentalização ou formação de complexos como as metalotioneínas, podendo absorver, acumular, bem como torná-los biodisponíveis para outros níveis tróficos. O mecanismo envolvendo a resistência bacteriana aos metais envolve a sua transformação química intracelular e posterior transporte ativo para fora da célula, bem como a detoxificação enzimática convertendo-os em menos tóxicos ou menos disponíveis no ambiente (Mejare & Bulow, 2001).

Por essas razões, a associação bactéria-macroalga é de grande relevância nos ambientes marinhos, e necessita ainda ser investigada com maior profundidade.

5 - CONCLUSÃO

- A adsorção das bactérias não depende da morfologia e da estrutura do talo, estando diretamente relacionada à densidade bacteriana disponível na coluna d' água.
- As bactérias, similarmente ao que se verifica para os compartimentos água e sedimento, ocorrem em maior densidade e em maior biomassa nos talos das algas de ambientes impactados do que naqueles de ambientes não impactados.
- O emprego de número e biomassa bacterianos são avaliações relevantes e consistentes para evidenciar o estado trófico do ambiente, utilizando distintos substratos marinhos.
- A influência de nutrientes ambientais na concentração de metais deve ser considerado em estudos de avaliação ambiental utilizando macroalgas.
- A influência dos macronutrientes, na acumulação de metais pode ter implicações na transferência trófica do metal em ecossistemas impactados por metais pesados e matéria orgânica.
- A interferência dos macronutrientes na concentração de metais em macroalgas também pode ser mostrada por sua influência na taxa de crescimento de macroalgas.

- As bactérias marinhas epífitas, são responsáveis pelo acúmulo de metais pesados nos talos das macroalgas. Havendo, portanto, a necessidade da interação de estudos multidisciplinares para avaliar o seu papel como biofiltro.

- A concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinco limitou o crescimento dos talos de *Champia parvula*, independente da presença ou ausência de bactérias, mostrando a necessidade da reavaliação dos valores estabelecidos na NT-202.R-10, Deliberação CECA no. 1007 de 04 de dezembro de 1986, para lançamento de efluentes líquidos para o Estado do Rio de Janeiro.

- Concentrações de Nitrato ($0,016$, $0,8$ e $1,61 \text{ } \mu\text{M}$) e fosfato ($0,065$, $0,032$, $0,0006 \text{ } \mu\text{M}$) mostraram ser limitantes para o crescimento de *Champia parvula* quando avaliadas isoladamente.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amado, G. M.; Karez, C.S. & Pfeiffer, W.C. "Algas e Poluição por Metais." *Ciência Hoje*, 18 (105): 21-24, 1994.
- Baptista Neto, J.A. & Silva, M.A.M. Caracterização dos sedimentos de fundo e dinâmica sedimentar da Enseada de Jurujuba (Baía de Guanabara), Niterói, RJ. *Pesquisas*, 23 (1/2): 7-16, 1996.
- Barbosa, A. Spatial and temporal variation of bacterioplankton abundance and biomass in a coastal lagoon (Ria Formosa, Southeastern Portugal). *Kieler Meeresforsch., Sonderh.* 8: 66-73, 1991.
- Bell, R.T. & Ahlgren, I. Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 32: 476-482, 1987.
- Bispo, M.G.S.; Crapez, M.A.C.; Paes, E.T.; Alves, P.H.; Pereira, D.C. Atividade enzimática bacteriana em sedimento marinho tropical. In: Moraes *et al* (Eds.) *Efeitos de poluentes em organismos marinhos*. São Paulo. Arte e Ciências. Villipress, 119-128, 2001.
- Carlucci, A.F.; Craven, D.B.; Robertson, D.J.; Williams, P.M. Surface-film microbial populations diel amino acid metabolism, carbon utilization and growth rates. *Mar. Biol.*, 92: 289-297, 1986.
- Carvalho, C.E.V.; Lacerda, L.D.; Gomes, M.P. Heavy metal contamination of the biota along the Rio de Janeiro coast, SE-Brazil. *Water, Air and Soil Pollution*, 57-58: 645-653, 1991.

- Cavari, B. & Colwell, R.R. Effect of pollution on the bacterial community structure in the coastal waters of the eastern mediterranean sea. *Prog. Oceanogr.* 21:147-157, 1988.
- Codispoti, L.A. The limits to growth. *Nature*, 387: 237-238, 1997.
- Cordeiro-Marino, M. Rodofíceas bentônicas Marinhas do Estado de Santa Catarina. *Rickia*, 7: 1-243, 1978.
- Corre, S. & Prieur, D. Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*. *Bot. Mar.*, 33:515-523, 1990.
- Correa, J.A.; Castilla, J.C.; Ramírez, M.; Varas, M.; Lagos, N.; Vergara, S.; Menne, A.; Román, D.; Brown, M.T. Copper, copper mine tailing and their effect on marine algae in Northern Chile. *Journal of Applied Phycology*, 11: 57-67, 1999.
- Costa, H. Uma avaliação das águas costeiras do Estado do Rio de Janeiro. FEMAR. Cooperação Técnica Brasil-Alemanha, Projeto Planagua - SEMA/GTZ, 261p, 1998.
- Coutinho, R. Bentos de costões rochosos. In: Crespo, R.P. & Soares-Gomes, A. (eds.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro, Interciência :147-157, 2002.
- Crapez, M.A.C. Bactérias Marinhas. In: Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (eds.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro, Interciência, 83-100, 2002.
- Crapez, M.A.C.; Pereira, D.C.; Tosta, Z.T.; Souza, M.M. Dosagem de proteínas como método de avaliação de atividade hidrocarbonoclástica de comunidade microbiana autóctone em sedimentos marinhos. *Geoch. Bras.*, 10: 249-255, 1996.
- Diaz-Piferrer, M. *Champia feldmannii*, a new species of rhodophyta from Venezuela. *Soc. Phycol. De France Bull*, 22: 40-46, 1997.

- Deming, J. W. & Baross, J.A. "The early diagenesis of organic matter: Bacterial activity." *Organic Geochemistry - Principles and Applications*: 119-144, 1993.
- Doria, E.V. & Bianchi, A. Comparaison de deux méthodes d'extraction des bactéries des sédiments marins. *Compte Rendus Academie Sciences Paris*, 294: 467-470, 1982.
- Epstein, S.S.; Alexander, D.; Cosman, K.; Dompé, A.; Gallagher, S.; Jarsobski, J.; Laning, E.; Martinez, R.; Panasik, G.; Peluso, C.; Runde, R.; Timmer, E. Enumeration of sandy sediment bacteria: are the counts quantitative or relative? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 151: 11-16, 1997.
- Epstein, S.S. & Rossel, J. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 117: 289-298, 1995.
- Falcão, C. M., M.C.; Nassar, C.A.G.; Széchy, M.T.M. & Mitchell, G.J.P. "Benthic marine flora of the northeastern and southeastern coast of Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil: Phytogeographic considerations." *Botanica Marina* 35: 357-364, 1992.
- Falkowski, P.G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature*, 387: 272-274, 1997.
- FEEMA *Critérios e padrões para lançamento de efluentes líquidos*. NT-202.R-10, 12 de dezembro de 1986. 4p, 1986.
- Gil-Turnes, M.S.; Hay, M.E. and Fenical, W. Symbiotic Marine Bacteria Chemically Defend Crustacean Embryos from a Pathogenic Fungus. *Science*, 246: 116-118, 1989.
- Gorostiaga, J.M. & Diez, I. Changes in the sublittoral benthic marine macroalgae in the polluted area of Abra de Bilbao and proximal coast (Northern Spain). *Marine Ecology Progress Series*, 130: 157-167, 1996.

- Haritonidis, S. & Malea, P. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. *Environmental Pollution*, 104: 365-372, 1999.
- Hirose, H. Composition of benthic marine algae in relation to pollution in the Seto Inland Sea, Japan. In: Arne Jensen and Janet R. Stein (Eds) *Proceeding of the Ninth International Seaweed Symposium*, Santa Bárbara, Califórnia (U.S.A). Science Press: 173-179, 1979.
- Holmes, M.A.; Brown, M.T.; Loutit, M.W.; Ryan, K. (1991). The Involvement of epiphytic bacteria in zinc concentration by the red alga *Gracilaria sordida*. *Marine Environmental Research*, 31: 55-67, 1991.
- Johnson, C.R.; Muir, D.G.; Reysenbach, A.L. Characteristic bacteria associated with surfaces of coralline algae: a hypothesis for bacterial induction of marine invertebrate larvae. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 74:281-294, 1991.
- Joly, A.B. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Bolm.Fac.Filos.Ciênc. Universidade de São Paulo (ser. Bot.)*, São Paulo, 21 (294): 1-393, 59pl., 1965.
- Joly, A.B. & Braga, Y.Y. Primeira nota sobre algas coletadas durante as viagens do navio oceanográfico "Almirante Saldanha". *Instituto de Pesquisa da Marinha*, Rio de Janeiro, 34, 12p + 2 prs., 1966.
- Kepner Jr, R. & Pratt, J.R. Use of fluorochromes for direct enumerations of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microb. Rev.*, 58: 603-615, 1994.
- Kirchman, D.L. *Microbial Ecology of the oceans*. Wiley-Liss, Inc.Publication, 2000.

- Künnis, K. Distribution of the microbial population in the gulf of Finland and in the Baltic Proper. *Kieler Meeresforsch, Sonderh*, 8:42-45, 1991.
- Lee, W-Y & Wang, W-X. Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and phosphate. *The Science of the Total Environment*, 278: 11-22, 2001.
- Lobban, C.S.; Harrinson, P.J.; Duncan, M.J. *The Physiological Ecology of Seaweeds*. Cambridge University Press, 242p., 1985.
- Lozano, G.; Hardisson, A.; Gutiérrez, A.J.; Lafuente, M.A. Lead and cadmium levels in coastal benthic algae (seaweeds) of Tenerife, Canary Islands. *Environment International*, 28: 627-631, 2003.
- Magnusson, G.; Axelsson, L.; Larsson, C.; Ryberg, H. A model for calculation of nutrient uptake capacity of seaweeds in cultivation. *Botanica Marina*, 37: 115-123, 1994.
- Martins, I.; Oliveira, J.M.; Flindt, M.R.; Marques, J.C. The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecologica*, 20 (4): 259-265, 1999.
- Maurat, M. C. S. Efeito crônico do óleo bruto, de dispersante de petróleo e da mistura óleo/dispersante na espécie *C. parvula* (C.Agardh) Harvey - macroalgas. *Escola de Engenharia de São Carlos*. São Carlos, Universidade de São Paulo: 68p., 1996.
- McClanahan, T.R.; Cokos, B.A.; Sala, E. Algal growth and species composition under experimental control of herbivory, phosphorus and coral abundance in Glovers Reef, Belize. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 441-451, 2002.

- Mcglathery, K.J. Physiological controls on the distribution of the macroalga *Spyridea hypnoides*: patterns along a eutrophication gradient in Bermuda. *Marine Ecology Progress Series*, 87: 173-182, 1992.
- Mejare, M. & Bulow, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trend in Biotechnology*, 19: 67-73, 2001.
- Meyer-Reil, L.-A. "Microbial life in sedimentary biofilms - the challenge to microbial ecologists." *Marine Ecology Progress Series 112*: 303-311, 1994.
- Mitchell, G.J.P.; Nassar, C.A.G.; Maurat, M.C.S.; Falcão, C. Tipos de vegetação marinha da Baía do Espírito Santo sob a influência da poluição – Espírito Santo (Brasil). *Anais do II Simpósio de Ecossistemas da costa Sul e Sudeste Brasileira. Estrutura, Função e Manejo. Águas de Lindóia – SP*: 202-214, 1990.
- Mohammadi, M.; Karjala, L.; Kuparinen, J. Number, biovolume and biomass of bacteria in the mud sediment of the Bothnian Sea. *Aqua Fennica*, 23: 201-208, 1993.
- Morrison, G. T., E.; Comeleo, R.; Walsh, R.; Kuhn, A. Burgess, R.; Tagliabue, M. & Greene, W. "Intralaboratory precision of saltwater short-term chronic toxicity tests." *Research Journal Water P. C. 61*(11/12): 1707-1710, 1989.
- Nassar, C.A.G.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Maurat, M.C.S.; Falcão, C.; Mitchell, G.J.P. Feofíceas do litoral norte do Estado do Espírito Santo. *Insula*, 19 (supl.): 143-168, 1989.
- Oliveira Filho, E.C. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. Tese de Livre-Docência em Ficologia, Departamento de Botânica, Inst. De biologia, USP, São Paulo, 407p., 1977.
- Paranhos, R. *Alguns métodos para análise da água*. Rio de Janeiro, Cadernos didáticos, UFRJ. 281p., 1996.

- Paranhos, R.; Pereira, A.P.; Mayr, L.M. Diel variability of water quality in a tropical polluted bay. *Environmental Monitoring and Assessment*, 50: 131-141, 1998.
- Peckol, P. & Rivers, J.S. Physiological responses of the opportunistic macroalgae *Cladophora vagabunda* (L.) van den Hoek and *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan) to environmental disturbances associated with eutrophication. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 190: 1-16, 1995.
- Pedrini, A.G. *Algas marinhas bentônicas da Baía de Sepetiba e arredores (Rio de Janeiro)*. Dissertação de Mestrado em Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 397p., 1980.
- Peters, R.H.W. *The Ecological Implication of Body Size*. Cambridge Studies in Ecology. Cambridge University Press, 3^o Ed., 328p., 1987.
- Pihl, L.; Magnusson, G.; Isaksson, I.; wallentinus, I. Distribution and growth dynamics of ephemeral macroalgae in shallow bays on the swedish west coast. *Journal of Sea Research*, 35 (1-3): 169-180, 1996.
- Prieur, D. "Interactions between bacteria and other organisms in the marine environment." *Kieler Meeresforsch., Sonderh 8*: 231-239, 1991.
- Provasoli, L. Media and Prospects for the Cultivation of Marine Algae. In: Watanabe,A. and Hattori,A.(eds.). *Cultures and Collections of Algae*. Proc.U.S., Japan Conf.Hakone, September 1966. *Jap. Soc. Plant Physiol.* p.63-75, 1968.
- Provasoli, L. & Pintner, I.J. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). *J. Phycol*, 16: 196-201, 1980.

- Rast, W.; Holland, M.; Ryding, S.O. *Eutrofication management framework for the policy-maker*. MAB digest. Paris: UNESCO, 83p., 1989.
- Ribeiro, C.H.A. *Uma análise da qualidade de água da Baía de Guanabara entre 1980 e 1993*. Dissertação de Mestrado, Geociências - Área de Concentração: Geoquímica. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro. 137p., 1996.
- Riquelme, C.; Rojas, A.; Flores, V.; Correa, J.A. Epiphytic bacteria in a copper-enriched environmental in northern Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 34 (10): 816-820, 1997.
- Rivers, J.S. & Peckol, P. Summer decline of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in a eutrophic embayment: interactive effects of temperature and nitrogen availability. *J. Phycol.*, 31:223-228, 1995.
- Sakami, T. Effects of algal excreted substances on the respiration activities of epiphytic bacteria on the brown alga, *Eisenia bicyclis* Kjellman. *Fisheries Science*, 62 (3): 394-396, 1996
- Schimmel, S. C.; Morrison, G.E. & Heber, M.A. "Marine complex effluent toxicity program: Test sensitivity, repeatability and relevance to receiving water toxicity." *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 739-746, 1989.
- Schimmel, S. C.; Thursby, G.B., Heber, M.A. & Chammas, M.J. "Case study of a marine discharge: Comparison of effluent and receiving water toxicity." *Aquatic Toxicology and Environmental Fate Eleventh Volume*: 159-173, 1989.
- Smith, V.H.; Tilman, G.D.; Nekola, J.C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 179-196, 1999.

- Steele, R.L. & Thursby, G.B. Laboratory Culture of Gametophytic Stages of the Marine Macroalgae *Champia parvula* (Rhodophyta) and *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *Envir.Tox.and Chem.*, 7: 997-1002, 1988.
- Stein, J.E. & Denison, J.C. Limitations of indicator organisms. In: T.A. Olsen and F.J.Burgess(Eds). *Pollution and Marine Ecology*. Intersci. Pub., London: 323-335, 1967.
- Taylor, W.R. A synopsis of the marine algae of Brazil. *Rev. Algal.*, 5: 279-313, 1931.
- Teixeira, V. L.; Pereira, R.C.; Junior, A.N.M.; Filho, C.M.L.; Silva, C.A.R. "Seasonal variations in infralittoral seaweed communities under a pollution gradient in Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (Brazil)." *Ciência e Cultura*, 39 (4): 423-428, 1987.
- Teixeira, V.L. & Jorge, M.R. A estratégia de dominância da clorófitica *Ulva fasciata* Delile na baía de Guanabara. In: Moraes et al (eds.). *Efeitos de poluentes em organismos marinhos*. São Paulo, Arte e Ciências Villipress, p.65-87, 2001.
- Tewari, A. & Joshi, H.V. Effect of domestic sewage and industrial effluents on biomass and species diversity of seaweeds. *Botanica Marina*, 31:389-397, 1988.
- Thursby, G.B. & Steele, R.L. Toxicity of arsenite and arsenate to the marine macroalga *Champia parvula* (Rhodophyta). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3: 391-397, 1984.
- Wahl, M.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 10: 45-57, 1994.

Weber,C.I., Horning,W.B., Klemm,D.J., Neiheisel,T.W., Lewis,P.A., Robinson,E.L., Menkedick,J. And Kessler,F. *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*. Environmental Protection Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA-600/4-87/028, 416p., 1988.

Weinberger, F.; Hoppe, H-G; Friedlander, M. Bacterial induction and inhibition of a fast necrotic response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 9: 277-285, 1997.

Wynne, M. J. *A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision*, 1998.

Zee, D. *Baía de Guanabara. Dossiê Sócio-ambiental - Gestão Sustentável da Baía de Guanabara*. Seminário Internacional. CIDS - Escola Brasileira de Administração Pública. Fundação Getúlio Vargas, 2000.

7 – ANEXOS

Anexo 1: Valores de biomassa e número de células bacterianas adsorvida as macroalgas da Praia da Baleia.

<i>Enteromorpha flexuosa</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$
547839,5188	$5,4 \times 10^5$	0,00648
466820,9984	$4,6 \times 10^5$	0,00552
640432,1135	$6,4 \times 10^5$	0,00768

<i>Ulva fasciata</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$
551697,5435	$5,5 \times 10^5$	0,0066
733024,7082	$7,3 \times 10^5$	0,00876
671296,3117	$6,7 \times 10^5$	0,00804

<i>Cladophora vagabunda</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$
520833,3453	$5,2 \times 10^5$	0,00624
543981,494	$5,4 \times 10^5$	0,00648
567129,6427	$5,6 \times 10^5$	0,00672

<i>Champia parvula</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$
389660,5028	$3,8 \times 10^5$	0,00456
455246,924	$4,5 \times 10^5$	0,0054
416666,6762	$4,1 \times 10^5$	0,00492

Anexo 2: Valores de biomassa e número de células bacterianas na coluna d'água e no sedimento da Praia da Baleia.

<i>Coluna d'água</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
532407,4196	$5,3 \times 10^5$	0,00636
632716,0639	$6,3 \times 10^5$	0,00756
601851,8657	$6,0 \times 10^5$	0,0072

<i>Sedimento</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
10262345,91	$1,0 \times 10^7$	0,12
10725308,89	$1,0 \times 10^7$	0,12
9413580,463	$9,4 \times 10^6$	0,1128

Anexo 3: Valores de biomassa e número de células bacterianas adsorvida as macroalgas da Praia de Boa Viagem.

<i>Enteromorpha flexuosa</i>		
Total	Número de células (média)	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$ (média)
3105710		
2816358		
3202161	$3,0 \times 10^6$	0,036
4243827		
2681327		
2739198		
3105710		
3028549		
3414352		
2932099		

<i>Ulva fasciata</i>		
Total	Número de células (média)	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$ (média)
2777778		
2449846		
2391975	$3,0 \times 10^6$	0,036
4417438		
2854938		
2932099		
3337191		
2854938		
3144290		
3298611		

Cladophora vagabunda

Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
2739198		
3838735		
3452932		
3722994		
2970679	$2,8 \times 10^6$	0,033
3009259		
2835648		
3877315		
2739198		
3009259		

Gymnogongrus griffithsiae

Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
4205247		
4552469		
3915895	$3,5 \times 10^6$	0,042
3549383		
3356482		
3202161		
3800154		
2932099		
3761574		
2893519		

<i>Codium decorticans</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
2912809		
3240741		
3260031		
3317901	$3,1 \times 10^6$	0,037
2719907		
2700617		
3472222		
3645833		
3317901		
3337191		

Anexo 4: Valores de biomassa e número de células bacterianas na coluna d'água e no sedimento da Praia de Boa Viagem.

<i>Coluna d'água</i>	
Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
$1,5 \times 10^7$	0,18
$1,7 \times 10^7$	0,204
$1,8 \times 10^7$	0,216
$1,6 \times 10^7$	0,192

<i>Sedimento</i>	
Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
$1,0 \times 10^8$	1,2
$1,0 \times 10^8$	1,2
$1,2 \times 10^8$	1,44
$1,1 \times 10^8$	1,32

Anexo 5: Valores de biomassa e número de células bacterianas adsorvida aos talos de *Champia parvula* proveniente do cultivo em laboratório.

<i>Champia parvula</i>		
Total	Número de células	Biomassa $\mu\text{gC.cm}^{-3}$
5285493,949	$5,2 \times 10^6$	0,0624
4629629,736	$4,6 \times 10^6$	0,0552
4475308,745	$4,4 \times 10^6$	0,0528

Anexo 6: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a condições de oligotrofia em combinação com zinco, com a presença de bactérias.

Biomassa final (15 dias de teste)

Testes	Nitrato = 1,61 uM	Fosfato = 0,065 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0119	0,0261	0,0146	0,0107
1	0,0137	0,0149	0,0187	0,024
1	0,0252	0,0220	0,0165	0,0105
1	0,0168	0,0226	0,0221	0,0129
1	0,0136	0,0222	0,0190	0,021
2	0,0135	0,0103	0,0125	0,0156
2	0,0124	0,0128	0,0154	0,0136
2	0,0140	0,0164	0,0060	0,0162
2	0,0095	0,0104	0,0204	0,0126
2	0,0110	0,0093	0,0051	0,0121
3	0,0073	0,0067	0,0076	0,0201
3	0,0059	0,0104	0,0012	0,0215
3	0,0126	0,0103	0,0250	0,014
3	0,0066	0,0023	0,0062	0,0216
3	0,0069	0,0071	0,0025	0,0271
soma	0,181	0,204	0,193	0,254
média	0,012	0,014	0,013	0,017
DP	0,005	0,007	0,008	0,005

Biomassa inicial

Testes	Nitrato = 1,61 uM	Fosfato = 0,065 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0109	0,0126	0,0175	0,0086
1	0,0127	0,0162	0,0139	0,0144
1	0,0162	0,0187	0,0136	0,0098
1	0,0184	0,0179	0,0156	0,0127
1	0,0143	0,0165	0,0179	0,0127

2	0,0107	0,0085	0,0125	0,0166
2	0,0101	0,0092	0,0147	0,009
2	0,0106	0,014	0,0122	0,0109
2	0,0111	0,0146	0,0182	0,0116
2	0,0103	0,0151	0,0144	0,0099
3	0,0105	0,0092	0,0119	0,0118
3	0,0131	0,0098	0,0105	0,0109
3	0,0097	0,0102	0,0117	0,0078
3	0,0097	0,0087	0,0105	0,011
3	0,0088	0,0102	0,0102	0,0101
soma	0,177	0,191	0,205	0,168
média	0,012	0,013	0,014	0,011
DP	0,003	0,004	0,003	0,002

Anexo 6 (cont.)

Biomassa final (15 dias de teste)

Testes	Nitrato = 0,016 uM	Fosfato = 0,0006 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0115	0,0134	0,0141	0,0107
1	0,0130	0,0139	0,0128	0,024
1	0,0138	0,0140	0,0078	0,0105
1	0,0100	0,0105	0,0129	0,0129
1	0,0101	0,0131	0,0103	0,021
2	0,0225	0,0169	0,0026	0,0156
2	0,0282	0,0230	0,0173	0,0136
2	0,0210	0,0249	0,0177	0,0162
2	0,0305	0,0185	0,0188	0,0126
2	0,0083	0,0083	0,0234	0,0121
3	0,0049	0,0039	0,0017	0,0201
3	0,0008	0,0068	0,0088	0,0215
3	0,0074	0,0008		0,014
3	0,0087	0,0032		0,0216
3	0,0048			0,0271
soma	0,196	0,171	0,148	0,254
média	0,013	0,012	0,012	0,017
DP	0,009	0,007	0,007	0,005

Biomassa inicial

Testes	Nitrato = 0,016 uM	Fosfato = 0,0006 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0173	0,0176	0,021	0,0086
1	0,0215	0,0178	0,0225	0,0144
1	0,0171	0,0184	0,0126	0,0098
1	0,0188	0,0176	0,015	0,0127
1	0,018	0,0165	0,0206	0,0127
2	0,0167	0,0134	0,015	0,0166
2	0,0186	0,0159	0,0157	0,009

2	0,0132	0,0164	0,0162	0,0109
2	0,0168	0,0163	0,0163	0,0116
2	0,0149	0,013	0,0192	0,0099
3	0,0076	0,0082	0,0113	0,0118
3	0,0122	0,0103	0,0125	0,0109
3	0,0073	0,0078	0,0083	0,0078
3	0,008	0,0071	0,0129	0,011
3	0,0078	0,0117	0,0117	0,0101
soma	0,216	0,208	0,231	0,168
média	0,014	0,014	0,015	0,011
DP	0,005	0,004	0,004	0,002

Anexo 7: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato, com bactérias (Teste de referência)

Biomassa final (15 dias de teste)

	Nitrato = 1,61 uM Fosfato = 0,065 uM	Nitrato = 0,8 uM Fosfato = 0,032 uM	Nitrato = 0,016 uM Fosfato = 0,0006 uM	controle
Testes				
1	0,0035	0,0015	0,0091	0,0201
1	0,0014	0,002	0,0065	0,0215
1	0,0035	0,0022	0,0025	0,014
1	0,0042	0,003	0,0072	0,0216
1			0,0086	0,0271
2	0,0025	0,0038	0,007	0,0533
2	0,0034	0,0041	0,0031	0,0361
2	0,0042	0,0026	0,0028	0,0326
2	0,0016	0,0032	0,0079	0,0428
2			0,0087	0,0445
3	0,0026	0,0041	0,0047	0,0331
3	0,0072	0,0063	0,0026	0,0201
3	0,0031	0,0055	0,0059	0,0233
3	0,0025	0,0025	0,0071	0,0245
3	0,0051	0,0032	0,0056	0,016
soma	0,045	0,044	0,089	0,431
média	0,003	0,003	0,006	0,029
DP	0,002	0,001	0,002	0,011

Biomassa inicial

	Nitrato = 1,61 uM Fosfato = 0,065 uM	Nitrato = 0,8 uM Fosfato = 0,032 uM	Nitrato = 0,016 uM Fosfato = 0,0006 uM	controle
Testes				
1	0,0111	0,0107	0,011	0,0118
1	0,0103	0,0075	0,0105	0,0109
1	0,0123	0,0085	0,0111	0,0078
1	0,0099	0,0096	0,0113	0,011
1	0,0122	0,0112	0,0107	0,0101

2	0,0074	0,0092	0,0091	0,0067
2	0,0116	0,011	0,0072	0,0065
2	0,0092	0,0112	0,0066	0,0052
2	0,0081	0,0085	0,0098	0,0056
2	0,0086	0,0099	0,0113	0,0071
3	0,0086	0,0097	0,0091	0,0077
3	0,0095	0,0102	0,0085	0,0075
3	0,0077	0,0084	0,0097	0,0064
3	0,0091	0,0079	0,011	0,0094
3	0,0082	0,0075	0,0083	0,0092
soma	0,144	0,141	0,145	0,123
média	0,010	0,009	0,010	0,008
DP	0,002	0,001	0,002	0,002

Anexo 8: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a condições de ambientes eutróficos em combinação com zinco, com e sem bactérias

Biomassa final (15 dias de teste) - com bactérias

Testes	Nitrato = 500 uM	Fosfato = 31,25 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0416	0,0827	0,1637	0,0533
1	0,0483	0,0933	0,089	0,0361
1	0,0443	0,096	0,0899	0,0326
1	0,0633	0,0908	0,1362	0,0428
1	0,0736	0,0825	0,1243	0,0445
2	0,0155	0,0127	0,0075	0,0331
2	0,0149	0,0153	0,0098	0,0201
2	0,0107	0,0014	0,0105	0,0233
2	0,008	0,0089	0,0062	0,0245
2	0,014	0,0152	0,0124	0,016
3	0,0152	0,0194	0,0173	0,0331
3	0,0209	0,0193	0,0109	0,0201
3	0,0086	0,0231	0,016	0,0233
3	0,0274	0,0363	0,0137	0,0245
3	0,0247	0,0339		0,016
soma	0,431	0,631	0,707	0,443
média	0,029	0,042	0,051	0,030
DP	0,021	0,036	0,057	0,011

Biomassa inicial

Testes	Nitrato = 500 uM	Fosfato = 31,25 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,012	0,0136	0,0121	0,0067
1	0,0176	0,0158	0,0144	0,0065
1	0,0105	0,0126	0,0127	0,0052
1	0,0155	0,0111	0,0098	0,0056
1	0,012	0,0143	0,012	0,0071
2	0,0058	0,0049	0,0064	0,0077

2	0,0037	0,005	0,0048	0,0075
2	0,0048	0,0053	0,0078	0,0064
2	0,0042	0,0054	0,0077	0,0094
2	0,0057	0,0075	0,0065	0,0092
3	0,0096	0,0062	0,0076	0,0077
3	0,0085	0,0069	0,0071	0,0075
3	0,006	0,0099	0,0068	0,0064
3	0,0076	0,0097	0,0084	0,0094
3	0,0089	0,0085	0,0075	0,0092
soma	0,132	0,137	0,132	0,112
média	0,009	0,009	0,009	0,007
DP	0,004	0,004	0,003	0,001

Anexo 8 (cont.)

Biomassa final (após 15 dias de teste) - sem bactérias

Testes	Nitrato = 500 uM		Fosfato = 31,25 uM		controle
	1 mg/L.Zn		0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	
1	0,0834		0,0837	0,0137	0,1298
1	0,0712		0,0807	0,0201	0,0257
1	0,1038		0,0368	0,0261	0,0447
1	0,0501		0,1022	0,0426	0,0642
1	0,1244		0,1501	0,0234	0,0842
2	0,036		0,1559	0,0105	0,1298
2	0,0358		0,1001	0,0688	0,0257
2	0,0365		0,0448	0,0651	0,0447
2	0,0493		0,0851	0,0447	0,0642
2	0,0385		0,1834	0,0204	0,0842
3	0,0333		0,0398	0,0388	0,1298
3	0,028		0,043	0,0417	0,0257
3	0,0668		0,0444	0,024	0,0447
3	0,0277		0,0298	0,0252	0,0642
3	0,0337		0,0409	0,0223	0,0842
soma	0,819		1,180	0,487	1,046
média	0,055		0,084	0,032	0,070
DP	0,030		0,050	0,017	0,037

Biomassa inicial - sem
bactérias

Testes	Nitrato = 500 uM		Fosfato = 31,25 uM		controle
	1 mg/L.Zn		0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	
1	0,0072		0,0071	0,0065	0,0057
1	0,0058		0,0065	0,0064	0,0051
1	0,0062		0,0099	0,0104	0,0103
1	0,005		0,0067	0,0069	0,0055
1	0,0069		0,0082	0,0072	0,007
2	0,005		0,0069	0,0054	0,0057

2	0,0047	0,0076	0,006	0,0051
2	0,0085	0,006	0,0079	0,0103
2	0,0075	0,0049	0,0059	0,0055
2	0,0056	0,0093	0,0058	0,007
3	0,0085	0,0076	0,0058	0,0057
3	0,0054	0,0065	0,0077	0,0051
3	0,0088	0,0108	0,0034	0,0103
3	0,0061	0,0071	0,0075	0,0055
3	0,0083	0,0062	0,0046	0,007
soma	0,100	0,111	0,097	0,101
média	0,007	0,007	0,006	0,007
DP	0,001	0,002	0,002	0,002

Anexo 9: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a condições de ambiente mesotrófico em combinação com zinco, com e sem bactérias.

Biomassa final (após 15 dias de teste) - com bactérias

Testes	Nitrato = 100 uM	Fosfato = 6,25 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0428	0,0928	0,2461	0,0533
1	0,0246	0,0851	0,0863	0,0361
1	0,0524	0,1352	0,0793	0,0326
1	0,0534	0,157	0,0611	0,0428
1	0,0419	0,1675	0,0872	0,0445
2	0,0203	0,0093	0,0156	0,0331
2	0,0133	0,0437	0,0115	0,0201
2	0,0256	0,0133	0,0141	0,0233
2	0,0256	0,0219	0,01	0,0245
2	0,0147	0,0111	0,0066	0,016
3	0,0279	0,048	0,0191	0,0331
3	0,0077	0,0141	0,0038	0,0201
3	0,011	0,024	0,0041	0,0233
3	0,0112	0,0243	0,0127	0,0245
3	0,012	0,0331	0,0087	0,016
soma	0,384	0,880	0,666	0,443
média	0,026	0,059	0,044	0,030
DP	0,015	0,055	0,064	0,011

Biomassa inicial

Testes	Nitrato = 100 uM	Fosfato = 6,25 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0075	0,0088	0,0103	0,0067
1	0,0064	0,0061	0,0076	0,0065
1	0,0099	0,0072	0,0084	0,0052
1	0,0093	0,0074	0,0058	0,0056
1	0,0086	0,0087	0,0072	0,0071

2	0,007	0,0053	0,0061	0,0077
2	0,0059	0,0054	0,0043	0,0075
2	0,0067	0,006	0,0052	0,0064
2	0,0082	0,0059	0,0058	0,0094
2	0,0066	0,0062	0,0048	0,0092
3	0,0083	0,0059	0,0076	0,0077
3	0,0087	0,0109	0,0076	0,0075
3	0,007	0,0083	0,0059	0,0064
3	0,0079	0,0077	0,0074	0,0094
3	0,0077	0,0091	0,0072	0,0092
soma	0,116	0,109	0,101	0,112
média	0,008	0,007	0,007	0,007
DP	0,001	0,002	0,002	0,001

Anexo 9 (cont.)

Biomassa final (após 15 dias de teste) - sem bactérias

Testes	Nitrato = 100 uM		Fosfato = 6,25 uM		controle
	1 mg/L.Zn		0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	
1	0,0178		0,0561	0,0064	0,0029
1	0,0111		0,0352	0,0073	0,0007
1	0,0243		0,0193	0,0033	0,0071
1	0,0142		0,0567	0,026	0,0023
1	0,0327		0,0025	0,0135	0,0061
2	0,0084		0,0015	0,0011	0,0029
2	0,0032		0,0107	0,0047	0,0007
2	0,0065		0,0146	0,0145	0,0071
2	0,0061		0,0044	0,0034	0,0023
2			0,0139	0,0461	0,0061
3	0,0036		0,0039	0,0025	0,0029
3	0,0069		0,006	0,0031	0,0007
3	0,0146		0,0034	0,0009	0,0071
3	0,0011		0,0031	0,0054	0,0023
3	0,0126			0,0065	0,0061
soma	0,163		0,231	0,145	0,057
média	0,012		0,017	0,010	0,004
DP	0,009		0,019	0,012	0,002

Biomassa inicial - sem
bactérias

Testes	Nitrato = 100 uM		Fosfato = 6,25 uM		controle
	1 mg/L.Zn		0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	
1	0,0074		0,0064	0,0068	0,0061
1	0,005		0,0061	0,006	0,0057
1	0,0062		0,0059	0,0062	0,0073
1	0,0063		0,0063	0,0068	0,006
1	0,0072		0,007	0,0091	0,0074

2	0,0054	0,0068	0,0066	0,0061
2	0,0059	0,0075	0,006	0,0057
2	0,0064	0,0054	0,0057	0,0073
2	0,0079	0,0055	0,0054	0,006
2	0,0043	0,0071	0,0068	0,0074
3	0,0049	0,0064	0,0059	0,0061
3	0,0051	0,0063	0,0071	0,0057
3	0,0066	0,0086	0,0038	0,0073
3	0,0062	0,0067	0,0057	0,006
3	0,0059	0,0065	0,0061	0,0074
soma	0,091	0,099	0,094	0,098
média	0,006	0,007	0,006	0,007
DP	0,001	0,001	0,001	0,001

Anexo 10: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a condições de ambiente oligotrófico em combinação com zinco, com e sem bactérias.

Biomassa final (após 15 dias de teste) - com bactérias

Testes	Nitrato = 1 uM	Fosfato = 0,06 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0268	0,0579	0,0182	0,0533
1	0,0194	0,0447	0,0305	0,0361
1	0,0307	0,0859	0,0331	0,0326
1	0,0321	0,0389	0,0745	0,0428
1	0,0349	0,0399	0,0282	0,0445
2	0,0135	0,0113	0,0069	0,0331
2	0,0159	0,0117	0,0028	0,0201
2	0,0117	0,0067	0,004	0,0233
2	0,0089	0,0036	0,0045	0,0245
2	0,0113	0,005	0,0049	0,016
3	0,0035	0,007	0,0096	0,0993
3	0,0073	0,0103	0,0117	0,1335
3	0,0066	0,0084	0,0102	0,093
3	0,003	0,0096	0,0099	0,1127
3	0,0082	0,0051	0,0091	0,1023
soma	0,234	0,346	0,258	0,867
média	0,016	0,023	0,017	0,058
DP	0,011	0,025	0,019	0,039

Biomassa inicial

Testes	Nitrato = 1 uM	Fosfato = 0,06 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	1 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn		
1	0,0061	0,0064	0,0059	0,0067
1	0,0075	0,0058	0,0061	0,0065
1	0,0074	0,0093	0,0063	0,0052
1	0,0065	0,0063	0,0071	0,0056

1	0,0086	0,0051	0,0082	0,0071
2	0,0056	0,0063	0,0067	0,0077
2	0,0048	0,0073	0,0068	0,0075
2	0,0052	0,0043	0,004	0,0064
2	0,0055	0,0051	0,0052	0,0094
2	0,0048	0,0055	0,0051	0,0092
3	0,0096	0,007	0,0069	0,0066
3	0,0069	0,0077	0,0069	0,0097
3	0,008	0,0116	0,0087	0,009
3	0,0081	0,008	0,0088	0,0094
3	0,0078	0,0079	0,0082	0,0109
soma	0,1024	0,1036	0,1009	0,1169
média	0,0068	0,0069	0,0067	0,0078
DP	0,0015	0,0019	0,0014	0,0017

Anexo 10 (cont.)

Biomassa final (após 15 dias de teste) - sem bactérias

Testes	Nitrato = 1	Fosfato = 0,06 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	uM	0,5 mg/L.Zn		
	1 mg/L.Zn			
1	0,0374	0,0293	0,0149	0,0143
1	0,0152	0,0163	0,0375	0,0131
1	0,064	0,068	0,042	0,0341
1	0,0387	0,1499	0,0732	0,0208
1	0,0367	0,0935	0,0158	
2	0,0184	0,0437	0,0489	0,0505
2	0,0373	0,1105	0,0421	0,0183
2	0,0639	0,1403	0,1124	0,1052
2	0,0375	0,026	0,0324	0,0649
2	0,0223	0,0218	0,1055	0,0783
3	0,0031	0,0083	0,01	0,0029
3	0,0079	0,0129	0,0284	0,0007
3	0,0077	0,0072	0,0059	0,0071
3	0,0047	0,0085		0,0023
3	0,018			0,0061
soma	0,413	0,736	0,569	0,419
média	0,028	0,053	0,044	0,030
DP	0,020	0,051	0,034	0,033

Biomassa inicial - sem
bactérias

Testes	Nitrato = 1	Fosfato = 0,06 uM	0,1 mg/L.Zn	controle
	uM	0,5 mg/L.Zn		
	1 mg/L.Zn			
1	0,006	0,0046	0,0044	0,0044
1	0,0081	0,0069	0,0053	0,0061
1	0,011	0,0055	0,0068	0,0071
1	0,0056	0,0083	0,005	0,0062
1	0,0091	0,0078	0,0114	0,007
2	0,0071	0,0071	0,0068	0,0061

2	0,008	0,0089	0,0074	0,0057
2	0,007	0,0074	0,0064	0,0073
2	0,0069	0,007	0,0067	0,006
2	0,0059	0,0079	0,0071	0,0074
3	0,0075	0,0066	0,0051	0,0061
3	0,0072	0,0062	0,0084	0,0057
3	0,0068	0,0061	0,0068	0,0073
3	0,0074	0,0052	0,0071	0,006
3	0,0077	0,0055	0,0087	0,0074
soma	0,111	0,101	0,103	0,096
média	0,007	0,007	0,007	0,006
DP	0,001	0,001	0,002	0,001

Anexo 11: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula* submetidos a três diferentes concentrações de nitrato e fosfato, com e sem bactéria.

Biomassa final (após 15 dias de teste) - com bactérias

	Nitrato = 500 uM Fosfato = 31,25 uM	Nitrato = 100 uM Fosfato = 6,25 uM	Nitrato = 1 uM Fosfato = 0,06 uM	controle
Testes				
1	0,0032	0,0012	0,0081	0,0533
1	0,0027	0,0057	0,0076	0,0361
1	0,0049	0,0033	0,0051	0,0326
1	0,0036	0,0016	0,0035	0,0428
1	0,0021	0,0042	0,0029	0,0445
2	0,0035	0,0021	0,0035	0,0331
2	0,0056	0,0038	0,0027	0,0201
2	0,0032	0,005	0,0048	0,0233
2	0,0027	0,0019	0,0025	0,0245
2		0,0042	0,0045	0,016
3	0,0031	0,0028	0,0025	0,0993
3	0,0023	0,0045	0,0047	0,1335
3	0,0018	0,0032	0,0035	0,093
3	0,0051	0,0027	0,0051	0,1127
3		0,0046	0,0062	0,1023
soma	0,044	0,051	0,067	0,867
média	0,003	0,003	0,004	0,058
DP	0,001	0,001	0,002	0,039

Biomassa inicial

	Nitrato = 500 uM Fosfato = 31,25 uM	Nitrato = 100 uM Fosfato = 6,25 uM	Nitrato = 1 uM Fosfato = 0,06 uM	controle
Testes				
1	0,0097	0,0089	0,0113	0,0067
1	0,0082	0,0095	0,0093	0,0065
1	0,0113	0,0079	0,0086	0,0052
1	0,0085	0,0077	0,0094	0,0056
1	0,0079	0,0091	0,0087	0,0071
2	0,0092	0,0079	0,0072	0,0077

2	0,0089	0,0086	0,0081	0,0075
2	0,0111	0,0092	0,0095	0,0064
2	0,0087	0,0097	0,0093	0,0094
2	0,0095	0,0088	0,0091	0,0092
3	0,0095	0,0086	0,0078	0,0066
3	0,0087	0,009	0,0092	0,0097
3	0,0078	0,0095	0,0087	0,009
3	0,0101	0,0098	0,0075	0,0094
3	0,0092	0,01	0,0094	0,0109
soma	0,138	0,134	0,133	0,117
média	0,009	0,009	0,009	0,008
DP	0,001	0,001	0,001	0,002

Anexo 11 (cont.)

Biomassa final (após 15 dias de teste) - sem bactérias

	Nitrato = 500 uM Fosfato = 31,25 uM	Nitrato = 100 uM Fosfato = 6,25 uM	Nitrato = 1 uM Fosfato = 0,06 uM	
Testes	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	controle
1	0,0032	0,0029	0,0067	0,1298
1	0,0025	0,0032	0,0074	0,0257
1	0,0045	0,0043	0,0052	0,0447
1	0,0036	0,0025	0,0041	0,0642
1	0,0029	0,0018	0,0031	0,0842
2	0,0042	0,0056	0,0029	0,1298
2	0,0031	0,0051	0,0035	0,0257
2	0,0054	0,0032	0,0026	0,0447
2	0,0027	0,0048	0,0019	0,0642
2	0,0036	0,0029	0,0052	0,0842
3	0,0054	0,0031	0,0041	0,1298
3	0,0038	0,0051	0,0032	0,0257
3	0,0042	0,006	0,0028	0,0447
3	0,0051	0,0027	0,0052	0,0642
3	0,0037	0,0042	0,0036	0,0842
soma	0,058	0,057	0,062	1,046
média	0,004	0,004	0,004	0,070
DP	0,001	0,001	0,002	0,037

Biomassa inicial

	Nitrato = 500 uM Fósforo = 31,25 uM	Nitrato = 100 uM Fósforo = 6,25 uM	Nitrato = 1 uM Fósforo = 0,06 uM	
	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	controle
1	0,0081	0,0074	0,0066	0,0057
1	0,0062	0,0068	0,0084	0,0051
1	0,0054	0,0094	0,0081	0,0103
1	0,0042	0,0092	0,0059	0,0055
1	0,0056	0,0085	0,0039	0,007
2	0,0042	0,0049	0,0048	0,0057

2	0,0047	0,0057	0,0052	0,0051
2	0,0065	0,0063	0,0061	0,0103
2	0,0062	0,0057	0,0037	0,0055
2	0,0084	0,0082	0,0091	0,007
3	0,0062	0,0064	0,0067	0,0057
3	0,0058	0,0039	0,0058	0,0051
3	0,0074	0,0051	0,0049	0,0103
3	0,0069	0,0062	0,0082	0,0055
3	0,007	0,0057	0,0091	0,007
soma	0,093	0,099	0,097	0,101
média	0,006	0,007	0,006	0,007
DP	0,001	0,002	0,002	0,002

Anexo 12: Valores de biomassa dos talos de *Champia parvula submetidos* a diferentes concentrações de zinco, com e sem bactérias.

Biomassa final (15 dias de teste) - com bactérias

Testes	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	controle
1	0,0269	0,0839	0,0715	0,0533
1	0,0223	0,1147	0,0976	0,0361
1	0,0315	0,1453	0,1202	0,0326
1	0,0323	0,138	0,0919	0,0428
1	0,0289	0,0403	0,1055	0,0445
2	0,1716	0,1728	0,1572	0,0993
2	0,1234	0,1389	0,1609	0,1335
2	0,116	0,2186	0,1502	0,0930
2	0,1411	0,1656	0,1882	0,1127
2	0,1208	0,0951	0,1157	0,1023
3	0,0763	0,1917	0,2596	0,0993
3	0,1254	0,1568	0,2853	0,1335
3	0,1221	0,1708	0,1463	0,0930
3	0,1436	0,2022	0,2287	0,1127
3	0,1157	0,1865	0,1679	0,1023
soma	1,398	2,221	2,347	1,291
média	0,093	0,148	0,156	0,086
DP	0,051	0,048	0,062	0,035

Biomassa inicial

Testes	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn	controle
1	0,0065	0,0071	0,0086	0,0067
1	0,0099	0,0088	0,0105	0,0065
1	0,0083	0,0078	0,0078	0,0052
1	0,0124	0,0076	0,0074	0,0056
1	0,0078	0,0086	0,0094	0,0071
2	0,0128	0,0108	0,0117	0,0066
2	0,0104	0,01	0,0114	0,0097
2	0,016	0,0135	0,0137	0,009
2	0,0134	0,0115	0,0082	0,0094

2	0,0122	0,0117	0,0086	0,0109
3	0,0104	0,0134	0,0152	0,0066
3	0,0127	0,0145	0,0112	0,0097
3	0,0112	0,0125	0,0083	0,009
3	0,0151	0,0114	0,0128	0,0094
3	0,0091	0,0118	0,0128	0,0109
soma	0,168	0,161	0,158	0,122
média	0,011	0,011	0,011	0,008
DP	0,003	0,002	0,002	0,002

Anexo 12 (cont.)

Biomassa final (após 15 dias de teste) - sem bactérias

Testes	controle	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn
1	0,0044	0,0074	0,0084	0,007
1	0,0061	0,0059	0,0077	0,007
1	0,0071	0,007	0,0081	0,0068
1	0,0062	0,0057	0,0072	0,0074
1	0,007	0,0066	0,0061	0,0087
2	0,0044	0,0098	0,0071	0,0058
2	0,0061	0,0050	0,0078	0,0068
2	0,0071	0,0084	0,0058	0,0067
2	0,0062	0,01	0,0071	0,009
2	0,007	0,0089	0,0065	0,0108
3	0,0044	0,0069	0,0076	0,0075
3	0,0061	0,0062	0,007	0,0081
3	0,0071	0,0066	0,0078	0,0084
3	0,0062	0,0062	0,0075	0,0098
3	0,007	0,0057	0,0085	0,007
soma	0,092	0,106	0,110	0,117
média	0,006	0,007	0,007	0,008
DP	0,001	0,002	0,001	0,001

Biomassa
inicial

Testes	controle	1,0 mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1 mg/L.Zn
1	0,0143	0,0672	0,0955	0,0234
1	0,0131	0,0131	0,0504	0,0493
1	0,0341	0,0464	0,0261	0,0721
1	0,0208	0,0579	0,0966	0,052
1		0,0458	0,0921	0,0332
2	0,0143	0,0249	0,0874	0,0434
2	0,0131	0,0391	0,0707	0,0650
2	0,0341	0,0165	0,0731	0,0701
2	0,0208	0,0262	0,0661	0,0722
2		0,0097	0,0283	0,0961

3	0,0143	0,0654	0,0552	0,0303
3	0,0131	0,0403	0,0572	0,0013
3	0,0341	0,0237	0,0145	0,0096
3	0,0208	0,0853	0,0784	0,0082
3		0,0367	0,0893	0,0074
soma	0,247	0,598	0,981	0,634
média	0,021	0,040	0,065	0,042
DP	0,009	0,022	0,026	0,029

Anexo 13: Valores de biomassa e número de células bacterianas aderidas aos talos de *Champia parvula* dos testes de laboratório.

CONTROLE	
Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC.cm}^{-3}$)
$31,59 \times 10^5$	0,037917
$25,94 \times 10^5$	0,031134
$33,66 \times 10^5$	0,040394

EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA: NITRATO E FOSFATO		
	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC.cm}^{-3}$)
Eutrófico	$71,18 \times 10^5$	0,085417
	$80,82 \times 10^5$	0,096991
	$94,85 \times 10^5$	0,113831
Mesotrófico	$75,27 \times 10^5$	0,090336
	$68,81 \times 10^5$	0,082581
	$79,33 \times 10^5$	0,095197
Oligotrófico	$76,96 \times 10^5$	0,092361
	$82,46 \times 10^5$	0,098958
	$75,13 \times 10^5$	0,090162

Anexo 13 (cont.)

EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA: ZINCO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L⁻¹	32,09 x 10 ⁵	0,038519
	29,20 x 10 ⁵	0,035046
	28,89 x 10 ⁵	0,034676
0,5 mg.L⁻¹	28,74 x 10 ⁵	0,034491
	29,37 x 10 ⁵	0,035255
	30,03 x 10 ⁵	0,036042
0,1 mg.L⁻¹	30,99 x 10 ⁵	0,037199
	33,89 x 10 ⁵	0,040671
	30,15 x 10 ⁵	0,036181

Anexo 13 (cont.)

EUTRÓFICO		
	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L⁻¹	8,44 x 10 ⁵	0,010139
	13,9 x 10 ⁵	0,016736
	30,9 x 10 ⁵	0,03713
0,5 mg.L⁻¹	10,12 x 10 ⁵	0,012153
	13,04 x 10 ⁵	0,015648
	15,43 x 10 ⁵	0,018519
0,1 mg.L⁻¹	17,07 x 10 ⁵	0,020486
	30,78 x 10 ⁵	0,036944
	12,61 x 10 ⁵	0,015139

Anexo 13 (cont.)

MESOTRÓFICO		
	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L⁻¹	30,84 x 10 ⁵	0,037014
	43,47 x 10 ⁵	0,052176
	30,82 x 10 ⁵	0,036991
0,5 mg.L⁻¹	20,69 x 10 ⁵	0,024838
	30,16 x 10 ⁵	0,036204
	24,90 x 10 ⁵	0,029884
0,1 mg.L⁻¹	28,41 x 10 ⁵	0,034097
	33,17 x 10 ⁵	0,039815
	15,41 x 10 ⁵	0,018495

Anexo 13 (cont.)

OLIGOTRÓFICO		
	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L⁻¹	80,34 , x 10 ⁵	0,096412
	79,57 x 10 ⁵	0,095486
	25,51 x 10 ⁵	0,030613
0,5 mg.L⁻¹	28,76 x 10 ⁵	0,034514
	33,48 x 10 ⁵	0,040185
	30,32 x 10 ⁵	0,036389
0,1 mg.L⁻¹	27,50 x 10 ⁵	0,033009
	31,67 x 10 ⁵	0,038009
	34,14 x 10 ⁵	0,040972

Anexo 14: Valores de biomassa e número de células bacterianas das amostras de água dos testes de laboratório.

Controle	
Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC.cm}^{-3}$)
$6,8 \times 10^5$	0,008171
$7,56 \times 10^5$	0,009074
$7,88 \times 10^5$	0,009468

EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA: NITRATO E FOSFATO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC.cm}^{-3}$)
Eutrófico	$1,01 \times 10^6$	0,012199
	$6,50 \times 10^5$	0,007917
	$7,42 \times 10^5$	0,008912
Mesotrófico	$1,08 \times 10^6$	0,013009
	$1,01 \times 10^6$	0,012222
	$1,07 \times 10^6$	0,012847
Oligotrófico	$10,12 \times 10^5$	0,012153
	$1,02 \times 10^6$	0,012245
	$10,35 \times 10^5$	0,012431

Anexo 14 (cont.)

EXPERIMENTOS DE REFERÊNCIA: ZINCO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L ⁻¹	3,12 x 10 ⁵	0,00375
	4,18 x 10 ⁵	0,005023
	5,36 x 10 ⁵	0,006435
0,5 mg.L ⁻¹	4,01 x 10 ⁶	0,048148
	3,70 x 10 ⁶	0,044444
	3,18 x 10 ⁶	0,038241
0,1 mg.L ⁻¹	1,02 x 10 ⁶	0,012245
	7,71 x 10 ⁵	0,009259
	7,38 x 10 ⁵	0,008866

Anexo 14 (cont.)

EUTRÓFICO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L ⁻¹	1,25 x 10 ⁵	0,001505
	1,15 x 10 ⁵	0,001389
	1,35 x 10 ⁵	0,00162
0,5 mg.L ⁻¹	7,52 x 10 ⁶	0,009028
	10,35 x 10 ⁶	0,012431
	7,34 x 10 ⁶	0,008819
0,1 mg.L ⁻¹	1,83 x 10 ⁶	0,002199
	2,35 x 10 ⁵	0,002824
	2,23 x 10 ⁵	0,002685

Anexo 14 (cont.)

 MESOTRÓFICO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-3}$)
1,0 mg.L ⁻¹	1,35 x 10 ⁵	0,00162
	1,42 x 10 ⁵	0,001713
	1,90 x 10 ⁵	0,002292
0,5 mg.L ⁻¹	2,25 x 10 ⁶	0,002708
	4,20 x 10 ⁶	0,005046
	2,77 x 10 ⁶	0,003333
0,1 mg.L ⁻¹	2,39 x 10 ⁶	0,00287
	9,06 x 10 ⁵	0,001088
	2,60 x 10 ⁵	0,003125

Anexo 14 (cont.)

OLIGOTRÓFICO

	Número de células	Biomassa ($\mu\text{gC.cm}^{-3}$)
1,0 mg.L ⁻¹	1,67 x 10 ⁵	0,002014
	1,65 x 10 ⁵	0,001991
	1,60 x 10 ⁵	0,001921
0,5 mg.L ⁻¹	7,00 x 10 ⁶	0,008403
	5,90 x 10 ⁶	0,007083
	7,07 x 10 ⁶	0,008495
0,1 mg.L ⁻¹	4,45 x 10 ⁶	0,005347
	4,35 x 10 ⁵	0,005231
	3,93 x 10 ⁵	0,004722

Anexo 15: Variáveis físicas e químicas

Controle - testes com bactérias

Controle	S%		OD		pH	
0h	35		6,31		8,52	
	início	término	início	término	início	término
72h	35	35	6,51	6,47	8,45	8,41
144h	34	35	6,08	5,49	8,66	8,48
216h	34	35	5,86	6,99	8,05	8,08
288h	34	34	4,84	5,68	8,19	8,24
360h	36		6,69		8,14	

Controle	S%		OD		pH	
0h	34		5,72		8,42	
	início	término	início	término	início	término
72h	34	34	4,80	5,98	8,44	8,48
144h	34	34	6,09	5,84	8,68	8,69
216h	35	34	7,06	6,92	8,10	8,06
288h	34	34	4,10	5,48	8,56	8,44
360h	35		5,04		8,63	

Controle	S%		OD		pH	
0h	34		6,71		8,53	
	início	término	início	término	início	término
72h	34	35	5,26	6,42	8,84	8,86
144h	34	35	4,73	5,74	8,72	8,64
216h	35	35	4,00	4,69	8,38	8,40
288h	35	35	3,96	4,85	8,48	8,52
360h	35		5,73		8,63	

Controle	S%		OD		pH	
0h	34		4,95		8,44	
	início	término	início	término	início	término
72h	34	34	5,17	5,52	8,72	8,63
144h	34	34	4,64	4,91	8,58	8,69
216h	34	34	4,72	5,21	8,00	8,33
288h	34	34	4,43	5,07	8,42	8,26
360h	34		4,69		8,53	

Controle	S%		OD		pH	
0h	33		3,96		8,35	
	início	término	início	término	início	término
72h	33	33	4,42	4,85	8,42	8,55
144h	33	34	4,56	4,89	8,32	8,06
216h	33	33	5,25	4,95	8,40	8,30
288h	34	34	4,98	5,41	8,34	8,35
360h	35		5,21		8,36	

Anexo 15 (cont.)

Zinco 1 com bactérias					Zinco 2 com bactérias			Zinco 3 com bactérias		
		1mg/L	0,5 mg/L	0,1 mg/L	1mg/L	0,5 mg/L	0,1 mg/L	1mg/L	0,5 mg/L	0,1 mg/L
	S%	34	34	34	31	32	32	31	32	32
Início	OD	4,99	5,05	4,91	6,61	6,62	5,92	6,61	6,62	5,92
	pH	8,44	8,42	8,40	8,47	8,49	8,37	8,47	8,49	8,37
72h Saída	S%	37	35	35	31	32	32	32	32	32
	OD	4,82	5,04	4,89	5,18	5,31	5,33	5,27	5,82	5,57
	pH	8,64	8,56	8,74	8,2	8,26	8,25	8,21	8,27	8,31
72h Entrada	S%	34	35	35	30	30	30	30	30	30
	OD	5,69	5,13	5,23	4,22	4,48	4,39	5,8	4,46	4,52
	pH	8,69	8,71	8,65	8,33	8,3	8,13	8,39	8,39	8,36
144h Saída	S%	34	35	35	31	31	31	31	31	31
	OD	5,10	5,41	5,02	5,74	5,71	5,74	5,77	5,7	5,70
	pH	8,59	8,74	8,69	8,32	8,15	8,24	8,23	8,31	8,36
144h Entrada	S%	34	34	34	31	31	31	31	31	31
	OD	4,44	4,50	4,54	5,74	5,74	5,75	5,65	5,71	5,7
	pH	8,46	8,52	8,52	8,21	8,19	8,32	8,36	8,42	8,32
216h Saída	S%	34	34	36	32	31	31	31	31	32
	OD	4,69	4,85	4,85	5,21	5,26	5,19	5,36	5,48	5,45
	pH	8,28	8,35	8,42	8,57	8,5	8,6	8,65	8,6	8,68
216h Entrada	S%	34	34	34	32	32	32	31	31	31
	OD	4,72	4,81	4,86	5,23	5,26	5,32	5,32	5,31	5,31
	pH	8,22	8,22	8,19	8,48	8,51	8,41	8,37	8,44	8,39
288h Saída	S%	35	34	35	33	32	32	32	32	32
	OD	4,81	4,79	4,99	5,37	5,31	5,3	5,32	5,5	5,9
	pH	8,16	8,23	8,31	8,62	8,71	8,62	8,68	8,79	8,92
288h Entrada	S%	34	34	34	31	32	32	32	32	32
	OD	4,62	4,87	4,92	4,98	5,13	4,93	4,81	4,98	4,92
	pH	8,34	8,42	8,79	8,48	8,45	8,41	8,52	8,46	8,53
360h Término	S%	34	35	34	31	33	32	33	33	32
	OD	4,83	5,27	4,74	6,36	5,66	5,35	5,94	6,76	5,18
	pH	8,54	8,52	8,51	8,7	8,69	8,95	8,75	8,84	8,99

Anexo 15 (cont.)

		Teste 1 com bactérias			Teste 2 com bactérias			Teste 3 com bactérias		
		NO ₃ = 1,61uM PO ₄ = 0,065			NO ₃ = 1,61uM PO ₄ = 0,065			NO ₃ = 1,61uM PO ₄ = 0,065		
		1mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1mg/L.Zn	1mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1mg/L.Zn	1mg/L.Zn	0,5 mg/L.Zn	0,1mg/L.Zn
Início	S%	35	35	35	34	34	34	34	34	34
	OD	6,31	6,27	6,19	5,94	5,87	6,02	6,23	5,67	5,91
	pH	8,38	8,34	8,30	8,51	8,49	8,47	8,61	8,62	8,62
72h Saída	S%	34	34	36	34	34	34	35	35	35
	OD	6,19	6,43	6,39	5,95	5,91	6,01	6,31	5,83	5,94
	pH	8,45	8,42	8,34	8,45	8,37	8,40	8,77	8,75	8,66
72h Entrada	S%	34	34	34	34	34	34	35	35	35
	OD	6,36	6,37	6,46	5,67	5,11	5,27	4,03	4,18	4,51
	pH	8,40	8,39	8,41	8,37	8,40	8,44	8,65	8,66	8,64
144h Saída	S%	35	35	36	34	34	34	35	35	35
	OD	4,88	4,95	4,39	6,65	5,54	6,06	4,06	4,22	4,73
	pH	8,51	8,52	8,43	8,58	8,62	8,71	8,54	8,41	8,57
144h Entrada	S%	35	34	34	34	34	34	34	34	34
	OD	5,59	5,60	5,46	6,09	6,21	6,09	5,65	5,06	4,72
	pH	8,53	8,57	8,37	8,77	8,77	8,61	8,66	8,62	8,65
216h Saída	S%	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	OD	6,56	6,65	6,39	5,27	5,45	5,38	5,43	4,53	4,67
	pH	8,07	8,02	7,93	7,94	7,94	7,96	8,34	8,38	8,30
216h Entrada	S%	34	34	34	34	34	34	35	35	35
	OD	5,88	5,79	5,84	6,60	5,66	6,02	4,43	4,79	6,59
	pH	8,09	8,10	8,05	8,07	8,01	8,05	8,35	8,31	8,36
288h Saída	S%	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	OD	5,58	5,82	5,62	5,74	4,72	5,81	5,58	4,57	5,01
	pH	8,29	8,29	8,19	8,51	8,59	8,63	8,43	8,49	8,47
288h Entrada	S%	34	34	34	34	34	34	34	34	34
	OD	5,20	5,20	5,34	4,49	4,32	4,52	4,30	4,48	4,41

	pH	8,18	8,20	8,17	8,49	8,48	8,56	8,43	8,49	8,57
360h	S%	35	35	35	35	35	35	34	34	34
Término	OD	5,13	4,85	5,14	5,38	5,43	5,51	5,43	5,22	5,45
	pH	8,03	8,11	8,06	8,32	8,42	8,56	8,39	8,50	8,65

Anexo 16: Formulação do meio de cultura (PES) utilizado nos teste.

Provasoli, 1968 (PES)	
H ₂ O	100 mL
NaNO ₃	350 mg
Na ₂ glicerofosfato.5H ₂ O	50 mg
Fe (como EDTA; 1:1 molar (1))	2,5 mg
P II metais (2)	25 mL
Vitamina B ₁₂	10µg
Tiamina	0,5 mg
Biotina	5 µg
Tampão - Tris (Sigma Co)	500 mg

(1) Dissolver 351 mg de Fe (NH₄)₂ (SO₄)₂.6H₂O e 330 mg de Na₂^{EDTA} em 500 mL de H₂O.

1 mL desta solução = 0,1 mg Fe.

(2) P II - mistura de metais

Quantidades adicionadas a 100 mL	
H ₃ BO ₃	0,114 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	4,9 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	16,4 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 mg
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,48 mg
Na ₂ ^{EDTA}	100 mg

Anexo 17: Formulação do meio de cultura (PES) utilizado nos testes.

Provasoli, 1968 (PES)	
H ₂ O	100 mL
NaNO ₃	350 mg
Na ₂ glicerofosfato.5H ₂ O	50 mg
Fe (como EDTA; 1:1 molar (1))	2,5 mg
P II metais (2)	25 mL
Vitamina B ₁₂	10 µg
Tiamina	0,5 mg
Biotina	5 µg
Tampão – Tris (Sigma Co)	500 mg
