

**Salvador Airton Gaeta**

Comparação das respostas  
de crescimento e  
fotossíntese de três clones de  
*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Teixeira

Dissertação apresentada ao Instituto  
Oceanográfico da Universidade  
de São Paulo,  
para a obtenção do Grau de  
Mestre em Oceanografia Biológica

## ÍNDICE

### 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais.....	3
1.2 - Objetivos.....	6

### 2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Considerações gerais.....	7
2.2 - Câmaras incubadoras.....	7
2.21 - Energia luminosa e fotoperíodo..	8
2.22 - Temperatura.....	9
2.3 - Vidraria.....	9
2.4 - Meios de cultura.....	10
2.5 - Alga teste.....	12
2.51 - Preparação dos inóculos.....	12
2.52 - Manutenção das culturas-estoque	13
2.6 - Planejamento e execução dos experimentos.....	13
2.7 - Amostragem das populações.....	15
2.71 - Fluorescência <i>in vivo</i> .....	16
2.72 - pH.....	16
2.73 - Contagens.....	16
2.74 - Clorofila-a total.....	17
2.75 - Produção primária.....	18
2.76 - Microfotografias.....	19
2.8 - Parâmetros estimados.....	19
2.81 - Taxa de crescimento.....	19
2.82 - Biomassa máxima.....	19
2.83 - Clorofila-a total média por célula.....	20
2.84 - Número de fluorescência.....	20
2.85 - Potencial fotossintético.....	20
2.9 - Tratamento estatístico.....	20
2.91 - Dados brutos.....	20
2.92 - Geração de números aleatórios..	21
2.93 - Regressões e coeficientes de correlação linear.....	21
2.94 - Matriz de covariância, coeficientes de correlação linear .....	21

2.96 - Teste de quiquadrado.....	21
2.97 - Análise de variância trifatorial (Three-way ANOVA).....	21

### 3 - RESULTADOS

3.1 - Comparação das curvas de crescimento dos três clones.....	24
3.11 - Com base na contagem celular..	24
3.12 - Com base na fluorescência <i>in vivo</i> .....	25
3.13 - Com base na clorofila-a total.	26
3.2 - Taxas específicas de crescimento.	27
3.3 - Taxas máximas de crescimento...	28
3.4 - Biomassas máximas alcançadas...	29
3.5 - Clorofila-a total média por célula.....	31
3.6 - Número de fluorescência.....	34
3.7 - Produtividade primária.....	34
3.8 - Aspectos dos três clones ao microscópio óptico.....	38

### 4 - DISCUSSÃO

4.1 - Parâmetros das respostas de crescimento.....	44
4.2 - Taxas máximas de crescimento...	49
4.3 - Biomassas máximas alcançadas...	55
4.4 - Produtividade primária.....	59
4.5 - Aspectos morfológicos.....	68

### 5 - CONCLUSÕES.....

### 6 - RESUMO.....

### 7 - ABSTRACT.....

### 8 - BIBLIOGRAFIA.....

### 9 - ANEXO.....

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Considerações gerais

A diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin tem sido empregada extensivamente em estudos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos. Entretanto esta espécie é atípica se apresentando com três morfótipos distintos: ovóide, fusiforme e trirradiado. Somente a forma ovóide possui uma única valva silicosa típica da maioria das diatomáceas enquanto que nas outras duas formas as valvas são constituídas totalmente de material orgânico (Lewin & Philpott, 1958). Apenas o morfótipo fusiforme tem sido apontado como provido de faixas silicosas na região pleural da parede (Neuville et al., 1971) muito embora as células ovóides e fusiformes contenham quantidades similares de sílica (Lewin, op. cit.). Os três morfótipos ocorrem na natureza (Wilson, 1946; Lewin & Philpott, 1958; Hayward, 1968b; Neuville et al., 1971) e Coughlan (1962) assinala que as células fusiformes e trirradiadas podem formar longas cadeias em cultura. Esse processo foi estudado em detalhe por Borowitzka et al. (1977). Segundo Darley (1968) os três morfótipos contêm quantidades similares de DNA sugerindo que eles não representariam uma alternância de gerações. Wilson (op. cit.) reportou a existência de um quarto tipo de morfótipo, cruciforme que, segundo Borowitzka & Volcani (1978) poderia ser um par de células trirradiadas incompletamente separadas. Estudos de microscopia eletrônica das paredes isoladas de *P. tricornutum* têm sido executados (Hendey, 1954; Bourrelly

& Dragesco, 1955; Lewin & Philpott, 1958; Neuville et al., 1971) bem como da ultraestrutura citoplasmática (Borowitzka et al., 1977; Borowitzka & Volcani, 1978). Baseado em algumas destas características Lewin (1958) propôs uma nova subordem Phaeodactylineae e uma nova família, Phaeodactylaceae, para acomodar esta espécie polimórfica.

As populações de algas comumente utilizadas em experimentos de laboratório ou encontrados na natureza em diferentes localidades são tão numerosas que, invariavelmente, apresentam as características típicas inerentes às grandes populações. Como um modelo de população podemos utilizar um número suficientemente grande de algas unicelulares microscópicas. Morfológicamente, organismos deste tipo representam um simples subobjeto. Entretanto, do ponto de vista fisiológico e bioquímico, estas células morfológicamente indiferenciadas podem representar tipos bem definidos e inteiramente distintos com uma considerável estabilidade genética em suas características fisiológicas e bioquímicas (Necas 1965 in Marvan et al., 1979).

A homogeniedade do material experimental é, em muitos casos, uma importante condição para que se obtenham resultados confiáveis. Especialmente se, os resultados de experimentos repetidos ou de simples repetições dentro do escopo de uma experimentação mais complexa serão comparados, o conhecimento do grau de homogeneidade do material experimental torna-se uma condição importante para a correta interpretação das coincidências ou diferenças obtidas através dessas comparações.

Guillard & Ryther (1962) trabalhando com cinco clones de *Cyclotella nana*, três oriundos de regiões estuarinas, um da plataforma continental e outro do Mar do Sargasso verificaram que os clones estuarinos não podiam ser distinguidos por qualquer critério morfológico mesmo ao nível da microscopia eletrônica e nem por diferenças de processos fisiológicos estudados. O clone da plataforma diferia morfologicamente dos outros somente no que concerne às dimensões. Os estudos fisiológicos mostraram que, num ambiente estuarino, este clone possivelmente poderia sobreviver mas estaria em desvantagem quando comparado com os clones estuarinos. O clone do Mar do Sargasso era o mais distinto morfologicamente e fisiologicamente no sentido de que só podia sobreviver em salinidades e temperaturas relativamente altas, o que inviabilizaria sua presença em águas totalmente adequadas para os outros clones.

Os autores consideram os cinco clones como sendo linhagens da mesma espécie *Cyclotella nana* Hustedt, muito embora existam pequenas diferenças morfológicas e consideráveis diferenças fisiológicas entre alguns deles. Esses clones por eles isolados poderiam ser parte de uma população amplamente distribuída apresentando um certo número de tipos morfológicos e fisiológicos com gradativas diferenças entre si.

Pesquisas sobre raças fisiológicas têm sido dirigidas para o mar Negro e o mar Azov e, especialmente, para os mares Cáspio e Aral. Todos eles têm não só uma salinidade consideravelmente mais baixa do que a da água do mar, particularmente o Mediterrâneo, como também apresentam

composições iônicas significativamente diferentes da água do mar diluída para o mesmo conteúdo total de sólidos (ou a mesma pressão osmótica). Zenkevitch (1963) assinala que todos esses mares possuem mais Ca, Mg e SO<sub>4</sub> do que a água do mar de mesma salinidade e relativamente menos Na e Cl; o K varia ligeiramente. Os efeitos de cátions e ânions individuais não são negligíveis.

Estudos com registradores de plâncton conduzidos no Atlântico Norte por Robinson & Colburn (1970), revelaram que três espécies de diatomáceas planctônicas apresentavam populações morfologicamente identificáveis e geograficamente circunscritas persistentes por algum tempo.

Fisher et al. (1973) e Fisher (1977) constataram que clones de diatomáceas originários de ambientes oceânicos eram mais sensíveis ao "stress" químico do que clones de ambientes estuarinos.

Jensen & Rystad (1974) verificaram que um clone da espécie nerítica *Skeletonema costatum* isolada de Sorfjord, o qual se encontra fortemente contaminado por zinco, tolerava maiores concentrações deste metal, do que um clone isolado de Trondheimfjord, relativamente menos poluído.

Guillard & Kilham (1977) sugerem que seria extremamente interessante determinar experimentalmente se as espécies de diatomáceas abundantes em mares isolados diferem daquelas correspondentes das águas vizinhas. Para eles não é difícil imaginar-se a seleção de raças fisiológicas num mar ou "fyörde" isolado, no entanto consideram questionável que popu-

lações discretas permanecessem intactas e, consequentemente, detectáveis em águas mais abertas.

Murphy & Belastock (1980) trabalhando com 11 clones de *Thalassiosira pseudonana* e 6 clones de *Skeletonema costatum* sendo 8 de origem oceânica e 9 de origem nerítica 3 dos quais de estuários extremamente poluídos, verificaram que estes últimos eram muito menos sensíveis quando testados com um tipo de lixo industrial do que os demais clones.

Aidar-Aragão (1980) comparando os resultados obtidos para as taxas de crescimento de um clone de *Skeletonema costatum* de Cananéia (SK-C2) com aqueles obtidos com um clone do Báltico por Paasche (1973) verificou que, para salinidade de 2‰, o clone de Cananéia apresentava razões de crescimento cerca de cinco vezes maior; em altas salinidades o clone de Cananéia sofria forte inibição da taxa de crescimento ao passo que o clone do Báltico apresentava taxa de crescimento máxima a partir de 10‰.

Da mesma forma que a especiação de plantas terrestres superiores e a contribuição das raças ecológicas para seus padrões de distribuição tem sido extensivamente estudadas com o apoio de dados genéticos, o conhecimento da distribuição das diatomáceas através de comparações genéticas oferece uma certa perspectiva especialmente quando acoplado a dados morfológicos e fisiológicos. A análise de enzimas por eletroforese em fase gel tem sido aplicada à espécies para as quais dispõem-se de muitos clones isola-

dos em cultura ( Murphy & Guillard, 1976).

Em razão de não se dispor de estudos comparativos entre clones de algas fitoplanctônicas marinhas isoladas de águas brasileiras, o presente trabalho pode representar uma contribuição inicial para o planejamento, execução e análise de parâmetros fisiológicos comparativos que permitam fornecer subsídios na abordagem de aspectos estritamente ecofisiológicos ou para fins aplicados tais como na seleção de isolados empregados em Maricultura.

De acordo com Raymond (1978), do ponto de vista de suas potencialidades *P. tricornutum* mostra ser adequado como alimento ou como combustível. Como única diatomácea desprovida de parede celular é facilmente digerida permitindo o crescimento de um grande número de moluscos marinhos incluindo ostras e mariscos em boas condições.

Os morfótipos ovóides se constituem em alimento adequado para os *nauplii* de *Artemia* e, quando utilizados juntamente com flagelados marinhos pequenos, tais como *Monochrysis lutheri* ou *Rhodomonassp.*, satisfazem as necessidades nutricionais de larvas de ouriço do mar e diversas espécies de copépodos. Seu potencial como combustível é bastante elevado com relação a outros vegetais alternativos. Dependendo das condições de cultura impostas, as células podem conter cerca de 50% de proteína até cerca de 80% de lípidos de peso seco, 70% dos quais representado por uma variedade de moléculas com 16 a 18 carbonos (Holdsworth & Colbeck, 1976)

## 1.2 - Objetivos

Utilizando-se tres clones de P. tricornutum, um de Cananéia isolado em 1980 (C1) e dois de Ubatuba, isolados em 1972 (U3) e 1979 (U5), em bioensaios estáticos com condições experimentais adequadamente controladas, desenvolveu-se este trabalho visando alcançar os seguintes objetivos:

- 1) Descrever a cinética de crescimento dos tres clones através de tres métodos distintos de monitoração do "standing-stock" das populações e compará-los.
- 2) Comparar as taxas máximas de crescimento estimadas a partir desses métodos e verificar a existência ou não de diferenças significativas entre os tres clones.
- 3) Comparar as biomassas máximas alcançadas pelos tres clones com base nas contagens celulares e verificar a existência ou não de diferenças significativas entre elas.
- 4) Comparar as taxas máximas de assimilação do carbono dos tres clones em duas fases distintas do crescimento e verificar a existência ou não de diferenças significativas entre eles.
- 5) Verificar através de análise estatística a existência de interações significativas no comportamento fisiológico dos tres clones com distintos meios de cultura e temperaturas.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Considerações gerais

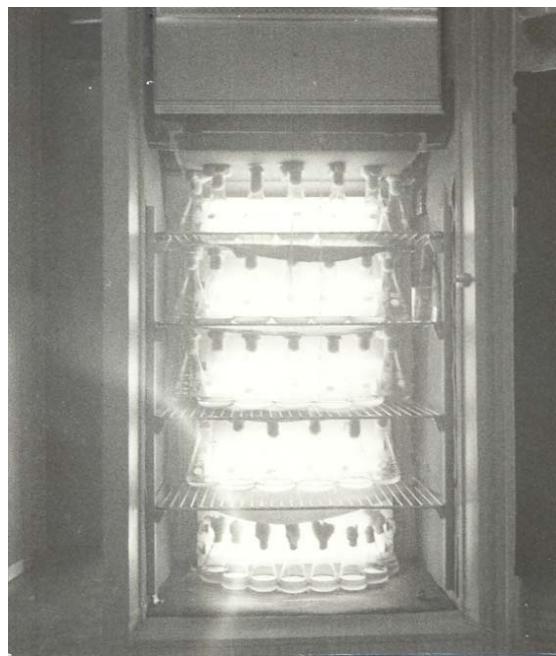
Frequentemente encontram-se os termos " bioensaio" e " bioteste" empregados como sinônimos. Para evitar as dificuldades associadas à distinção terminológica desses dois termos, Von Oertzen (1976) propôs os termos bioensaios " normais" e bioensaios " toxicológicos ". Os bioensaios normais se referem somente a testes biológicos envolvendo fatores ambientais naturais tais como luz, temperatura, salinidade, gases dissolvidos e pressão, só para se mencionar os mais importantes. Desta forma representam os métodos básicos em Ecologia Fisiológica ( ou Autoecologia Experimental ) utilizados com objetivo de contribuir no esclarecimento causal de problemas ecológicos. Assim a potencialidade fisiológica de uma população ou espécie é definida por sua resistência fisiológica, tolerância e preferência com relação aos diferentes fatores ambientais. Então, após as condições ambientais terem sido estudadas, a existência ecológica da população ou espécie dentro do ecossistema pode ser explicada com precisão. Por outro lado, os bioensaios normais constituem um pré-requisito para os biotestes toxicológicos. O objetivo primordial destes é determinar os valores limites ecologicamente relevantes das perturbações antropogênicas ( poluentes ) que até o presente têm um efeito mais ou menos considerável sobre a biosfera.

Vários problemas são comuns a ambos os tipos de bioensaios e todos eles deriam do grau de abstração das condições

de campo inerente aos métodos de laboratório normalmente empregados o que torna questionável a relevância ecológica dos resultados obtidos.

### 2.2 - Câmaras incubadoras

Todos os experimentos foram realizados em quatro câmaras incubadoras da marca Fanem, tipo BOD que foram adaptadas para atender as condições desejadas no planejamento e execução dos mesmos. Assim foram instaladas dez lâmpadas fluorescentes marca Philips de 15 w tipo luz do dia (TLD 15w/54) sobre um painel revestido de fórmica branca que foi fixado no fundo das incubadoras.( figura 2.1 abaixo ).



Cada incubadora foi equipada com cinco prateleiras fixáveis à alturas variáveis através de trilhos e suportes de alumínio.

Na parte inferior de cada prateleira foi fixada cartolina preta recortada mais ou menos segundo uma circunferência com extensão suficiente para que a luz emitida por cada par de lâmpadas fluorescentes não incidisse sobre os frascos das

prateleiras inferiores ou superiores. As superfícies laterais, superiores e inferiores e as portas das incubadoras também foram forradas com o mesmo material para se anular as reflexões da luz e produzir um foco unidirecional.

Essas adaptações permitiam a introdução de até 35 frascos do tipo Erlenmeyer de 300 ml em cada incubadora o que possibilitava a manutenção de frascos com culturas estoque e frascos para incubação do  $^{14}\text{C}$  exatamente nas mesmas condições das populações submetidas aos diversos tratamentos.

## 2.21 - Energia luminosa e fotoperíodo

A intensidade luminosa recebida pelos frascos em todos os experimentos (medida no bordo voltado para a fonte de luz) era de  $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . A medida era obtida através de um " Quanta-meter " marca LI-COR, Inc., modelo Lambda - LI-185A com um sensor ( " quantum-sensor" ) LI-190S o qual era colocado manualmente com sua face receptora exposta ao longo dos pares de lâmpadas. Simultaneamente eram assinalados pontos com um pincel atômico sobre as grades ( prateleiras) para delimitar a posição na qual cada frasco deveria fixar-se durante todos os experimentos para uma iluminação constante em cada prateleira.

De acordo com o fabricante deste equipamento ( LI-COR, 1979) o erro total, sem se levar em conta o erro do manuseio, é de 7,6%. No caso do emprego de um único sensor para caracterizar o perfil de radiação no interior de câmaras de incubação a medida do fluxo de irradiação num dado plano pode variar consideravel-

mente devido a sombreamento e reflexão das paredes, dando origem a um erro denominado erro espacial de manuseio.

Justamente visando atenuar ao máximo esse tipo de erro as paredes de todas as incubadoras foram forradas de cartolina preta e a determinação das posições dos frascos seguiu as instruções constantes do manual de operação.

Assumindo-se uma curva de distribuição espectral regular para a fonte de luz fluorescente na amplitude de 400 a 700 nm e empregando-se um fator de corréção ( LI-COR, op.cit.) o valor de irradiação utilizado nos experimentos,  $125 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  corresponderia em unidades fotométricas a  $27,2 \text{ watt} \cdot \text{m}^{-2}$  ou  $6.400 \text{ lux}$ .

O " quanta-meter" equipado com o sensor LI-190S fornece uma medida de irradiação ( densidade de fluxo de fôtons fotossinteticamente ativos) representada pelo número de fôtons incidentes por unidade de tempo numa dada superfície para a amplitude de 400 a 700nm. A correspondência das unidades em einsteins, moles e fôtons é a seguinte :  $1 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \equiv 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \equiv 6,02 \times 10^{17} \text{ fôtons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ .

O fotoperíodo em todos os experimentos era de 12 horas de exposição à luz e 12 horas no escuro e foi mantido através de relógios eletromecânicos marca Sermar instalados em cada incubadora ligados ao circuito que acionava o conjunto de lâmpadas. Estas foram instaladas nos painéis com acionamento através de " starters " que se revelaram bastante eficientes a cada início de período de iluminação o que não ocorreu com o sistema de partida rápida existente em uma das incubadoras, modificada posteriormente.

## 2.22 - Temperatura

A temperatura das câmaras incubadoras era mantida através de um termostato originalmente instalado para uma amplitude nominal de -10°C a 50 °C. Cada câmara vem equipada com quatro lâmpadas fluorescentes pelo fabricante. A instalação de 10 lâmpadas mais a aplicação de superfícies negras para evitar as reflexões da luz alteraram as condições térmicas para as quais essas incubadoras foram projetadas e consequentemente foram necessárias algumas modificações nos circuitos dos termostatos que permitiram a manutenção de temperatura numa amplitude de 100°C a 300°C.

Sistematicamente um termógrafo marca Thies Gottingen com seu elemento termosensível protegido da luz incidente por um pequeno pedaço de papel alumínio era introduzido nas incubadoras durante uma semana para se avaliar a variação de temperatura ocasionada pelas condições de fotoperíodo. Em todas as temperaturas usadas nos experimentos ( 160°C, 200°C, 240°C) a variação foi em torno de  $\pm 10^\circ\text{C}$  e somente em alguns testes a 280°C essa variação foi de  $\pm 20^\circ\text{C}$ .

## 2.3 Vídraria

Todos os frascos utilizados tanto para a execução dos experimentos como para a manutenção de estoques de meios de cultura eram do tipo Pyrex (borossilicato).

Os meios de cultura eram elaborados e mantidos em balões de 12ℓ de capacidade e garrafões de 9ℓ de capacidade dotados de um sistema de sifão e filtro de ar. As tampas e tubos deste sistema também foram elaboradas em borossilicato.

Para a colocação do meio de cultura numa determinada quantidade para cada frasco experimental, utilizava-se uma bomba de ar manual ligada ao sifão por tubos flexíveis de silicone. O ar bombeado era filtrado por um tubo de 25cm de comprimento por 1,5cm de diâmetro preenchido de algodão hidrófobo. Suas extremidades eram vedadas por rochas de Teflon ajustadas por pressão à bocas cônicas esmerilhadas. Uma vez aumentada a pressão no interior dos balões ou garrafões, os meios de cultura saiam desses frascos por um tubo em forma de L ( cerca de 8mm de diâmetro interno) ao qual se ligava um tubo flexível de silicone com uma pequena torneira de Teflon em sua extremidade.

Com esse dispositivo sempre foi possível preparar todos os frascos para cada experimento no interior de uma câmara asséptica ( ultra-violeta) sem desperdícios de meio, sem derrames e mantendo o estoque fora de contato com o ar ambiente. Além de se reduzir bastante a probabilidade de contaminação dos meios de cultura evitaram-se as manobras com esses frascos bastante volumosos e pesados que dessa forma eram mantidos ao lado da câmara asséptica.

Em todos os experimentos as inoculações foram feitas em frascos do tipo Erlenmeyer de 300mℓ com 200mℓ de meio de cultura.

As culturas estoque eram mantidas em frascos do tipo Erlenmeyer ou balões de 150mℓ. Os experimentos com  $^{14}\text{C}$  foram realizados em frascos com tampa esmerilhada de cerca de 65mℓ de capacidade.

Toda a vidraria incluindo tubos de

centrífuga e pipetas utilizadas para a inoculação das populações em frascos experimentais era submetida à seguinte preparação: lavagem com detergente Extran® MA O<sub>2</sub> neutro a 10% ( Merck ) seguida de lavagem com água de torneira; lavagem de toda superfície interior dos frascos com uma solução de H Cl a 10%. No caso dos tubos de centrífuga e pipetas essa solução era mantida durante alguns minutos e para os frascos maiores cerca de um décimo do volume era preenchido e agitado para que toda a superfície interna fosse banhada pela solução. Após essa lavagem com H Cl a vidraria era neutralizada com uma solução saturada de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, lavada cinco vezes com água de torneira e três vezes com água deionizada.

A vidraria assim tratada era mantida em estufa a 50°C. Os frascos para as culturas, bem como os destinados ao estoque de meios de cultura, eram tapados com chumassos de algodão envoltos com papel alumínio e autoclavados durante 30 minutos a 1,1 Kg/cm<sup>2</sup> e 121°C. Os tubos de centrífuga, pipetas, sifões, filtros de algodão, provetas, beckers, placas de Petri eram totalmente embrulhados em papel alumínio e autoclavados da mesma forma. Uma vez resfriada essa vidraria era mantida rotineiramente no interior da câmara asséptica. Quanto aos frascos para as culturas simplesmente eram estocados em prateleiras até o momento de uso.

Todos os frascos utilizados com culturas nos experimentos foram numerados para controle da própria experimentação e para controle de possíveis resultados

muito discrepantes dos limites ( ver item 2.73). estabelecidos, caso que determinaria sua rejeição para experimentos posteriores.

#### 2.4 - Meios de Cultura

Três tipos de meios de cultura foram utilizados : o meio ASP<sub>2</sub> ( Provasoli et al., 1957), o meio Erd-Schreiber ( Foyn, 1934 ) e o meio f1 ( Guillard & Ryther, 1962 ). Suas composições constam da tabela 2.1.

Na preparação do meio ASP<sub>2</sub> a adição do fosfato foi feita após o pH da solução ter sido ajustado para 7,0 com HCl 1N e o metassilicato adicionado em seguida ao pH ter sido ajustado para 7,8 com Na OH 1N. Então a solução era autoclavada para finalmente se acrescentar as vitaminas ( Mix S<sub>3</sub> ). A mistura de vitaminas foi preparada como uma solução a parte esterilizada por filtração com filtros Millipore® tipo HA (0,45 μ m) de 25 mm de diâmetro e acondicionada em frascos que eram selados e mantidos em congelador.

A água do mar utilizada para elaboração dos meios Erd-Schreiber e f<sub>1</sub> era filtrada com papel de filtro, depois com pré-filtro de fibra de vidro AP-20 e finalmente armazenada no escuro por períodos mais ou menos variáveis de no mínimo um mes.

Para o meio Erd-Schreiber a água do mar era esterilizada em autoclave e as adições de nitrato e fosfato já autoclavados feitas logo em seguida. Após 24 horas era adicionado o extrato de solo. Este foi preparado tomando-se 1 Kg de solo de mangue de Cananéia dissolvido em

1L de água bi-destilada e autoclavado durante 30 minutos. O material foi mantido em repouso por 3 dias e então retirou-se o sobrenadante filtrou-se em papel de filtro, esterilizou-se a 100°C e manteve-se em repouso durante 4 dias em refrigerador.

TABELA 2.1 - Compostões dos meios de cultura

	ASP <sub>2</sub>	Erd-Schreiber	f <sub>1</sub>
NaNO <sub>3</sub>	50mg/L	100 mg/L	150mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5mg/L	--	--
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	--	20 mg/L	10mg/L
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	150mg/L	--	30 - 60mg/L
Na Cl	18 g/L	--	--
Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5 g/L	--	--
K Cl	0,6 g/L	--	--
Ca Cl <sub>2</sub>	0,1 g/L	--	--
TRIS	1 g/L	--	500mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA	30mg/L	--	--
Fe Sequestreno	--	--	10mg/L
Fe Cl <sub>3</sub>	0,8mg/L	--	--
Co Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	3ug/L	--	0,020mg/L
Mn Cl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,2mg/L	--	0,360mg/L
Cu Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1,2ug/L	--	--
Zn Cl <sub>2</sub>	150ug/L	--	--
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6mg/L	--	--
Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	--	--	0,0196mg/L
Zn SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	--	--	0,044mg/L
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	--	--	0,0126mg/L
B <sub>12</sub>	2ug/L	--	1ug/L
Tiamina . H Cl	0,05mg/mL	--	0,2mg/L
Ácido nicotínico	0,01mg/mL	--	--
Pantotenato de Ca	0,01mg/mL	--	--
Ácido pará-amino benzólico	1ug/mL	--	--
Biotina	0,1ug/mL	--	1ug/L
Inositol	0,5mg/mL	--	--
Ácido fólico	0,21ug/mL	--	--
Timina	0,3mg/mL	--	--
H <sub>2</sub> O do mar	--	1000 mL	1000mL
H <sub>2</sub> O bi-destilada	1000mL	--	--
Extrato de solo	--	50mL/L	--

Na elaboração do meio f<sub>1</sub> a água do mar previamente filtrada foi esterilizada por filtração com filtros Millipore® tipo HA (0,45 μm) de 47mm de diâmetro em equipamento Millipore utilizado para determinação de clorofila. Este equipamento bem como os filtros eram autoclavados a 121°C durante 30 minutos. Para evitar enrugamentos dos filtros Millipore durante a esterilização estes eram colocados numa placa de Petri com água deionizada e sobre eles colocavam-se algumas lâminas de vidro para mante-los com sua forma o-

riginal plana. A manipulação dos filtros e do equipamento de filtração foi feita sempre no interior de uma câmara asséptica ( ultra-violeta).

A água do mar assim preparada eram adicionados o metassilicato, o ferro sequestreno e o nitrato preparados em soluções separadas e autoclavados da forma usual. O pH era ajustado para 7,0 e em seguida eram feitas as adições do fosfato, TRIS e da mistura de vitaminas e micronutrientes. Normalmente após essas adições o pH era ajustado para 7,8. A mistura de vitaminas e micronutrientes foi preparada do mesmo modo que aquele para a mistura de vitaminas do meio ASP<sub>2</sub>.

A preparação do meio f<sub>1</sub> esterilizado por filtração revelou-se muito eficiente pois ao longo de toda a experimentação os testes de esterilidade com bactopeptona + ágar ( Spencer, 1952) não revelaram contaminações. Ao contrário do que ocorreu com o mesmo meio preparado de acordo com a formulação original ( esterilização por autoclave) e utilizado nos primeiros testes deste trabalho.

Na preparação das soluções estoque para os meios enriquecidos (f<sub>1</sub> e Erd-Schreiber) e meio sintético (ASP<sub>2</sub>) foram seguidas as recomendações de Mc Lachlan (1973).

A escolha dos meios de cultura referidos anteriormente foi feita tendo-se em vista o fato de serem utilizados por diversos autores em trabalhos de culturas e fisiologia do fitoplâncton marinho o que permite comparações de resultados.

No que se refere ao meio f<sub>1</sub>, segundo Vieira (1975) o enriquecimento relativamente elevado minimiza as possíveis va-

rições da composição química por mineralizações quando da estocagem da água do mar, fato de extrema importância em experimentação fisiológica na qual uma mesma amostra de água é utilizada em vários experimentos, porém, em tempos distintos.

Para os experimentos comparativos entre três clones de *P. tricornutum* foram empregados além do meio  $f_1$ , o meio Erd-Schreiber e o meio sintético ASP<sub>2</sub> que é relativamente pobre em matéria orgânica mas tem composição conhecida, visando submetê-los a condições nutricionais qualitativa e quantitativamente distintas para a detecção de possíveis diferenças fisiológicas em suas respostas.

A salinidade do meio ASP<sub>2</sub> utilizado em todos os experimentos era 24,6% e a salinidade da água do mar utilizada na elaboração dos meios Erd-Schreiber e Guillard  $f_1$  era 28%. Essa água do mar foi coletada no Mar de Cananéia e estocada em quantidade suficiente para permitir a elaboração dos meios enriquecidos para todos os experimentos deste trabalho.

## 2.5 - Alga Teste

A escolha de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin se deveu ao fato de existirem disponíveis três clones desta espécie que têm sido mantidos no "Banco" de Cultura de Algas do IOUSP com baixo nível de bactérias, os quais, como já foi referido anteriormente, provêm de regiões distintas e que portanto poderão servir para fins comparativos eventualmente em estudos posteriores sofre o efeito de poluentes em ambientes com condições ecológicas muito distintas. Por outro lado essa espécie é cosmopolita e tem sido extensivamente empregada em estudos de culturas (Spen-

cer, 1954; Raymont & Adams, 1958; Berland, 1966; Vieira, 1975), efeitos dos parâmetros-luz (Quraishi, 1968; Quraishi & Spencer, 1971; Beardall & Morris, 1976), temperatura (Morris & Glover, 1974; Goldman, 1977), nutrientes (Kuentzler & Ketchum, 1962; Glover, 1977) e em estudos de relações interespecíficas (Berland et al., 1969; D'Elia & Guillard, 1979).

Do ponto de vista técnico sua utilização torna-se recomendável na medida em que sua manutenção em cultura é relativamente simples e que sua contagem celular fica facilitada em razão de se apresentar na forma de células isoladas. A cinética de crescimento desta espécie é bem conhecida (Hayward, 1965; 1968a; 1968b; 1968c; 1969; 1970); igualmente sua fisiologia (Morris et al., 1974; Beardall & Morris, 1975; Glover et al., 1975; Shimura & Fujita, 1975; Carreto & Catoggio, 1976; Mukerji & Morris, 1976; Collos & Slawyk, 1979), morfologia (Wilson, 1946); ultraestrutura (Lewin et al., 1958; Reimann & Volcani, 1968; Borowitzka et al., 1977; Borowitzka & Volcani, 1978) e toxonomia (Lewin, 1958).

## 2.51 - Preparação dos inóculos

A partir de culturas-mãe não axenicas em fase exponencial um determinado volume da cultura era submetido a lavagem por centrifugação (Pringsheim, 1946; Balantine, 1953).

Em cada lavagem as populações eram centrifugadas a 2000rpm durante 3 minutos; em seguida o meio sobrenadante era despejado e as células centrifugadas ressuspensas em água do mar esterilizada por filtração não enriquecida (para as populações mantidas em meios enriquecidos) ou água do

mar artificial esterilizada por autoclave não enriquecida (para as populações mantidas em meio sintético) no interior de uma câmara asséptica. Esta operação era repetida cinco vezes e então na última o sobrenadante era despejado e as células centrifugadas ressuspensas no meio de cultura a que se destinavam. Esse volume era despejado em Erlenmeyer ou balão de 150 ml com meio de cultura novo, agitado várias vezes e, após cerca de 30 minutos, era feita uma amostra para contagem em duplicata em um hemocitômetro. Determinada a densidade celular era calculado o volume do inóculo em função do volume de meio de cultura de cada frasco experimental.

A densidade das populações dos inóculos era planejada de modo a permitir as inoculações em todos os frascos de cada experimento com uma determinada margem de segurança. Em geral, o volume dos inóculos se situou entre 0,1 a 0,5 ml.

Em todos os experimentos a densidade dos inóculos utilizada foi de  $1,00 \times 10^4 \pm 2,00 \times 10^3$  células/ml

## 2.52 - Manutenção das culturas-estoque

As culturas-estoque eram mantidas em meio f<sub>1</sub> esterilizado por filtração ou meio ASP<sub>2</sub> esterilizado em autoclave a 200C ± 10C, sob uma iluminação de 125 μ E. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 horas de exposição à luz e 12 horas de exposição ao escuro. Para os experimentos realizados em temperaturas diferentes eram feitas subculturas colocadas em outra incubadora na qual introduzia-se uma alteração aproximada de 10C a cada dois dias até se alcançar as temperaturas desejadas..

Todas elas eram repicadas uma vez por semana durante a fase exponencial o que permitiu a manutenção de populações em ótimo estado fisiológico ao longo de todo período experimental. Todo o processo de manipulação das populações foi sempre executado com vidraria esterilizada em autoclave e no interior de uma câmara asséptica.

Sistematicamente foram feitos testes de esterilidade para verificar a presença ou não de bactérias nas culturas unialgais empregando-se o meio de bacto peptona + ágar (Spencer, 1952) bem como nos inóculos preparados para cada experimento.

## 2.6 - Planejamento e execução dos experimentos.

Para efeito de descrição do planejamento experimental, amostragem e tratamento estatístico deste trabalho denominamos de unidade experimental cada réplica (frasco) utilizada em qualquer experimento contendo uma população de alga teste *P. tricornutum* à qual foi aplicado um tratamento que pode resultar da combinação de dois ou mais fatores; por réplica entendemos a repetição de uma unidade experimental visando obter-se uma estimativa do erro experimental que atua como uma unidade básica de medida no que se refere à avaliação da significância das diferenças observadas ou determinação da extensão do intervalo de confiança e, igualmente, uma estimativa mais precisa do efeito médio de qualquer fator, uma vez que,  $\sigma^2_Y = \sigma^2/n$  onde  $\sigma^2$  representa o erro experimental real e n o número de replicações. Em cada situação em particular, o erro experimental reflete: (1) os erros de experimentação, (2) os erros

de observação, (3) os erros de medida, (4) a variação do material experimental (i.e., entre unidades experimentais) e (5) os efeitos combinados de todos os fatores estranhos que poderiam influenciar as características sob estudo mas que não puderam ser controlados durante a experimentação. Por tratamento entendemos o procedimento cujo efeito foi medido e comparado com outros tratamentos; por unidade de amostragem, uma parcela aleatoriamente retirada da unidade experimental a partir da qual o efeito de um tratamento foi medido.

Na preparação de todas as unidades experimentais deste trabalho, tendo em vista a redução do erro experimental, procurou-se empregar populações de algas fisiologicamente homogêneas, conduzir os experimentos sempre de maneira uniforme e, na medida do possível, obter informações de variáveis concomitantes. Essas unidades experimentais foram tomadas em grupos de igual número de modo que diferentes grupos podessem ser submetidos a diferentes tratamentos completamente casualizados.

Como já foi mencionado anteriormente, a replicação fornece uma estimativa do erro experimental a qual pode ser utilizada na avaliação da significância das diferenças observadas, ou seja, possibilita a aplicação de testes de significância. Entretanto, todos os testes estatísticos exigem pressupostos que devem ser satisfeitos para que se tornem válidos. Provavelmente o pressuposto mais frequentemente evocado estabelece que as observações (ou erros, nesse sentido) sejam independentemente distribuídos.

De acordo com Ostle & Mensing (1975) persistir na casualização das amostragens de uma população ou na casualização das aplicações dos tratamentos às unidades experimentais não assegura independência, contudo permite que procedamos como se fosse um fato validando os testes de significância e tornando-os apropriados para a análise dos dados. A razão para essa distinção está em que os erros associados a unidades experimentais adjacentes no espaço e no tempo tendem a ser correlacionados e, tudo o que a casualização faz, é assegurar-nos que o efeito desta correlação sobre qualquer comparação entre tratamentos seja o menor possível. Um certo grau de correlação permanecerá, sendo impossível eliminá-la totalmente. No entanto, a independência deve ser visada e a casualização é a melhor técnica para esse fim.

Segundo Steel & Torrie (1960) o planejamento experimental completamente casualizado apresenta vantagens no sentido de que o número de tratamentos e replicações só é limitado pelo número de unidades experimentais disponível, a análise estatística é simples mesmo se o número de réplicas varia com os tratamentos e se vários tratamentos são sujeitos a variâncias desiguais, comumente referidas como não homogeneidade do erro experimental. Além disso, a simplicidade da análise não é alterada se algumas unidades experimentais ou tratamentos inteiros são perdidos ou rejeitados. A perda de informação devido a ausência de dados é relativamente pequena quando comparada com outros planejamentos. O número de graus de liberdade para a estimativa do erro experimental é máximo o

que melhora a precisão do experimento e se torna importante com experimentos pequenos, isto é, aqueles para os quais o número de graus de liberdade para o erro experimental é menor do que 20. A maior objeção a este tipo de planejamento com casualização irrestrita decorre do erro experimental incluir a totalidade da variação entre as unidades experimentais excetuando aquela devido aos tratamentos.

Os experimentos de comparação entre 3 clones de *P. tricornutum* foram executados conforme o delineamento esquematizado abaixo:

temp.	T1 = 160 C			T2 = 200 C			T3 = 240 C			Meios de Cultura
	Réplicas			Réplicas			Réplicas			
Clones	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
C <sub>1</sub> Cananéia										ASP <sub>2</sub>
										Erd-Schreiber
										Guillard f <sub>1</sub>
C <sub>2</sub> Ubatuba										ASP <sub>2</sub>
										Erd-Schreiber
										Guillard f <sub>1</sub>
C <sub>3</sub> Ubatuba										ASP <sub>2</sub>
										Erd-Schreiber
										Guillard f <sub>1</sub>

Assim, tínhamos um experimento factorial ( 3 clones x 3 temperaturas x 3 meios ) no qual foram utilizados 27 frascos tipo Erlenmeyer de 300 mL, com 200mL de meio de cultura, fixando-se a temperatura. ( 3 réplicas x 3 clones x 3 meios = 27). Esses 27 frascos foram colocados na incubadora 1 que dispunha de 5 prateleiras ( 6 frascos por prateleira + 3 frascos na 5<sup>a</sup> prateleira). As demais incubadoras, que dispunham do mesmo espaço, foram mantidas ligadas em sincronia de fotoperíodo para os seguintes fins: incubadora 2 - manutenção das culturas-estoque; incubadora 3 - aclimatação de culturas, através de alterações lentas da tempera-

tura, para os demais experimentos que se seguiriam; incubadora 4 - reserva para eventuais falhas especialmente da incubadora 1 ou das demais e, manutenção dos frascos experimentais que eram retirados aleatoriamente da incubadora 1 durante 2 horas com o objetivo de propiciar espaço para as incubações com <sup>14</sup>C em determinados dias no decorrer de cada experimento. Por ocasião das incubações com <sup>14</sup>C os frascos experimentais utilizados eram mantidos na incubadora 1 em duas prateleiras. Como tínhamos 9 combinações experimentais (3 clones x 3 meios) e para cada uma delas utilizavam-se 3 frascos ( 2 claros e 1 preto) essa condição gerava a necessidade do emprego de 27 frascos. Entretanto cada prateleira da incubadora permitia a colocação de no máximo 14 frascos lado a lado com igual recepção de intensidade lumínosa. Conseqüentemente eram necessárias 2 prateleiras e por essa razão que se removiam os frascos em número equivalente a essa disponibilidade de espaço e se transferiam para a incubadora 4 somente durante o período de 2 horas referente a incubação com o <sup>14</sup>C. Isto posto, os frascos removidos eram recolocados na incubadora 1.

## 2.7 - Amostragem das populações

As amostras retiradas diariamente das unidades experimentais foram sempre executadas cerca de 2 horas após o início do período de iluminação. Cada frasco era agitado várias vezes visando homogeneizar a distribuição das células na população, aberto sobre a chama de um bico de Bunsen e despejada uma determinada alíquota em um frasco de vidro neutro com tampa plástica com capacidade aproximada de 40 mL.

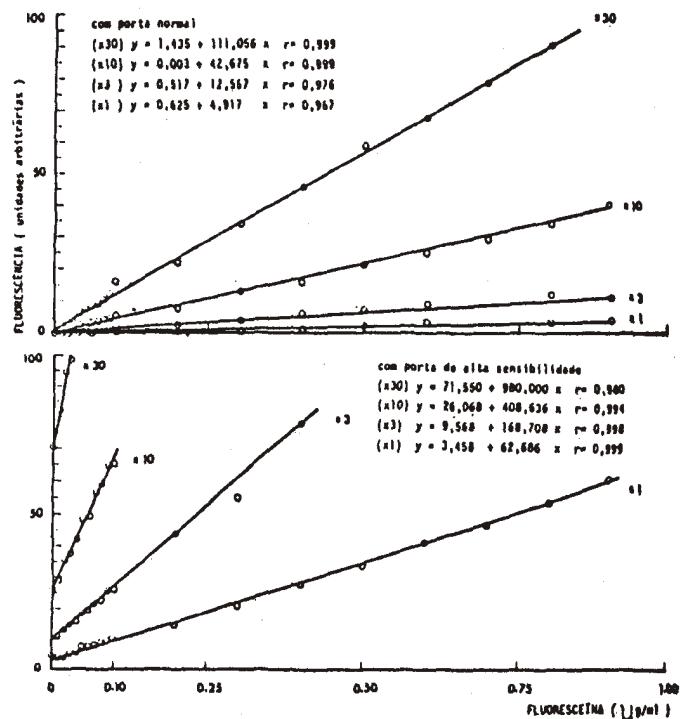
A partir desta unidade de amostra eram feitas as leituras da fluorescência *in vivo* e do pH; uma parcela de 1 a 3 mL era destinada a um frasco contendo 1 gota de lugol acético para a fixação das células e posterior medida do "standing-stock" através de sua contagem; o volume restante era utilizado para a medida da clorofila a total.

### 2.71 - Fluorescência *in vivo*

As leituras de fluorescência *in vivo* das amostras foram feitas num Fluorímetro Turner modelo 111 (Sequoia - Turner Corporation) equipado com lâmpada azul T-5 (110-853) destinada a análise da clorofila, filtro primário 5/60 e secundário 2/64, seguindo as instruções de operação do fabricante.

O equipamento foi submetido a testes de linearidade de leituras com a porta alojadora da amostra normal e de alta sensibilidade contra as fendas de passagem da luz fonte 1x, 3x, 10x, 30x utilizando uma solução de fluoresceína em fosfato de sódio dibásico 0,05M em concentração de 0 a 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . (figura 2.3).

As amostras eram introduzidas em cubetas cilíndricas de 12 x 75mm padrão, de borossilicato, colocadas no aparelho e lidas sempre na faixa de 15 a 90 unidades (escala de deflexão do aparelho) com as fendas de passagem de luz variáveis conforme a densidade celular da amostra. A cada leitura o fluorímetro era zerado com água destilada. O registro das leituras



foi sempre baseado num fator de sensibilidade comum e multiplicado por 1000 para a construção de curvas de crescimento com transformação monilogarítmica. Todas as operações com o fluorímetro eram iniciadas após 30 minutos que o aparelho havia sido ligado sempre no interior de uma sala com temperatura constante.

### 2.72 - pH

As medidas diárias de pH foram feitas com um peágómetro digital marca Digi med.

As amostras eram as mesmas utilizadas na leitura da fluorescência *in vivo* sendo mantidas em frascos de vidro neutro de 10mL de capacidade com abertura suficiente para introdução do eletrodo.

### 2.73 - Contagens

Para as contagens das células foram utilizadas câmaras tipo hemocitômetros - Agasse - Lafont B (volume total=10mm<sup>3</sup>) para os inóculos (densidade = 1,00 x 10<sup>4</sup>

Figura 2.3 - Teste de linearidade do fluorímetro Turner mod. 111 utilizando solução de fluoresceína (1mg/mL) em Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,05M.

células/ml) até mais ou menos dois dias após a inoculação; Nageotte (volume total =  $25\text{mm}^3$ ) para densidades inferiores àquela dos inóculos, especialmente quando, em certos tratamentos, ocorreu uma drástica redução do número de células; Fuchs-Rosenthal (volume total =  $3,2\text{mm}^3$ ) para densidades de  $1,00 \times 10^5$  a  $8,00 \times 10^6$  células/ml; Thoma (volume total =  $0,1\text{mm}^3$ ) e Malassez (volume total =  $0,01\text{mm}^3$ ) para densidades celulares superiores a  $8,00 \times 10^6$  células/ml.

Para cada amostra diária de cada réplica foi estabelecida uma contagem mínima de 400 células o que determina um erro de  $\pm 10\%$  para 95% de limites de confiança (Lund et al., 1958). Quando as densidades celulares sofreram reduções extremas, estabeleceu-se o mínimo de 100 células através de um número variável de repetições de contagens em amostras repetidas da mesma réplica com o erro assim fixado em  $\pm 20\%$ .

Teoricamente se as células das populações se encontram distribuídas ao acaso no interior dos frascos experimentais e, amostras pequenas em relação à população total são retiradas e contadas por uma técnica bem eficiente, essas contagens devem se distribuir de acordo com uma série de Poisson e a variação entre as réplicas atribuídas aos erros aleatórios de amostragem. As estimativas do erro nas contagens mencionadas anteriormente estão baseadas no pressuposto que o único erro importante é o erro ao acaso. Entretanto existem, certamente, outros tipos de erros envolvidos devido à amostragem e ao processo de contagem. Pelo cálculo das médias, desvios padrão e

coeficientes de variação das réplicas obteve-se uma estimativa conjunta desses erros para todas as contagens deste trabalho (ver anexo, 9.1 a 9.5).

Conforme a densidade celular alcançada num determinado momento da experimentação, a contagem celular para o erro teórico estabelecido pode exigir a observação de um ou mais campos da câmara de contagem. A escolha desses campos foi sempre feita ao acaso e, sistematicamente, foram aplicados testes  $\chi^2$  para testar a homogeneidade da distribuição das células nesses campos de cada câmara utilizada.

Os procedimentos detalhados na preparação, contagem e limpeza das câmaras seguiram as recomendações de Guillard (1973)

## 2.74 - Clorofila - a total

As amostras retiradas de cada réplica experimental tinham um volume adequado para as medidas da fluorescência, pH e contagem o qual, entretanto, era insuficiente para a determinação da clorofila - a total, principalmente no início dos experimentos quando as densidades celulares eram muito baixas. Assim, como se dispunham de triplicatas de cada combinação experimental, após as medidas de pH, fluorescência e fixação de um pequeno volume para contagem, o restante das amostras era filtrado em filtro Millipore® tipo HA de 22mm de diâmetro com pressão negativa de 0,3 atm para efetuar a medida de clorofila. Esse procedimento foi rotineiramente adotado para todos os experimentos de modo que, para a variável clorofila - a total não foram feitas medidas replicadas.

Após a filtração, os filtros eram colocados num dessecador com sílica-gel e guardados no interior do "freezer" de um congelador. A extração da clorofila - a foi feita com acetona P.A.a 90% durante 24 horas no interior de um congelador. As leituras das absorbâncias foram feitas nos comprimentos de onda 750, 665, 664, 647, 645, 630nm com cubas de 5cm num espectrofotômetro PMQ II, C. Zeiss. As amostras foram acidificadas em seguida com 2 gotas de HCl 1N, agitadas e lidas a 750 e 665 nm. Para os cálculos foram utilizadas as equações de Strickland & Parsons(1968), Lorenzen(1967) e Jeffrey & Humphrey (1975).

Como as estimativas da clorofila - a e feofitina pelas equações de Lorenzen (*op.cit.*) não lograram êxito, obtendo-se muitos resultados negativos desta última, os resultados aqui expressos se referem a clorofila - a total, isto é, clorofila - a funcional mais a feofitina conforme a equação de Strickland & Parsons (*op. cit.*).

## 2.75 - Produção Primária

A produção primária foi medida pelo método introduzido por Steeman-Nielsen (1952) seguindo as recomendações de Teixeira ( 1973b ).

As ampolas de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  utilizadas nos experimentos comparativos entre 3 clones de *P.tricornutum* eram de 1 ml com atividade de  $10\text{ }\mu\text{Ci}/\text{ml}$  (New England, lote 670-079) tendo apresentado na padronização uma atividade de  $19.985.235 \text{ dpm/ml}$ .

A série de experimentos de produção primária foi realizada com suspensões de  $2,00 \times 10^5 \pm 5,00 \times 10^3$  células/

ml que haviam sido retiradas dos frascos experimentais, lavadas por centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, por 3 vezes, com água do mar esterilizada por filtração ou água do mar sintética esterilizada em autoclave, ambas não enriquecidas. Após a última lavagem as células eram ressuspensas em meio de cultura novo idêntico ao do frasco original e despejadas num frasco tipo Erlenmeyer de 500 ml com 250ml de meio. Decorridos cerca de 30 minutos essas populações eram agitadas várias vezes e distribuídas pelos frascos ( 2 transparentes e 1 preto) de incubação com tampa esmerilhada com cerca de 65ml de capacidade até mais ou menos 3/4 de sua capacidade. Conforme o número de combinações experimentais um número variável de ampolas era aberto, removido seu conteúdo com uma seringa descartável e despejado num frasco de vidro neutro de 10ml de capacidade e bem misturado. Então, com uma micropipeta Eppendorf de 0,1ml de capacidade eram tomadas alíquotas nesse valor e introduzidas nos frascos de incubação. Imediatamente em seguida esses frascos eram completados em seus volumes, tapados de forma a não restarem espaços com ar, agitados e levados para o interior das câmaras de incubação exatamente nas condições originais de temperatura e luz, durante 2 horas. Uma alíquota de 25ml da suspensão de células era filtrada para a determinação inicial da clorofila - a total e o restante incubado junto com os frascos de  $^{14}\text{C}$ .

Em todos os experimentos o início do período de incubação ocorreu aproximadamente de 4 a 5 horas após o início do período de iluminação.

Decorridas as duas horas de incubação,

todos os frascos eram retirados da incubadora e alojados numa caixa forrada de cartolina preta completamente abrigada da luz. As filtrações eram executadas imediatamente começando-se sempre pelos frascos pretos em seguida os transparentes e, o remanescente da suspensão filtrado para a determinação da clorofila - a total ao final do período de incubação.

Todos os frascos de incubação utilizados tiveram seus volumes aferidos e os volumes filtrados, sempre que possível, corresponderam à totalidade do conteúdo de cada frasco experimental. Quando a filtração se apresentava mais lenta procurou-se estabelecer um tempo máximo de 5 minutos para sua execução conforme recomendado por Teixeira (op.cit.) e o volume restante determinado para a devida correção.

Os filtros foram conservados secos no interior de envelopes de papel até serem dissolvidos em solução cintiladora segundo Bray (1960) e levados a um cintilador marca Beckman modelo LS 8000 para a medida de suas atividades.

## 2.76 - Microfotografias

As microfotografias foram obtidas empregando-se um microscópio binocular marca Wild Heerbrug com contraste de fase ao qual foi acoplado um sistema fotográfico marca Zeiss modelo Ikon, filme marca Kodak tipo Panatomic-X com um aumento de 500 x e tempos de exposição de 25 a 35 segundos.

## 2.8 - Parâmetros estimados

### 2.81 - Taxa de crescimento

A inspeção das curvas de crescimento

com base na densidade celular diária, variação da clorofila -a total diária e fluorescência *in vivo* diária, sugeriu praticamente em todos os casos, um crescimento logarítmico que pode ser descrito pela equação  $y = ab^x$ . Assim, procedeu-se a uma transformação mologarítmica das variáveis densidade celular, fluorescência *in vivo* e clorofila -a total. Para cada uma delas foram executadas as regressões pelo método dos mínimos quadrados contra o tempo obtendo-se as retas ajustadas:  $\log y = a + bx$ . Com base nestas retas estimavam-se os valores de cada variável num tempo  $t_0$  e  $t_f$  equivalentes aos tempos inicial e final do período experimental durante o qual o crescimento era logarítmico e, de posse destas estimativas, utilizando a equação  $\log_2 (Y_f/Y_0) / t$  foram calculadas as taxas de crescimento (Guillard, 1973); onde  $Y_0$  representa o valor da variável estimado no início do período,  $Y_f$  o valor da variável estimado no final do período,  $t$ , o tempo transcorrido em dias. Portanto as taxas de crescimento com base na densidade celular expressam o número médio de divisões celulares diárias nos referidos períodos experimentais, as taxas de crescimento com base na evolução da clorofila -a total e fluorescência *in vivo* expressam o valor médio das duplicações diárias dessas variáveis nos mesmos períodos.

## 2.82 - Biomassa máxima

A biomassa máxima alcançada em qualquer frasco experimental é definida como o "standing-stock" máximo em termos de densidade celular durante a incubação. O critério utilizado foi considerar o valor máximo de cada réplica quando os in-

crementos posteriores eram menores do que 5% por dia (EPA,1971).

#### 2.83 - Clorofila-a total média por célula

A clorofila -a total média por célula foi calculada pelo quociente entre a quantidade de clorofila -a total observada a cada dia e a média de três observações da densidade celular no mesmo dia, expressa em nanogramas.

#### 2.84 - Número de fluorescência

O número de fluorescência resulta do quociente entre o valor da fluorescência *in vivo* observada em unidades arbitrárias e a quantidade de clorofila -a total em mg/m<sup>3</sup>; um aumento no quantum desse número é considerado como uma medida da ineficiência da fotossíntese, uma vez que a fluorescência representa uma perda de energia livre a qual deveria ter sido canalizada como energia química do processo fotossintético ( Loftus.& Seliger,1975).

#### 2.85 - Potencial fotossintético

A produção primária foi estimada através do <sup>14</sup>C fixado nas células retidas pelos filtros " Millipore", portanto somente em termos de carbono particulado não se levando em conta os produtos orgânicos excretados ou perdidos durante o processo de filtração, segundo a equação:

$$\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} = \frac{\text{cpm}(1) \times ^{12}\text{CO}_2(2) \times 1,05(3)}{\text{CPM}(4)}$$

$$\times K_1 \times K_2 \times K_3$$

$$\text{CPM}(4)$$

onde (1): <sup>14</sup>C assimilado( frascos transparentes menos frascos pretos) menos o "background" da ampola.

(2) : Concentração total do <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> das amostras; valor estimado em 90mg CO<sub>2</sub>/ℓ  

$$( = \frac{90}{1} \times \frac{12}{44} ).$$

(3) : Fator de correção para o efeito da discriminação isotópica.

(4) : Carbono radioativo total(CPM) adicionado nas amostras.

K<sub>1</sub> : Fator de correção para o fator tempo  $(\frac{1}{h})$

K<sub>2</sub> : Fator de correção dimensional para transformar mg C.ℓ<sup>-1</sup> em mg C.m<sup>-3</sup>

K<sub>3</sub> : Fator de correção para o volume de amostra filtrada ( volume do frasco experimental - volume da alíquota da ampola) / volume filtrado .

O potencial fotossintético foi expresso em termos de mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>; mg C.mg clorofila -a total<sup>-1</sup>. m<sup>-3</sup>. h<sup>-1</sup> e por mg C. mg clorofila -a total<sup>-1</sup>. 1,00 x 10<sup>-4</sup> células. m<sup>-3</sup>. h<sup>-1</sup>.

A quantidade de clorofila-a total utilizada nesses cálculos foi sempre resultante da média de duas determinações no início da incubação e duas horas depois.

#### 2.9 - Tratamento estatístico

##### 2.91 - Dados brutos

Foram calculadas a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ) para os resultados das medidas de "standing-stock" por densidade celular e fluorescência *in vivo* diárias obtidas em triplicata; do mesmo modo foram calculadas a média, o desvio padrão e coeficiente de variação para as estimativas das taxas de cresci-

mento, biomassas máximas, potencial fotosintético.

#### 2.92 - Geração de números aleatórios

Para a casualização dos procedimentos de execução e amostragem dos experimentos foi utilizado um programa gerador de números uniformemente distribuidos contido num módulo de Estatística Aplicada (Texas Instruments, 1977) numa calculadora marca Texas modelo TI 59 programável acoplada a uma impressora modelo PC-100C.

#### 2.93 - Regressões e coeficientes de correlação linear simples

As regressões e coeficientes de correlação linear simples foram calculadas com o auxílio da calculadora TI 59

#### 2.94 - Matriz de Covariância, Coeficientes de Correlação Linear

As matrizes de covariância e coeficientes de correlação linear foram calculados empregando-se programas de Testes Estatísticos ( Texas Instruments, 1978).

#### 2.95 - Teste de Regressão

Para a comparação de duas regressões lineares foram utilizadas as comparações de dois coeficientes de regressão e de dois termos independentes conforme as equações de Leme (1958).

#### 2.96 - Teste de Quiquadrado

Os testes de quiquadrado utilizados sistematicamente para testar a homogeneidade

dade de distribuição de células nas câmaras de contagem foram realizados com um programa de Testes Estatísticos ( Texas Instruments, op.cit.).

#### 2.97 - Análise de Variância Trifatorial ( Three-way ANOVA )

Num sentido bem amplo ao delinearmos os experimentos comparativos entre três clones de *P.tricornutum* nosso objetivo era obter uma grande variação no parâmetro medido ( Y ), porém com as causas desta variação o mais eficientemente possível controladas.

Assumimos que a variação total do(s) parâmetro(s) medido(s) Y, representado por  $\sigma^2_T$  pode ser decomposta da seguinte forma :

$$\sigma^2_T = S^2_g + S^2_m + S^2_t + S^2_{gm} + S^2_{gt} + S^2_{mt} + S^2_{gmt} + S^2_e , \text{ onde:}$$

$S^2_g$  - é a variância devido às diferenças genéticas e outros pré-requesitos celulares internos dos distintos clones;

$S^2_m$  - é a variância devido ao meios de cultura;

$S^2_t$  - é a variância devido às diferentes temperaturas;

$S^2_{gm}$  - é a variância devido à interação do genótipo das algas com o meio de cultura;

$S^2_{gt}$  - é a variância devido à interação do genótipo das algas com a temperatura;

$S^2_{mt}$  - é a variância devido à interação do meio com a temperatura;

$S^2_{gmt}$  - é a variância devido à interação dos três fatores;

$S^2_e$  - é a variância devida à variação entre outros fatores ambientais não

controlados e a interação deles com os acima mencionados mais a variação devido ao acaso mais a variância devido à influência do método de medida.

Assumindo-se os pressupostos adequados (aleatoriedade das amostras, independência e identidade da distribuição do erro experimental ou acaso, homogeneidade de variâncias e aditividade dos tratamentos) aplicamos uma análise de variância trifatorial com a finalidade de obter estimativas das magnitudes relativas de cada uma das componentes de variância alinhadas, seguindo os procedimentos recomendadas por Sokal & Rohlf (1969).

Assim, a fonte de variação foi subdividida em três efeitos principais C (Clones), M (meios de cultura) e T (temperaturas), três interações de primeira ordem, CxM, CxT, MxT, uma interação de segunda ordem CxMxT e uma interação de segunda ordem dentro dos subgrupos (E).

O modelo utilizado tem como equação:  
 $y_{ijkl} = \mu + Ci + Mj + Tk + (CM)ij + (CT)ik + (MT)jk + (CMT)ijk + (E)ijkl;$

$i = 1 \text{ a } 3$ ,  $j = 1 \text{ a } 3$ ,  $k = 1 \text{ a } 3$ , onde  $y_{ijkl}$  é a  $\ell$ -ésima observação do  $i$ -ésimo clone,  $j$ -ésimo meio e  $k$ -ésima temperatura;

$\mu$  é a média paramétrica da população;  $C_i, M_j, T_k$  são os efeitos dos tratamentos fixados para o  $i$ -ésimo clone,  $j$ -ésimo meio e  $k$ -ésima temperatura;

$(CM)ij, (CT)ik$  e  $(MT)jk$  são os efeitos de interação de primeira ordem nos subgrupos representados pelas combinações indicadas do  $i$ -ésimo clone, o  $j$ -ésimo meio e a  $k$ -ésima temperatura;

$(CMT)ijk$  é o efeito da interação de segunda ordem entre os tratamentos no subgru-

po;

$(E)ijkl$  é o erro da  $\ell$ -ésima repetição no subgrupo  $ijk$ .

A análise estatística testou as seguintes hipóteses:

$H_0(1): C_1 = C_2 = C_3 = 0$ ; igualdade de médias entre os clones

$H_0(2): M_1 = M_2 = M_3 = 0$ ; igualdade de médias entre os meios

$H_0(3): T_1 = T_2 = T_3 = 0$ ; igualdade de médias entre as temperaturas

$H_0(4): (CM)ij=0$ ; a existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone e o  $j$ -ésimo meio

$H_0(5): (CT)ik=0$ ; existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone e a  $k$ -ésima temperatura

$H_0(6): (MT)jk=0$ ; existência de interação entre o  $j$ -ésimo meio e a  $k$ -ésima temperatura

$H_0(7): (CMT)ijk=0$ ; existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone,  $j$ -ésimo meio e a  $k$ -ésima temperatura

Assumi-se que todos os  $(E)ijkl$  fossem normalmente distribuídos com média zero e variância  $\sigma^2$  comum e mutuamente independentes. Cada hipótese foi testada pela estatística F a qual é rejeitada quando o valor F calculado é maior que o valor F tabelado ao nível de 5% de significância.

Os cálculos referentes a essas análises foram feitos com um programa FORTRAN (ver anexo 9.2) utilizando um computador DPD digital do Depto. de Engenharia Naval do IPT.

Como os tratamentos foram sempre fixos os quadrados médios esperados do mo-

deles consistem simplesmente da variância do erro e do efeito adicionado do tratamento para cada fonte de variação particular. Os testes de significância (teste F) foram feitos, quando existiam réplicas, através da relação entre qualquer quadrado médio de uma fonte de variação e o quadrado médio do erro.

Quando não existiam réplicas em lugar deste último foi utilizado o quadrado médio da interação de segunda ordem ( $\alpha \times \beta \times \gamma$ ), assumindo-se que o efeito adicionado à ela devido

$$\sum_{abc} (\alpha \beta \gamma)^2 / (a-1)(b-1)(c-1)$$
 é igual a zero.

Nos casos onde surgiram diferenças significativas das médias entre fatores principais e interações, aplicou-se uma Análise de Agrupamentos (Scott & Knott, 1974) que separa grupos com médias significantemente diferentes, empregando-se os resultados obtidos pelos modelos dados pela ANOVA. Dentro de cada grupo final obtido as médias, por esse método, são consideradas homogêneas.

Os cálculos referentes a Análise de Agrupamentos foram efetuados com um programa FORTRAN (ver anexo 9.2) utilizando um computador Burroughs do Centro de Processamento de Dados da USP.

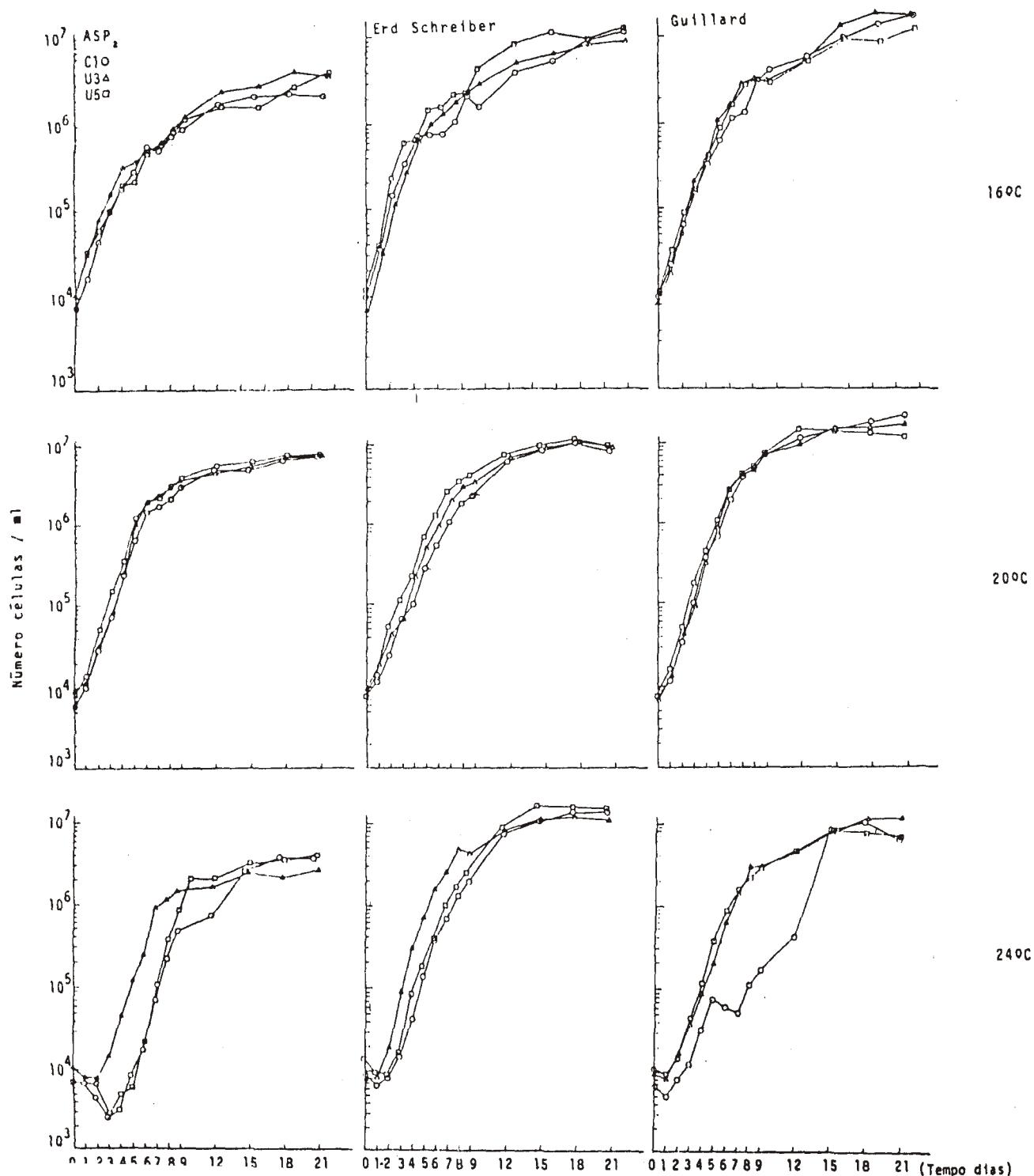
### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Comparação das curvas de crescimento dos três clones

##### 3.1.1 Curvas de crescimento com base na contagem celular

A figura (3.1) apresenta as respostas de crescimento dos três clones de *P. tricornutum* submetidos à distintas temperaturas e meios de cultura.

**Figura 3.1 - Curvas de crescimento de três clones de *P. tricornutum* (C1, isolado de Cananéia em 1980; U3 isolado de Ubatuba em 1972 e U5, isolado de Ubatuba em 1979) baseadas na densidade celular diária. Cada ponto representa o valor médio de três observações provenientes de cada uma das três réplicas para cada ensaio; os intervalos de confiança se encontram nos anexos A1 a A3.**



A análise das curvas de crescimento tomando-se por base a temperatura revela que as respostas dos três clones obedecem a um padrão similar. Para as temperaturas 16°C e 20°C não existiu uma fase "lag" de crescimento e as células de todos os clones, logo em seguida à inoculação, cresceram exponencialmente. A 24°C no entanto, os três clones exibiram uma fase "lag" de duração variável conforme o meio de cultura em que se encontravam. Essa fase "lag" durou cerca de 24 horas para os três clones nos meios Erd-Schreiber e Guillard f<sub>1</sub>. Já para o meio sintético ASP<sub>2</sub> o tempo de adaptação foi maior-48 horas para o clone U<sub>3</sub> e 72 horas para os clones C1 e U5.

Tomando-se por base os meios de cultura verifica-se que a 16°C para o meio ASP<sub>2</sub> tanto a inclinação das curvas de crescimento quanto o tempo de duração da fase exponencial foram menores do que para os outros meios de cultura. A 20°C as respostas dos três clones para os três meios de cultura foram muito semelhantes. A 24°C apareceram, de modo bem evidente, diferenças inclusive a manifestação de uma queda no crescimento do clone de Cananéia C1 após o 49 dia de fase exponencial, à semelhança de uma segunda fase "lag", após a qual o crescimento foi retomado (meio Guillard).

Os resultados das contagens de células para os três clones crescendo em meios de cultura e temperaturas distintas, médias e intervalos de confiança se encontram nas tabelas do anexo A1 a A9; na tabela A10, constam os coeficientes de variação dessas contagens.

De modo geral as contagens celulares foram regularmente variadas (coeficientes de variação  $\geq 10\% \leq 30\%$ ) e as maio-

res dispersões foram sempre observadas nos experimentos efetuados a 24°C para os três meios de cultura.

As médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e amplitude de variação das medidas de dispersão das contagens celulares para os três clones se encontram na tabela A 21.

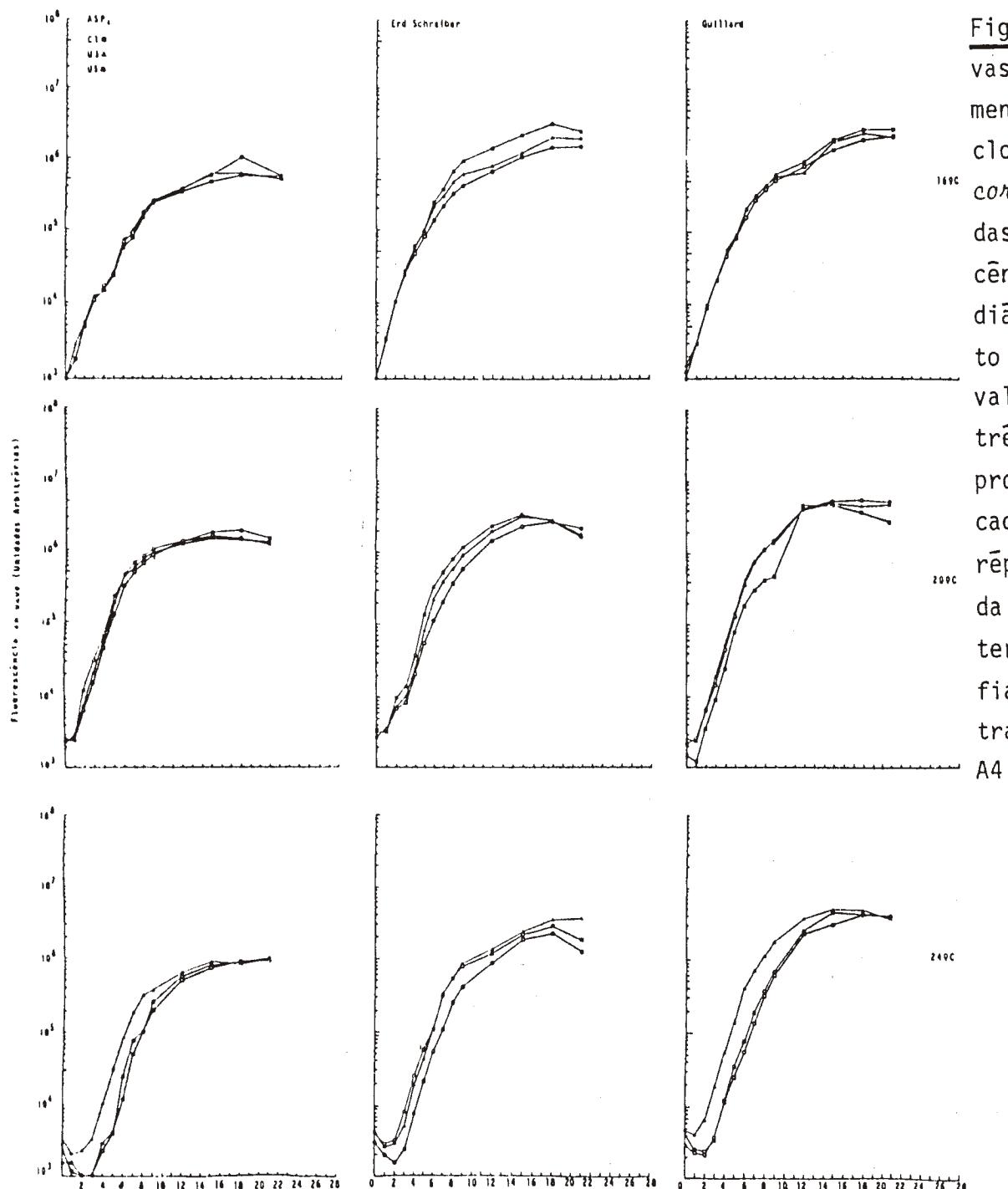
### 3.12 - Curvas de crescimento com base na fluorescência *in vivo*.

Para cada amostra utilizada na determinação do "standing -stock" por densidade celular foi medida a fluorescência *in vivo* que propiciou a construção das curvas de crescimento dos três clones como pode ser observado na figura 3.2 .

Essas curvas quando comparadas com aquelas da figura 3.1 mostram, praticamente em todos os casos, uma concordância no padrão de resposta. As diferenças mais marcantes estão nas respostas do clone U5 a 20°C e no clone C1 a 24°C ambos crescendo em meio Guillard. Nesse último, do 59 para o 69 dia de crescimento, nota-se uma ligeira redução na inclinação da curva ao passo que, no gráfico para densidade celular (figura 3.1) ocorreu uma queda durante 48 horas ( do 59 ao 79 dia).

Os resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para os três clones, médias e intervalos de confiança se encontram nas tabelas A11 a A19; na tabela A20 se encontram os coeficientes de variação dessas medidas.

Do mesmo modo que para as contagens celulares, as maiores dispersões nas medidas de fluorescência foram observadas para os experimentos efetuados a 24°C para os três meios de cultura. Para os ex-



**Figura 3.2 -Curvas de crescimento de três clones de *P. tricornutum* baseadas na fluorescência *in vivo* diária. Cada ponto representa o valor médio de três observações provenientes de cada uma das três réplicas para cada ensaio; os intervalos de confiança se encontram nos anexos A4 a A6.**

perimentos executados a 16°C e 20°C essas medidas foram regularmente variadas (CV  $\geq 10\% \leq 30\%$ ).

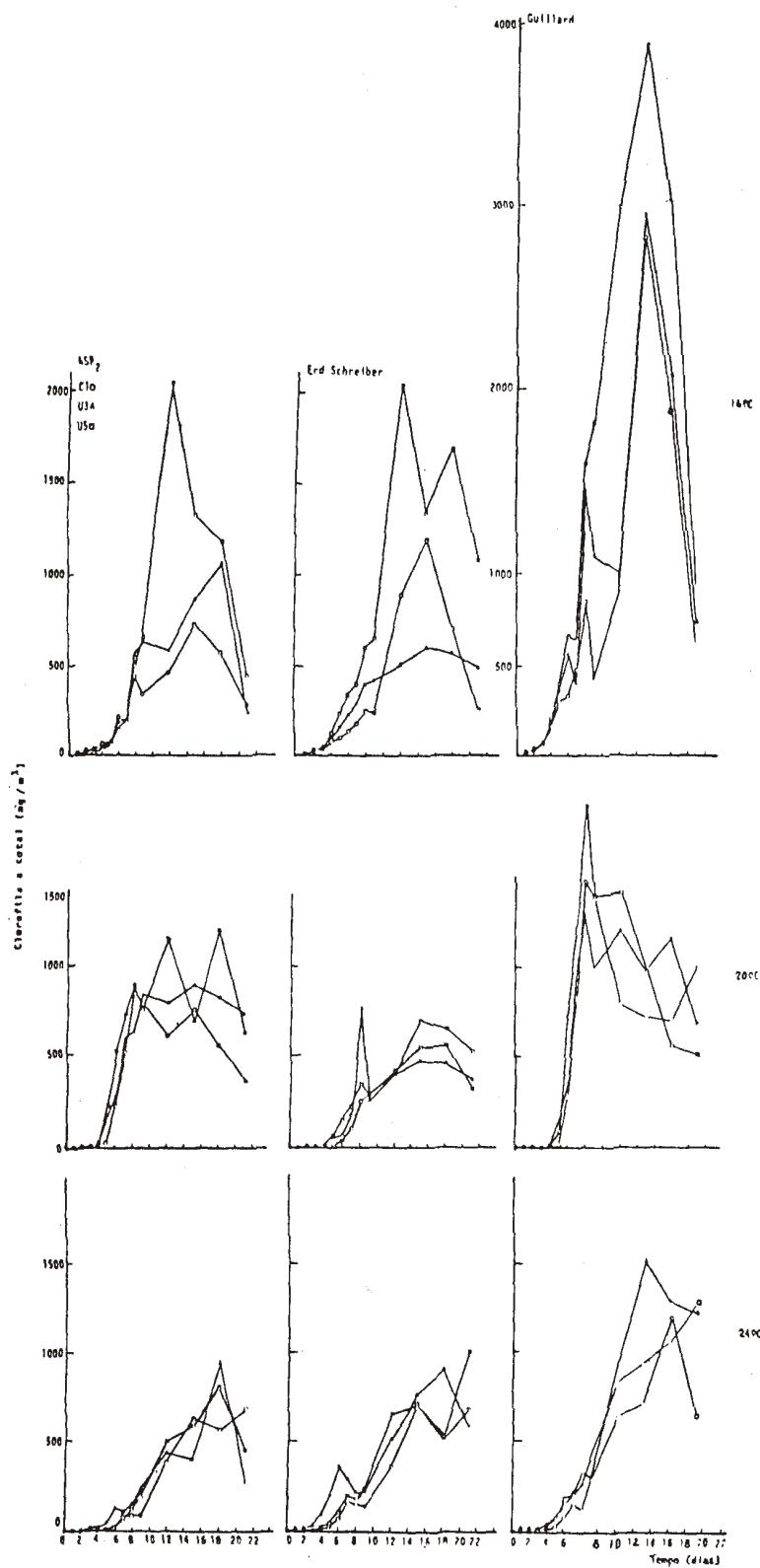
As médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e amplitude de variação das medidas de dispersão da fluorescência *in vivo* estão na tabela A22.

### 3.13 - Curvas de crescimento com base na clorofila -a total

A partir das amostras utilizadas pa-

ra a estimativa do "standing-stock" baseado na densidade celular e fluorescência *in vivo*, também foi medida a clorofila-a total dos três clones e construídas curvas de crescimento (figura 3.3).

A observação desses resultados mostra que, em todas temperaturas, foi no meio Guillard que os três clones atingiram os maiores valores de clorofila - a total. Esses valores decresceram na medida em que a temperatura na qual foram e-



**Figura 3.3**

Curvas de crescimento de três clones de *P. tricornutum* baseadas na clorofila - a total diária. Cada ponto representa uma única observação proveniente das alíquotas das três réplicas

executados os experimentos aumentou. Já para os meios  $ASP_2$  e Erd-Schreiber o comportamento dos três clones não obedeceu a uma redução uniforme.

A 16°C os três clones, aproximadamente 4 dias após a inoculação, exibiram um crescimento exponencial. A 20°C e 24°C, durante esse período de tempo, o crescimento foi praticamente inexistente caracterizando uma fase "lag" do mesmo modo que foi observada para as curvas de crescimento baseadas na densidade celular a 24°C (figura 3.1).

Quanto à inclinação das curvas de crescimento, as diferenças entre os três clones mais visíveis foram observadas a 16°C nos distintos meios de cultura e as menores inclinações, no conjunto de todos os experimentos, foram observadas a 24°C.

### 3.2 - Taxas específicas de crescimento

Na figura 3.4 são apresentadas as variações das taxas específicas de crescimento dos três clones ao longo do tempo.

Nota-se que, para cada temperatura, os três clones responderam mais ou menos segundo um mesmo padrão: a 16°C as taxas de crescimento sofreram uma redução progressiva até alcançar a fase estacionária de crescimento. Entretanto para o meio Erd-Schreiber as taxas de crescimento iniciais apresentaram valores mais altos e, para os clones C1 e U5, inclusive uma elevação até o 3º dia seguida de uma queda mais pronunciada do que para os meios  $ASP_2$  e Guillard.

A 20°C, as taxas de crescimento para os três clones inicialmente foram aumentando, mantendo-se entre os valores 1,0 a 2,0 praticamente durante toda a fase exponencial para, em seguida, sofrer uma redução acentuada. As maiores oscilações das taxas durante a fase exponencial foram observadas para o meio Erd-Schreiber.

A 24°C o padrão de resposta caracterizou-se por taxas iniciais negativas seguidas da elevação desses valores durante a fase exponencial e de uma redução progressiva durante a fase estacionária do crescimento.

As maiores diferenças nas taxas específicas de crescimento entre os três clones foram observadas a 16°C e 24°C.

### 3.3 - Taxas máximas de crescimento

Os valores referentes às taxas máximas de crescimento são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Taxas máximas de crescimento (divisões celulares.dia<sup>-1</sup>) para três clones de *P. tricornutum* em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Temperatura	16°C			20°C			24°C			
	Meio	ASP <sub>x</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>x</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>x</sub>	ERD-SC.	Guillard
CAN 1	Rép.									
	R1	1,07	1,55	1,12	1,39	1,08	1,36	0,71	1,13	1,04
	R2	1,07	1,60	1,18	1,36	1,05	1,33	0,43	1,02	1,01
	R3	1,01	1,60	1,18	1,35	0,97	1,38	0,85	0,83	1,03
	$\bar{x}$	1,05	1,58	1,16	1,37	1,03	1,36	0,66	0,99	1,03
	$\sigma$	0,03	0,03	0,03	0,02	0,06	0,03	0,21	0,15	0,02
UBA 3	$\text{CV}$	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	0,02	0,32	0,15	0,01
	R1	1,28	1,51	1,24	1,35	1,08	1,37	1,07	1,30	1,08
	R2	1,35	1,55	1,26	1,48	1,20	1,46	0,92	1,27	1,12
	R3	1,36	1,58	1,22	1,34	1,12	1,47	0,98	1,31	1,13
	$\bar{x}$	1,33	1,55	1,24	1,39	1,13	1,43	0,99	1,29	1,11
	$\sigma$	0,04	0,04	0,02	0,08	0,06	0,06	0,08	0,02	0,03
UBA 5	$\text{CV}$	0,03	0,02	0,02	0,06	0,05	0,04	0,08	0,02	0,02
	R1	0,97	2,02	1,16	1,41	1,23	1,40	0,91	0,93	1,00
	R2	1,06	2,04	1,14	1,50	1,24	1,39	0,61	1,09	1,08
	R3	1,03	2,05	1,18	1,49	1,21	1,47	0,77	1,08	1,15
	$\bar{x}$	1,02	2,04	1,16	1,47	1,23	1,42	0,76	1,03	1,08
	$\sigma$	0,05	0,02	0,02	0,05	0,02	0,04	0,15	0,09	0,08
	$\text{CV}$	0,04	0,01	0,02	0,03	0,01	0,03	0,20	0,08	0,07

Para o clone de Cananéia (C1) as taxas máximas de crescimento apresentaram

uma amplitude de variação entre 0,66 e 1,58, para o clone de Ubatuba (U3) entre 0,99 e 1,55 e para o clone de Ubatuba (U5) entre 0,76 e 2,04. Os resultados das regressões a partir das quais foram calculadas essas taxas máximas de crescimento se encontram na tabela (A. 23).

Igualmente para as curvas de crescimento baseadas na fluorescência *in vivo* diária foram calculadas as taxas máximas de crescimento como mostra a tabela 3.2.

As amplitudes de variação para essas taxas foram as seguintes: para o clone C1 de 1,12 a 1,66, para o clone U3 de 0,85 a 1,85 e para o clone U5 de 0,81 a 1,55.

Os resultados das regressões a par-

tir das quais foram calculadas as taxas máximas de crescimento são mostradas na

tabela A24.

Tomando-se as curvas de crescimento baseadas na variação diária da clorofila -a total as taxas máximas de crescimento delas derivadas apresentaram os seguintes resultados (tabela 3.3):

Tabela 3.2 Taxas máximas de crescimento com base na evolução da fluorescência *in vivo* de três clones de *P. tricornutum* em três meios de cultura e três temperaturas. R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Temperatura	16°C			20°C			24°C			
	Meio	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard
Clone	Rép.									
CAN 1	R1	1,03	1,66	1,18	1,40	1,31	1,40	1,43	1,30	1,42
	R2	1,37	1,66	1,43	1,43	1,35	1,48	1,13	1,14	1,50
	R3	0,95	1,66	1,37	1,45	1,36	1,44	1,72	1,14	1,45
	$\bar{x}$	1,12	1,66	1,33	1,43	1,34	1,44	1,43	1,19	1,46
	$\sigma$	0,22	0,00	0,13	0,03	0,03	0,04	0,30	0,09	0,04
	CV	0,20	0,00	0,10	0,02	0,02	0,03	0,21	0,08	0,03
UBA 3	R1	0,90	1,73	1,31	2,14	1,37	1,45	1,66	1,48	1,44
	R2	0,86	2,04	1,41	1,45	1,54	1,47	1,40	1,45	1,49
	R3	0,80	1,79	1,32	1,46	1,53	1,55	1,56	1,49	1,42
	$\bar{x}$	0,85	1,85	1,35	1,68	1,48	1,49	1,54	1,47	1,45
	$\sigma$	0,05	0,16	0,06	0,40	0,10	0,05	0,13	0,02	0,04
	CV	0,06	0,09	0,04	0,24	0,06	0,04	0,09	0,01	0,02
UBA 5	R1	0,83	1,56	1,45	1,48	1,53	1,51	1,39	1,43	1,31
	R2	0,84	1,46	1,45	1,45	1,58	1,39	1,56	1,21	1,32
	R3	0,77	1,48	1,45	1,44	1,54	1,46	1,57	1,47	1,27
	$\bar{x}$	0,81	1,50	1,45	1,46	1,55	1,45	1,51	1,37	1,30
	$\sigma$	0,04	0,05	0,00	0,02	0,03	0,06	0,10	0,14	0,03
	CV	0,05	0,04	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,10	0,02

Tabela 3.3 Taxas máximas de crescimento baseadas na variação diária da clorofila a total para três clones de *P. tricornutum* em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>).

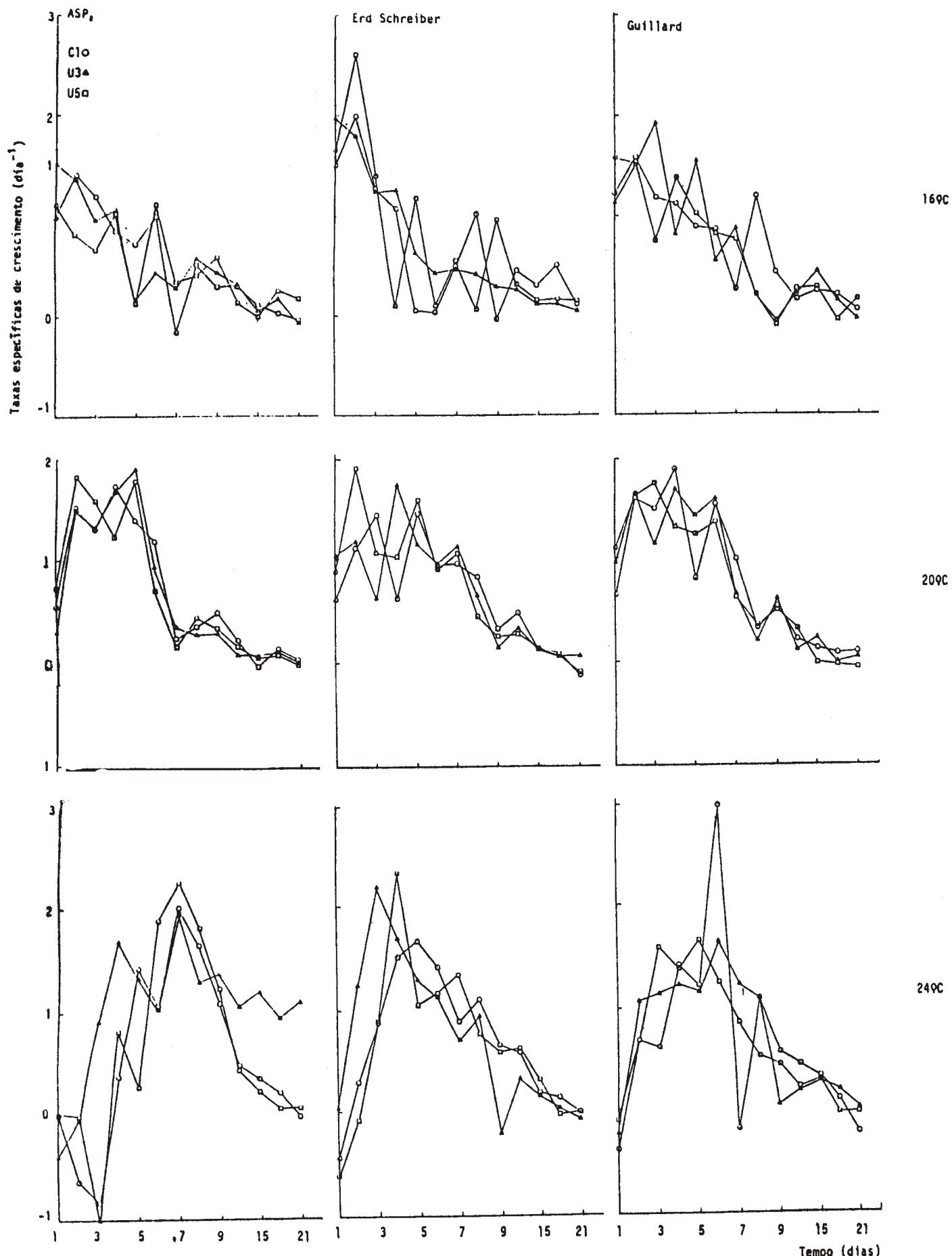
Temperatura	16°C			20°C			24°C			
	Meio	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>z</sub>	ERD-SC.	Guillard
Clone	Rép.									
C1	10,89	0,62	0,82	1,24	1,48	1,62	0,68	0,65	0,81	
R1	0,90	0,70	0,90	1,89	1,25	1,54	0,73	1,01	0,80	
U3	0,77	0,82	0,95	1,50	1,01	1,23	0,64	0,66	0,84	

As amplitudes de variação foram as seguintes: para o clone C1 de 0,62 a 1,62, para o clone U3 de 0,70 a 1,89 e para o clone U5 de 0,64 a 1,50. Os resultados das regressões a partir das quais foram calculadas essas taxas se encontram na tabela A25.

### 3.4 - Biomassas máximas alcançadas

A tabela 3.4 apresenta os valores máximos de biomassa alcançados por cada clone em todos os experimentos comparativos.

O número de células/ml máximo variou de  $3,71 \times 10^6$  a  $1,96 \times 10^7$  para o clone C1, de  $2,57 \times 10^6$  a  $2,04 \times 10^7$  para o clone U3 e de  $4,17 \times 10^6$  a  $1,91 \times 10^7$  para o clone U5 (médias de três réplicas) Esses valores foram colocados em histogramas como mostra a figura 3.5.



**Figura 3.4** - Taxas específicas de crescimento de três clones de *P. tricornutum*. Cada ponto resulta do valor médio de três observações calculadas seguido  $\log_2 (N_f / N_0)$ , onde  $N_i$  representa o número de células 24 horas após o número de células anterior  $N_0$ , e  $T$ , o tempo em dias.

No)/ $t$ , onde  $N_i$  representa o número de células 24 horas após o número de células anterior  $N_0$ , e  $T$ , o tempo em dias.

Tabela 3.4 Biomassas máximas alcançadas ( $\log_{10}$  do número de células/ml) para três clones de *P. tricornutum* em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Temperatura	16°C			20°C			24°C			
	Meio	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard
Clone	Rép.									
CAN 1	R1	6,63	7,18	7,18	6,92	7,04	7,30	6,65	7,31	7,00
	R2	6,53	7,03	7,28	6,78	7,00	7,22	6,62	7,14	7,07
	R3	6,56	7,08	7,28	6,92	7,03	7,34	6,67	7,20	7,20
	$\bar{x}$	6,57	7,10	7,25	6,87	7,02	7,29	6,65	7,22	7,09
	$\sigma$	0,05	0,08	0,06	0,08	0,02	0,06	0,03	0,09	0,10
	CV	0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,01	0,01
UBA 3	R1	6,84	6,97	7,26	6,92	7,01	7,26	6,43	7,08	7,17
	R2	6,74	7,03	7,30	6,93	7,04	7,20	6,37	7,06	7,10
	R3	6,72	7,03	7,36	6,77	7,05	7,26	6,43	7,13	7,15
	$\bar{x}$	6,77	7,01	7,31	6,87	7,03	7,24	6,41	7,09	7,14
	$\sigma$	0,06	0,03	0,05	0,09	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04
	CV	0,01	< 0,01	0,01	0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01
UBA 5	R1	6,68	7,09	7,15	6,95	7,11	7,00	6,65	7,33	6,86
	R2	6,58	7,10	7,13	6,94	7,07	7,28	6,63	7,30	7,25
	R3	6,60	7,12	7,15	6,90	6,97	7,27	6,63	7,20	6,96
	$\bar{x}$	6,62	7,10	7,14	6,93	7,05	7,18	6,64	7,28	7,02
	$\sigma$	0,05	0,02	0,01	0,03	0,07	0,16	0,01	0,07	0,20
	CV	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,02	< 0,01	0,01	0,03

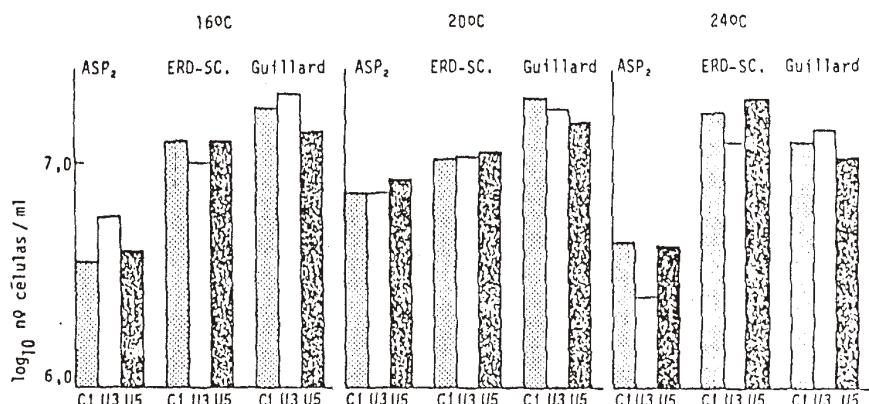


Figura 3.5 - Biomassas máximas alcançadas de três clones de *P. tricornutum*. Cada barra dos histogramas representa o valor médio de três observações.

Pode-se observar na figura 3.5 que a 16°C e 20°C os três clones apresentaram biomassas máximas que aumentam progressivamente do meio sintético ASP<sub>2</sub> para os meios enriquecidos Erd-Schreiber e Guillard. Contudo, a 24°C os valores máximos foram obtidos para o meio Erd-Schreiber exceto para o clone U3 onde a biomassa máxima foi ligeiramente maior no meio Guillard. A 20°C as respostas dos três clones apresentaram, nos distintos meios

de cultura, as menores diferenças enquanto que a 16°C e 24°C essas diferenças são bastante notáveis.

### 3.5 - Clorofila-a total média por célula

A figura 3.6 mostra a variação da clorofila - a total média por célula ao longo do tempo.

Os três clones cresceram em meio

ASP<sub>2</sub> a 16°C apresentaram pequena variação e uma tendência a um aumento da clorofila por célula durante a fase exponencial até o início da fase estacionária. Daí em diante essa quantidade permaneceu mais ou menos constante e, no final, tendeu a diminuir. Comparando-se estes resultados com o gráfico das taxas específicas de crescimento (figura 3.4) verifica-se que, nesse mesmo período, ocorreu uma progressiva queda destas taxas. Nos meios enriquecidos a clorofila por célula mostrou uma tendência a uma pequena redução inicial seguida de sua manutenção mais ou menos constante para, finalmente, sofrer uma redução atingindo valores similares

àquelas para o meio ASP<sub>2</sub>. Ao mesmo tempo as taxas específicas de crescimento (figura 3.4) apresentaram um comportamento inversamente proporcional.

Examinando-se os resultados a 20°C nota-se que nos três meios a quantidade de clorofila por célula tendeu a aumentar nas primeiras 48 horas, manteve-se mais ou menos constante durante a fase exponencial e, finalmente, no início da fase estacionária, começou a declinar atingindo valores finais aproximadamente iguais àqueles observados a 16°C. A análise das taxas de crescimento (figura 3.4) durante o mesmo período revela uma concordância idêntica àquela observada a 16°C.

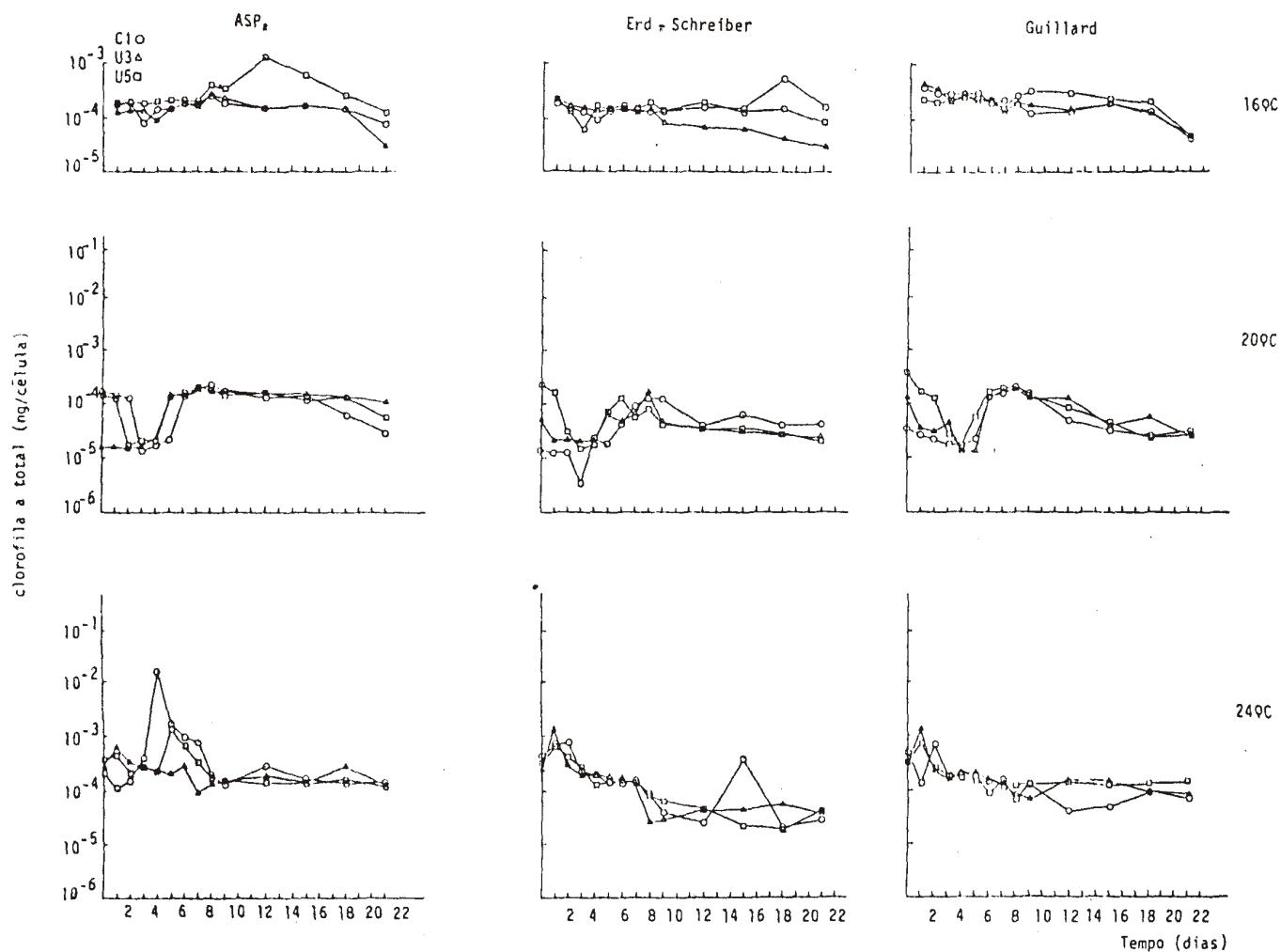


Figura 3.6 - Clorofila -a total média por célula de três clones de *P. tricornutum*. Cada ponto expressa o quociente en-

tre a quantidade de clorofila-a total observada em cada dia e a média de três observações da densidade celular neste dia.

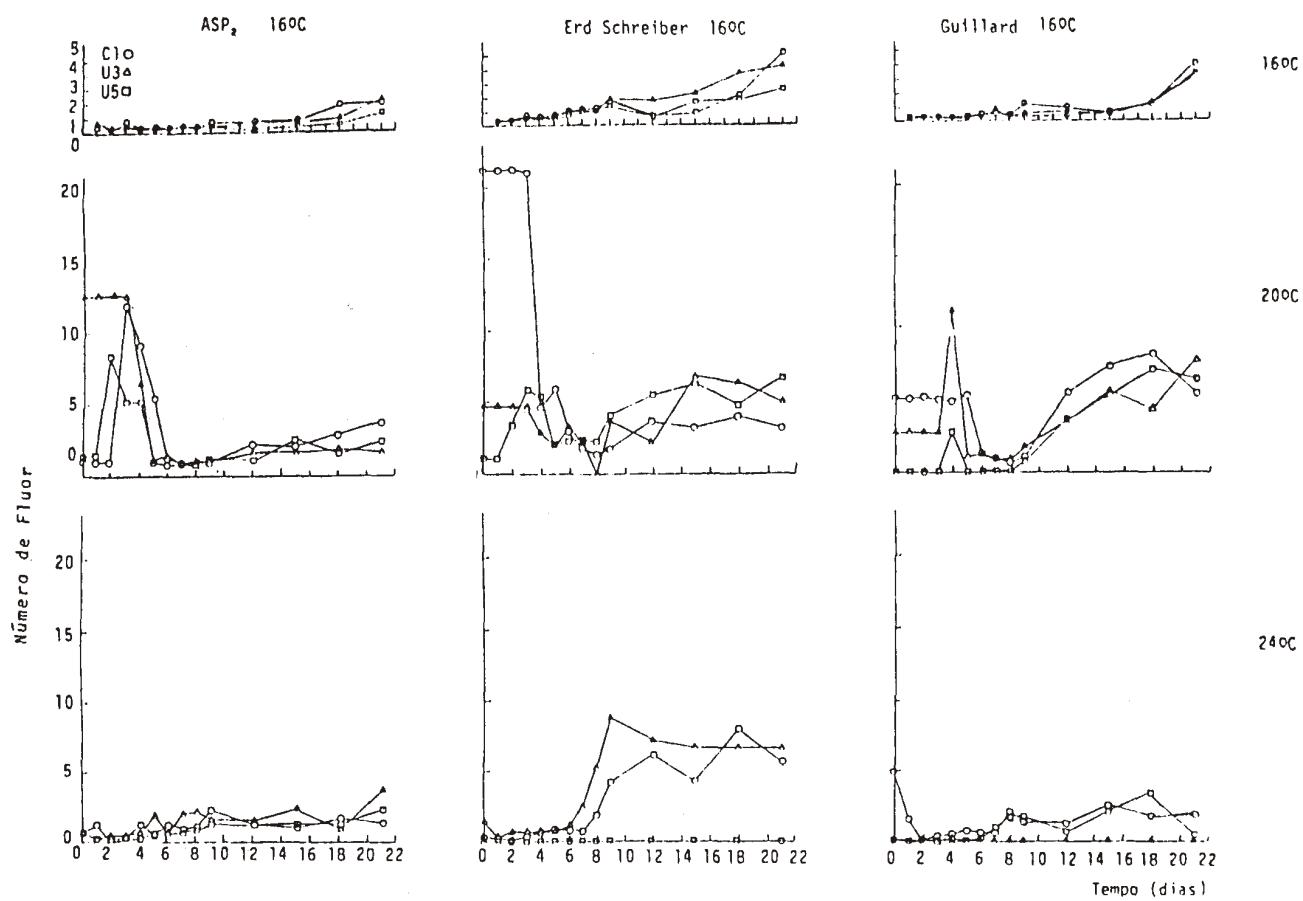


Figura 3.7 - Número de fluorescência de três clones de *P. tricornutum*. Cada ponto resulta da média de três observações do quociente entre o valor da fluores-

cência *in vivo* observada em unidades arbitrárias e a quantidade de clorofila -  $a$  total em unidade de  $\text{mg/m}^3$ .

Tabela 3.5 Produtividade primária ( $\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{mg clorofila a}^{-1}$ ) para três clones de *P. tricornutum* em fase exponencial, em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Temperatura	16°C			20°C			24°C			
	Meio	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard
Rép.										
CAN 1	R1	3,60	0,91	1,50	9,92	7,27	12,74	4,04	1,29	9,31
	R2	3,57	0,86	1,44	8,86	6,44	14,43	3,83	2,01	9,59
	$\bar{x}$	3,59	0,89	1,47	9,39	6,86	13,59	3,94	1,65	9,45
	$\sigma$	0,02	0,04	0,04	0,75	0,59	1,20	0,15	0,51	0,20
UBA 3	$\text{CV}$	0,01	0,04	0,03	0,08	0,09	0,09	0,04	0,31	0,02
	R1	2,83	0,64	1,73	7,39	4,61	14,12	1,94	0,90	5,24
	R2	2,74	0,55	2,09	7,19	4,33	16,96	1,84	0,94	4,63
	$\bar{x}$	2,79	0,60	1,91	7,29	4,47	15,54	1,89	0,92	4,94
UBA 5	$\sigma$	0,06	0,06	0,25	0,14	0,20	2,01	0,07	0,03	0,43
	$\text{CV}$	0,02	0,11	0,13	0,02	0,04	0,13	0,04	0,03	0,09
	R1	3,16	0,75	1,65	5,56	6,23	21,11	4,41	0,96	4,25
	R2	3,13	0,64	1,68	6,23	5,93	17,01	4,29	1,31	4,17
	$\bar{x}$	3,15	0,70	1,67	5,90	6,08	19,06	4,35	1,14	4,21
	$\sigma$	0,02	0,08	0,02	0,47	0,21	2,90	0,08	0,25	0,06
	$\text{CV}$	0,01	0,11	0,01	0,08	0,03	0,15	0,02	0,22	0,01

A 24°C pode-se constatar que nas primeiras 24 horas ocorreu, de modo geral, um aumento da quantidade de clorofila por célula seguido de uma redução e manutenção constante durante a fase estacionária de crescimento. No meio  $ASP_2$  foram observadas as maiores oscilações entre os três clones. As quantidades finais foram aproximadamente as mesmas com exceção do meio Erd-Schreiber para o qual foram ligeiramente mais baixas. A comparação desse comportamento com as taxas específicas de crescimento, do mesmo modo que para 16°C e 20°C mostra a existência de uma proporcionalidade inversa entre as duas variáveis.

### 3.6 - Número de fluorescência

Na figura 3.7 são mostradas as variações diárias do número de fluorescência para os três clones em distintas temperaturas e meios de cultura.

As populações dos três clones crescendo a 16°C mostraram durante a fase exponencial valores do número de fluorescência aproximadamente constantes e baixos (entre 0,2 e 1,0). Esses valores começam a se elevar gradativamente no início da fase estacionária atingindo seus máximos ao final dos experimentos.

A 20°C, no início da fase exponencial de crescimento, o número de fluorescência apresentou as maiores variações entre os três clones. Aproximadamente no 5º dia ocorreu uma redução para todos os três clones mantendo-se assim até o final da fase exponencial para então, no início da fase estacionária ter início uma elevação progressiva atingindo, como a 16°C, valores máximos ao final dos experimentos.

Os três clones apresentaram a 24°C padrão de comportamento do número de fluorescência semelhante àquele observado a 16°C excetuando-se para o meio Erd-Schreiber onde a elevação dos valores foi muito mais acentuada e, igualmente, a variação entre eles.

Comparando-se esses resultados com aqueles do gráfico (3.6) verifica-se que, a um aumento na quantidade de clorofila por célula corresponde uma redução do número de fluorescência o que pode ser constatado durante a fase exponencial. Na medida em que prosseguem os experimentos e tem início a fase estacionária, a uma redução da quantidade de clorofila por célula observa-se um aumento do número de fluorescência como consequência da progressiva redução dos nutrientes disponíveis no meio e o acúmulo dos excretas celulares.

### 3.7 - Produtividade primária

A tabela 3.5 apresenta os resultados obtidos da produção primária considerada em termos de clorofila-a durante a fase exponencial de crescimento.

A produtividade primária para o clone de Cananéia (C1) variou de 0,89 a 13,59 mg C.  $h^{-1} \cdot m^{-3}$ .mg clorofila a $^{-1}$ , para o clone de Ubatuba (U3) variou de 0,60 a 15,54 mg C.  $h^{-1} \cdot m^{-3}$ .mg clorofila a $^{-1}$  e para o clone de Ubatuba (U5) variou de 0,70 a 19,06 mg C.  $h^{-1} \cdot m^{-3}$ .mg clorofila a $^{-1}$  (médias de duas réplicas).

A tabela 3.6 apresenta os resultados da produção primária considerada por  $10^4$  células durante a fase exponencial de crescimento.

Para o clone de Cananéia (C1) a pro-

Tabela 3.6 Produtividade primária ( $\text{mg C} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot 10^{-4}$  células), para três clones de *P. tricoccum* em fase exponencial, para três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial 3<sup>1</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Temperatura	16°C				20°C				24°C			
	Meio	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard		
Clone	Rép.	R1	26,73	3,18	10,62	15,23	6,63	42,21	16,71	9,89	72,33	
	CAN 1	R2	26,50	3,01	14,57	13,61	5,89	47,79	15,83	15,43	74,47	
		$\bar{x}$	26,62	3,10	12,60	14,42	6,26	45,00	16,27	12,66	73,40	
		$\sigma$	0,16	0,12	2,79	1,15	0,53	3,95	0,62	3,92	1,52	
		CV	0,01	0,04	0,22	0,08	0,08	0,09	0,04	0,31	0,02	
UBA 3	R1	23,38	3,27	16,68	17,65	7,32	42,09	12,95	6,54	86,95		
	R2	22,62	2,81	20,13	17,18	6,87	50,54	12,24	6,82	76,76		
	$\bar{x}$	23,00	3,04	18,41	17,42	7,10	46,32	12,60	6,68	81,86		
	$\sigma$	0,54	0,33	2,44	0,33	0,32	5,98	0,50	0,20	7,21		
	CV	0,02	0,11	0,13	0,02	0,05	0,13	0,04	0,03	0,09		
UBA 5	R1	24,44	3,63	7,53	10,37	6,85	45,68	24,93	6,75	33,88		
	R2	24,22	3,13	7,69	11,62	6,52	36,81	24,11	9,25	33,18		
	$\bar{x}$	24,33	3,38	7,61	11,00	6,69	41,25	24,52	8,00	33,53		
	$\sigma$	0,16	0,35	0,11	0,88	0,23	6,27	0,58	1,77	0,49		
	CV	0,01	0,10	0,01	0,08	0,03	0,15	0,02	0,22	0,01		

Produtividade primária variou de 3,10 a 73,40 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células, para o clone de Cananéia (C1) variou de 3,10 a 73,40 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células, para o clone de Ubatuba (U3) variou de 3,04 a 81,86 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células e para o clone de Ubatuba (U5) variou de 3,38 a 41,25 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células (médias de duas réplicas).

Esses resultados foram colocados em histogramas para comparação das duas estimativas de produtividade primária bem como das respostas dos três clones nas distintas condições experimentais (figura 3.8).

Os três clones apresentaram maiores taxas de assimilação do carbono, tanto em termos de clorofila-a como em termos de células, no meio ASP<sub>2</sub> a 16°C e no meio Guillard a 20°C e 24°C. Essas taxas de assimilação foram menores, em todas as temperaturas, no meio Erd-Schreiber. As maiores diferenças entre os três clones foram observadas a 20°C e 24°C para as taxas baseadas na clorofila-a e a 24°C

para as taxas baseadas em 10<sup>4</sup> células.

A tabela 3.7 apresenta os resultados da produção primária considerada em termos de clorofila-a durante a fase estacionária de crescimento.

Para o clone de Cananéia (C1) a produtividade primária durante a fase estacionária apresentou uma amplitude de variação de 0,65 a 5,47 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.mg clorofila-a<sup>-1</sup>, para o clone de Ubatuba (U3) de 0,56 a 3,62 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.mg clorofila-a<sup>-1</sup> e para o clone de Ubatuba (U5) de 0,56 a 3,60 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.mg clorofila-a<sup>-1</sup> (médias de duas réplicas).

Na tabela 3.8 constam os resultados da produtividade primária durante a fase estacionária considerada por 10<sup>4</sup> células.

Para o clone de Cananéia (C1) a produtividade variou de 0,45 a 12,53 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células, para o clone de Ubatuba (U3) variou de 0,18 a 11,07 mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>.10<sup>-4</sup> células e para o clone de

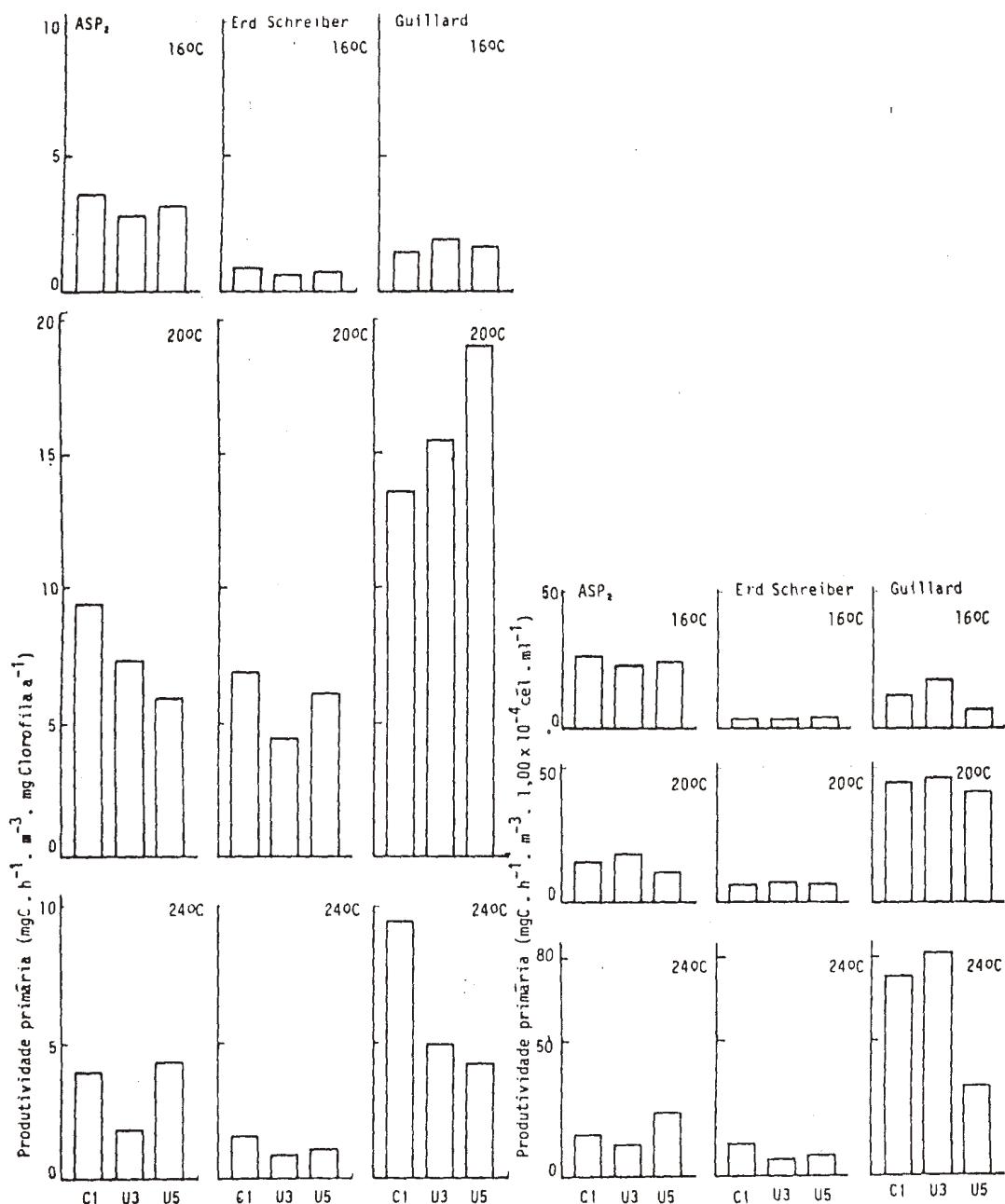


Figura 3.8 - Produtividade primária de três clones de *P. tricornutum* durante a fase exponencial de crescimento expressa em  $\text{mg C.h}^{-1}.\text{m}^{-3}.\text{mg clorofila-a}^{-1}$  (à

esquerda) e  $\text{mg C.h}^{-1}.\text{m}^{-3}.10^{-4}$  células (à direita). Cada barra dos histogramas representa a média de duas observações.

Ubatuba (U5) variou de 0,26 a 11,41  $\text{mg C.h}^{-1}.\text{m}^{-3}.10^{-4}$  células (médias de duas réplicas).

Na figura 3.9 estão representados em histogramas os resultados constantes das duas tabelas anteriores para comparação das duas estimativas de produtivi-

dade primária.

As taxas de assimilação em termos de clorofila-a apresentaram maior variação entre os clones a 24°C e em termos de  $10^4$  células a 16°C a 24°C.

Os valores das medidas de pH dia-

Tabela 3.7 Produtividade primária ( $\text{mg C} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $\text{mg clorofila a}^{-1}$ ) para três clones de *P. tricornutum* em fase estacionária, em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Meio	16°C			20°C			24°C		
	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard
Clone		Rép.							
CAN 1	R1	2,16	1,62	2,19	4,17	0,56	1,06	1,54	1,05
	R2	2,18	1,64	2,33	3,24	0,73	1,14	1,64	0,98
	$\bar{x}$	2,17	1,63	2,26	3,71	0,65	1,10	1,59	1,02
	$\sigma$	0,01	0,01	0,10	0,66	0,12	0,06	0,07	0,05
	CV	0,01	0,01	0,04	0,18	0,18	0,05	0,04	0,05
									0,01
UBA 3	R1	2,60	1,41	2,63	3,58	0,84	1,09	3,05	0,52
	R2	2,85	1,29	2,62	3,65	0,80	1,04	3,05	0,59
	$\bar{x}$	2,73	1,35	2,63	3,62	0,82	1,07	3,05	0,56
	$\sigma$	0,18	0,08	0,01	0,05	0,03	0,04	0,00	0,05
	CV	0,06	0,06	0,003	0,01	0,03	0,03	0,00	0,09
									0,02
UBA 5	R1	2,51	0,83	1,67	3,40	1,05	0,61	2,23	0,62
	R2	2,43	0,80	1,87	3,80	1,56	0,51	2,25	0,83
	$\bar{x}$	2,47	0,82	1,77	3,60	1,31	0,56	2,24	0,73
	$\sigma$	0,06	0,02	0,14	0,28	0,36	0,07	0,01	0,15
	CV	0,02	0,03	0,08	0,08	0,28	0,12	0,01	0,20
									0,02

Tabela 3.8 Produtividade primária ( $\text{mg C} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-4} \text{ células}$ ) para três clones de *P. tricornutum* em fase estacionária, em três meios de cultura sob efeito de três temperaturas (experimento trifatorial: 3<sup>3</sup>). R: réplica;  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Meio	16°C			20°C			24°C		
	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard	ASP <sub>2</sub>	ERD-SC.	Guillard
Clone		Rép.							
CAN 1	R1	5,35	1,54	12,14	9,42	0,62	3,21	1,03	0,46
	R2	5,39	1,55	12,91	7,31	0,80	3,46	1,10	0,43
	$\bar{x}$	5,37	1,55	12,53	8,37	0,71	3,34	1,07	0,45
	$\sigma$	0,03	0,01	0,54	1,49	0,13	0,18	0,05	0,02
	CV	0,01	0,01	0,04	0,18	0,18	0,05	0,05	0,01
UBA 3	R1	8,79	2,85	11,09	7,44	0,71	2,95	1,11	0,17
	R2	9,62	2,60	11,05	7,60	0,68	2,83	1,11	0,19
	$\bar{x}$	9,21	2,73	11,07	7,52	0,70	2,89	1,11	0,18
	$\sigma$	0,59	0,18	0,03	0,11	0,02	0,08	0,00	0,01
	CV	0,06	0,07	< 0,01	0,01	0,03	0,03	0,00	0,06
									0,02
UBA 5	R1	11,60	1,79	6,84	6,15	0,58	2,99	0,72	0,22
	R2	11,21	1,73	7,69	6,89	0,86	2,50	0,73	0,30
	$\bar{x}$	11,41	1,76	7,27	6,52	0,72	2,75	0,73	0,26
	$\sigma$	0,28	0,04	0,60	0,52	0,20	0,35	0,01	0,06
	CV	0,02	0,02	0,08	0,08	0,28	0,13	0,01	0,23
									0,02

rias para todos os experimentos comparativos entre os três clones se encontram na tabela A26.

Para o meio ASP<sub>2</sub> nas três temperaturas a amplitude de variação do pH foi de 7,5 a 8,2 para a fase exponencial de crescimento.

Considerando-se a fase estacionária o pH atingiu o valor 8,6 somente a 16°C. Em relação ao meio Erd-Schreiber, para as três temperaturas a amplitude de variação foi de 7,8 a 8,9 durante a fase exponencial de crescimento. Na fase estacionária valores de 9,0 a 9,4 só foram observados a 16°C.

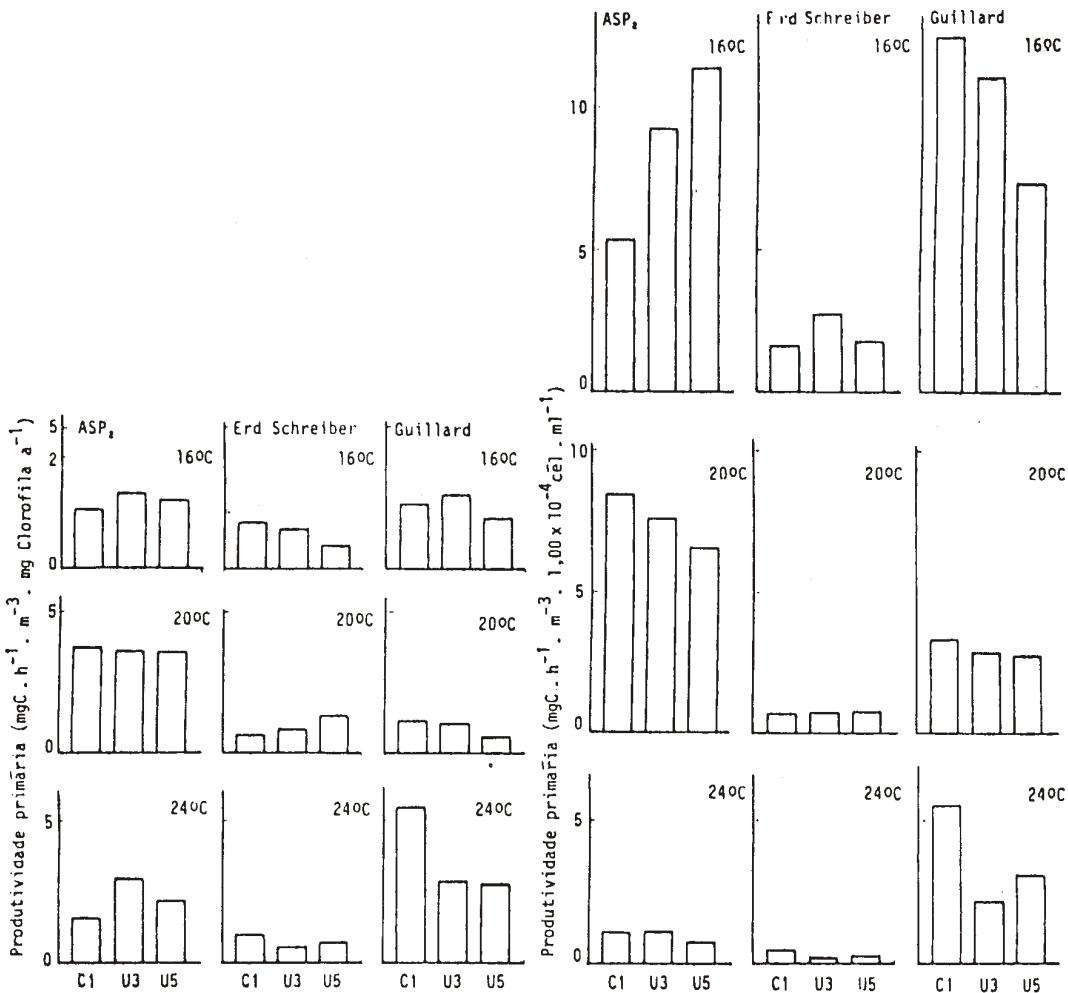


Figura 3.9 - Produtividade primária de três clones de *P. tricornutum* durante a fase estacionária de crescimento expressa em  $\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{mg clorofila-a}^{-1}$

( à esquerda) e  $\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot 10^{-4}$  células ( à direita). Cada barra dos histogramas representa a média de duas observações.

O meio Guillard apresentou, para as três temperaturas, uma amplitude de variação de 7,8 a 9,3 durante a fase exponencial tendo alcançado valores até 10,2 durante a fase estacionária somente a 16°C.

### 3.8 - Aspectos dos três clones de *P. tricornutum* ao microscópio óptico.

Todos os três clones utilizados nesses experimentos apresentaram sempre, ao longo de todos os tratamentos, célu-

las fusidormes como descreve Wilson(1946). Entretanto, em três frascos contendo culturas-estoque de cada um deles acidentalmente deixados numa incubadora a 16°C durante cerca de 90 dias sob uma iluminação de 800 lux, foram observados praticamente todos os morfótipos descritos por Wilson (*op.cit.*) e inclusive a formação de cadeias como descreve Coughlan (1962) e Borowitzka *et al.*(1977)

A figura 3.10 A a J mostra uma série de microfotografias feitas com mi -

croscópio de contraste de fase dos diversos morfótipos observados.

O comportamento dos três clones para essas culturas mantidas casualmente estáticas, sob baixa intensidade luminescente e à 16°C, foi bastante distinto. Assim, a formação de cadeias e a presença de morfótipos trirradiados e cruciformes só foi observada no clone de Ubatuba (U3). O clone de Cananéia (C1) se apresentou somente com os morfótipos fusiformes e ovóides. Em sua grande maioria os morfótipos fusiformes formaram grumos de densidades celulares variáveis, porém quase sempre com as células unindo-se pelas extremidades de um dos braços assumindo o aspecto de uma estrela (figura 3.10A)

A

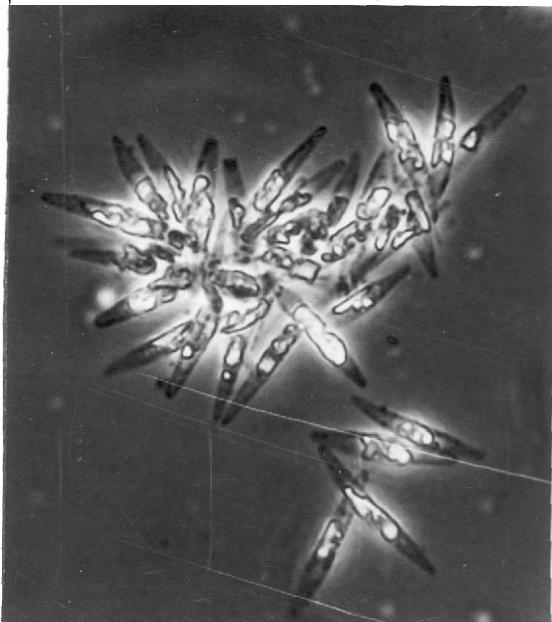
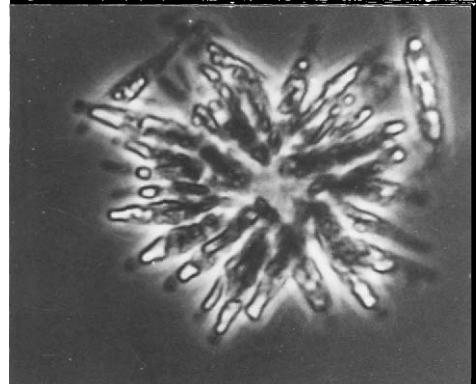


Figura 3.10A - Microfotografias de cé-

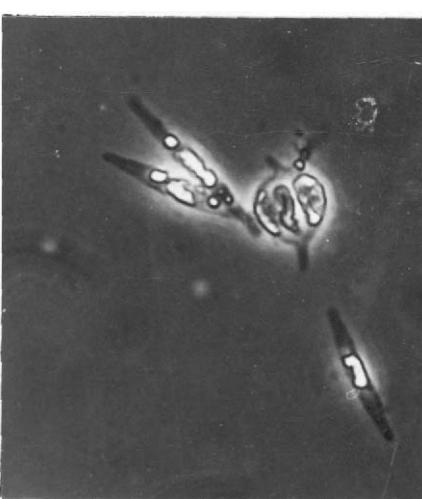
A



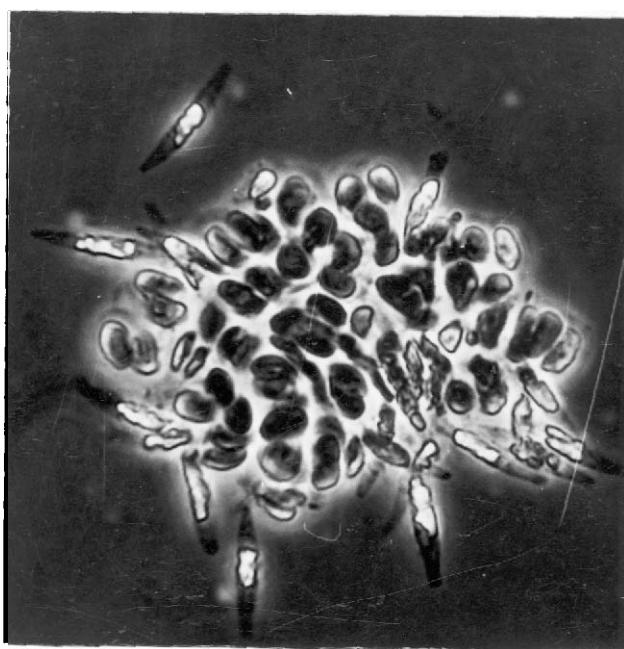
lulas do clone de Cananéia (C1) formando grumos ("clusters") •

Justamente no início dos experimentos com esse clone as células presentes nas culturas-mãe mantidas no "Banco" de Algas do IOUSP se apresentavam sob esta forma. Sucessivas lavagens e homogeneização dessas culturas permitiram a preparação de inóculos com células fusiformes perfeitamente isoladas e homogeneousemente distribuídas nos meios de cultura.

A figura 3.10B mostra uma forma extremamente rara nas amostras analisadas

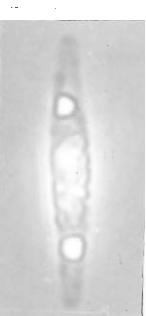


B



C

D Figura 3.10B,C e D - Morfótipos do clone de Cananéia(C1): morfótipo fusiforme possivelmente dando origem a formas ovóides(B); grumo de morfótipos ovóides(C); morfótipo fusiforme mostrando dois glóbulos refringentes típico das formas envelhecidas (D) •



desse clone que, possivelmente, corresponde a um estágio na formação de morfótipos ovóides a partir de um morfótipo fusiforme normal como descreve Wilson (*op.cit.*). Na figura 3.10C são mostrados morfótipos ovóides formando um grumo de células ladeado por alguns morfótipos fusiformes e na figura 3.10D aparece um morfótipo fusiforme apresentando dois glóbulos refringentes ao lado do cromatóforo.

Quanto ao clone de Ubatuba (U3) os morfótipos trirradiados observados se assemelham aos morfótipos fusiformes apresentando no entanto os braços com extensões ligeiramente menores (figura 3.10E).

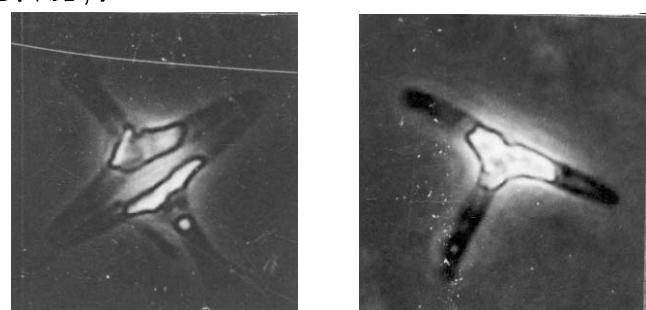


Figura 3.10E - Morfótipos trirradiados do clone de Ubatuba(U3): à esquerda duas formas trirradiadas provavelmente após a citocinese, a direita uma forma com um dos braços alongados, à esquerda uma forma com braços de extensões iguais formando ângulos aproximadamente iguais.

Aparentemente esses morfótipos exibiam apenas um cromatóforo. Em todas as subamostras realizadas para análise ao microscópio com contraste de fase puderam ser encontrados alguns desses morfótipos.

Os morfótipos cruciformes ao contrário eram extremamente raros só tendo sido observados três em todas as subamostras (cerca de 20 subamostras). Um deles se apresentava com forma bastante regular e os outros dois com dois braços bem mais curtos e irregulares exatamente como descreve Wilson (*op. cit.*) (figura 3.10F).

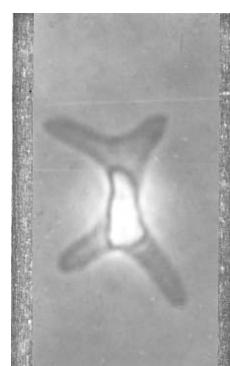
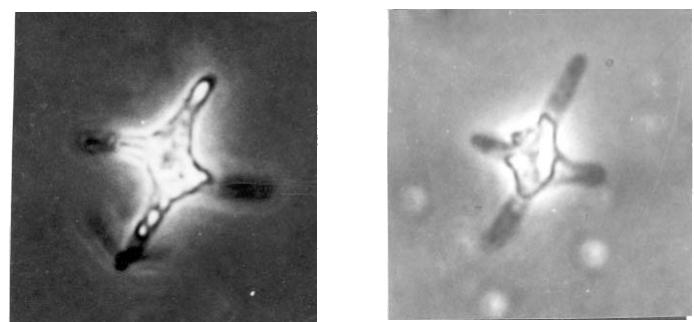


Figura 3.10F - Três morfótipos cruciformes do clone de Ubatuba(U3): à esquerda uma forma com braços de extensões similares, a direita e a esquerda formas com dois braços mais curtos e irregulares.

Durante todas as contagens de células referentes aos experimentos com os três clones raramente eram observados morfótipos trirradiados e sempre no clone de Ubatuba(U3).

As formas ovóides observadas nos três clones não apresentavam braços, sua extensão era bem menor do que a dos fusiformes e, characteristicamente, apresentavam todo seu espaço interno ocupado pelo cromatóforo. A figura 3.10G mostra alguns morfótipos ovóides formando um pequeno grumo observado em amostras do clone de Ubatuba (U3).

Em relação à formação de cadeias (figura 3.10H), também só observadas

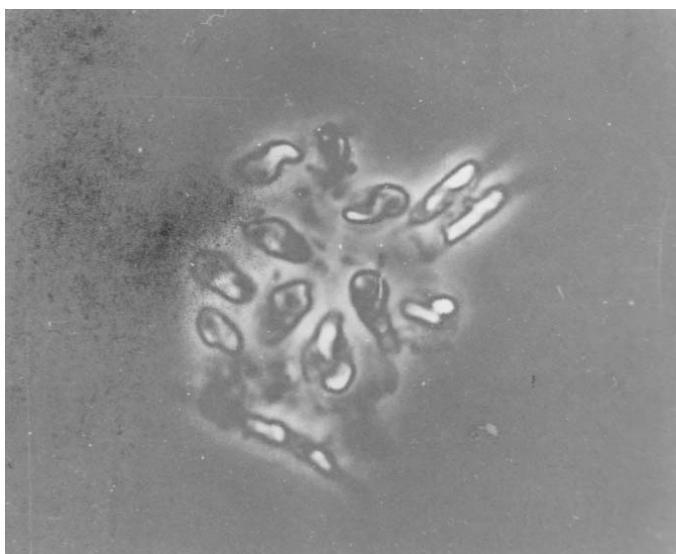


Figura 3.10G - Morfótipos ovóides do clone de Ubatuba (U3) formando um pequeno grumo.

no clone de Ubatuba(U3), lavagens sucessivas visando verificar a manutenção ou não dessas formas, deram como resultado um aumento no número de cadeias mais curtas ao lado dos morfótipos fusiformes normais já existentes. As cadeias que antes das lavagens se apresentavam constituídas por 8 até mais de 300 células, após as lavagens apresentaram predominância de cadeias com 50 a 60 células. Resultados muito similares foram obtidos por Borowitzka *et al* (1977).

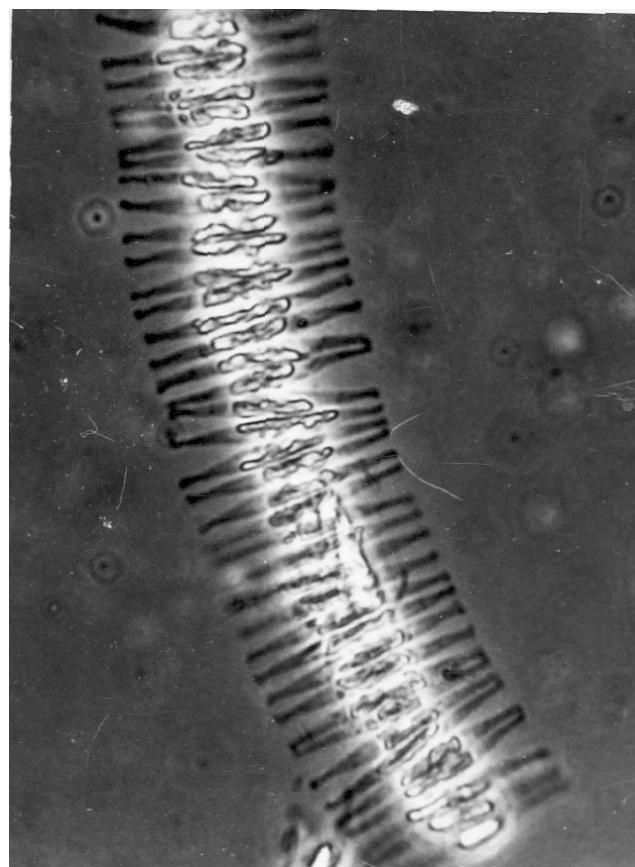
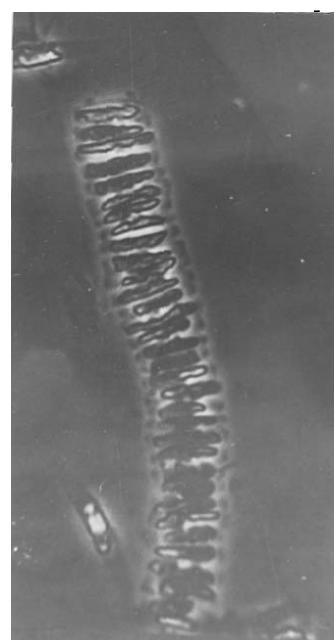
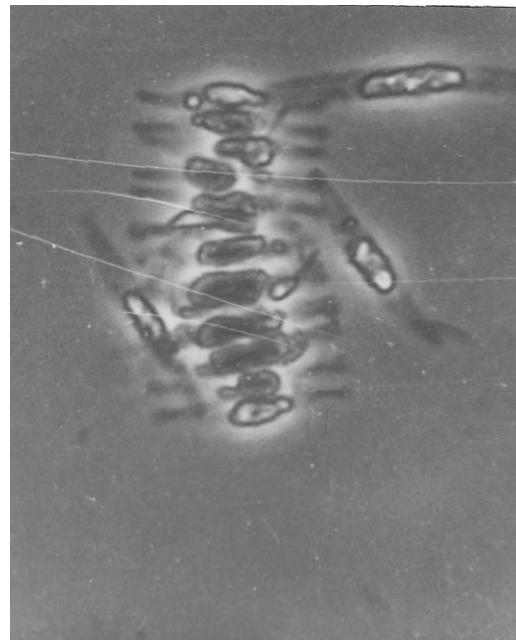
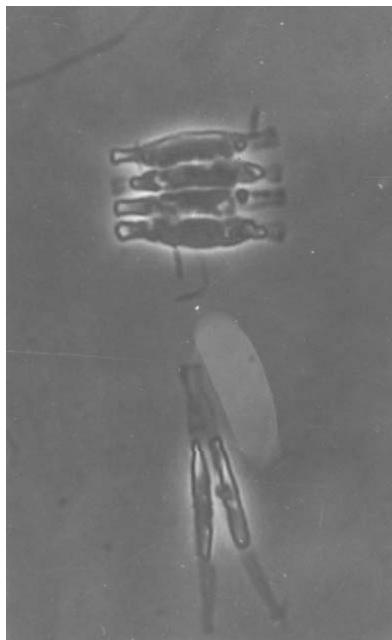


Figura 3.10H - Formação de cadeias de morfótipos fusiformes no clone de Ubatuba (U3): à direita acima parte de uma cadeia que apresentava mais de 300 células, embaixo à esquerda e no centro uma cadeia curta com quatro células cujas extremidades dos braços se encontram encurtadas e dilatadas, à direita uma cadeia com células cujos braços foram extremamente encurtados.



Aparentemente essas cadeias eram formadas por células fusiformes cuja extensão e forma dos cromatóforos se apresentava bastante variada. Foram observadas também cadeias curtas, com quatro células, cujas extremidades dos braços se apresentavam encurtadas e dilatadas, e outras nas quais aparentemente os cromatóforos assumiam um aspecto muito semelhante àquele observado para os morfótipos ovóides.

A figura 3.10I apresenta os morfótipos fusiformes normais observados nas amostras do clone de Ubatuba (U3).

No que concerne ao clone de Ubatuba (U5) observou-se que a maioria das células se apresentava com morfótipos ovóides em grumos extremamente densos (figura 3.10J).

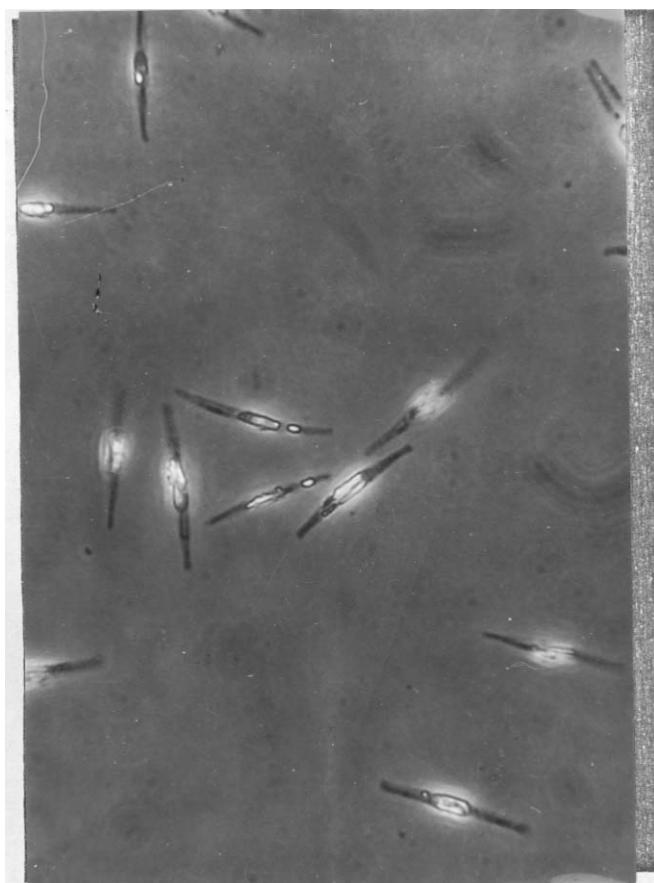
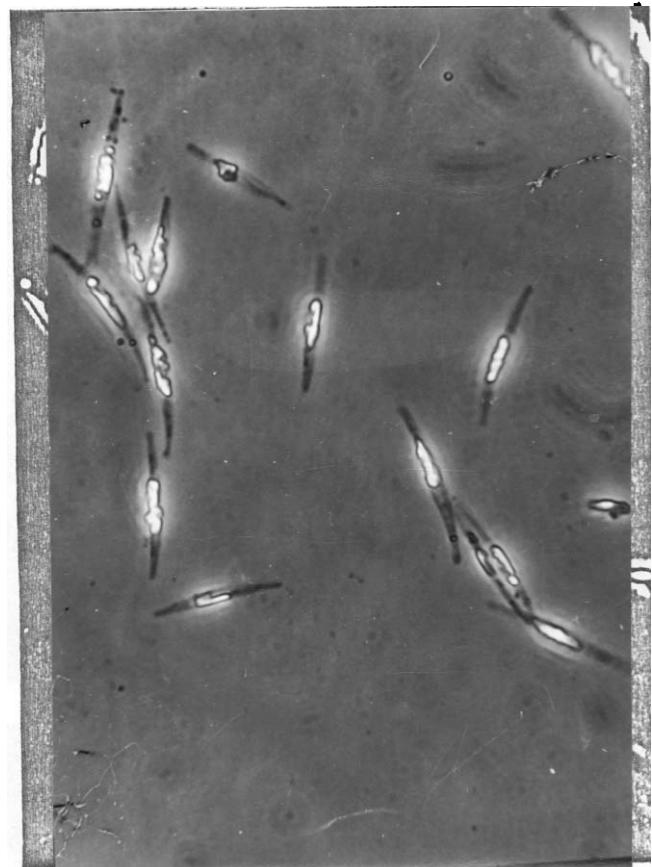


Figura 3.10I - Morfótipos fusiformes normais do clone de Ubatuba (U3)•



Restavam, comparativamente, poucas células fusiformes e, geralmente exibindo um aspecto típico daquelas células mantidas em culturas envelhecidas : a porção médiana que contém o núcleo e cromatóforo normalmente intumescida nas células em bom estado fisiológico; extremamente reduzida; os braços que correspondem aos prolongamentos das valvas bastante finos e frequentemente curvados.

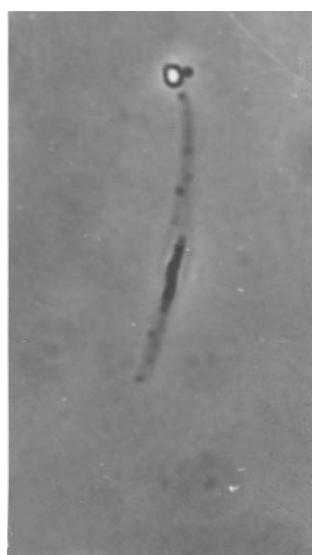


Figura 3.10J - Morfótipo fusiforme característico do clone de Ubatuba (U3)•

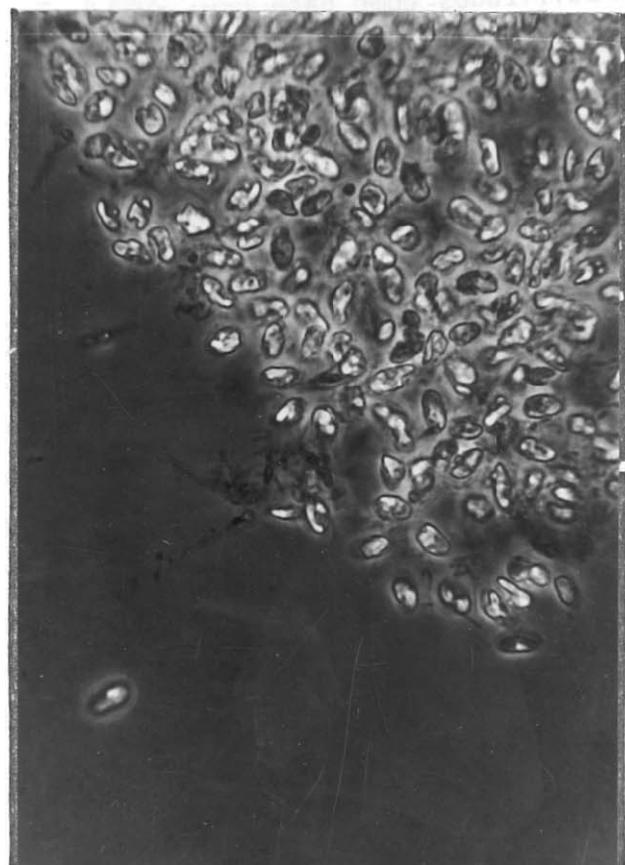
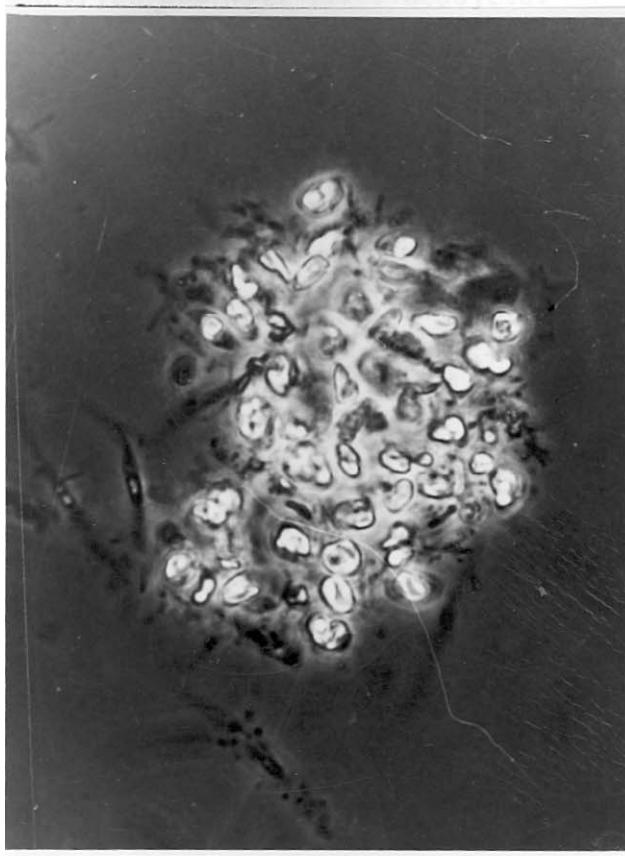


Figura 3.10J - Clone de Ubatuba (U5) :  
acima e abaixo grumos de morfótipos ovóides.

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - Parâmetros das respostas de crescimento.

Em bioensaios estáticos, os experimentos são executados num sistema fechado ("batch") sem possibilidades de controle da composição dos nutrientes durante a fase de crescimento das culturas. Estas são inoculadas a partir de culturas-estoque e crescem sob determinadas condições de luz e temperatura até que o(s) nutriente(s) limitante(s) do crescimento são exauridos, momento em que os experimentos são encerrados. Conforme as condições de cultura e organismos teste a curva de crescimento pode assumir aspectos variáveis. Em princípio, contudo, a curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases fisiologicamente distintas:

#### 1. Fase "lag" inicial

Esta fase representa a "juventude fisiológica" da cultura. O tempo de corrido antes do início das divisões celulares depende da idade do inóculo e da composição do meio de cultura.

#### 2. Fase de crescimento exponencial ou logarítmico.

Esta representa a fase de crescimento na qual as algas estão se multiplicando segundo uma taxa aproximadamente constante. Esta taxa de crescimento é característica para cada espécie sob uma determinada condição de cultivo e representa a capacidade reprodutiva máxima daquela espécie num determinado ambiente.

#### 3. Fase estacionária

Nesta fase as algas são suficientemente numerosas a ponto de exercer um efeito apreciável sobre o meio. Eventualmente alguns nutrientes são exauridos e o ambiente se torna menos favorável ao crescimento a ponto da taxa de crescimento diminuir até uma fase estacionária.

#### 4. Fase de declínio

Nesta fase as condições nutricionais para qualquer crescimento ulterior são tão impróprias que a morte e lixe das algas começa a predominar sobre o crescimento.

Quando as condições da cinética de crescimento de uma dada espécie de alga são efetivamente conhecidas, então os seguintes parâmetros de crescimento podem ser utilizados como base para avaliação de tratamentos experimentais:

$\mu_{\max}$  = taxa específica de crescimento máxima.

$X_{\max}$  = biomassa algal máxima

$Y_{\max}$  = coeficiente máximo de rendimento celular (biomassa celular por quantidade de nutriente limitante do crescimento removido).

As variações na biomassa algal produzidas em função do tempo para um dado sistema podem ser expressas conforme a seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - Kd) X$$

onde X : densidade da população.

t : tempo

$\mu : \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$  : taxa específica de crescimento

$Kd$  : taxa específica de declínio do

organismo (morte e respiração) e sob condições naturais também sedimentação, "grazing", lixiviação, etc.

Durante a fase estacionária de crescimento  $\mu$  pode ser expresso em função da concentração disponível de nutrientes intracelulares pela seguinte equação (Gargas, 1974)

$$\mu = f \times \frac{C_i - C_a}{K_c + C_i - C_a};$$

$$f = \frac{K_c + C_i \text{ máx} - C_a}{C_i \text{ máx} - C_a} \times \mu \text{ máx.}$$

onde  $C_i = \frac{S_i}{X}$  é a quantidade total de nutrientes orgânicos e inorgânicos intracelular por biomassa.

$C_a = \frac{1}{Y \text{ máx}}$  é o requisito mínimo de nutrientes.

$K_c$  : é a constante de saturação

$C_i \text{ máx}$  : é a concentração intracelular máxima de nutrientes ( $C_i$  quando  $\mu = \mu \text{ máx.}$ ).

Empiricamente tem sido demonstrado que os nutrientes são absorvidos em excesso pelas algas durante a fase "lag" de crescimento. Consequentemente, em experimentos de crescimento nos quais são empregados meios com baixas concentrações iniciais de nutrientes, já durante a fase de crescimento exponencial as algas terão esgotado os nutrientes essenciais desses meios. Nessas condições valeria a seguinte equação:

$$C_i = \frac{S_0}{X}$$

onde  $S_0$  é a concentração inicial de nutrientes.

Ao contrário das culturas mantidas em quimostatos, as culturas mantidas em sistemas fechados são consideradas não balanceadas na medida em que concentrações de nutrientes, relação superfície/volume, etc estão continuamente sendo modificadas. Certamente isso ocorre devido às mudanças na fisiologia do crescimento da alga em suas distintas fases. Por conseguinte,  $\mu \text{ máx}$  (a taxa máxima de crescimento estimada em culturas fechadas) será normalmente menor do que aquela estimada em culturas mantidas em quimostatos.

Na prática,  $\mu \text{ máx.}$  é estimado conforme a seguinte equação:

$$\mu \text{ máx} = \frac{\log_2 X_2 - \log_2 X_1}{t_2 - t_1}$$

onde  $X_2$  é a biomassa no tempo  $t_2$

$X_1$  é a biomassa no tempo  $t_1$

Ao contrário da taxa máxima de crescimento que representa um parâmetro dinâmico estimado durante a fase exponencial de crescimento, os parâmetros biomassa máxima produzida ( $X \text{ máx}$ ) e coeficiente máximo de rendimento celular ( $Y \text{ máx}$ ) representam parâmetros descriptivos estimados durante a fase estacionária de crescimento. Frequentemente  $X \text{ máx}$  é expresso como peso seco, volume celular, número de células, clorofila, carbono particulado, nitrogênio particulado, fósforo particulado e  $Y \text{ máx.}$  como biomassa produzida em peso seco ou volume celular por quantidade de nutrientes limitantes do crescimento, os quais normalmente são o fósforo e o nitrogênio (Gargas, 1974).

As respostas de uma alga para determinados meios de cultura podem ser melhor definidas através de suas taxas de crescimento durante a fase exponencial de crescimento uma vez que nesta fase os fatores limitantes são mínimos. Evidentemente a medida destas taxas depende da técnica de contagem celular, da diferença de densidades entre os dois pontos de referência no tempo e do período de tempo total.

Um outro aspecto importante diretamente ligado às contagens celulares a partir das quais foram derivadas as estimativas das taxas máximas de crescimento e biomassas máximas diz respeito às transformações logarítmicas utilizadas neste trabalho.

De acordo com EPA (1971) existem três razões de ordem estatística para se analisar o logaritmo da contagem celular além (ou invés) da contagem celular. Em primeiro lugar é evidente que a variância ou desvio padrão entre réplicas é muito maior para o logaritmo da contagem celular do que para esta simplesmente. Em outras palavras, as diferenças entre os desvios padrão para frascos sob diferentes combinações experimentais são muito menores para o log da contagem celular do que para a contagem celular. Isto apresenta diversas vantagens. A suposição que os desvios da população (desconhecidos) são todos idênticos é plausível com o uso do log da contagem mas não o é com a contagem celular, fato que nos permite utilizar estimativas conjuntas de variância o que nos fornece testes mais poderosos e melhores estimativas de variâncias. Esta homogeneidade também significa que os dados se aproximam mais pa-

ra satisfazer as suposições subjacentes às comparações estatísticas dos tratamentos.

Uma segunda razão para se utilizar a transformação logarítmica é que a variação entre o log das contagens entre réplicas de frascos tende a apresentar uma distribuição mais normal do que a variação entre as contagens. Uma terceira razão, talvez mais premente, envolve a correlação entre médias e desvios padrão. É fora de dúvida que as combinações de tratamentos que produzem grandes números de algas têm grande variabilidade frasco a frasco entre réplicas. Esta correlação entre a média e o desvio padrão chega ao redor de 0,8, que representa um valor muito alto.

Para dados biológicos que abrangem várias ordens de magnitude a transformação logarítmica frequentemente corrige todos os três problemas: produz variâncias homogêneas, o log dos dados parece ter uma distribuição mais proximamente normal e faz desaparecer a correlação entre médias e desvios padrão. Nesse caso a transformação logarítmica influencia no sentido de produzir homogeneidade e normalidade, porém existe uma correlação negativa entre médias e desvios padrão do log dos dados.

Em termos práticos é muito interessante observar que a precisão, medida pelo coeficiente de variação,  $CV = \frac{\sigma}{\bar{x}}$ , é a grosso modo de uma ordem de magnitude melhor para o log do número de células do que para a contagem celular. Isto provavelmente resulta do fato que a transformação logarítmica reduz amplamente o efeito (sobre o desvio padrão) de um ou dois frascos que diferem muito de outros num-

conjunto de réplicas. Se a transformação logarítmica reduz a dispersão da distribuição de observações relativas à média, i.e., se diminui o coeficiente de variação tão drasticamente, então ela certamente deve ser empregada.

Ao lado de uma linha mais filosófica, pode-se considerar qual escala de medida é mais apropriada: número de células contadas ou log desse número. O Estatístico não pode nem deve fazer essa determinação. Na consideração deste problema deve-se levar em conta a ampla faixa de contagem celular envolvida. Assim, por exemplo, neste trabalho as contagens variaram de  $1,00 \times 10^4$  até cerca de  $2,00 \times 10^7$ . Suponhamos que os números médios de células sob duas condições distintas foram 1.000 e 2.000, uma diferença de 1.000. Teria uma diferença de 1000 células neste caso a mesma significância da diferença de 1000 células entre médias de 20.001.000 e 20.000.000? Seria uma diferença no quinto dígito tão significante quanto no 1º dígito? Se a resposta for negativa então uma escala logarítmica é fortemente sugerida como uma escala mais significativa de medida do que uma escala aritmética.

Não obstante as razões alinhadas anteriormente, as medidas do "standing - stock" diário estimadas através de contagem celular e fluorescência *in vivo* foram tabuladas sem transformação logarítmica para se ter uma perspectiva da precisão dos dois métodos.

Uma comparação dos coeficientes de variação para as duas estimativas (tabelas A10 e A20) mostra que, exceto para as duas primeiras observações, praticamente em todos os experimentos não exis-

tem diferenças significativas entre elas. As tabelas A21 e A22 mostram que as amplitudes de variação dessa medida de dispersão para os dois métodos são praticamente as mesmas.

A menor variabilidade das medidas de fluorescência *in vivo* no início dos experimentos quando comparada com a contagem celular certamente está ligada a uma menor sensibilidade em responder a pequenas diferenças existentes nos inóculos até 24h após o início do crescimento das populações.

Na tabela A27 se encontram todos os valores das contagens celulares (média de três réplicas), fluorescência *in vivo* (média de três réplicas) e clorofila-a total (uma réplica) transformados em logaritmo neperiano para todos os experimentos comparativos entre os três clones. Pode-se notar que as correlações entre essas variáveis assim transformadas foram muito boas (amplitude de variação de 0,922 a 0,999).

Analizando-se as matrizes de covariância na tabela A27 verifica-se que as variâncias (diagonal da esquerda para a direita,  $Sx^2$ ,  $Sy^2$ ,  $Sz^2$ ) das três variáveis empregadas para a construção das curvas de crescimento não diferem de modo significativo para cada experimento e por conseguinte as sensibilidades dos três métodos se situam praticamente num mesmo nível.

Testes de regressão linear visando comparar os coeficientes angulares e lineares (tabela A28) obtidos pelas regressões lineares derivadas das curvas de crescimento com base na contagem celular e na fluorescência *in vivo*, para diversos

experimentos executados no meio Guillard, mostraram que os coeficientes angulares fornecidos pelos dois métodos de estimativa do "standing-stock" diário não diferiram significativamente. Os coeficientes lineares, por outro lado, apresentaram diferenças significativas o que deve estar ligado, como já mencionado, à menor sensibilidade da fluorescência *in vivo* para detectar pequenas diferenças iniciais nas densidades das populações. Este fato pode ser verificado na comparação da porção inicial das curvas de crescimento por contagem celular e por fluorescência *in vivo* na qual a fase "lag", especialmente para as temperaturas mais elevadas, é mais demorada. Consequentemente ao início da fase exponencial correspondem valores de "standing-stock" estimados pela fluorescência *in vivo* inferiores àqueles valores estimados pela contagem celular e o intercepto das retas de regressão (coeficientes lineares) são sempre menores do que os obtidos pelas contagens celulares.

Como já foi assinalado anteriormente a medida das taxas máximas de crescimento depende da diferença de densidades entre os dois pontos de referência no tempo e do período de tempo total estimado para a duração da fase exponencial. Por essa razão, o fato de dois métodos distintos de estimativa do "standing-stock" poderem fornecer coeficientes angulares idênticos derivados das regressões lineares, não significa necessariamente que devem corresponder a estimativas de taxas máximas de crescimento idênticas.

Uma comparação das taxas máximas médias de crescimento estimadas pelos dois métodos (testes F) agrupando os resulta-

dos para os três clones em cada meio de cultura e temperatura de execução dos experimentos, revelou a existência de diferenças significativas. As únicas exceções foram verificadas para as taxas obtidas a 16°C no meio Guillard e a 20°C no meio ASP<sub>2</sub>.

Os coeficientes de variação médios, calculados a partir dos agrupamentos dos resultados para os três clones em cada meio de cultura e temperatura, foram: para contagem de células a 16°C, 0,02 e uma amplitude de variação de 0,01 a 0,04; para fluorescência 0,15 e uma amplitude de variação de 0,00 a 0,20; para contagem a 20°C, 0,03 e uma amplitude de variação de 0,01 a 0,06; para fluorescência 0,09 e uma amplitude de variação de 0,01 a 0,24; para contagem a 24°C, 0,11 e uma amplitude de variação de 0,01 a 0,32; para fluorescência 0,07 e uma amplitude de variação de 0,01 a 0,21.

A variância do resíduo, levando-se em conta todos os experimentos, foi de 0,00524 para contagem e 0,01579 para fluorescência (tabelas 4.1 e 4.3), portanto 3 vezes maior para esta última.

As diferenças constatadas para os dois métodos de estimar as taxas máximas médias de crescimento se refletiram na análise de variância (tabelas 4.1 e 4.3). Para as estimativas baseadas na contagem celular foi determinada a existência de interações significativas entre os clones e os meios, entre os clones e as temperaturas, entre os meios e as temperaturas e entre os três fatores ao mesmo tempo. Já para as estimativas baseadas na fluorescência as duas primeiras interações mencionadas acima não foram significativas. Isso pode ser melhor

visualizado quando se comparam as ilustrações das interações pelos dois métodos (figuras 4.1 e 4.2) nas quais pode-se notar que, para a fluorescência, as linhas ( $M \times C$  e  $T \times C$ ) são mais ou menos paralelas e as interações são muito menos pronunciadas quando comparadas com as linhas referentes às contagens.

Da mesma maneira, a análise de agrupamento apresentou uma maior discriminação para contagem do que para a fluorescência havendo entretanto concordância entre os dois métodos para a única conclusão obtida por esta última.

#### 4.2 - Taxas máximas de crescimento

A tabela 4.1 mostra os resultados da análise de variância para as taxas máximas de crescimento baseadas nas contagens celulares.

As estatísticas fornecidas por essa análise testam as seguintes hipóteses:

$H_{01}$  :  $C_1 = C_2 = C_3 = 0$ , testa a igualdade de médias entre os três clones

$H_{02}$  :  $M_1 = M_2 = M_3 = 0$ , testa a igualdade de médias entre os três meios

$H_{03}$  :  $T_1 = T_2 = T_3 = 0$ , testa a igualdade de médias entre as três temperaturas

$H_{04}$  :  $CM_{ij} = 0$ , testa a existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone e o  $j$ -ésimo meio.

$H_{05}$  :  $CT_{ik} = 0$ , testa a existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone e a  $k$ -ésima temperatura.

$H_{06}$  :  $MT_{jk} = 0$ , testa a existência de interação entre o  $j$ -ésimo meio e a  $k$ -ésima temperatura.

$H_{07}$  :  $CMT_{ijk} = 0$ , testa a existência de interação entre o  $i$ -ésimo clone, o  $j$ -ésimo meio e a  $k$ -ésima temperatura.

Foram rejeitadas todas as hipóteses, assim conclui-se que existem diferenças significativas nas taxas de crescimento dos três clones, entre os três meios de cultura e entre as três temperaturas. Da mesma forma constatou-se que existem influências recíprocas entre os clones e os meios de cultura, entre os clones e as temperaturas, entre os meios e as temperaturas e entre os três fatores simultaneamente. Consequentemente o modelo para esses dados será :

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + M_j + T_k + CM_{ij} + CT_{ik} + MT_{jk} + CMT_{ijk} + E_{ijkl} \text{ onde } i=1, \dots, 3, j=1, \dots, 3, k=1, \dots, 3, l=1, \dots, 3$$

A análise de agrupamento forneceu na primeira partição  $\lambda = 65,058$  e  $\lambda_c = 36,415$  (5%); na segunda partição  $\lambda = 16,71$  e  $\lambda_c = 24,736$ , para o 1º grupo,  $\lambda = 19,853$  e  $\lambda_c = 21,920$  (2,5%) para o 2º grupo. Assim foram obtidos dois grupos de médias homogêneas de 0,66 a 1,23 e de 1,24 a 2,04

As taxas máximas de crescimento foram significativamente distintas entre : o clone de Cananéia (C1) e o de Ubatuba (U3) nos meios  $ASP_2$  e Guillard a 16°C e no meio Erd-Schreiber a 24°C; o clone de Ubatuba (U3) e o de Ubatuba (U5) nos meios  $ASP_2$  e Guillard a 16°C e no meio Erd-Schreiber a 24°C. Entre os clones de Cananéia (C1) e de Ubatuba (U5) não foram observadas diferenças significativas.

A partir da tabela 4.2 foram construídos gráficos (figura 4.1) que ilus-

tram o comportamento dos três clones para a variável taxas máximas de crescimento com base na contagem celular bem como a existência de interações de primeira or-

dem ( CxM , CxT , MxT ) e de segunda ordem ( C x M x T ).

Os resultados dos testes de significância indicam que existe uma interação

Tabela 4.1 Análise de Variância dos dados da tabela 3.1 .

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=3.					
Média Total: 1,21901					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias(F)	
M	2	0,56451	0,28226	53,90898(M)	***
T	2	2,05646	1,02823	196,38458(T)	***
C	2	0,28285	0,14143	27,01155(C)	***
MT	4	2,28963	0,57241	109,32587(MxT)	***
MC	4	0,19444	0,04861	9,28425(MxC)	***
TC	4	0,15267	0,03817	7,28979(TxC)	***
MTC	8	0,42681	0,05335	10,18970(MxTxC)***	
ERRO	54	0,28273	0,00524		
TOTAL	80	6,25012			
F 0,05 (2,54) = 3,17		F 0,01 (2,54) = 5,04		F 0,001 (2,54) = 7,91	
(4,54) = 2,55		(4,54) = 3,70		(4,54) = 5,43	
(8,54) = 2,12		(8,54) = 2,87		(8,54) = 3,97	

Tabela 4.2 Dados da tabela 3.1 (experimento fatorial 3<sup>3</sup>) redispostos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1ª e 2ª ordem (ver figura 4.1).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t1+t2+t3
		160C = t1	200C = t2	240C = t3	
ASP <sub>2</sub> = m1	CAN 1 = c1	3,15	4,10	1,99	9,24 (m1c1)
	UBA 3 = c2	3,99	4,17	2,97	11,13 (m1c2)
	UBA 5 = c3	3,06	4,40	2,29	9,75 (m1c3)
Total = c1+c2+c3		10,20 (m1t1)	12,67 (m1t2)	7,25 (m1t3)	30,12 (m1)
ERD - SC. = m2	c1	4,75	3,10	2,98	10,83 (m2c1)
	c2	4,64	3,40	3,88	11,92 (m2c2)
	c3	6,11	3,68	3,10	12,89 (m2c3)
Total = c1+c2+c3		15,50 (m2t1)	10,18 (m2t2)	9,96 (m2t3)	35,64 (m2)
GUILL. = m3	c1	3,48	4,07	3,08	10,63 (m3c1)
	c2	3,72	4,30	3,33	11,35 (m3c2)
	c3	3,48	4,29	3,23	11,00 (m3c3)
Total = c1+c2+c3		10,68 (m3t1)	12,66 (m3t2)	9,64 (m3t3)	32,98 (m3)
Total = m1 + m2 + m3	c1	11,38 (t1c1)	11,27 (t2c1)	8,05 (t3c1)	30,70 (c1)
	c2	12,35 (t1c2)	11,87 (t2c2)	10,18 (t3c2)	34,40 (c2)
	c3	12,65 (t1c3)	12,37 (t2c3)	8,62 (t3c3)	33,64 (c3)
Total = c1+c2+c3		36,38 (t1)	35,51 (t2)	26,85 (t3)	98,74

altamente significativa entre os meios e as temperaturas, entre os clones e os meios e entre os clones e as temperaturas. Isto pode ser observado na figura 4.1. Nota-se que as linhas que ilustram as relações entre esses fatores não são paralelas mas apresentam intersecções que evidenciam efeitos combinados significantes. Assim, passando-se do meio sintético ASP<sub>2</sub> (M1) para os meios enriquecidos Erd-Schreiber (M2) e Guillard f<sub>1</sub> (M3) os efeitos sobre as taxas máximas de crescimento são mais marcantes sobre o clone de Ubatuba U3 (C2), o mesmo ocorrendo com o aumento da temperatura.

A interação de 2º ordem evidencia que as interações entre os clones e os meios dependem do nível do fator temperatura como se deduz pelas intersecções das linhas nos meios ASP<sub>2</sub> (M1) e Erd-Schreiber (M2) na parte inferior da figura 4.1. Para esses dois tratamentos o clone de Ubatuba U3 mostra as maiores diferenças em relação aos clones de Cananéia C1 e de Ubatuba U5 nas temperaturas de 160 e 240 (M1) e 240 (M2). No meio Guillard (M3) as linhas são mais ou menos paralelas para os três clones evidenciando ausência de efeito combinado.

As taxas máximas de crescimento estimadas com base na fluorescência *in vivo* foram submetidas a análise de variância cujos resultados se encontram na tabela 4.3.

De acordo com esses resultados foram rejeitadas as hipóteses H<sub>01</sub>, H<sub>02</sub>, H<sub>03</sub>, H<sub>06</sub>, H<sub>07</sub> e por essa razão conclui-se que existem diferenças significativas nas taxas de crescimento dos três clones, entre os três meios de cultura e entre as três temperaturas; também existem influências recíprocas entre os meios e as temperaturas e entre os três fatores simultaneamente. Assim o modelo será:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + M_j + T_k + MT_{jk} + E_{ijkl}$$

onde i=1,...,3 , j=1,...,3 , k=1,...,3 , l=1,...,3

A análise de agrupamento forneceu na primeira partição  $\lambda_1 = 58,959$  e  $\lambda_C = 32,671$  (5%); na segunda partição  $\lambda_2 = 7,649$  e  $\lambda_C = 11,143$  para o 1º grupo,  $\lambda_3 = 15,453$  e  $\lambda_C = 34,17$  (2,5%) para o 2º grupo. Dessa forma foram obtidos dois grupos de médias homogêneas de 0,81 a 1,19 e de 1,33 a 1,85.

O clone de Cananéia C1 diferiu significativamente dos clones de Ubatuba U3 e

Tabela 4.3 Análise de Variância dos dados da tabela 3.2 .

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=3.					
Média Total: 1,40580					
Fonte de Variacão	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias(F)	
M	2	0,42676	0,21338	13,51450(M)	***
T	2	0,32874	0,16437	10,41059(T)	***
C	2	0,13408	0,06704	4,24591(C)	*
MT	4	2,21449	0,55362	35,06412(MxT)	***
MC	4	0,10832	0,02708	1,71507(MxC)	ns
TC	4	0,11424	0,02856	1,80890(TxC)	ns
MTC	8	0,39894	0,04987	3,15842(MxTxC)	**
ERRO	54	0,85260	0,01579		
TOTAL	80	4,57817			
F 0,05 (2,54) = 3,17	F 0,01 (2,54) = 5,04	F 0,001 (2,54) = 7,91			
(4,54) = 2,55	(4,54) = 3,70	(4,54) = 5,43			
(8,54) = 2,12	(8,54) = 2,87	(8,54) = 3,97			

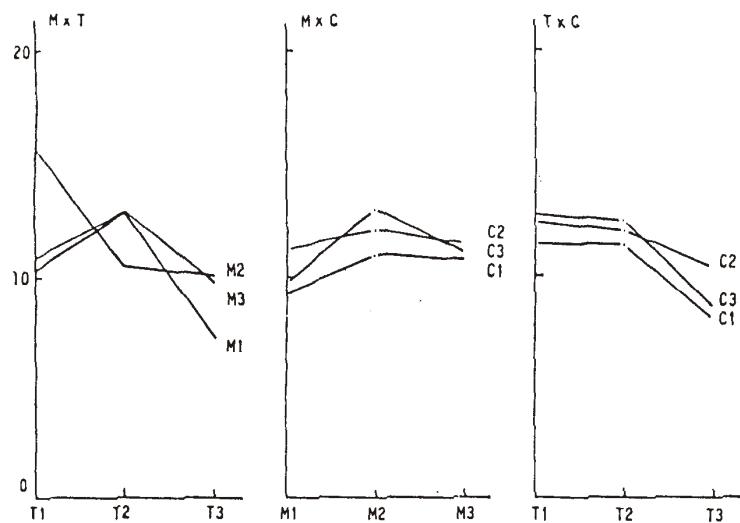
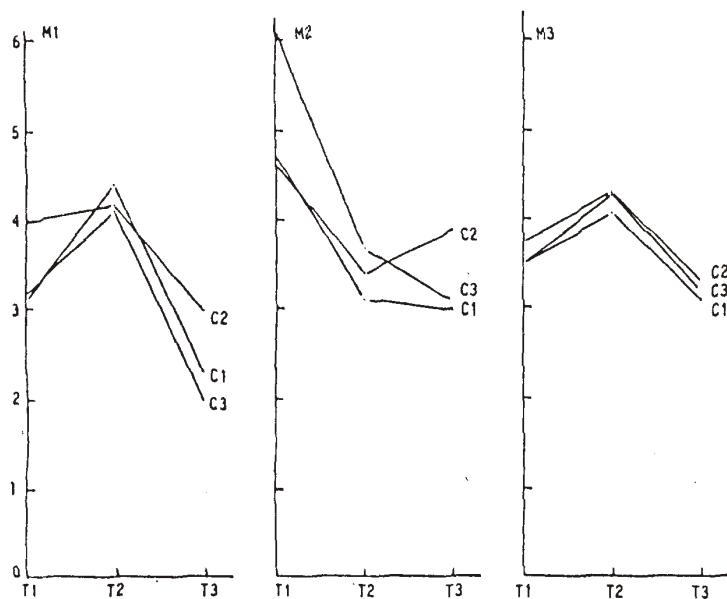


Figura 4.1 - Ilustração das interações de 1º ordem : ordenadas  $\bar{Y}_{jk}(M \times T)$ ,  $\bar{Y}_{ij}(M \times C)$ ,  $\bar{Y}_{ik}(T \times C)$  ( parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{i1k}(M1)$ ,  $\bar{Y}_{i2k}(M2)$ ,  $\bar{Y}_{i3k}(M3)$  ( parte inferior).  $\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas máximas de crescimento baseadas na contagem celular.



U5 no meio Erd-Schreiber a 24°C.

A tabela 4.4 mostra os resultados das estimativas das taxas máximas de crescimento baseadas na fluorescência *in vivo* a partir dos quais foram construídos os gráficos das interações (figura 4.2).

Os resultados dos testes de significância indicam a existência de uma interação altamente significativa entre os meios e as temperaturas como se pode observar na parte superior da figura 4.2 para o gráfico M x T. A interação de 2ª ordem ilustrada na parte inferior da mes-

Tabela 4.4 Dados da tabela 3.2 (experimento fatorial 3<sup>3</sup>) redispuestos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1ª e 2ª ordem (ver figura 4.2).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t1+t2+t3
		160C = t1	200C = t2	240C = t3	
ASP <sub>2</sub> = m1	CAN 1 = c1	3,35	4,28	4,28	11,91 (m1c1)
	UBA 3 = c2	2,56	5,05	4,62	12,23 (m1c2)
	UBA 5 = c3	2,44	4,37	4,52	11,33 (m1c3)
	Total = c1+c2+c3	8,35 (m1t1)	13,70 (m1t2)	13,42 (m1t3)	39,47 (m1)
ERD - SC. = m2	c1	4,98	4,02	3,58	12,58 (m2c1)
	c2	5,56	4,44	4,42	14,42 (m2c2)
	c3	4,50	4,65	4,11	13,26 (m2c3)
	Total = c1+c2+c3	15,04 (m2t1)	13,11 (m2t2)	12,11 (m2t3)	40,26 (m2)
GUILL. = m3	c1	3,98	4,32	4,37	12,67 (m3c1)
	c2	4,04	4,47	4,35	12,86 (m3c2)
	c3	4,35	4,36	3,90	12,61 (m3c3)
	Total = c1+c2+c3	12,37 (m3t1)	13,15 (m3t2)	12,62 (m3t3)	38,14 (m3)
Total = m1 + m2 + m3	c1	12,31 (t1c1)	12,62 (t2c1)	12,23 (t3c1)	37,16 (c1)
	c2	12,16 (t1c2)	13,96 (t2c2)	13,39 (t3c2)	39,51 (c2)
	c3	11,29 (t1c3)	13,38 (t2c3)	12,53 (t3c3)	37,20 (c3)
	Total = c1+c2+c3	35,76 (t1)	39,96 (t2)	38,15 (t3)	113,87

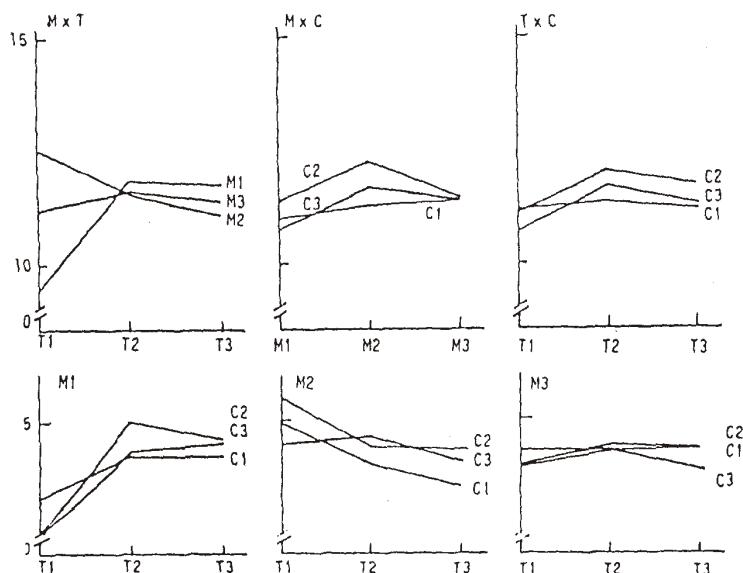


Figura 4.2 - Ilustração das interações de 1ª ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{jh}(M \times T)$ ,  $\bar{Y}_{ij}(M \times C)$ ,  $\bar{Y}_{ik}(T \times C)$  (parte superior) e de 2ª ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{1lk}(M1)$ ,  $\bar{Y}_{2lk}(M2)$ ,  $\bar{Y}_{3lk}(M3)$  (parte inferior).

$\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas máximas de crescimento baseadas na fluorescência *in vivo*.

ma figura destaca as maiores diferenças para o clone de Cananéia (C1) no meio ASP<sub>2</sub> (M1) a 16°C (T1) e para o clone de Ubatuba U5(C3) no meio Erd-Schreiber (M2) e no meio Guillard (M3) a 16°C (T1) e 24°C (T3).

A tabela 4.5 mostra os resultados da análise de variância para as taxas máximas de crescimento estimadas com base na clorofila-a total.

De acordo com esses resultados somente a H<sub>03</sub> foi rejeitada consequentemente

existem diferenças significativas entre as três temperaturas. O modelo para esses dados será:

$$Y_{j\ell} = \mu + T_j + E_{j\ell} \text{ onde } j = 1, \dots, 3 \\ \ell = 1$$

A análise de agrupamento não apresentou partição significante ( $\lambda = 29,285$  e  $\lambda_C = 36,415$  para 5%). A tabela 4.6 e a figura 4.3 apresentam os resultados dessas estimativas e as respectivas ilustrações das interações.

Os testes de significância indicam

Tabela 4.5 Análise de Variância dos dados da tabela 3.3 .

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=1.					
Média Total: 0,99444					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias(F)	
M	2	0,09536	0,04768	1,32900(M)	ns
T	2	2,44282	1,22141	34,04630(T)	***
C	2	0,11216	0,05608	1,56314(C)	ns
MT	4	0,11636	0,02909	0,81084(MxT)	ns
MC	4	0,04676	0,01169	0,32582(MxC)	ns
TC	4	0,09382	0,02346	0,65381(TxC)	ns
MTC	8	0,28700	0,03587		
TOTAL	26	3,19427			
F 0,05 (2,8) = 4,46		F 0,01 (2,8) = 8,65		F 0,001 (2,8) = 21,69	
(4,8) = 3,84		(4,8) = 7,01		(4,8) = 14,39	

Tabela 4.6 Dados da tabela 3.3 (experimento fatorial 3<sup>3</sup>) redispostos na forma de dupla entrada (two-way). Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1ª e 2ª ordem (ver figura 4.3 ).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t <sub>1</sub> +t <sub>2</sub> +t <sub>3</sub>
		16°C = t <sub>1</sub>	20°C = t <sub>2</sub>	24°C = t <sub>3</sub>	
ASP <sub>2</sub> = m <sub>1</sub>	CAN 1 = c <sub>1</sub>	0,89	1,24	0,68	2,81 (m <sub>1</sub> c <sub>1</sub> )
	UBA 3 = c <sub>2</sub>	0,90	1,89	0,73	3,52 (m <sub>1</sub> c <sub>2</sub> )
	UBA 5 = c <sub>3</sub>	0,77	1,50	0,64	2,91 (m <sub>1</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		2,56 (m <sub>1</sub> t <sub>1</sub> )	4,63 (m <sub>1</sub> t <sub>2</sub> )	2,05 (m <sub>1</sub> t <sub>3</sub> )	9,24 (m <sub>1</sub> )
ERD - SC. = m <sub>2</sub>	c <sub>1</sub>	0,62	1,48	0,65	2,75 (m <sub>2</sub> c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	0,70	1,25	1,01	2,96 (m <sub>2</sub> c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	0,82	1,01	0,66	2,49 (m <sub>2</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		2,14 (m <sub>2</sub> t <sub>1</sub> )	3,74 (m <sub>2</sub> t <sub>2</sub> )	2,32 (m <sub>2</sub> t <sub>3</sub> )	8,20 (m <sub>2</sub> )
GUILL. = m <sub>3</sub>	c <sub>1</sub>	0,82	1,62	0,81	3,25 (m <sub>3</sub> c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	0,90	1,54	0,80	3,24 (m <sub>3</sub> c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	0,95	1,23	0,84	3,02 (m <sub>3</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		2,67 (m <sub>3</sub> t <sub>1</sub> )	4,39 (m <sub>3</sub> t <sub>2</sub> )	2,45 (m <sub>3</sub> t <sub>3</sub> )	9,51 (m <sub>3</sub> )
Total = m <sub>1</sub> +m <sub>2</sub> +m <sub>3</sub>	c <sub>1</sub>	2,33 (t <sub>1</sub> c <sub>1</sub> )	4,34 (t <sub>2</sub> c <sub>1</sub> )	2,14 (t <sub>3</sub> c <sub>1</sub> )	8,81 (c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	2,50 (t <sub>1</sub> c <sub>2</sub> )	4,68 (t <sub>2</sub> c <sub>2</sub> )	2,54 (t <sub>3</sub> c <sub>2</sub> )	9,72 (c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	2,54 (t <sub>1</sub> c <sub>3</sub> )	3,74 (t <sub>2</sub> c <sub>3</sub> )	2,14 (t <sub>3</sub> c <sub>3</sub> )	8,42 (c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		7,37 (t <sub>1</sub> )	12,76 (t <sub>2</sub> )	6,82 (t <sub>3</sub> )	26,95

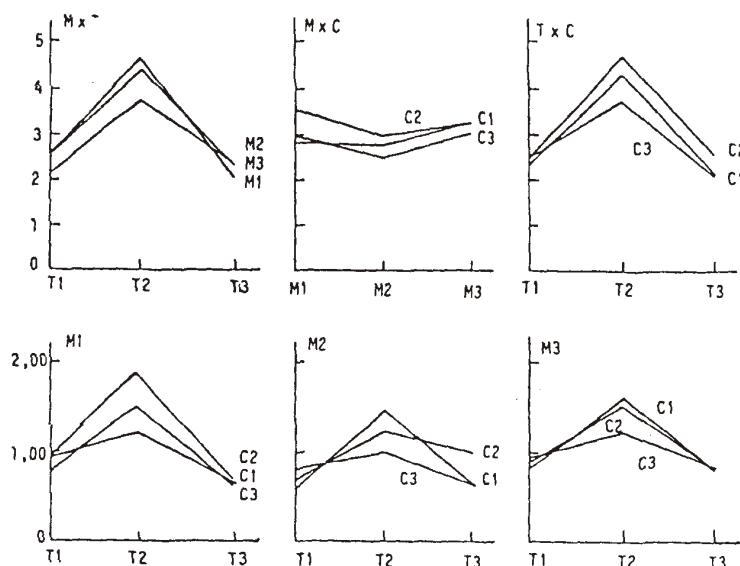


Figura 4.3 - Ilustração das interações de 1º ordem: ordenadas  $Y_{jk}$  ( $M \times T$ ),  $Y_{ij}$  ( $M \times C$ ),  $Y_{ik}$  ( $T \times C$ ) (parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $Y_{1jk}$  ( $M_1$ ),  $Y_{2jk}$  ( $M_2$ ),  $Y_{3jk}$  ( $M_3$ ) (parte inferior).

Y efeito combinado dos tratamentos sobre as taxas máximas de crescimento baseadas na clorofila-a total.

ausência de interações significativas como mostram as linhas mais ou menos paralelas dos gráficos da figura 4.3.

#### 4.3 - Biomassas máximas alcançadas

A tabela 4.7 mostra os resultados da análise de variância das biomassas máximas alcançadas pelos três clones de *P. tricornutum*.

De acordo com esses resultados foram rejeitadas as hipóteses  $H_{02}$ ,  $H_{03}$ ,  $H_{04}$ ,  $H_{05}$ ,  $H_{06}$ ,  $H_{07}$ , e portanto conclui-se que existem diferenças significativas entre as biomassas produzidas nos

distintos meios de cultura e nas distintas temperaturas. Igualmente a variável sofre influências recíprocas entre os clones e os meios, entre os clones e as temperaturas e entre os meios e as temperaturas. Além disso existem influências dos três fatores simultaneamente. Então para esses dados, o modelo será:

$$Y_{ijkl} = \mu + M_j + T_k + CM_{ij} + CT_{ik} + MT_{jk} + CMT_{ijk} + E_{ijkl} \text{ onde } i=1, \dots, 3, j=1, \dots, 3, k=1, \dots, 3; l=1, \dots, 3.$$

A análise de agrupamento não apresentou partição significante.

Na tabela 4.6 estão os resultados ob-

Tabela 4.7 Análise de Variância dos dados da tabela 3.4.

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=3.					
Média Total: 6,99593					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão das Variâncias (F)	
M	2	3,56349	1,78174	338,06813(M)	***
T	2	0,15934	0,07967	15,11666(T)	***
C	2	0,00561	0,00280	0,53197(C)	ns
MT	4	0,61873	0,15468	29,34926(MxT)	***
MC	4	0,11419	0,02855	5,41672(MxC)	**
TC	4	0,08296	0,02074	3,93535(TxC)	**
MTC	8	0,12164	0,01520	2,88493(MxTxT)	**
ERRO	54	0,28460	0,00527		
TOTAL	80	4,95056			
F 0,05 (2,54) = 3,17		F 0,01 (2,54) = 5,04		F 0,001 (2,54) = 7,91	
(4,54) = 2,55		(4,54) = 3,70		(4,54) = 5,43	
(8,54) = 2,12		(8,54) = 2,87		(8,54) = 3,97	

Tabela 4.8 Dados da tabela 3.4 (experimento factorial 3<sup>3</sup>) redispuestos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1º e 2º ordem (ver figura 4.4).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t <sub>1</sub> +t <sub>2</sub> +t <sub>3</sub>
		160C = t <sub>1</sub>	200C = t <sub>2</sub>	240C = t <sub>3</sub>	
ASP <sub>2</sub> = m <sub>1</sub>	CAN 1 = c <sub>1</sub>	19,71	20,61	19,95	60,27 (m <sub>1</sub> c <sub>1</sub> )
	UBA 3 = c <sub>2</sub>	20,31	20,61	19,23	60,15 (m <sub>1</sub> c <sub>2</sub> )
	UBA 5 = c <sub>3</sub>	19,86	20,79	19,92	60,57 (m <sub>1</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		59,88 (m <sub>1</sub> t <sub>1</sub> )	62,01 (m <sub>1</sub> t <sub>2</sub> )	59,10 (m <sub>1</sub> t <sub>3</sub> )	180,99 (m <sub>1</sub> )
ERD - SC. = m <sub>2</sub>	c <sub>1</sub>	21,30	21,06	21,66	64,02 (m <sub>2</sub> c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	21,03	21,09	21,27	63,39 (m <sub>2</sub> c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	21,30	21,15	21,84	64,29 (m <sub>2</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		63,63 (m <sub>2</sub> t <sub>1</sub> )	63,30 (m <sub>2</sub> t <sub>2</sub> )	64,77 (m <sub>2</sub> t <sub>3</sub> )	191,70 (m <sub>2</sub> )
GUILL. = m <sub>3</sub>	c <sub>1</sub>	21,75	21,87	21,27	64,89 (m <sub>3</sub> c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	21,93	21,72	21,42	65,07 (m <sub>3</sub> c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	21,42	21,54	21,06	64,02 (m <sub>3</sub> c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		65,10 (m <sub>3</sub> t <sub>1</sub> )	65,13 (m <sub>3</sub> t <sub>2</sub> )	63,75 (m <sub>3</sub> t <sub>3</sub> )	193,98 (m <sub>3</sub> )
Total = m <sub>1</sub> +m <sub>2</sub> +m <sub>3</sub>	c <sub>1</sub>	62,76 (t <sub>1</sub> c <sub>1</sub> )	63,54 (t <sub>2</sub> c <sub>1</sub> )	62,88 (t <sub>3</sub> c <sub>1</sub> )	189,18 (c <sub>1</sub> )
	c <sub>2</sub>	63,27 (t <sub>1</sub> c <sub>2</sub> )	63,42 (t <sub>2</sub> c <sub>2</sub> )	61,92 (t <sub>3</sub> c <sub>2</sub> )	188,61 (c <sub>2</sub> )
	c <sub>3</sub>	62,58 (t <sub>1</sub> c <sub>3</sub> )	63,48 (t <sub>2</sub> c <sub>3</sub> )	62,82 (t <sub>3</sub> c <sub>3</sub> )	188,88 (c <sub>3</sub> )
Total = c <sub>1</sub> +c <sub>2</sub> +c <sub>3</sub>		188,61 (t <sub>1</sub> )	190,44 (t <sub>2</sub> )	187,62 (t <sub>3</sub> )	566,67

tidos para as biomassas máximas a partir dos quais foram construídos os gráficos que ilustram as interações (figura 4.4).

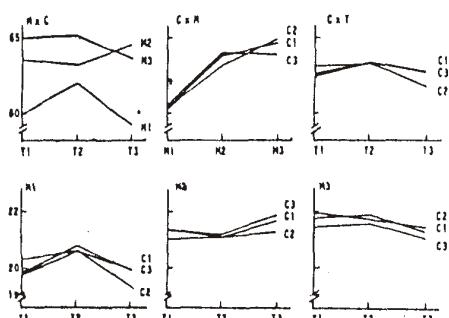
Os testes de significância indicam a existência de interações significativas entre os clones e os meios e entre os clones e as temperaturas; entre os meios e as temperaturas a interação é altamente significativa. A observação dos gráficos da figura 4.4 (parte superior) mostra que as maiores diferenças estão nas biomassas produzidas pelo clone de Ubatuba U5 (C3) no meio Guillard (M3) e pelo clone de Ubatuba U3 (C2) a 240C (T3). O gráfico da interação de 2º ordem (parte in-

ferior) mostra claramente que as interações dos clones com os meios dependem do nível do fator temperatura.

Em resumo os resultados das análises estatísticas para as taxas máximas de crescimento quando estimadas com base na contagem celular mostraram que o clone de Ubatuba U3 apresentou valores significativamente mais altos do que o clone de Canaéia C1 a 160C nos meios ASP<sub>2</sub> e Guillard e a 240C no meio Erd-Schreiber; em relação ao clone de Ubatuba U5 também apresentou valores significativamente mais altos nas mesmas condições. Entre os clones de Canaéia C1 e de Ubatuba U5 não foram consta-

Figura 4.4 - Ilustração das interações de 1º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{jk}$  (MxT),  $\bar{Y}_{ij}$  (MxC),  $\bar{Y}_{ik}$  (CxT) (parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{1jk}$  (M1),  $\bar{Y}_{2jk}$  (M2),  $\bar{Y}_{3jk}$  (M3) (parte inferior)

$\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as biomassas máximas alcançadas pelos três clones.



tadas diferenças significantes.

Quando as estimativas foram baseadas na fluorescência *in vivo*, os clones de Ubatuba U3 e U5 apresentaram taxas de crescimento significativamente mais altas do que o clone de Cananéia C1 apenas no meio Erd-Schreiber a 24°C. Entre os dois clones de Ubatuba não foram detectadas diferenças significativas.

As estimativas baseadas na clorofila-a não revelaram diferenças significativas entre os três clones.

No que se refere as biomassas máximas, os três clones não apresentaram diferenças significativas entre si muito embora suas respostas tenham apresentado interações significativas com os meios e as temperaturas.

Os resultados aqui obtidos são similares aqueles obtidos por Hayward (1968) trabalhando com cinco clones de *P. tricornutum* sendo dois provenientes de Plymouth, dois de Woods Hole e um da Finlândia. O autor verificou que o clone da Finlândia apresentava taxas de crescimento e biomassas máximas significativamente menores quando comparado com os demais que não diferiam entre si. Submetidos à variações de pH e de salinidade constatou a existência de diferenças significativas também para o clone da Finlândia. As menores taxas de crescimento deste clone foram obtidas nos meios sintéticos ASP<sub>2</sub> e ASW, nos meios elaborados com água do mar enriquecida não existiam diferenças entre os clones ainda que o nível de crescimento nesses meios fosse menor do que nos meios artificiais.

Um importante aspecto ligado aos estudos com clones de uma mesma espécie

isolados do ambiente e mantidos em laboratório deve ser realçado.

De acordo com Lewin & Guillard (1963) a maioria das diatomáceas se reproduz tanto sexuada como assexuada sendo capazes de apresentar reprodução sexual dentro de um simples clone.

Normalmente os clones são estabelecidos a partir de uma única célula isolada de modo apropriado da qual, por reprodução assexuada, se constituem as culturas. Assumindo-se que as populações assim originadas estejam sendo mantidas em ótimas condições fisiológicas de crescimento, é razoável admitir-se que, não ocorrendo pressões seletivas ou mutações, elas se constituam num único genótipo.

Murphy & Guillard (1976) examinando a constituição genética de 14 clones de duas espécies de *Thalassiosira* através da comparação de suas enzimas por eletroforese verificaram que quatro clones de *T. fluviatilis* Hustedt formavam um grupo distinto claramente separado de todos os clones de *T. pseudonana* Hasle & Heimdal. Dentro desta última, quatro clones estuarinos e um de recife formavam um grupo diferente de quatro clones oceânicos e um único clone de águas do talude continental era intermediário entre os dois grupos provavelmente compartilhando genes com os dois grupos e, consequentemente, indicando que ambos não são geneticamente isolados. A maioria dos indivíduos analisados eram homozigotos para todos os loci testados ainda que a presença de mais de um alelo por locus fosse comum. Por conseguinte a espécie afigurava-se como uma coleção de distintos homozigotos representada por uma série de clones originários

de uma ampla variedade de habitats sendo raros os heterozigotos. Este fato poderia ser explicado de duas maneiras: por um lado, embora existam formas heterozigotas em espécies diploides polimórficas em populações naturais obedecendo ao equilíbrio Hardy-Weinberg, quando estas são mantidas como clones em culturas podem vir a perder essa condição, já que na prática, não existe um controle sobre a ocorrência de reprodução sexuada entre as células assenxuadamente produzidas. Pode ocorrer autofertilização dentro de um clone uma vez que gametas e auxospores frequentemente são observados em clones mantidos em cultura. Em consequência são formados recombinantes homozigotos e a população assim mantida contém mais de um genótipo. Nestas condições a heterose não pode aumentar como resultado da reprodução sexuada entre genótipos deste tipo. Ao contrário diminuiria como resultado tanto de processos estocásticos como da seleção de homozigotos recombinantes. Por outro lado, os heterozigotos seriam raros na natureza e as espécies efetivamente se constituiriam de uma série de populações locais monomórficas com pequena troca genética entre elas tendo evoluído na direção de um complexo de distintas linhagens homozigotas.

Murphy (1978) analisando bioquimicamente 12 novos isolados de *T. pseudonana* Hasle & Heimdal e 25 novos isolados de *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve verificou a existência de genótipos heterozigotos para dois loci. Mantidos em cultura por 6 meses e retestados para esses mesmos loci, constatou que todos os heterozigotos para um deles e metade dos heterozigotos para outro haviam se torna-

do homozigotos. As implicações fisiológicas desta perda de condição heterozigota em clones mantidos em cultura não foi analisada, porém a autora salientou que qualquer alteração num clone resultante das condições de cultura reduz a utilidade deste clone como organismo teste para correlações ecológicas. Esses clones eram mantidos na mesma temperatura, salinidade, regime de luz e meio de cultura. Devido às condições das culturas assim mantidas ("batch") mudarem frequentemente em função do tempo, os recombinantes sexuais formados em diferentes momentos ao longo da curva de crescimento se separariam com forças seletivas inteiramente distintas. Consequentemente, mesmo se a seleção fosse operar a nível de loci individuais ao invés do fenótipo recombinante integral, poder-se-ia esperar recombinantes diferentes predominando em distintos frascos. O fator determinante da formação de gametas seria a condição ou condições ambientais, entretanto segundo a autora, os fatores que induzem a formação de gametas nas diatomáceas ainda estão por ser elucidados.

Baseadas nestes fatos e na hipótese que clones oceânicos poderiam gradualmente perder suas sensibilidades a determinados intoxicantes, após uma longa exposição à águas costeiras ligeiramente poluídas, Murphy & Belastock (1980) tentaram correlacionar a sensibilidade com a extensão de tempo na qual um clone é mantido em cultura. Os resultados obtidos por essas autoras não evidenciaram a perda de sensibilidade e um dos clones de *T. pseudonana* mantido em cultura nas condições mencionadas anteriormente desde 1958 apresentou uma sensibilidade idênti-

ca a dois outros clones correlatos isolados em 1977.

#### 4.4 - Produtividade primária

Os resultados da análise de variância dos dados referentes a produtividade primária expressa em  $\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3} \cdot 10^4$  células durante a fase exponencial de crescimento se encontram na tabela 4.9.

Esses resultados levaram a rejeição de todas as hipóteses nulas portanto conclui-se que as taxas de assimilação do Carbono na fase exponencial de crescimento apresenta diferenças significativas entre os clones, entre os meios e entre as temperaturas. Foram constatadas também influências recíprocas entre os clones e os meios de cultura, entre os clones e as temperaturas, entre os meios e as temperaturas e entre os três fatores ao mesmo tempo. Consequentemente o modelo para esses dados será:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + M_j + T_k + CM_{ij} + CT_{ik} \\ + MT_{jk} + CMT_{ijk} + E_{ijkl} \quad \text{onde } i=1, \dots,$$

$j = 1, \dots, 3 ; k = 1, \dots, 3 ; l = 1, 2$

A análise de agrupamento forneceu na primeira partição  $\lambda = 53,745$  e  $\lambda_C = 36,415$  (5%); na segunda partição  $\lambda = 7,599$  e  $\lambda_C = 32,85$ , para o 1º grupo  $\lambda = 9,158$  e  $\lambda_C = 11,143$  (2,5%) para o 2º grupo. Então, obteve-se dois grupos de médias homogêneas de 3,04 a 33,53 e de 41,25 a 81,86.

A produtividade primária ( $\text{mg C.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ ) expressa com base em  $10^4$  células foi significativamente diferente entre: o clone de Cananéia (C1) e o clone de Ubatuba (U5) e entre este e o clone de Ubatuba (U3) em meio Guillard a 24°C.

Na tabela 4.10 constam os dados de produtividade primária a partir dos quais foram construídos os gráficos das interações (figura 4.5).

Os resultados dos testes de significância mostram a existência de interações altamente significativas entre os meios e as temperaturas, entre os clones e os

Tabela 4.9 Análise de Variância dos dados da tabela 3.5 .

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=2.					
Média Total: 21,74093					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias (F)	
M	2	10422,26880	5211,13440	775,05176(M)	***
T	2	2415,41461	1207,70731	179,62225(T)	***
C	2	421,21179	210,60590	31,32340(C)	***
MT	4	5701,12183	1425,28046	211,98189(MxT)	***
MC	4	1099,17801	274,79450	40,87017(MxC)	***
TC	4	222,92492	55,73123	8,28890(TxC)	***
MTC	8	1309,55737	163,69467	24,34630(MxTxC)	***
ERRO	27	181,53708	6,72360		
TOTAL	53	21773,21484			
F 0,05 (2,27) = 3,35		F 0,01 (2,27) = 5,49		F 0,001 (2,27) = 9,02	
(4,27) = 2,73		(4,27) = 4,11		(4,27) = 6,33	
(8,27) = 2,31		(8,27) = 3,26		(8,27) = 4,76	

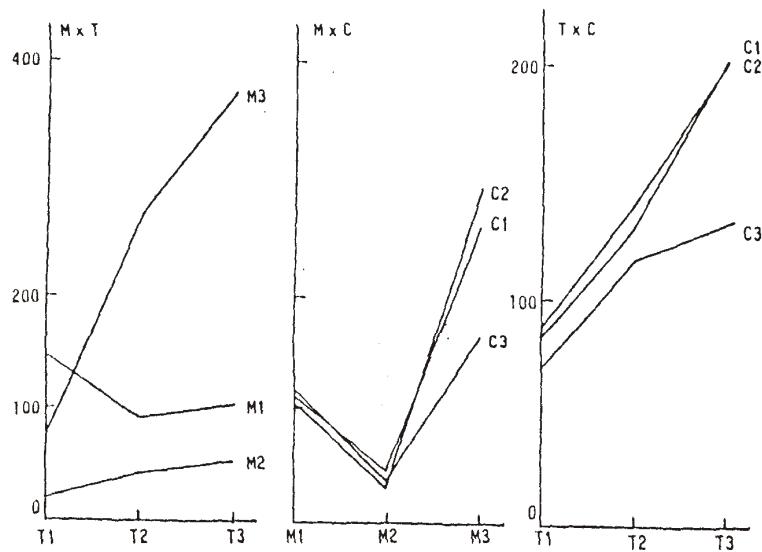
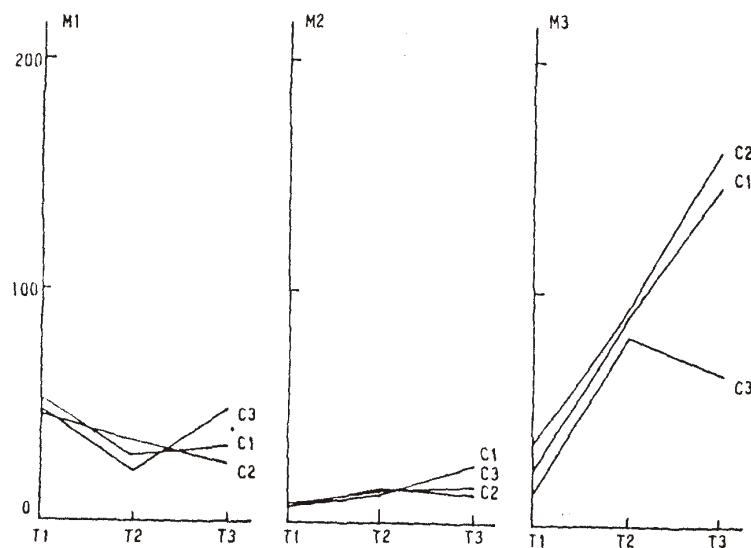


Figura 4.5 - Ilustração das interações de 1º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{ijk}$  ( $M \times T$ ),  $\bar{Y}_{ij}$  ( $M \times C$ ),  $\bar{Y}_{ik}$  ( $T \times C$ ) (parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{i1k}$  ( $M_1$ ),  $\bar{Y}_{i2k}$  ( $M_2$ ),  $\bar{Y}_{i3k}$  ( $M_3$ ) (parte inferior).

$\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas de assimilação do carbono durante a fase exponencial de crescimento.



meios e entre os clones e as temperaturas como se vê na figura 4.5, parte superior. Na parte inferior pode-se observar claramente que a interação dos clones com os meios depende dos níveis do fator temperatura.

Na tabela 4.11 estão os resultados da análise de variância referente à produtividade primária ( $mg\ C.h^{-1}.m^{-3}$ ) expressa por  $mg\ clorofila-a\ total$ .

Em face desses resultados foram rejeitadas as hipóteses  $H_{01}, H_{02}, H_{03}, H_{05}, H_{06}, H_{07}$ . As conclusões são idênticas a análise de variância anterior com exceção do fato de não ter sido constatada interação significativa entre os clones e os

meios. O modelo para esses dados será:

$$\bar{Y}_{ijkl} = \mu + C_i + M_j + T_k + CT_{ik} + MT_{jk} + CMT_{ijk} + E_{ijkl} \text{ onde } i=1, \dots, 3, j=1, \dots, 3; k=1, \dots, 3; l=1, 2.$$

A análise de agrupamento forneceu na primeira partição  $\lambda = 53,152$  e  $\lambda_C = 36,415$  (5%); na segunda partição  $\lambda = 8,84$  e  $\lambda_C = 32,852$  para o 1º grupo,  $\lambda = 6,56$  e  $\lambda_C = 14,45$  (2,5%) para o 2º grupo. Dessa forma obteve-se dois grupos de médias homogêneas de 0,60 a 7,29 e de 9,39 a 19,06.

A produtividade primária com base na clorofila-a total do clone de Cananéia (C1) foi significativamente diferente dos clones de Ubatuba (U3) e (U5) no meio

Tabela 4.10 Dados da tabela 3.5 (experimento fatorial 3<sup>3</sup>) redispostos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1ª e 2ª ordem (ver figura 4.5).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t1+t2+t3
		160C = t1	200C = t2	240C = t3	
ASP <sub>z</sub> = m1	CAN 1 = c1	53,23	28,84	32,53	114,60 (m1c1)
	UBA 3 = c2	46,00	34,83	25,19	106,20 (m1c2)
	UBA 5 = c3	48,66	21,99	49,04	119,69 (m1c3)
Total = c1+c2+c3		147,89 (m1t1)	85,66 (m1t2)	106,76 (m1t3)	340,49 (m1)
ERD - SC. = m2	c1	6,19	12,51	25,32	44,02 (m2c1)
	c2	6,08	14,19	13,36	33,63 (m2c2)
	c3	6,76	13,37	16,00	36,13 (m2c3)
Total = c1+c2+c3		19,03 (m2t1)	40,07 (m2t2)	54,68 (m2t3)	113,78 (m2)
GUILL. = m3	c1	25,19	90,00	146,80	261,99 (m3c1)
	c2	36,81	92,63	163,71	293,15 (m3c2)
	c3	15,22	82,49	67,05	164,76 (m3c3)
Total = c1+c2+c3		77,22 (m3t1)	265,12 (m3t2)	377,56 (m3t3)	719,90 (m3)
Total = m1 + m2 + m3	c1	84,61 (t1c1)	131,35 (t2c1)	204,65 (t3c1)	420,61 (c1)
	c2	88,89 (t1c2)	141,65 (t2c2)	202,26 (t3c2)	432,80 (c2)
	c3	70,64 (t1c3)	117,85 (t2c3)	132,09 (t3c3)	320,58 (c3)
Total = c1+c2+c3		244,14 (t1)	390,85 (t2)	539,00 (t3)	1173,99

Tabela 4.11 Análise de Variância dos dados da tabela 3.6.

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=2.					
Média Total: 5,08796					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias (F)	
M	2	265,93819	132,96910	227,68609(M)	***
T	2	626,02730	313,01365	535,98058(T)	***
C	2	12,24561	6,12281	10,48423(C)	***
MT	4	188,85563	47,21391	80,84548(MxT)	***
MC	4	2,76459	0,69115	1,18347(MxC)	ns
TC	4	11,73734	2,93434	5,02453(TxC)	**
MTC	8	63,01496	7,87687	13,48775(MxTxC)	***
ERRO	27	15,76805	0,58400		
TOTAL	53	1186,35168			
F 0,05 (2,27) = 3,35		F 0,01 (2,27) = 5,49		F 0,001 (2,27) = 9,02	
(4,27) = 2,73		(4,27) = 4,11		(4,27) = 6,33	
(8,27) = 2,31		(8,27) = 3,26		(8,27) = 4,76	

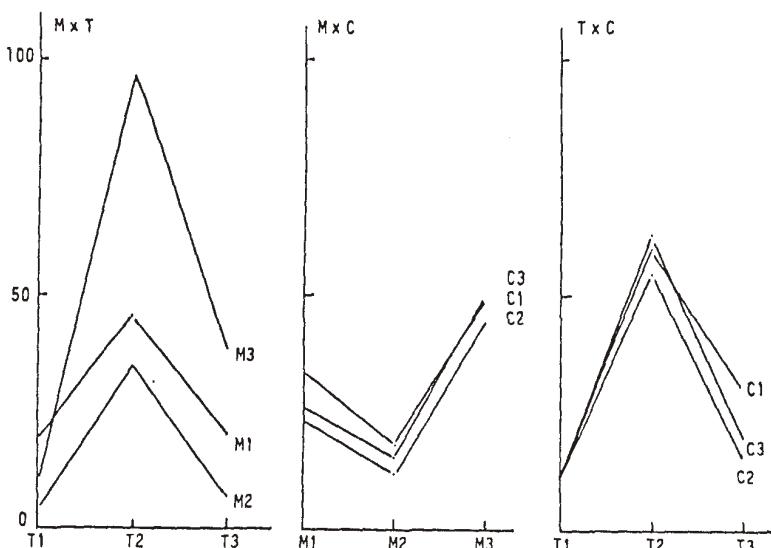
$ASP_2$  a 200°C. Entre esses dois últimos, nas mesmas condições, não foram determinadas diferenças significativas.

A tabela 4.12 apresenta os dados de produtividade a partir dos quais foram construídos os gráficos das interações (figura 4.6).

Os resultados dos testes de significância mostram a existência de interações altamente significativas entre os meios e as temperaturas e entre os clones e as temperaturas como se pode observar pelas interações das linhas nos gráficos superiores da figura 4.6. Os gráficos da interação de 2ª ordem mostram que a inter-

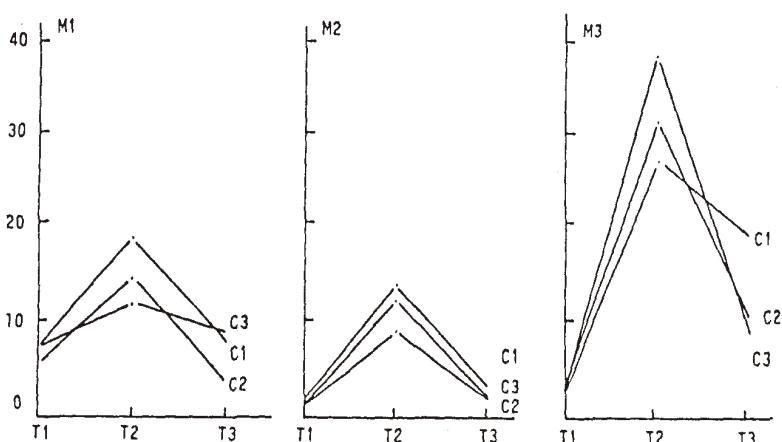
Tabela 4.12 Dados da tabela 3.6 (experimento fatorial 3<sup>1</sup>) redispuestos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1ª e 2ª ordem (ver figura 4.6).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t1+t2+t3
		160C = t1	200C = t2	240C = t3	
$ASP_2 = m1$	CAN 1 = c1	7,17	18,78	7,87	33,82 (m1c1)
	UBA 3 = c2	5,57	14,58	3,78	23,93 (m1c2)
	UBA 5 = c3	6,29	11,79	8,70	26,78 (m1c3)
Total = c1+c2+c3		19,03 (m1t1)	45,15 (m1t2)	20,35 (m1t3)	84,53 (m1)
ERD - SC. = m2	c1	1,77	13,71	3,30	18,78 (m2c1)
	c2	1,19	8,94	1,84	11,97 (m2c2)
	c3	1,39	12,16	2,27	15,82 (m2c3)
Total = c1+c2+c3		4,35 (m2t1)	34,81 (m2t2)	7,41 (m2t3)	46,57 (m2)
GUILL. = m3	c1	2,94	27,17	18,90	49,01 (m3c1)
	c2	3,83	31,08	9,87	44,78 (m3c2)
	c3	3,33	38,12	8,42	49,87 (m3c3)
Total = c1+c2+c3		10,10 (m3t1)	96,37 (m3t2)	37,19 (m3t3)	143,66 (m3)
$m1 + m2 + m3$	c1	11,18 (t1c1)	59,66 (t2c1)	30,07 (t3c1)	101,61 (c1)
	c2	10,59 (t1c2)	54,60 (t2c2)	15,49 (t3c2)	80,68 (c2)
	c3	11,01 (t1c3)	62,07 (t2c3)	19,39 (t3c3)	92,47 (c3)
Total = c1+c2+c3		33,48 (t1)	176,33 (t2)	64,95 (t3)	274,76



**Figura 4.6 - Ilustração das interações de 1º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{jk}$  ( $M \times T$ ) ,  $\bar{Y}_{ij}$  ( $M \times C$ ),  $\bar{Y}_{ik}$  ( $T \times C$ ) ( parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{1k}$  ( $M_1$ ) ,  $\bar{Y}_{2k}$  ( $M_2$ ),  $\bar{Y}_{3k}$  ( $M_3$ ) ( parte inferior).**

$\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas de assimilação do carbono durante a fase exponencial de crescimento.



ração dos clones com as temperaturas depende dos meios de cultura.

A tabela 4.13 mostra os resultados da análise de variância dos dados de produtividade primária ( $mg\ C.h^{-1}.m^{-3}$ ) expressos com base em  $10^4$  células durante a fase estacionária.

Em razão dos resultados obtidos todas as hipóteses foram rejeitadas e as conclusões são idênticas àquelas formuladas para os mesmos resultados durante a fase exponencial. Por conseguinte o modelo será:

$$\begin{aligned} Y_{ijkl} = & \mu + C_i + M_j + T_k + CM_{ij} + CT_{ik} + MT_{jk} + \\ & CMT_{ijk} + E_{ijkl} \end{aligned} \text{ onde } i = 1, \dots, 3 ; j = 1, \dots, 3 ; k = 1, \dots, 3 ; l = 1, 2.$$

A análise de agrupamento forneceu na

primeira partição  $\lambda = 58,920$  e  $\lambda_c = 36,415$  (5%); na segunda partição  $\lambda = 6,082$  e  $\lambda_c = 30,191$  para o 1º grupo,  $\lambda = 5,56$  e  $\lambda_c = 16,013$  (2,5%) para o 2º grupo. Consequentemente foram obtidos dois grupos de médias homogêneas de 0,18 a 5,37 e 6,52 a 12,53.

O clone de Cananéia (C1) diferiu de modo significativo dos clones de Ubatuba (U3) e (U5) no meio  $ASP_2$  a 16°C. Entre os clones de Ubatuba (U3) e (U5), nas mesmas condições, não foram observadas diferenças significativas.

A tabela 4.14 apresenta os dados de produtividade primária na fase estacionária de crescimento a partir dos quais foram construídos os gráficos das inte-

Tabela 4.13 Análise de Variância dos dados da tabela 3.7.

Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=2.					
Média Total: 4,08963					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias (F)	
M	2	257,15327	128,57664	900,65367(M)	***
T	2	268,46606	134,23303	940,27559(T)	***
C	2	1,97486	0,98743	6,91675(C)	***
MT	4	148,01680	37,00420	259,20703(MxT)	***
MC	4	25,06636	6,26659	43,89622(MxC)	***
TC	4	8,27681	2,06920	14,49435(TxC)	***
MTC	8	46,25774	5,78222	40,50328(MxTxT)	***
ERRO	27	3,85450	0,14276		
TOTAL	53	759,06641			
F 0,05 (2,27) = 3,35		F 0,01 (2,27) = 5,49		F 0,001 (2,27) = 9,02	
(4,27) = 2,73		(4,27) = 4,11		(4,27) = 6,33	
(8,27) = 2,31		(8,27) = 3,26		(8,27) = 4,76	

rações (figura 4.7).

Os testes de significância mostram a existência de interações altamente significativas entre os meios e as temperaturas, entre os clones e os meios e entre os clones e as temperaturas o que pode ser visto nos gráficos da figura 4.7, parte superior. Na parte inferior está evidenciado que a interação dos clones com os meios de cultura depende dos níveis do fator temperatura.

Tabela 4.14 Dados da tabela 3.7 (experimento factorial 3<sup>3</sup>) redispuestos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para ilustração das interações de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ordem (ver figura 4.7).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			
		16°C = t1	20°C = t2	24°C = t3	Total = t1+t2+t3
ASP <sub>2</sub> = m1	CAN 1 = c1	10,74	16,73	2,13	29,60 (m1c1)
	UBA 3 = c2	18,41	15,04	2,22	35,67 (m1c2)
	UBA 5 = c3	22,81	13,04	1,45	37,30 (m1c3)
Total = c1+c2+c3		51,96 (m1t1)	44,81 (m1t2)	5,80 (m1t3)	102,57 (m1)
ERD - SC = m2	c1	3,09	1,42	0,89	5,40 (m2c1)
	c2	5,45	1,39	0,36	7,20 (m2c2)
	c3	3,52	1,44	0,52	5,48 (m2c3)
Total = c1+c2+c3		12,06 (m2t1)	4,25 (m2t2)	1,77 (m2t3)	18,08 (m2)
GUILL. = m3	c1	25,05	6,72	10,18	41,95 (m3c1)
	c2	22,14	5,78	4,29	32,21 (m3c2)
	c3	14,53	5,49	6,06	26,08 (m3c3)
Total = c1+c2+c3		61,72 (m3t1)	17,99 (m3t2)	20,53 (m3t3)	100,24 (m3)
Total = m1+m2+m3	c1	38,88 (t1c1)	24,87 (t2c1)	13,20 (t3c1)	76,95 (c1)
	c2	46,00 (t1c2)	22,21 (t2c2)	6,87 (t3c2)	75,08 (c2)
	c3	40,86 (t1c3)	19,97 (t2c3)	8,03 (t3c3)	68,86 (c3)
Total = c1+c2+c3		125,74 (t1)	67,05 (t2)	28,10 (t3)	220,89

A tabela 4.15 mostra os resultados da análise de variância dos dados de produtividade primária (mg C.h<sup>-1</sup>.m<sup>-3</sup>) expressos com base na clorofila-a total durante a fase estacionária de crescimento.

Esses resultados conduziram à rejeição de todas as hipóteses e as conclusões são idênticas ao caso anterior; consequentemente o modelo será:

$$Y_{ijk\ell} = \mu + C_i + M_j + T_k + CM_{ij} + CT_{ik} + MT_{jk} + CMT_{ijk} + E_{ijk\ell}$$

onde  $i = 1, \dots, 3$ ;  $j = 1, \dots, 3$ ;  $k = 1, \dots, 3$ ;  $\ell = 1, 2$ .

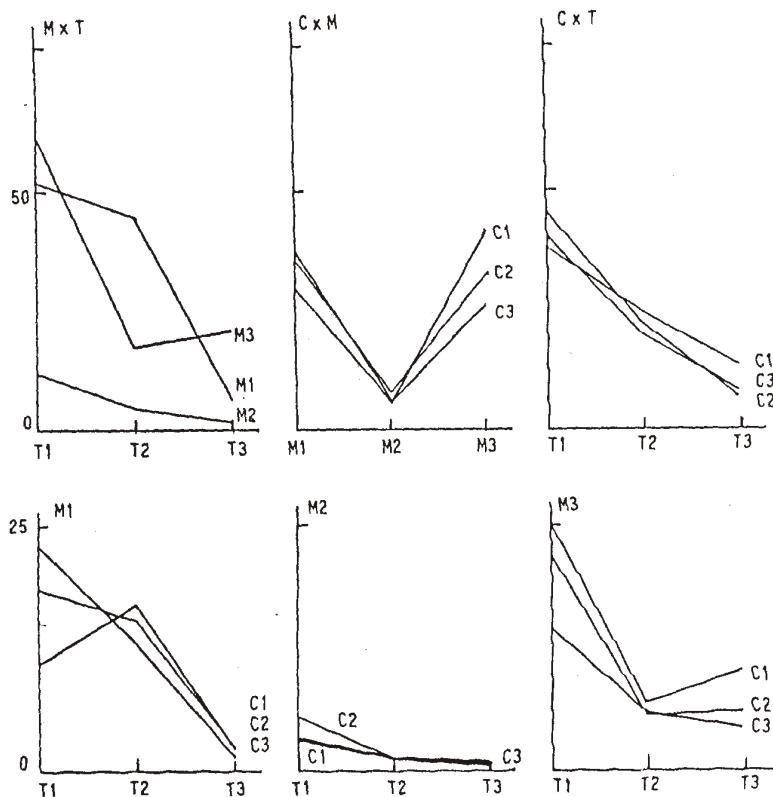


Figura 4.7 - Ilustração das interações de 1º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{jk}$  ( $M \times T$ ) ,  $\bar{Y}_{ik}$  ( $M \times C$ ) ,  $\bar{Y}_{ik}$  ( $T \times C$ ) (parte superior) e de 2º ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{ikl}$  ( $M_1$ ),  $\bar{Y}_{ikl}$  ( $M_2$ ),  $\bar{Y}_{ikl}$  ( $M_3$ ) ( parte inferior).  
 $\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas de assimilação do carbono durante a fase estacionária de crescimento.

A análise de agrupamento forneceu na primeira partição  $\lambda = 50,789$  e  $\lambda_c = 36,415$  (5%); na segunda partição  $\lambda = 3,168$  e  $\lambda_c = 23,337$ , para o 1º grupo;  $\lambda = 12,29$  e  $\lambda_c = 21,92$  (2,5%) para o 2º grupo. Assim obteve-se dois grupos de médias homogêneas de 0,56 a 1,77 e de 2,17 a 5,47.

No meio ASP<sub>2</sub> a 24°C o clone de Cananéia (C1) diferiu significativamente dos

clones de Ubatuba (U3) e (U5). Estes, nas mesmas condições, não apresentaram diferenças significativas.

A tabela 4.16 mostra os dados de produtividade primária a partir dos quais foram construídos os gráficos das interações.

A existência de interações altamente significativas entre os meios e as temperaturas, entre os clones

Tabela 4.15 Análise de Variância dos dados da tabela 3.8 .

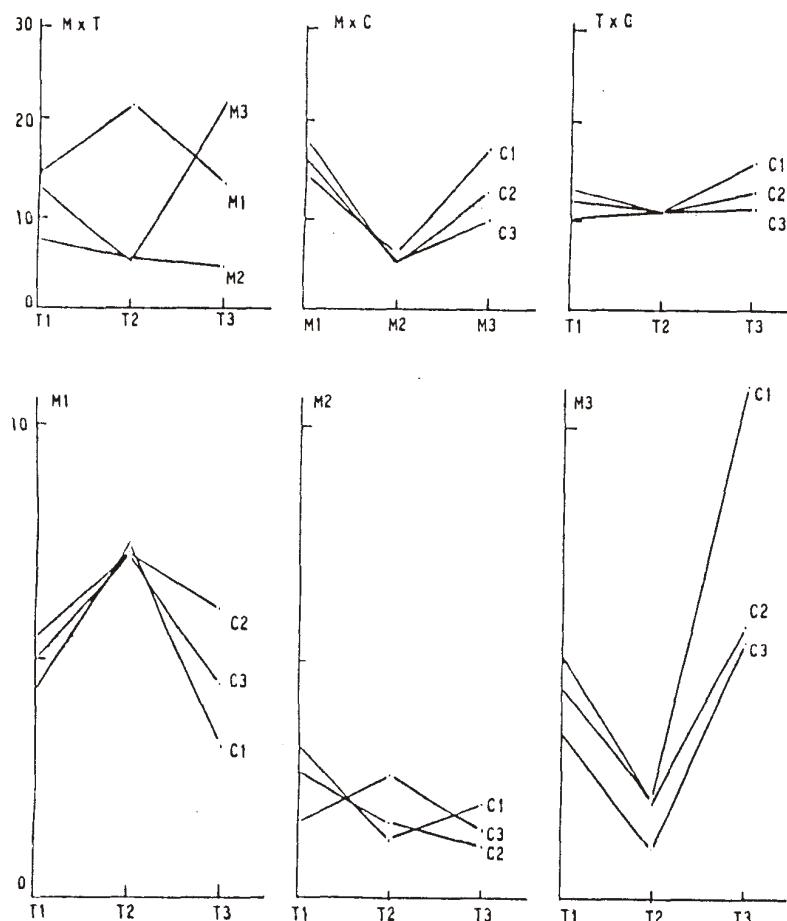
Níveis dos Fatores: M=3; T=3; C=3; R=2.					
Média Total: 2,02000					
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias(F)	
M	2	31,35663	15,67832	540,28660(M)	***
T	2	1,73008	0,86504	29,80989(T)	***
C	2	1,33671	0,66836	23,03204(C)	***
MT	4	29,15092	7,28773	251,14068(MxT)	***
MC	4	4,73976	1,18494	40,83389(MxC)	***
TC	4	1,48431	0,37108	12,78762(TxC)	***
MTC	8	6,62049	0,82756	28,51838(MxTxC)	***
ERRO	27	0,78350	0,02902		
TOTAL	53	77,20240			
F 0,05 (2,27) = 3,35		F 0,01 (2,27) = 5,49	F 0,001 (2,27) = 9,02		
(4,27) = 2,73		(4,27) = 4,11	(4,27) = 6,33		
(8,27) = 2,31		(8,27) = 3,26	(8,27) = 4,76		

Tabela 4.16 Dados da tabela 3.8 (experimento factorial 3<sup>3</sup>) redispuestos na forma de dupla entrada (two-way) com cada dado representando a soma dos blocos. Esses dados são colocados em gráfico para a ilustração das interações de 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> ordem (ver figura 4.8).

Fator M = Meio	Fator C = Clone	Fator T = Temperatura			Total = t1+t2+t3
		16°C = t1	20°C = t2	24°C = t3	
ASP <sub>1</sub> = m1	CAN 1 = c1	4,34	7,41	3,18	14,93 (m1c1)
	UBA 3 = c2	5,45	7,23	6,10	18,78 (m1c2)
	UBA 5 = c3	4,94	7,20	4,48	16,62 (m1c3)
Total = c1+c2+c3		14,73 (m1t1)	21,84 (m1t2)	13,76 (m1t3)	50,33 (m1)
ERD - SC. = m2	c1	3,86	1,22	2,03	6,58 (m2c1)
	c2	2,70	1,64	1,11	5,45 (m2c2)
	c3	1,63	2,61	1,45	5,69 (m2c3)
Total = c1+c2+c3		7,59 (m2t1)	5,54 (m2t2)	4,59 (m2t3)	17,72 (m2)
GUILL. = m3	c1	4,52	2,20	10,93	17,65 (m3c1)
	c2	5,25	2,13	5,83	13,21 (m3c2)
	c3	3,54	1,12	5,51	10,17 (m3c3)
Total = c1+c2+c3		13,31 (m3t1)	5,45 (m3t2)	22,27 (m3t3)	41,03 (m3)
Total = m1 + m2 + m3	c1	12,12 (t1c1)	10,90 (t2c1)	16,14 (t3c1)	39,16 (c1)
	c2	13,40 (t1c2)	11,00 (t2c2)	13,04 (t3c2)	37,44 (c2)
	c3	10,11 (t1c3)	10,93 (t2c3)	11,44 (t3c3)	32,48 (c3)
Total = c1+c2+c3		35,63 (t1)	32,83 (t2)	40,62 (t3)	109,08

e os meios e entre os clones e as temperaturas pode ser observada nas interações das linhas dos gráficos da figura 4.8, na parte superior. Na parte inferior pode-

se verificar que, como no caso anterior, a interação entre os clones e os meios de cultura é função dos níveis do fator temperatura.



**Figura 4.8 - Ilustração das interações de 1<sup>o</sup> ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{jk}$  (MxT),  $\bar{Y}_{ij}$  (MxC),  $\bar{Y}_{ik}$  (TxG) (parte superior) e de 2<sup>o</sup> ordem: ordenadas  $\bar{Y}_{ijk}$  (M1),  $\bar{Y}_{i2jk}$  (M2),  $\bar{Y}_{i3jk}$  (M3) (parte inferior).**

$\bar{Y}$  média dos efeitos combinados dos tratamentos sobre as taxas de assimilação do carbono durante a fase estacionária de crescimento.

Em resumo a análise estatística das respostas de assimilação do carbono para os três clones em fases distintas de crescimento mostra que: na fase exponencial de crescimento os clones de Cananéia (C1) e de Ubatuba (U3) apresentaram taxas de assimilação do carbono por célula significativamente maiores do que o clone de Ubatuba (U5) no meio Guillard a 24°. O mesmo ocorreu quando as taxas de assimilação foram expressas por clorofila-a total no meio ASP<sub>2</sub> a 20°. Entre os clones de Cananéia (C1) e de Ubatuba (U3) não foram verificadas diferenças significativas nas mesmas condições.

Vieira (1975) trabalhando com o mesmo clone de Ubatuba (U3) assinalou que a temperatura tem um importante papel na ecologia de *Phacodactylum tricornutum* na região de Ubatuba de onde foi isolado. Este autor verificou que esta espécie apresentava temperatura letal entre 25° e 30° indicando ainda que os dados pertinentes à ocorrência desta espécie mostra relação com temperaturas em torno de 22°C. Esta temperatura estava próxima do ótimo que obteve em laboratório (20°C) para a concentração de clorofila-a, assimilação do carbono relativa à clorofila e com o número máximo de células apenas 20% menor do que o máximo obtido (em 15°C). Ainda segundo este autor pouco se conhece sobre a ocorrência de *P. tricornutum* na região, porém, sua ausência em águas com temperaturas acima de 25°C deve ser algumas vezes apenas aparente, devido ao reduzido número de células e à ineficiência dos métodos de observação. Isso seria evidenciado quando amostras de superfície nessas temperaturas são enriquecidas com nutrientes e incubadas em laboratório; em poucos dias ocorre um florescimento intenso de

várias espécies pequenas e entre elas, *P. tricornutum*. Essa ocorrência na natureza em temperaturas próximas da letal, sem afetar a viabilidade, teria uma explicação provável no efeito atenuador do escuro do fotoperíodo natural.

As respostas desta espécie em amostras de água enriquecidas principalmente com nitrogênio (Teixeira & Vieira, 1976) e o fato de se encontrar a espécie em quantidades razoáveis em profundidade associada a águas frias mais ricas em nutrientes (Teixeira, 1973a), sugerem que o fator nutrientes deve ter papel relevante, interagindo com a temperatura no "standing-stock" da espécie na região de Ubatuba.

Quanto aos clones de Cananéia (C1) e de Ubatuba (U5), não existem dados sobre o comportamento fisiológico, pois foram utilizados pela primeira vez justamente neste trabalho. Entretanto parece interessante ressaltar que a taxa de assimilação do carbono relativa à clorofila-a do clone de Cananéia (C1), durante a fase exponencial de crescimento, foi significativamente mais alta do que as taxas apresentadas pelos clones de Ubatuba (U3) e (U5) na temperatura de 20°C em meio ASP<sub>2</sub>. Na temperatura de 24°C o clone de Cananéia (C1) apresentou uma taxa de assimilação do carbono por célula significativamente maior do que o clone de Ubatuba (U5) no meio Guillard. Em relação ao clone de Ubatuba (U3) não mostrou diferença significativa.

Já na fase estacionária o clone C1 apresentou uma taxa de assimilação do carbono por célula significativamente mais baixa do que os clones U3 e U5 no meio ASP<sub>2</sub> a 16° e resultado idêntico a 24° no

meio ASP<sub>2</sub> quando expresso relativamente à clorofila-a.

Caberia aqui ressaltar um importante aspecto ligado ao regime de luz em que foram mantidas as culturas neste trabalho e ao horário de execução dos experimentos com o carbono radioativo.

Sob condições naturais a maioria das algas vive sob períodos alternativos de várias horas de exposição à luz e ao escuro. Embora a maioria das algas cultivadas em laboratório seja mantida em condições de luz contínua, frequentemente são utilizados regimes alternados de luz-escuro com a finalidade de estimular as condições naturais mais comuns e obter sincronia na divisão celular. O crescimento em condições alternadas de luz-escuro produz ritmos nictemerais nas propriedades bioquímicas (Sournia, 1974) e, portanto, frequentemente não se justifica a associação de resultados obtidos com algas crescendo em regime de iluminação contínua e em regime de alternância luz-escuro.

Humphrey (1979) trabalhando com culturas de *P. tricornutum* crescendo sob uma intensidade luminosa de 80  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  sob iluminação contínua e sob fotoperíodo de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuro verificou que nessa última condição somente a taxa média de crescimento foi 30% menor sendo os demais parâmetros medidos superiores: taxa fotossintética (30%), concentração de clorofila (75%) e número de assimilação (45%). Constatou também que o número de assimilação era máximo 4 horas após o início do período de iluminação, período no qual, as taxas de fotossíntese e a concentração da clorofila-a aumentavam exponencialmente. Re-

petindo esses experimentos sob uma intensidade luminosa de 800  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  a qual é ligeiramente superior à intensidade de saturação, obteve para um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, taxas máxima de fotossíntese 41% maior, para a relação fotossíntese/ respiração valor 143% maior, para clorofila-a valor 47% maior, para número de assimilação valor 25% maior e para taxa de crescimento valor 36% menor.

De acordo com Humphrey (*op.cit*) ainda que trabalhar com células em regime de luz-escuro traga como vantagem uma abordagem mais próxima às condições naturais, por outro lado leva à necessidade de se manter o horário de amostragem consistente para eliminar a variação nas respostas bioquímicas causadas por mudanças rítmicas nas características metabólicas. Mesmo assim os ritmos endógenos ainda estariam presentes. As maiores taxas de fotossíntese, relação fotossíntese/ respiração e número de assimilação e, menores taxas de crescimento sugerem que o metabolismo seria elevado em intensidade para compensar a iluminação total reduzida.

#### 4.5 - Aspectos morfológicos

Diversas diatomáceas formam cadeias (Busch, 1974; Housely *et al.*, 1975) frequentemente por meio da interligação de projeções silicosas de suas valvas. No entanto *Phaeodactylum* não possui capa de sílica e a formação de cadeias nunca foi assinalada em condições naturais. Guillard (*in* Borowitzka *et al.*, 1977) verificou que, após 17 anos em cultura, células fusiformes e trirradiadas começaram a formar cadeias e o proces-

so prosseguiria durante os últimos 8 anos.

De acordo com Borowitzka *et al.*, (1977) tanto as células fusiformes como as trirradiadas são capazes de formar cadeias. Essas células, desprovidas de carapaças de sílica, se ligamumas às outras através da região central da teca deixando livres os braços. Nem a homogeneização nem o ultrasom rompem completamente as cadeias. A ligação é produzida pela fusão da parede celular na região central da célula durante a deposição da parede. Esta fusão resulta do sulco de clivagem do citoplasma ser insuficiente para separar as membranas plasmáticas das duas células filhas de modo que uma única parede é depositada ao invés de duas paredes separadas. Este autor observou que as quebras ocorriam numa cadeia quando apareciam sulcos de clivagens muito extensos e as duas novas células produziam paredes separadas ou que se aderiam tenuemente. Em clones que formavam somente cadeias curtas estas rupturas eram frequentes ocorrendo também quando uma célula era lesada ou morta; a célula rompida deixava uma teca ligada à célula da extremidade da cadeia. Para ele parece mais provável que a formação de cadeias em *Phaeodactylum* resulte de um único ponto de mutação a qual, frequentemente sofre reversão e, estudos visando verificar se o processo é geneticamente causado ou induzido pelo ambiente ajudariam a esclarecer o problema do polimorfismo nesta espécie.

No que se refere à ultraestrutura, Borowitzka & Volcani (1978) sustentam que *Phaeodactylum tricornutum* se assemelha a outras diatomáceas no tipo de divisão celular e na formação da valva si-

lica, quando esta ocorre. A deposição de sílica na forma ovóide bem como a ultraestrutura das células é completamente idêntica a de outras diatomáceas. A maioria das diatomáceas com valvas silicosas exibe alguma variação no tamanho, forma da célula e ornamentação das valvas porém nenhuma apresenta a extrema variação de *Phaeodactylum*. Como a ultraestrutura não difere grandemente entre seus morfótipos poderia ser postulada uma sequência de desenvolvimento do morfótipo ovóide para o fusiforme e trirradiado e vice-versa. Assim, por exemplo, a mudança da forma ovóide para fusiforme poderia ocorrer pelo gradual alongamento das células ovóides desprovidas de sílica na direção de seus braços. Tais mudanças seriam especialmente prováveis nesta espécie que não possuiu restrições derivadas de uma rígida valva silicosa. No entanto estes fatores não podem explicar a rápida e frequente alteração drástica nos morfótipos como se observa em culturas de *Phaeodactylum*. Os efeitos de fatores ambientais tais como salinidade, intensidade luminosa, agitação, concentrações variáveis de silicato, sobre o crescimento e o morfótipo neste organismo têm sido bastante estudados porém nenhum deles produziu qualquer alteração nos morfótipos.

As fontes e concentrações dos nutrientes nitrogênio e fósforo parecem também não exercer efeito (Wilson, 1946; Hayward, 1965; 1968a; 1968b; 1970; Antia *et. al.*, 1975) e igualmente condições de cultura a longo prazo, uma vez que os principais morfótipos e seus intermediários ocorrem na natureza (Wilson, 1946; Ryther, 1954; Lewin & Philpott, 1958).

As células ovóides apresentam um material capsular mucilaginoso não presente nas células fusiformes, composto de xilose, manose; fucose e galactose (Lewin, 1958). Provavelmente a presença desse material mucilaginoso explique o fato das formas ovóides, quase sempre terem sido observadas formando grumos de tamanhos variáveis especialmente para o clone de Ubatuba (U5) (Figura 3.10 G e J).

Entretanto para o comportamento do clone de Cananéia (C1) formando grumos de células aparentemente unidos por uma das extremidades (figura 3.10A) não foram encontradas menções na literatura pertinente.

Wilson (1946) tentando seguir o ciclo de vida deste organismo em culturas com meio líquido notou que, naquelas culturas originárias de células ovóides, surgiam células com braços curtos e que a extensão média dos braços aumentava em sucessivas repicagens. Muito embora estas células ostentassem dois braços, ocasionalmente observava a origem de formas trirradiadas e de outras formas variantes.

Lewin (1958) estudando o desenvolvimento de células em ágar, através de desenhos feitos diariamente, observou que as células ovóides se dividiam dando origem à células ovóides e que as células fusiformes se dividiam formando células fusiformes com comprimento e forma similares, confirmando as observações de Wilson. Observou também que células dilatadas, com aproximadamente 25  $\mu$  de comprimento, produziam um par de células ovóides (conforme Wilson, figura 2) pela

divisão do protoplasma dentro da porção central dilatada da célula. Estas células ovóides algumas vezes se dividiam novamente e eram liberadas pela ruptura da parede celular original. Esta observação não apoia a suposição de Wilson que células ovóides derivariam de células fusiformes por divisão desigual.

A observação das células dos três clones estudados mostrou formas bastante raras dilatadas em sua porção central aparentemente com 2 células ovóides no interior (figura 3.10B) semelhantes às descritas anteriormente por esses autores.

Lewin (*op. cit.*) notou também que as culturas em ágar ocasionalmente continham auxósporos esféricos, caracterizados por porções de protoplasma vacuolizadas e nuas de 6 a 12  $\mu$  de diâmetro. Tentativas de seguir o destino destes auxósporos em ágar foram infrutíferas. De 64 subclones originados de algumas colônias em ágar e crescendo em meio líquido, verificou que uma delas apresentava todas as células inicialmente triradiadas. Este clone foi mantido durante muito tempo até que grandes quantidades de células ovóides fossem produzidas. Semeadas em ágar e reisoladas para meio líquido, quando examinadas 28 dias após essas culturas só apresentavam células ovóides. Então foram transferidas para meio com triptona. Dez dias depois todas as culturas produziram abundantes quantidades de células fusiformes. Uma vez que, nenhuma forma triradiada fora observada, concluiu que esta forma não persiste além do estágio intermediário das células ovóides, confirmando as observações de Wilson

(1946) e de Droop (Hendey, 1954) e apoian do o ponto de vista que as formas trirradiadas não representam estágios normais do ciclo de vida.

Ainda de acordo com Lewin, parece ser opinião generalizada da maioria dos pesquisadores que estudaram *Phaeodactylum tricornutum* que as células ovóides e fusiformes representam os estágios típicos prevalentes no ciclo de vida. Com o cultivo prolongado na superfície do ágar predominam as células ovóides, aparentemente sendo favorecidas uma vez que têm uma certa facilidade de espalhar-se sobre este tipo de substrato. Com o cultivo prolongado em meio líquido, por outro lado, predominam as formas fusiformes, aparentemente em vantagem porque em culturas crescendo ativamente essas formas têm melhor fluidez enquanto que as formas ovóides tendem a se associar em grumos e afundar. As formas trirradiadas têm sido as únicas facilmente reconhecíveis em amostras de águas litorais. As células fusiformes podem ser confundidas com *Nitzschia closterium* e as ovóides, quando notadas seriam classificadas como diatomáceas penadas não identificadas. As formas trirradiadas raramente se formam em laboratório, porém em certas condições, como em culturas estáticas, tais células podem ser favorecidas pela seleção, talvez devido a uma redução na taxa de afundamento, podendo predominar em relação às outras formas. Além das formas trirradiadas, células cruciformes, curvadas e outras formas anomais foram ocasionalmente observadas. Quando tais anomalias morfológicas aparecem, elas se reproduzem clonalmente, formando células filhas com a mesma forma da célula parental, uma vez que a divisão celular ocorre num plano longitudinal. A men-

brana celular é evidentemente inelástica o bastante para manter sua característica de forma através de sucessivas divisões celulares. Entretanto variantes deste tipo tendem a persistir somente até produzir células ovóides, já que estas, em seu devido tempo, dão origem à células fusiformes normais.

Os três clones utilizados nos experimentos comparativos deste trabalho não exibiram diferenças morfológicas notáveis afora aquelas relativas ao tamanho das células e aspecto geral dos cromatóforos inerentes ao estado fisiológico das culturas em suas distintas fases de crescimento.

Entretanto a constatação de diferentes comportamentos morfológicos por parte dos três clones (figura 3.10A a J) mantidos em condições estáticas em baixa temperatura e intensidade luminosa sugere que se possa tratar de três linhagens fisiologicamente distintas da mesma espécie.

Existe uma tendência em direção à pleiomorfia maior em determinados clones do que em outros sugerindo que a mudança na forma é, em parte, de origem genética (Borowitzka & Volcani, 1978).

Por outro lado o crescimento de *P. tricornutum* é estimulado pela giberelina e pela cinetina (Bentley-Mowat & Reid, 1968) sabendo-se que estes e muitos outros fitormônios atuam na diferenciação, crescimento e divisão celular em outras algas (Augier, 1974); esses fatos poderiam estar ligados às mudanças na forma as quais poderiam ser induzidas ou controladas por fitormônios liberados tanto por outras algas como pelo próprio *Phaeodactylum*.

## 5 - CONCLUSÕES

5.1 - Muito embora a monitoração do "standing-stock" das populações mantidas em culturas através da fluorescência *in vivo* apresente ótimas correlações com as densidades celulares e com a clorofila-a total e, por conseguinte obtenham-se coeficientes angulares derivados das regressões lineares idênticos ou com diferenças não significativas, raramente as estimativas das taxas máximas de crescimento são similares para os dois métodos; as medidas de fluorescência *in vivo* são adequadas como parâmetro descritivo, por exemplo, na construção de uma curva de crescimento visando obter-se apenas o padrão de resposta de uma cultura. A temperatura e a condição nutricional do meio de cultura influem de modo apreciável no comportamento dessa variável tornando significativas as diferenças entre as estimativas feitas pelos dois métodos. As contagens celulares são mais precisas para se estimar as taxas máximas de crescimento.

5.2 - Considerando-se os coeficientes de variação médios relativos às contagens celulares e a fluorescência *in vivo*, a variância do resíduo desta última foi três vezes maior. A densidade celular, a fluorescência *in vivo* e a clorofila-a total log transformadas para a construção das curvas de crescimento apresentaram variações que não diferem de modo significante e portanto as sensibilidades dos três métodos se situam praticamente num mesmo nível.

5.3 - A constatação de diferenças estatisti-

ticamente significantes obtidas com parâmetros fisiológicos importantes como as taxas máximas de crescimento e as taxas de assimilação do carbono além do comportamento polimórfico exibido pelos três clones estudados neste trabalho corroboram no sentido de que devem se constituir em linhagens fisiológicas distintas da mesma espécie de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

## 6 - RESUMO

ciformes bem como formação de cadeias, só foram observados no clone U3.

Através de bioensaios estáticos foram comparadas as taxas máximas de crescimento, razão de fotossíntese em termos de clorofila-a e de célula, bem como o rendimento final de três clones de *Phaeodactylum tricornutum* visando verificar uma possível existência de diferenças intraespécificas entre eles. Dois desses clones foram isolados a partir de amostras de Ubatuba (U3, isolado em 1972 e U5 isolado em 1979) e um de Cananéia (C1, isolado em 1980). Todos os resultados foram submetidos a uma análise de variância trifatorial e a uma análise de agrupamento com a finalidade de discriminar as condições experimentais nas quais os três clones diferiram significativamente em suas respostas fisiológicas. Durante a fase exponencial de crescimento os três clones se apresentaram com morfótipos fusiformes raramente se encontrando morfótipos ovóides e triradiados. O padrão das curvas de crescimento dos três clones em diferentes temperaturas (16, 20, 24°C) e meios de cultura (ASP 2, Erd-Schreiber, Guillard f1) não diferiu. Os resultados obtidos indicaram a existência de diferenças significativas nas taxas de crescimento e produtividade primária. Morfótipos ovóides formando grumos foram observados nos três clones após a fase exponencial e de modo conspícuo no clone U5. Nas mesmas condições, o clone C1 apresentou uma grande quantidade de grumos, com a forma de uma estrela, constituídos por morfótipos fusiformes unidos convergentemente por uma das extremidades de cada célula. Por outro lado, morfótipos triradiados e cru-

## 7 - ABSTRACT

A comparison of the maximum growth rates, primary productivity on chlorophyll-a and cell basis, and maximum yield achieved in batch culture of three clones of *Phaeodactylum tricornutum* has been carried out in order to check intraespecific differences among them. Two of the clones were isolated from samples of Ubatuba (U3, isolated in 1972 and U5, in 1979), while the third one was isolated from samples of Cananéia (C1, isolated in 1980) Three-way analysis of variance was accomplished and cluster analysis was carried out to distinguish the experimental conditions in which the clones would show distinct physiological responses. During the log phase of growth the three clones usually presented fusiform type of cells. Nevertheless, rare oval and triradiate cells have been observed. The pattern of the growth curves submitted to different temperatures (16, 20, 24°C) and media (Guillard f1, Erd-Schreiber, ASP2) was the same for the three clones. The results indicated significant differences in growth rates and primary productivity. Oval morphotypes in clusters have been observed in all clones after the log phase under exhausted media. The clone U5 has exhibited this behaviour in a prominent way. Many star-shape clusters, constituted of fusiform morphotypes linked by one of the extremities of each cell were observed in clone C1. On the other hand, triradiate and cruciform cells, and the formation of chains, were observed only in clone U3.

## 8 - BIBLIOGRAFIA

AIDAR-ARAGÃO, E.

1980.

Alguns aspectos da autoecologia de *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve de Cananéia (25°S 48°W), com especial referência ao fator salinidade. Tese de doutoramento. São Paulo, Univ. S Paulo, Instituto Oceanográfico, Departamento de Oceanografia Biológica, 190 pp.

AUGIER, H.

1974.

Les phytohormones des Algues. II. Etude physiologique. Ann. Sci. Nat. Bot. Paris ser. 12. 15:119-80.

BALANTINE, D.

1953.

Comparison of the different methods of estimating nannoplankton. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 32(1):129-42.

BEARDALL, J. &amp; MORRIS, I.

1975.

Effect of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). II. Effect of oxygen. J. Phycol. 11(4):430-34.

&amp;

1976.

The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Biol. 37(4):377-87.

BENTLEY-MOWAT, J.A. &amp; REID, S.M.

1968.

Effect of gibberellins, kinetin and other factors on the growth of unicellular marine algae in culture. Bot. Mar. 12:185-99.

BERLAND, B.

1966.

Contribution à l'étude des cultures de diatomées marines. Rec. Trav. Sta. mar. Endoume. 40, fasc. 56:3-82.

\_\_\_\_\_, BIANCHI, H.G. & MAESTRINI, S.Y.

1969.

Study of bacteria associated with marine algae in culture. I. Preliminary determination of species. Mar. Biol. 2:350-55.

BOROWITZKA, M.A., CHIAPPINO, M.L. & VOLCANI, B.E.

1977.

Ultrastructure of a chain-forming diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. J. Phycol. 13:162-70.

\_\_\_\_\_, & VOLCANI, B.E.

1978.

The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. J. Phycol. 14:10-21.

BOURRELY, P. &amp; DRAGESCO, J.

1955.

Contribution à la croissance d'une algue rarissime "*Phaeodactylum tricornutum*". Bohlin. Bull. Microsc. Appl. 5:41-4.

BRAY, G.A.

1960.

A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a

- liquid scintillation counter. *Anal.Biochem.* EPA.  
1:279-85. 1971.
- BUSCH, D.E. Algal Assay Procedure: Bottle Test. National Eutrophication Research Program. Environmental Protection Agency. 82pp.  
1974.
- Ultrastructure of the filamentous habit in the diatom *Navicula confervacea* (Kutz) Grun. *J.Phycol.* 10:241-43. EPA. 1971.
- CARRETO,J.I. & CATOGGIO, J.A. Inter-Laboratory Precision Test. An Eight-Laboratory Evaluation of the Provisional Algal Assay Procedure Bottle Test. National Eutrophication Research Program. Environmental Protection Agency 70pp.  
1977.
- An indirect method for the rapid estimation of carotenoid content in *Phaeodactylum tricornutum*: possible application to other marine algae. *Mar.Biol* 40(2):109-16. FISHER, N.S. 1977.
- COLLOS, Y. & SLAWYK, G. On the differential sensitivity of estuarine and open-ocean diatoms to exotic chemical stress. *Am.Nat.* 111:871-95.  
1979.
- <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N uptake by marine phytoplankton. 1. Influence of nitrogen source and concentration in laboratory cultures of diatoms. *J.Phycol.* 15(2):186-90. \_\_\_\_\_, GRAHAM, L.B., CARPENTER,E. J. & WURSTER, C.F. 1973.
- COUGHLAN, J. Geographic differences in phytoplankton sensitivity to PCBs. *Nature*. 241:548-9.  
1962.
- Chain formation by *Phaeodactylum tricornutum*. *Nature London*. 195:831-2.
- DARLEY, W.M. FØYN, B. 1934a.
- Deoxyribonucleic acid content of the three cell types of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *J.Phycol.* 4:219-20. Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceen *Cladophora suhriana* Kützing. *Arch.Protistenk.* 83:1-56.
- D'ELIA, C.F. & GWILLARD, R.R.L. GARGAS, E. & PEDERSEN, J.S. 1974.
- Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. 1. Nutrient effects. *Mar.Biol.* 50:305-12. Algal Assay Procedure Batch Technique. Water Quality Research Institute of Denmark. 48pp.
- GLOVER, H. 1977.

- Effects of iron deficiency on *Isochrysis galbana* (Chrysophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 13(3):208-12.
- \_\_\_\_\_, BEARDALL, J. & MORRIS, I. 1965.
- Effects of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). I. Effect of nitrogen deficiency and light intensity. *J. Phycol.* 11(4):424-29.
- GOLDMAN, J.C. 1968a.
- Biomass production in mass cultures of marine phytoplankton at varying temperatures. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 27(2):161-69.
- GUILLARD, R.R.L. 1968b.
- Division rates. In: *Handbook of Phycological Methods, Cultures Methods and Growth Measurements*, pp. 289-311. Ed. by J.R. Stein. London, Cambridge Univ. Press.
- \_\_\_\_\_, & RYTHER, J.H. 1968c.
- Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-39.
- \_\_\_\_\_, & KILHAM, P. 1969.
- The ecology of marine planktonic diatoms. In: *The Biology of Diatoms, Botanical Monographs*, Vol. 13, pp. 372-469. Ed. by D. Werner. The Whitefriars Press.
- HAYWARD, J. 1970.
- Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. VI. The relationship to sodium, potassium, calcium and magnesium. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 50(2):293-99.
- HENDEY, N.I. 1954.
- Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). I. The effect of certain organic nitrogenous substances on growth. *Physiol. Plant.* 18:201-207.
- Studies on growth of *Phaeodactylum tricornutum*. II. The effect of organic substances on growth. *Physiol. Plant.* 21:100-108.

- Note on the Plymouth "Nitzschia" culture. LEME, R.A.S.  
*J.Mar.Biol.Assoc.U.K.* 33:335-9. 1958.
- HOLDSWORTH, E.S. & COLBECK, J. Análise de Regressão. Testes de Significância. In: *Curso de Estatística*. Vol.II  
 1976. , pp. 13.78-13.103. Escola Politécnica  
*da Univ. de São Paulo.*
- The pattern of carbon fixation in the marine unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar.Biol.* 38:189-99.
- HOUSELY, H.L., SCHEETZ, R.W. & PESSONEY, LEWIN, J.C.  
 G.F. 1958.
- Filament formation in the diatom *Skeletosphaera costatum*. *Protoplasma*. 86:363-69.
- HUMPHREY, G.F. \_\_\_\_\_, LEWIN, R.A. & PHILPOTT, D.E.  
 1975. 1958.
- Photosynthetic characteristics of algae Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *J.Gen.Microbiol.* 18:418-26.
- grown under constant illumination and  
 light-dark regimes. *J.exp.mar.Biol.Ecol.*  
 40:63-70.
- JEFFREY, S.W. & HUMPHREY, G.F. \_\_\_\_\_ & GUILLARD, R.R.L.  
 1975. 1963.
- New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem.Physiol.Pflanz.* 167: LI-COR.  
 191-94. 1979.
- JENSEN, A., RYSTAD, B. & MELSON, S. Quantameter Lambda-LI-185A., quantum sensor LI-190S. LI-COR, Inc. Instrumentation for biological and environmental sciences. Instruction Manual.
- Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. I. The tolerance of three algal species to zinc in coastal sea water. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 15:145-157.
- KUENTZLER, J.E. & KETCHUM, B.H. LOFTUS, M.E. & SELIGER, H.H.  
 1962. 1975.
- Rate of phosphorus uptake by *Phaeodactylum tricornutum*. *Biol.Bull.* 123:134-45.
- LUND, J.W.G., KIPPLING, C. & LECREN, E.D.

- 1958.
- The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11:143-70.
- MC LACHLAN, J.  
1973.
- Growth Media-Marine. In: *A Handbook of Phycological Methods, Cultures Methods and Growth Measurements*, pp. 25-51. Ed. by J.R. Stein. London, Cambridge Univ. Press.
- MORRIS, I. & GLOVER, H.E.  
1974.
- Questions on the mechanism of temperature adaptation in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 24(2):147-54.
- \_\_\_\_\_ & YENTSCH, C.S.  
1974.
- Products of photosynthesis by marine phytoplankton: the effect of environmental factors on relative rates of protein synthesis. *Mar.Biol.* 27(1):1-9.
- MUKERJI, D. & MORRIS, I.  
1976.
- Photosynthetic carboxilating enzymes in *Phaeodactylum tricornutum* assay methods and properties. *Mar.Biol.* 36(3):199-206.
- MURPHY, L.S.  
1978.
- Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. II. Loss of heterozygosity in clonal cultures of the centric diatoms *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*. *J.Phycol.* 14:247-50.
- \_\_\_\_\_ & GUILLARD, R.R.L.  
1976.
- Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. I. The centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *T. fluviatilis*. *J.Phycol.* 12 (1):9-13.
- \_\_\_\_\_ & BELASTOCK, R.A.  
1980.
- The effect of environmental origin on the response of marine diatoms to chemical stress. *Limnol.Oceanogr.* 25(1):160-65.
- NECAS, J.  
1979.
- Genetic variability and the resulting nonhomogeneity in algal populations. In: *Algal Assays and Monitoring Eutrophication*, pp. 141-152. Ed. by P.Marvan, S.Pribil & O.Lhotsky. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nagele u. Obermiller) Stuttgart.
- NEUVILLE, D., DASTE, P. & GENEVES, L.  
1971.
- Sur une souche axénique de *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) isolée à partir d'une claire de l'île d'Oléron. *C.R.Acad.Sci.Ser.D.* 273:1221-3.
- OSTLE, B. & MENSING, R.W.  
1975.
- Design of experimental investigations. In: *Statistics in Research. basic concepts and techniques for research workers*, pp. 258-88. The IOWA State University Press/AMES.
- PRINGSHEIM,E.G.

- Pure cultures of algae. 119 pp. Cambridge Univ. Press, London.
- PROVASOLI, L. MC LAUGHLIN, J.J.A. & DROOP, M.R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch.Mikrobiol.* 25:392-425.
- QURAISHI, F.O. 1968. The reaction of phytoplankton to different illumination regimes. Ph.D. thesis, University of Wales Bangor.
- \_\_\_\_\_  
 & SPENCER, C.P. 1971. Studies on the growth of some marine unicellular algae under different artificial light sources. *Mar.Biol.* 8:60-65.
- RAYMOND, L.P. 1978. Initial investigations of a shallow-layer algal production system. Technical Report NO. 7. 38 pp. Hawaii Natural Energy Institute. University of Hawaii, Honolulu.
- RAYMONT, J.E.G. & ADAMS, M.N.E. 1958. Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. *Limnol.Oceanogr.* 3(2):119-36.
- REIMANN, B.E.F. & VOLCANI, B.E. 1968. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. III. The structure of the cell wall of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *J.Ultrastruct.Res.* 21:182-93.
- ROBINSON, G.A. & COLBURN, D.J. 1970. Continuous plankton records: Further studies on the distribution of *Rhizosolenia styliformis* Brightwell. *Bull.mar.Ecol.* 6:303-31.
- RYTHER, J.H. 1954. The ecology of phytoplankton blooms in Moriches Bay and Great South Bay, Long Island, New York. *Biol.Bull.* 106:198-209.
- SCOTT, A.J. & KNOTT, M. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics.* 30:507-12.
- SHIMURA, S. & FUJITA, Y. 1975. Changes in the activity of fucoxanthin-excited photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under different culture conditions. *Mar.Biol.* 33(3):185-94.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 776 pp. W.H.Freeman. S.Francisco.
- SOURNIA, A. 1974. Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Adv.mar.Biol.* 12:325-89.
- SPENCER, C.P.

1952.  
On the use of antibiotic for isolating  
bacteria-free cultures of marine phyto  
plankton organisms. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.*  
31:87-106.
- 
1954.  
Studies on the culture of a marine diatom. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* 33:265-90.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H.
1960.  
Principles of experimental design. In:  
*Principles and Procedures of Statistics  
with special reference to the Biological  
Sciences*, pp. 88-98. Mc Graw-Hill Book  
Company, Inc.
- STEEMANN-NIELSEN, E.
1952.  
The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for  
measuring organic production in the sea.  
*J.Cons.perm.int.Explor.Mer.* 18(2):117-40.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R.
1968.  
A practical handbook of sea water analysis  
*Bull.Fish.Res.Bd Canada.* 167:311pp.
- TEIXEIRA, C.
- 1973a.  
Preliminary studies of primary production  
in the Ubatuba region. *Bolm Inst.oceanogr.*  
, S Paulo. 22:49-58.
- 
- 1973b.  
Introdução aos métodos para medir a pro-  
dução primária do fitoplâncton marinho.  
*Bolm Inst.oceanogr.*, S Paulo. 22:59-92.
- 
- & VIEIRA, A.A.H.  
1976.  
Nutrient experiment using *Phaeodactylum  
tricornutum* as an assay organism. *Bolm  
Inst. oceanogr.*, S Paulo. 25:29-42.
- TEXAS INSTRUMENTS.
1977.  
Applied Statistics. Solid State Software  
module for TI Programmable 58/59. 91 pp.  
Texas Instruments Inc.
- 
1978.  
Statistical Testing. Specialty Pakettes  
for TI Programmable 58/59. 84 pp. Texas  
Instruments Inc.
- VIEIRA, A.A.H.
1975.  
Estudos experimentais em fitoplancton  
marinho. Culturas e aspectos ecofisioló-  
gicos. Dissertação de mestrado. São Pau-  
lo, Univ. S Paulo, Instituto Oceanográ-  
fico, Departamento de Oceanografia Bio-  
lógica, 162 pp.
- VON OERTZEN, J.A.  
1976.  
Problems in normal bioassay work and  
toxicity testing. FAO; Rome (Italy)FAO-  
TF-INT-173 (SWE) Suppl.1. pp. 47-67.
- WILSON, D.P.  
1946.  
The triradiate and other forms of *Nitzs-  
chia closterium* (Ehrenberg) Wm. Smith  
forma *minutissima* of Allen and Nelson.  
*J.Mar.Biol.Assoc.U.K.* 26:235-70.
- ZENKEVITCH, L.A.

1963.  
*Biology of the Seas of the USSR.* 955 pp.  
Interscience Pub., New York.

## 9 - ANEXO

9.1 - Experimentos comparativos entre três clones de *P. Tricornutum*

Tabelas A1 a A28

Tabela A 1 - Resultados das contagens de células para o clone de Cananéia(C1) a 16°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	9,30x10 <sup>3</sup>	1,09x10 <sup>4</sup>	1,32x10 <sup>4</sup>	1,11x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,39x10 <sup>4</sup>	1,27x10 <sup>4</sup>	1,03x10 <sup>4</sup>	1,89x10 <sup>4</sup>	1,40x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,86x10 <sup>4</sup>	1,23x10 <sup>4</sup>	7,35x10 <sup>3</sup>	8,90x10 <sup>3</sup>	9,52x10 <sup>3</sup>	$\pm$ 4,88x10 <sup>3</sup>	9,52x10 <sup>3</sup>	8,88x10 <sup>3</sup>	
1	1,92x10 <sup>4</sup>	2,16x10 <sup>4</sup>	2,52x10 <sup>4</sup>	2,20x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,59x10 <sup>4</sup>	3,98x10 <sup>4</sup>	3,86x10 <sup>4</sup>	4,10x10 <sup>4</sup>	3,98x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,24x10 <sup>4</sup>	2,20x10 <sup>4</sup>	2,13x10 <sup>4</sup>	2,35x10 <sup>4</sup>	2,23x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,22x10 <sup>4</sup>	2,23x10 <sup>4</sup>	2,23x10 <sup>4</sup>	
2	5,76x10 <sup>4</sup>	6,23x10 <sup>4</sup>	5,63x10 <sup>4</sup>	5,87x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,63x10 <sup>4</sup>	1,58x10 <sup>5</sup>	1,50x10 <sup>5</sup>	1,66x10 <sup>5</sup>	1,58x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,16x10 <sup>5</sup>	6,23x10 <sup>4</sup>	7,11x10 <sup>4</sup>	7,00x10 <sup>4</sup>	6,78x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,94x10 <sup>4</sup>	6,78x10 <sup>4</sup>	6,78x10 <sup>4</sup>	
3	1,34x10 <sup>5</sup>	1,25x10 <sup>5</sup>	1,47x10 <sup>5</sup>	1,35x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,22x10 <sup>5</sup>	3,50x10 <sup>5</sup>	3,76x10 <sup>5</sup>	4,01x10 <sup>5</sup>	3,76x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,51x10 <sup>5</sup>	1,38x10 <sup>5</sup>	1,67x10 <sup>5</sup>	1,60x10 <sup>5</sup>	1,55x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,29x10 <sup>5</sup>	1,55x10 <sup>5</sup>	1,55x10 <sup>5</sup>	
4	2,64x10 <sup>5</sup>	2,60x10 <sup>5</sup>	2,12x10 <sup>5</sup>	2,45x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,57x10 <sup>5</sup>	7,20x10 <sup>5</sup>	8,09x10 <sup>5</sup>	8,33x10 <sup>5</sup>	7,87x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,18x10 <sup>5</sup>	2,94x10 <sup>5</sup>	3,68x10 <sup>5</sup>	3,56x10 <sup>5</sup>	3,39x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,78x10 <sup>5</sup>	3,39x10 <sup>5</sup>	3,39x10 <sup>5</sup>	
5	4,40x10 <sup>5</sup>	4,35x10 <sup>5</sup>	3,44x10 <sup>5</sup>	4,06x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,06x10 <sup>5</sup>	7,62x10 <sup>5</sup>	8,17x10 <sup>5</sup>	8,57x10 <sup>5</sup>	8,12x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,94x10 <sup>5</sup>	5,50x10 <sup>5</sup>	6,49x10 <sup>5</sup>	6,86x10 <sup>5</sup>	6,28x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,37x10 <sup>5</sup>	6,28x10 <sup>5</sup>	6,28x10 <sup>5</sup>	
6	7,80x10 <sup>5</sup>	8,71x10 <sup>5</sup>	7,85x10 <sup>5</sup>	8,12x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,00x10 <sup>5</sup>	8,50x10 <sup>5</sup>	8,44x10 <sup>5</sup>	7,89x10 <sup>5</sup>	8,28x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,67x10 <sup>5</sup>	9,80x10 <sup>5</sup>	1,21x10 <sup>6</sup>	1,26x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,29x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	
7	6,82x10 <sup>5</sup>	8,04x10 <sup>5</sup>	6,91x10 <sup>5</sup>	7,26x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,33x10 <sup>5</sup>	1,26x10 <sup>6</sup>	1,34x10 <sup>6</sup>	8,80x10 <sup>5</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,49x10 <sup>6</sup>	1,28x10 <sup>6</sup>	1,39x10 <sup>6</sup>	1,47x10 <sup>6</sup>	1,38x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,20x10 <sup>6</sup>	1,38x10 <sup>6</sup>	1,38x10 <sup>6</sup>	
8	1,07x10 <sup>6</sup>	1,09x10 <sup>6</sup>	1,00x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,10x10 <sup>6</sup>	2,94x10 <sup>6</sup>	2,13x10 <sup>6</sup>	1,98x10 <sup>6</sup>	2,35x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 1,02x10 <sup>6</sup>	3,05x10 <sup>6</sup>	3,34x10 <sup>6</sup>	3,22x10 <sup>6</sup>	3,20x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,29x10 <sup>6</sup>	3,20x10 <sup>6</sup>	3,20x10 <sup>6</sup>	
9	1,19x10 <sup>6</sup>	1,38x10 <sup>6</sup>	1,32x10 <sup>6</sup>	1,30x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,20x10 <sup>6</sup>	2,28x10 <sup>6</sup>	1,47x10 <sup>6</sup>	1,41x10 <sup>6</sup>	1,72x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,96x10 <sup>6</sup>	4,30x10 <sup>6</sup>	3,85x10 <sup>6</sup>	4,75x10 <sup>6</sup>	4,30x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,88x10 <sup>6</sup>	4,30x10 <sup>6</sup>	4,30x10 <sup>6</sup>	
12	2,28x10 <sup>6</sup>	2,56x10 <sup>6</sup>	2,75x10 <sup>6</sup>	2,53x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,47x10 <sup>6</sup>	5,87x10 <sup>6</sup>	3,76x10 <sup>6</sup>	3,51x10 <sup>6</sup>	4,38x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 2,55x10 <sup>6</sup>	6,15x10 <sup>6</sup>	5,91x10 <sup>6</sup>	6,09x10 <sup>6</sup>	6,05x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,24x10 <sup>6</sup>	6,05x10 <sup>6</sup>	6,05x10 <sup>6</sup>	
15	3,04x10 <sup>6</sup>	3,17x10 <sup>6</sup>	3,64x10 <sup>6</sup>	3,28x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,63x10 <sup>6</sup>	8,60x10 <sup>6</sup>	4,78x10 <sup>6</sup>	4,50x10 <sup>6</sup>	5,96x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 4,49x10 <sup>6</sup>	9,80x10 <sup>6</sup>	1,13x10 <sup>7</sup>	8,80x10 <sup>6</sup>	9,97x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 2,47x10 <sup>6</sup>	9,97x10 <sup>6</sup>	9,97x10 <sup>6</sup>	
18	4,26x10 <sup>6</sup>	2,76x10 <sup>6</sup>	3,42x10 <sup>6</sup>	3,48x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 1,47x10 <sup>6</sup>	1,21x10 <sup>7</sup>	8,30x10 <sup>6</sup>	9,46x10 <sup>6</sup>	1,00x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,37x10 <sup>7</sup>	1,50x10 <sup>7</sup>	1,72x10 <sup>7</sup>	1,39x10 <sup>7</sup>	1,54x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,33x10 <sup>7</sup>	1,54x10 <sup>7</sup>	1,54x10 <sup>7</sup>	
21	3,06x10 <sup>6</sup>	3,40x10 <sup>6</sup>	3,21x10 <sup>6</sup>	3,22x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,33x10 <sup>6</sup>	1,52x10 <sup>7</sup>	1,08x10 <sup>7</sup>	1,20x10 <sup>7</sup>	1,27x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,45x10 <sup>7</sup>	1,49x10 <sup>7</sup>	1,91x10 <sup>7</sup>	1,89x10 <sup>7</sup>	1,76x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,47x10 <sup>7</sup>	1,76x10 <sup>7</sup>	1,76x10 <sup>7</sup>	

Tabela A 2 - Resultados das contagens de células para o clone de Cananéia(C1) a 20°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	5,40x10 <sup>3</sup>	6,90x10 <sup>3</sup>	8,40x10 <sup>3</sup>	6,90x10 <sup>3</sup>	$\pm$ 2,94x10 <sup>3</sup>	6,80x10 <sup>3</sup>	9,20x10 <sup>3</sup>	8,40x10 <sup>3</sup>	8,13x10 <sup>3</sup>	$\pm$ 2,39x10 <sup>3</sup>	7,00x10 <sup>3</sup>	9,60x10 <sup>3</sup>	6,60x10 <sup>3</sup>	7,73x10 <sup>3</sup>	$\pm$ 3,19x10 <sup>3</sup>	7,73x10 <sup>3</sup>	7,73x10 <sup>3</sup>	
1	7,30x10 <sup>3</sup>	1,31x10 <sup>4</sup>	1,03x10 <sup>4</sup>	1,02x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,57x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	1,12x10 <sup>4</sup>	1,57x10 <sup>4</sup>	1,23x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,59x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	1,34x10 <sup>4</sup>	1,30x10 <sup>4</sup>	1,21x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 0,35x10 <sup>4</sup>	1,21x10 <sup>4</sup>	1,21x10 <sup>4</sup>	
2	2,72x10 <sup>4</sup>	2,52x10 <sup>4</sup>	3,55x10 <sup>4</sup>	2,93x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 1,06x10 <sup>4</sup>	2,36x10 <sup>4</sup>	2,16x10 <sup>4</sup>	3,40x10 <sup>4</sup>	2,64x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 1,29x10 <sup>4</sup>	4,10x10 <sup>4</sup>	3,07x10 <sup>4</sup>	3,84x10 <sup>4</sup>	3,67x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 1,04x10 <sup>4</sup>	3,67x10 <sup>4</sup>	3,67x10 <sup>4</sup>	
3	5,55x10 <sup>4</sup>	8,77x10 <sup>4</sup>	7,47x10 <sup>4</sup>	7,26x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 3,18x10 <sup>4</sup>	3,69x10 <sup>4</sup>	4,99x10 <sup>4</sup>	1,27x10 <sup>5</sup>	7,13x10 <sup>4</sup>	$\pm$ 9,55x10 <sup>4</sup>	8,00x10 <sup>4</sup>	1,13x10 <sup>5</sup>	1,15x10 <sup>5</sup>	1,03x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,37x10 <sup>5</sup>	1,03x10 <sup>5</sup>	1,03x10 <sup>5</sup>	
4	1,98x10 <sup>5</sup>	2,40x10 <sup>5</sup>	2,91x10 <sup>5</sup>	2,43x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,90x10 <sup>5</sup>	9,50x10 <sup>5</sup>	1,16x10 <sup>5</sup>	1,16x10 <sup>5</sup>	1,09x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,24x10 <sup>5</sup>	2,98x10 <sup>5</sup>	4,45x10 <sup>5</sup>	4,12x10 <sup>5</sup>	3,85x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,51x10 <sup>5</sup>	3,85x10 <sup>5</sup>	3,85x10 <sup>5</sup>	
5	5,95x10 <sup>5</sup>	7,40x10 <sup>5</sup>	5,95x10 <sup>5</sup>	6,43x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 1,65x10 <sup>5</sup>	3,27x10 <sup>5</sup>	2,54x10 <sup>5</sup>	2,69x10 <sup>5</sup>	2,98x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,80x10 <sup>5</sup>	6,20x10 <sup>5</sup>	6,00x10 <sup>5</sup>	8,00x10 <sup>5</sup>	6,73x10 <sup>5</sup>	$\pm$ 0,22x10 <sup>5</sup>	6,73x10 <sup>5</sup>	6,73x10 <sup>5</sup>	
6	1,19x10 <sup>6</sup>	1,52x10 <sup>6</sup>	1,70x10 <sup>6</sup>	1,47x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,51x10 <sup>6</sup>	5,65x10 <sup>6</sup>	5,40x10 <sup>6</sup>	6,00x10 <sup>6</sup>	5,68x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,59x10 <sup>6</sup>	1,69x10 <sup>6</sup>	2,10x10 <sup>6</sup>	2,08x10 <sup>6</sup>	1,96x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,45x10 <sup>6</sup>	1,96x10 <sup>6</sup>	1,96x10 <sup>6</sup>	
7	1,67x10 <sup>6</sup>	1,76x10 <sup>6</sup>	1,82x10 <sup>6</sup>	1,75x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,14x10 <sup>6</sup>	1,11x10 <sup>6</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>	1,02x10 <sup>6</sup>	1,10x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,14x10 <sup>6</sup>	3,84x10 <sup>6</sup>	3,92x10 <sup>6</sup>	3,92x10 <sup>6</sup>	3,89x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,09x10 <sup>6</sup>	3,89x10 <sup>6</sup>	3,89x10 <sup>6</sup>	
8	2,00x10 <sup>6</sup>	2,84x10 <sup>6</sup>	1,94x10 <sup>6</sup>	2,26x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,98x10 <sup>6</sup>	1,86x10 <sup>6</sup>	2,18x10 <sup>6</sup>	1,80x10 <sup>6</sup>	1,94x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,39x10 <sup>6</sup>	4,70x10 <sup>6</sup>	4,88x10 <sup>6</sup>	5,04x10 <sup>6</sup>	4,87x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,33x10 <sup>6</sup>	4,87x10 <sup>6</sup>	4,87x10 <sup>6</sup>	
9	2,74x10 <sup>6</sup>	2,90x10 <sup>6</sup>	2,96x10 <sup>6</sup>	3,20x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,92x10 <sup>6</sup>	2,62x10 <sup>6</sup>	2,64x10 <sup>6</sup>	2,04x10 <sup>6</sup>	2,43x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,67x10 <sup>6</sup>	6,16x10 <sup>6</sup>	7,76x10 <sup>6</sup>	7,20x10 <sup>6</sup>	7,04x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 1,59x10 <sup>6</sup>	7,04x10 <sup>6</sup>	7,04x10 <sup>6</sup>	
12	5,52x10 <sup>6</sup>	5,08x10 <sup>6</sup>	4,96x10 <sup>6</sup>	5,19x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 0,57x10 <sup>6</sup>	6,68x10 <sup>6</sup>	7,15x10 <sup>6</sup>	5,60x10 <sup>6</sup>	6,48x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 1,55x10 <sup>6</sup>	1,26x10 <sup>7</sup>	1,03x10 <sup>7</sup>	1,02x10 <sup>7</sup>	1,10x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,25x10 <sup>7</sup>	1,10x10 <sup>7</sup>	1,10x10 <sup>7</sup>	
15	5,68x10 <sup>6</sup>	4,68x10 <sup>6</sup>	4,68x10 <sup>6</sup>	5,01x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 1,14x10 <sup>6</sup>	6,94x10 <sup>6</sup>	9,15x10 <sup>6</sup>	9,90x10 <sup>6</sup>	8,66x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 3,02x10 <sup>6</sup>	1,72x10 <sup>7</sup>	1,36x10 <sup>7</sup>	1,14x10 <sup>7</sup>	1,41x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,57x10 <sup>7</sup>	1,41x10 <sup>7</sup>	1,41x10 <sup>7</sup>	
18	8,40x10 <sup>6</sup>	6,04x10 <sup>6</sup>	5,72x10 <sup>6</sup>	6,72x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 2,86x10 <sup>6</sup>	1,11x10 <sup>7</sup>	9,90x10 <sup>6</sup>	1,06x10 <sup>7</sup>	1,05x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,12x10 <sup>7</sup>	2,00x10 <sup>7</sup>	1,50x10 <sup>7</sup>	1,44x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup>	$\pm$ 0,61x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup>	
21	7,52x10 <sup>6</sup>	6,16x10 <sup>6</sup>	8,32x10 <sup>6</sup>	7,35x10 <sup>6</sup>	$\pm$ 2,14x10 <sup>6</sup>	9,36x10 <sup>6</sup> </td												

Tabela A 3 - Resultados das contagens de células para o clone de Cananéia(C1) a 24°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$6,10 \times 10^3$	$9,30 \times 10^3$	$8,90 \times 10^3$	$8,10 \times 10^3 \pm 3,41 \times 10^3$			$1,00 \times 10^4$	$1,24 \times 10^4$	$9,50 \times 10^3$	$1,06 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$			$7,50 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$1,04 \times 10^4$	$8,63 \times 10^3 \pm 3,04 \times 10^3$		
1	$8,68 \times 10^3$	$8,68 \times 10^3$	$6,82 \times 10^3$	$8,06 \times 10^3 \pm 2,10 \times 10^3$			$8,68 \times 10^3$	$4,34 \times 10^3$	$1,05 \times 10^4$	$7,84 \times 10^3 \pm 6,19 \times 10^3$			$6,20 \times 10^3$	$5,27 \times 10^3$	$8,37 \times 10^3$	$6,61 \times 10^3 \pm 3,12 \times 10^3$		
2	$3,41 \times 10^3$	$5,27 \times 10^3$	$6,82 \times 10^3$	$5,17 \times 10^3 \pm 3,35 \times 10^3$			$1,21 \times 10^4$	$5,89 \times 10^3$	$1,08 \times 10^4$	$9,60 \times 10^3 \pm 6,41 \times 10^3$			$1,05 \times 10^4$	$1,18 \times 10^4$	$9,61 \times 10^3$	$1,06 \times 10^4 \pm 0,22 \times 10^4$		
3	$2,48 \times 10^3$	$1,86 \times 10^3$	$4,34 \times 10^3$	$2,89 \times 10^3 \pm 2,53 \times 10^3$			$2,79 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$5,89 \times 10^3$	$1,78 \times 10^4 \pm 2,18 \times 10^4$			$1,73 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$	$1,92 \times 10^4$	$1,62 \times 10^4 \pm 0,73 \times 10^4$		
4	$6,00 \times 10^2$	$9,30 \times 10^2$	$9,61 \times 10^2$	$3,71 \times 10^3 \pm 1,00 \times 10^3$			$8,27 \times 10^4$	$5,56 \times 10^4$	$1,36 \times 10^4$	$5,06 \times 10^4 \pm 6,82 \times 10^4$			$4,81 \times 10^4$	$3,87 \times 10^4$	$4,21 \times 10^4$	$4,30 \times 10^4 \pm 0,94 \times 10^4$		
5	$3,72 \times 10^3$	$2,79 \times 10^3$	$2,32 \times 10^3$	$9,90 \times 10^3 \pm 22,59 \times 10^3$			$3,15 \times 10^5$	$1,39 \times 10^5$	$2,63 \times 10^4$	$1,60 \times 10^5 \pm 2,86 \times 10^5$			$1,20 \times 10^5$	$8,75 \times 10^4$	$9,12 \times 10^4$	$9,96 \times 10^4 \pm 3,49 \times 10^4$		
6	$1,51 \times 10^4$	$4,03 \times 10^3$	$4,31 \times 10^4$	$2,07 \times 10^4 \pm 4,06 \times 10^4$			$8,99 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$7,10 \times 10^4$	$4,25 \times 10^5 \pm 8,37 \times 10^5$			$1,67 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$4,58 \times 10^5$	$2,92 \times 10^5 \pm 2,94 \times 10^5$		
7	$4,90 \times 10^4$	$1,41 \times 10^4$	$1,85 \times 10^5$	$8,27 \times 10^4 \pm 17,70 \times 10^4$			$1,27 \times 10^6$	$5,90 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$7,90 \times 10^5 \pm 8,23 \times 10^5$			$7,40 \times 10^5$	$5,75 \times 10^5$	$7,65 \times 10^5$	$6,93 \times 10^5 \pm 2,02 \times 10^5$		
8	$1,85 \times 10^4$	$4,43 \times 10^4$	$5,40 \times 10^4$	$2,56 \times 10^5 \pm 5,00 \times 10^5$			$2,64 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$7,35 \times 10^5$	$1,69 \times 10^6 \pm 2,65 \times 10^6$			$1,16 \times 10^6$	$1,49 \times 10^6$	$1,79 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6 \pm 0,63 \times 10^6$		
9	$4,70 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$1,02 \times 10^6$	$5,40 \times 10^5 \pm 0,88 \times 10^5$			$4,34 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$1,75 \times 10^6$	$2,66 \times 10^6 \pm 2,86 \times 10^6$			$2,80 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	$2,19 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^6$		
12	$9,60 \times 10^5$	$8,60 \times 10^5$	$2,47 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6 \pm 1,76 \times 10^6$			$1,30 \times 10^7$	$8,60 \times 10^6$	$4,56 \times 10^6$	$8,72 \times 10^6 \pm 8,27 \times 10^6$			$5,80 \times 10^6$	$3,80 \times 10^6$	$6,35 \times 10^6$	$5,31 \times 10^6 \pm 2,63 \times 10^6$		
15	$2,30 \times 10^6$	$2,75 \times 10^6$	$3,67 \times 10^6$	$2,91 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$			$1,50 \times 10^7$	$9,00 \times 10^6$	$1,28 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7 \pm 0,59 \times 10^7$			$8,80 \times 10^6$	$9,60 \times 10^6$	$1,27 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7 \pm 0,39 \times 10^7$		
18	$4,50 \times 10^6$	$3,95 \times 10^6$	$4,65 \times 10^6$	$4,37 \times 10^6 \pm 0,73 \times 10^6$			$2,05 \times 10^7$	$1,39 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$1,58 \times 10^7 \pm 0,80 \times 10^7$			$9,90 \times 10^6$	$1,17 \times 10^7$	$1,60 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7 \pm 0,61 \times 10^7$		
21	$3,40 \times 10^6$	$4,20 \times 10^6$	$4,80 \times 10^6$	$4,13 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$			$1,60 \times 10^7$	$1,42 \times 10^7$	$1,58 \times 10^7$	$1,53 \times 10^7 \pm 0,20 \times 10^7$			$5,40 \times 10^6$	$7,20 \times 10^6$	$1,05 \times 10^7$	$7,70 \times 10^6 \pm 5,06 \times 10^6$		

Tabela A 4 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U3) a 16°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreider						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$1,20 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	$1,43 \times 10^4 \pm 0,80 \times 10^4$			$1,12 \times 10^4$	$8,59 \times 10^3$	$9,37 \times 10^3$	$9,70 \times 10^3 \pm 2,55 \times 10^3$			$1,09 \times 10^4$	$8,90 \times 10^3$	$9,50 \times 10^3$	$9,80 \times 10^3 \pm 1,96 \times 10^3$		
1	$4,00 \times 10^4$	$4,59 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$	$4,13 \times 10^4 \pm 0,80 \times 10^4$			$3,91 \times 10^4$	$4,04 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4 \pm 0,55 \times 10^4$			$1,98 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$2,12 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4 \pm 0,14 \times 10^3$		
2	$1,12 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$			$1,24 \times 10^5$	$1,46 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5 \pm 0,24 \times 10^5$			$6,00 \times 10^4$	$6,34 \times 10^4$	$5,45 \times 10^4$	$5,93 \times 10^4 \pm 0,88 \times 10^4$		
3	$2,10 \times 10^5$	$2,07 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5 \pm 0,08 \times 10^5$			$3,00 \times 10^5$	$3,13 \times 10^5$	$3,28 \times 10^5$	$3,13 \times 10^5 \pm 0,27 \times 10^5$			$2,15 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	$2,06 \times 10^5$	$2,27 \times 10^5 \pm 0,57 \times 10^5$		
4	$3,65 \times 10^5$	$5,01 \times 10^5$	$4,64 \times 10^5$	$4,43 \times 10^5 \pm 1,37 \times 10^5$			$6,80 \times 10^5$	$7,79 \times 10^5$	$7,92 \times 10^5$	$7,50 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$			$4,50 \times 10^5$	$5,02 \times 10^5$	$4,18 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5 \pm 1,69 \times 10^5$		
5	$5,10 \times 10^5$	$5,29 \times 10^5$	$4,62 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5 \pm 0,69 \times 10^5$			$1,23 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	$1,03 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6 \pm 0,22 \times 10^6$			$1,10 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6$	$1,19 \times 10^6 \pm 0,45 \times 10^6$		
6	$8,15 \times 10^5$	$6,99 \times 10^5$	$5,29 \times 10^5$	$6,81 \times 10^5 \pm 2,82 \times 10^5$			$1,75 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$			$1,74 \times 10^6$	$1,93 \times 10^6$	$1,54 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$		
7	$9,82 \times 10^5$	$8,47 \times 10^5$	$6,95 \times 10^5$	$8,41 \times 10^5 \pm 2,82 \times 10^5$			$1,81 \times 10^6$	$2,17 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$	$2,15 \times 10^6 \pm 0,65 \times 10^6$			$3,22 \times 10^6$	$3,24 \times 10^6$	$3,18 \times 10^6$	$3,21 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$		
8	$1,53 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$1,27 \times 10^6 \pm 2,83 \times 10^6$			$2,70 \times 10^6$	$2,76 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6$	$2,87 \times 10^6 \pm 0,47 \times 10^6$			$3,40 \times 10^6$	$3,75 \times 10^6$	$3,96 \times 10^6$	$3,70 \times 10^6 \pm 0,55 \times 10^6$		
9	$1,93 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6 \pm 0,33 \times 10^6$			$2,94 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	$4,10 \times 10^6$	$3,52 \times 10^6 \pm 1,14 \times 10^6$			$3,92 \times 10^6$	$3,37 \times 10^6$	$3,34 \times 10^6$	$3,54 \times 10^6 \pm 0,65 \times 10^6$		
12	$3,98 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$3,01 \times 10^6$	$3,44 \times 10^6 \pm 0,96 \times 10^6$			$5,16 \times 10^6$	$5,88 \times 10^6$	$7,27 \times 10^6$	$6,10 \times 10^6 \pm 2,10 \times 10^6$			$7,25 \times 10^6$	$4,88 \times 10^6$	$4,74 \times 10^6$	$5,62 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^6$		
15	$4,42 \times 10^6$	$3,91 \times 10^6$	$3,36 \times 10^6$	$3,90 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^6$			$6,36 \times 10^6$	$8,13 \times 10^6$	$8,43 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6 \pm 2,20 \times 10^6$			$1,20 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$1,69 \times 10^7$	$1,41 \times 10^7 \pm 0,49 \times 10^7$		
18	$6,92 \times 10^6$	$5,49 \times 10^6$	$4,69 \times 10^6$	$5,70 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$			$7,60 \times 10^6$	$9,12 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$9,57 \times 10^6 \pm 4,37 \times 10^6$			$1,47 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7 \pm 0,82 \times 10^7$		
21	$5,12 \times 10^6$	$7,68 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	$4,93 \times 10^6 \pm 0,80 \times 10^6$			$9,44 \times 10^6$	$1,08 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7 \pm 0,14 \times 10^6$			$1,83 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	$1,91 \times 10^7$	$1,82 \times 10^7 \pm 0,20 \times 10^7$		

Tabela A 5 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U3) a 20°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP<sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f<sub>1</sub>					
1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	


<tbl\_r

Tabela A 6 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U3) a 24°C,  
médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$8,20 \times 10^3$	$1,57 \times 10^4$	$9,60 \times 10^3$	$1,12 \times 10^4 \pm 0,76 \times 10^4$			$8,60 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	$8,10 \times 10^3$	$8,90 \times 10^3 \pm 1,92 \times 10^3$			$1,01 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4 \pm 0,27 \times 10^4$		
1	$6,82 \times 10^3$	$9,92 \times 10^3$	$8,68 \times 10^3$	$8,47 \times 10^3 \pm 3,06 \times 10^3$			$9,92 \times 10^3$	$7,75 \times 10^3$	$9,92 \times 10^3$	$9,20 \times 10^3 \pm 2,45 \times 10^3$			$8,37 \times 10^3$	$1,11 \times 10^4$	$9,61 \times 10^3$	$9,69 \times 10^3 \pm 2,69 \times 10^3$		
2	$1,36 \times 10^4$	$8,68 \times 10^3$	$2,20 \times 10^3$	$8,16 \times 10^3 \pm 11,21 \times 10^3$			$3,19 \times 10^4$	$2,17 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$	$2,17 \times 10^4 \pm 2,02 \times 10^4$			$1,05 \times 10^4$	$1,76 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$	$2,02 \times 10^4 \pm 2,20 \times 10^4$		
3	$1,95 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$8,37 \times 10^3$	$1,53 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^4$			$1,29 \times 10^5$	$8,25 \times 10^4$	$8,75 \times 10^4$	$9,97 \times 10^4 \pm 5,00 \times 10^4$			$1,98 \times 10^4$	$7,03 \times 10^4$	$4,25 \times 10^4$	$4,42 \times 10^4 \pm 4,96 \times 10^4$		
4	$6,37 \times 10^4$	$4,87 \times 10^4$	$3,44 \times 10^4$	$4,89 \times 10^4 \pm 2,88 \times 10^4$			$3,85 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$	$2,95 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5 \pm 1,04 \times 10^5$			$4,75 \times 10^4$	$9,00 \times 10^4$	$1,72 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5 \pm 1,23 \times 10^5$		
5	$2,44 \times 10^5$	$7,75 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$1,22 \times 10^5 \pm 2,09 \times 10^5$			$9,60 \times 10^5$	$7,10 \times 10^5$	$6,99 \times 10^5$	$7,89 \times 10^5 \pm 1,47 \times 10^5$			$2,50 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$3,31 \times 10^5$	$2,28 \times 10^5 \pm 3,61 \times 10^5$		
6	$2,57 \times 10^5$	$2,45 \times 10^5$	$2,47 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$			$1,94 \times 10^6$	$1,66 \times 10^6$	$1,54 \times 10^6$	$1,71 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$			$3,65 \times 10^5$	$6,95 \times 10^5$	$1,06 \times 10^6$	$7,06 \times 10^5 \pm 6,82 \times 10^5$		
7	$1,07 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$7,05 \times 10^5$	$9,58 \times 10^5 \pm 4,31 \times 10^5$			$3,20 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	$2,92 \times 10^6$	$2,79 \times 10^6 \pm 0,94 \times 10^6$			$1,01 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$	$1,64 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^6$		
8	$1,54 \times 10^6$	$1,05 \times 10^6$	$9,20 \times 10^5$	$1,17 \times 10^6 \pm 0,65 \times 10^6$			$6,48 \times 10^6$	$4,94 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$	$5,35 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^6$			$1,99 \times 10^6$	$3,86 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6 \pm 2,67 \times 10^6$		
9	$1,55 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6 \pm 0,35 \times 10^6$			$3,44 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$	$5,84 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6 \pm 2,35 \times 10^6$			$3,12 \times 10^6$	$3,04 \times 10^6$	$4,60 \times 10^6$	$3,59 \times 10^6 \pm 1,72 \times 10^6$		
12	$1,90 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6 \pm 0,43 \times 10^6$			$8,68 \times 10^6$	$9,01 \times 10^6$	$8,99 \times 10^6$	$8,89 \times 10^6 \pm 0,35 \times 10^6$			$4,80 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	$5,80 \times 10^6$	$5,26 \times 10^6 \pm 0,98 \times 10^6$		
15	$2,70 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$	$2,49 \times 10^6 \pm 0,35 \times 10^6$			$1,05 \times 10^7$	$1,15 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	$1,18 \times 10^7 \pm 0,29 \times 10^7$			$9,60 \times 10^6$	$7,40 \times 10^6$	$1,05 \times 10^7$	$9,16 \times 10^6 \pm 3,12 \times 10^6$		
18	$2,15 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$2,18 \times 10^6$	$2,18 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$			$1,20 \times 10^7$	$1,13 \times 10^7$	$1,39 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$			$1,48 \times 10^7$	$1,13 \times 10^7$	$1,40 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^7$		
21	$2,63 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$	$2,61 \times 10^6 \pm 0,20 \times 10^6$			$1,11 \times 10^7$	$7,89 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$1,03 \times 10^7 \pm 0,41 \times 10^7$			$1,43 \times 10^7$	$1,26 \times 10^7$	$1,37 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7 \pm 0,24 \times 10^7$		

Tabela A 7 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U5) a 16°C,  
médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$1,50 \times 10^4$	$1,34 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$			$1,00 \times 10^4$	$1,40 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$	$1,17 \times 10^4 \pm 0,41 \times 10^4$			$1,25 \times 10^4$	$1,49 \times 10^4$	$1,09 \times 10^4$	$1,28 \times 10^4 \pm 0,39 \times 10^4$		
1	$3,87 \times 10^4$	$3,48 \times 10^4$	$3,10 \times 10^4$	$3,48 \times 10^4 \pm 0,76 \times 10^4$			$3,59 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4$	$4,05 \times 10^4$	$3,82 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^4$			$3,62 \times 10^4$	$3,74 \times 10^4$	$3,87 \times 10^4$	$3,74 \times 10^4 \pm 0,25 \times 10^4$		
2	$6,50 \times 10^4$	$5,69 \times 10^4$	$6,40 \times 10^4$	$6,20 \times 10^4 \pm 0,86 \times 10^4$			$2,25 \times 10^5$	$2,36 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$			$1,10 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5 \pm 0,16 \times 10^4$		
3	$9,19 \times 10^4$	$1,07 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$9,96 \times 10^4 \pm 1,49 \times 10^5$			$5,80 \times 10^5$	$6,03 \times 10^5$	$6,44 \times 10^5$	$6,09 \times 10^5 \pm 0,63 \times 10^5$			$1,76 \times 10^5$	$2,71 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5 \pm 0,45 \times 10^5$		
4	$1,89 \times 10^5$	$2,22 \times 10^5$	$1,98 \times 10^5$	$2,03 \times 10^5 \pm 0,33 \times 10^5$			$6,80 \times 10^5$	$6,85 \times 10^5$	$5,96 \times 10^5$	$6,54 \times 10^5 \pm 0,98 \times 10^5$			$4,80 \times 10^5$	$5,35 \times 10^5$	$4,46 \times 10^5$	$4,87 \times 10^5 \pm 0,88 \times 10^5$		
5	$2,47 \times 10^5$	$2,29 \times 10^5$	$1,93 \times 10^5$	$2,23 \times 10^5 \pm 0,53 \times 10^5$			$1,58 \times 10^6$	$1,49 \times 10^6$	$1,37 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6 \pm 0,20 \times 10^6$			$9,25 \times 10^5$	$1,22 \times 10^6$	$8,50 \times 10^5$	$9,98 \times 10^5 \pm 3,84 \times 10^5$		
6	$5,50 \times 10^5$	$4,83 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$4,84 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^5$			$1,90 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6 \pm 0,53 \times 10^6$			$1,90 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6 \pm 0,41 \times 10^6$		
7	$6,17 \times 10^5$	$7,17 \times 10^5$	$5,34 \times 10^5$	$6,23 \times 10^5 \pm 1,80 \times 10^5$			$2,30 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	$2,23 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$			$3,22 \times 10^6$	$3,24 \times 10^6$	$3,18 \times 10^6$	$3,21 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$		
8	$9,40 \times 10^5$	$8,28 \times 10^5$	$7,27 \times 10^5$	$8,32 \times 10^5 \pm 2,10 \times 10^5$			$2,70 \times 10^6$	$2,56 \times 10^6$	$1,70 \times 10^6$	$2,32 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^6$			$3,42 \times 10^6$	$3,77 \times 10^6$	$3,98 \times 10^6$	$3,72 \times 10^6 \pm 0,55 \times 10^6$		
9	$1,43 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	$1,13 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6 \pm 0,29 \times 10^6$			$4,25 \times 10^6$	$4,75 \times 10^6$	$4,27 \times 10^6$	$4,27 \times 10^6 \pm 0,55 \times 10^6$			$3,30 \times 10^6$	$3,69 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$3,48 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$		
12	$1,90 \times 10^6$	$1,58 \times 10^6$	$1,61 \times 10^6$	$1,70 \times 10^6 \pm 0,35 \times 10^6$			$8,56 \times 10^6$	$8,46 \times 10^6$	$8,18 \times 10^6$	$8,40 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$			$5,64 \times 10^6$	$6,17 \times 10^6$	$6,12 \times 10^6$	$5,98 \times 10^6 \pm 0,57 \times 10^6$		
15	$1,97 \times 10^6$	$1,64 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$	$1,69 \times 10^6 \pm 0,51 \times 10^6$			$1,05 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$	$1,09 \times 10^7$	$1,14 \times 10^7 \pm 0,24 \times 10^7$			$9,92 \times 10^6$	$1,09 \times 10^7$	$1,09 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7 \pm 0,12 \times 10^7$		
18	$3,42 \times 10^6$	$2,66 \times 10^6$	$2,58 \times 10^6$	$2,89 \times 10^6 \pm 0,90 \times 10^6$			$1,06 \times 10^7$	$7,90 \times 10^6$	$1,03 \times 10^7$	$9,60 \times 10^6 \pm 2,94 \times 10^6$			$1,00 \times 10^7$	$1,11 \times 10^7$	$8,30 \times 10^6$	$9,80 \times 10^6 \pm 2,74 \times 10^6$		
21	$4,77 \times 10^6$	$3,82 \times 10^6$	$4,01 \times 10^6$	$4,20 \times 10^6 \pm 0,98 \times 10^6$			$1,22 \times 10^7$	$1,27 \times 10^7$	$1,32 \times 10^7$	$1,27 \times 10^7 \pm 0,10 \times 10^7$			$1,42 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	$1,40 \times 10^7$	$1,39 \times 10^7 \pm 0,06 \times 10^7$		

Tabela A 8 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U5) a 20°C,  
médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP<sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f<sub>1</sub>					
1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	

<tbl\_r cells="4" ix="1" maxcspan="6

Tabela A 9 - Resultados das contagens de células para o clone de Ubatuba(U5) a 24°C, médias das contagens ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	6,90x10 <sup>3</sup>	7,60x10 <sup>3</sup>	8,50x10 <sup>3</sup>	7,67x10 <sup>3</sup>	± 1,57x10 <sup>3</sup>		1,92x10 <sup>4</sup>	1,72x10 <sup>4</sup>	9,60x10 <sup>3</sup>	1,53x10 <sup>4</sup>	± 0,98x10 <sup>4</sup>		1,69x10 <sup>4</sup>	8,70x10 <sup>3</sup>	7,80x10 <sup>3</sup>	1,11x10 <sup>4</sup>	± 0,98x10 <sup>4</sup>	
1	7,44x10 <sup>3</sup>	8,06x10 <sup>3</sup>	7,44x10 <sup>3</sup>	7,65x10 <sup>3</sup>	± 0,71x10 <sup>3</sup>		9,92x10 <sup>3</sup>	9,92x10 <sup>3</sup>	1,05x10 <sup>4</sup>	1,01x10 <sup>4</sup>	± 0,06x10 <sup>4</sup>		1,08x10 <sup>4</sup>	1,30x10 <sup>4</sup>	7,13x10 <sup>3</sup>	1,03x10 <sup>4</sup>	± 0,57x10 <sup>4</sup>	
2	6,82x10 <sup>3</sup>	7,44x10 <sup>3</sup>	8,37x10 <sup>3</sup>	7,54x10 <sup>3</sup>	± 1,53x10 <sup>3</sup>		1,39x10 <sup>4</sup>	6,51x10 <sup>3</sup>	9,61x10 <sup>3</sup>	9,60x10 <sup>3</sup>	± 6,15x10 <sup>4</sup>		1,98x10 <sup>4</sup>	1,61x10 <sup>4</sup>	1,36x10 <sup>4</sup>	1,65x10 <sup>4</sup>	± 0,61x10 <sup>4</sup>	
3	4,96x10 <sup>3</sup>	2,48x10 <sup>3</sup>	2,10x10 <sup>3</sup>	3,18x10 <sup>3</sup>	± 3,04x10 <sup>3</sup>		1,08x10 <sup>4</sup>	3,28x10 <sup>4</sup>	1,08x10 <sup>4</sup>	1,81x10 <sup>4</sup>	± 2,49x10 <sup>4</sup>		3,50x10 <sup>4</sup>	5,50x10 <sup>4</sup>	5,75x10 <sup>4</sup>	4,92x10 <sup>4</sup>	± 2,41x10 <sup>4</sup>	
4	1,05x10 <sup>4</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	3,72x10 <sup>3</sup>	5,57x10 <sup>3</sup>	± 8,45x10 <sup>3</sup>		1,64x10 <sup>4</sup>	1,22x10 <sup>5</sup>	1,36x10 <sup>5</sup>	9,15x10 <sup>4</sup>	± 12,82x10 <sup>4</sup>		1,06x10 <sup>5</sup>	1,66x10 <sup>5</sup>	1,12x10 <sup>5</sup>	1,28x10 <sup>5</sup>	± 0,65x10 <sup>5</sup>	
5	1,24x10 <sup>4</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	5,12x10 <sup>3</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	± 10,04x10 <sup>3</sup>		3,19x10 <sup>5</sup>	1,10x10 <sup>5</sup>	1,37x10 <sup>5</sup>	1,89x10 <sup>5</sup>	± 2,23x10 <sup>4</sup>		4,35x10 <sup>5</sup>	3,00x10 <sup>5</sup>	4,65x10 <sup>5</sup>	4,00x10 <sup>5</sup>	± 1,72x10 <sup>5</sup>	
6	3,71x10 <sup>4</sup>	6,82x10 <sup>3</sup>	2,97x10 <sup>4</sup>	2,45x10 <sup>4</sup>	± 3,08x10 <sup>4</sup>		2,02x10 <sup>5</sup>	7,00x10 <sup>5</sup>	3,65x10 <sup>5</sup>	4,22x10 <sup>5</sup>	± 4,98x10 <sup>5</sup>		5,55x10 <sup>5</sup>	7,55x10 <sup>5</sup>	9,20x10 <sup>5</sup>	7,43x10 <sup>5</sup>	± 3,58x10 <sup>5</sup>	
7	2,38x10 <sup>5</sup>	3,55x10 <sup>4</sup>	7,87x10 <sup>4</sup>	1,17x10 <sup>5</sup>	± 2,06x10 <sup>5</sup>		6,55x10 <sup>5</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	1,01x10 <sup>6</sup>	1,07x10 <sup>6</sup>	± 0,88x10 <sup>6</sup>		1,16x10 <sup>6</sup>	1,98x10 <sup>6</sup>	2,02x10 <sup>6</sup>	1,72x10 <sup>6</sup>	± 0,94x10 <sup>6</sup>	
8	7,25x10 <sup>5</sup>	1,55x10 <sup>5</sup>	3,45x10 <sup>5</sup>	4,08x10 <sup>5</sup>	± 5,68x10 <sup>5</sup>		1,16x10 <sup>6</sup>	2,72x10 <sup>6</sup>	1,56x10 <sup>6</sup>	1,81x10 <sup>6</sup>	± 1,59x10 <sup>6</sup>		2,58x10 <sup>6</sup>	2,28x10 <sup>6</sup>	2,50x10 <sup>6</sup>	2,45x10 <sup>6</sup>	± 0,29x10 <sup>6</sup>	
9	1,46x10 <sup>6</sup>	5,20x10 <sup>5</sup>	8,75x10 <sup>5</sup>	9,51x10 <sup>5</sup>	± 9,29x10 <sup>5</sup>		2,18x10 <sup>6</sup>	4,20x10 <sup>6</sup>	1,66x10 <sup>6</sup>	2,68x10 <sup>6</sup>	± 2,63x10 <sup>6</sup>		2,74x10 <sup>6</sup>	3,72x10 <sup>6</sup>	3,42x10 <sup>6</sup>	3,29x10 <sup>6</sup>	± 0,78x10 <sup>6</sup>	
12	2,72x10 <sup>6</sup>	2,00x10 <sup>6</sup>	2,12x10 <sup>6</sup>	2,28x10 <sup>6</sup>	± 0,74x10 <sup>6</sup>		8,80x10 <sup>6</sup>	1,41x10 <sup>7</sup>	5,60x10 <sup>6</sup>	9,50x10 <sup>6</sup>	± 8,41x10 <sup>6</sup>		4,80x10 <sup>6</sup>	4,79x10 <sup>6</sup>	5,60x10 <sup>6</sup>	5,06x10 <sup>6</sup>	± 0,90x10 <sup>6</sup>	
15	3,60x10 <sup>6</sup>	3,58x10 <sup>6</sup>	3,40x10 <sup>6</sup>	3,58x10 <sup>6</sup>	± 0,22x10 <sup>6</sup>		2,13x10 <sup>7</sup>	1,98x10 <sup>7</sup>	1,20x10 <sup>7</sup>	1,77x10 <sup>7</sup>	± 0,96x10 <sup>7</sup>		7,25x10 <sup>6</sup>	1,33x10 <sup>7</sup>	8,75x10 <sup>6</sup>	9,10x10 <sup>6</sup>	± 7,13x10 <sup>6</sup>	
18	3,80x10 <sup>6</sup>	3,60x10 <sup>6</sup>	4,25x10 <sup>6</sup>	3,88x10 <sup>6</sup>	± 0,65x10 <sup>6</sup>		1,70x10 <sup>7</sup>	1,69x10 <sup>7</sup>	1,49x10 <sup>7</sup>	1,62x10 <sup>7</sup>	± 0,24x10 <sup>7</sup>		6,21x10 <sup>6</sup>	1,78x10 <sup>7</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>	8,39x10 <sup>6</sup>	± 16,72x10 <sup>6</sup>	
21	4,45x10 <sup>6</sup>	4,30x10 <sup>6</sup>	4,35x10 <sup>6</sup>	4,36x10 <sup>6</sup>	± 0,14x10 <sup>6</sup>		1,43x10 <sup>7</sup>	1,70x10 <sup>7</sup>	1,59x10 <sup>7</sup>	1,57x10 <sup>7</sup>	± 0,25x10 <sup>7</sup>		6,62x10 <sup>6</sup>	7,18x10 <sup>6</sup>	9,20x10 <sup>6</sup>	7,66x10 <sup>6</sup>	± 2,65x10 <sup>6</sup>	

Tabela A 10 - Coeficientes de variação das contagens celulares referentes às tabelas

Tempo (dias)	Clone C1			Clone U3			Clone US																					
	ASP <sub>2</sub>	Erd-Schreiber	Guillard																									
	16°	20°	24°		16°	20°	24°		16°	20°	24°		16°	20°	24°		16°	20°	24°									
0	0,18	0,22	0,21	0,31	0,15	0,14	0,26	0,21	0,18	0,29	0,32	0,35	0,13	0,19	0,11	0,10	0,16	0,12	0,11	0,24	0,10	0,18	0,10	0,33	0,16	0,14	0,45	
1	0,14	0,29	0,13	0,03	0,24	0,40	0,05	0,15	0,24	0,10	0,26	0,18	0,07	0,57	0,14	0,03	0,25	0,14	0,11	0,06	0,05	0,06	0,11	0,03	0,10	0,28		
2	0,05	0,18	0,33	0,05	0,25	0,34	0,07	0,14	0,11	0,06	0,38	0,70	0,09	0,38	0,47	0,08	0,58	0,56	0,07	0,12	0,10	0,03	0,01	0,33	0,07	0,13	0,19	
3	0,08	0,22	0,45	0,07	0,68	0,62	0,10	0,18	0,23	0,02	0,18	0,39	0,04	0,03	0,26	0,13	0,07	0,57	0,08	0,17	0,49	0,05	0,06	0,70	0,12	0,40	0,26	
4	0,12	0,19	0,14	0,08	0,11	0,69	0,12	0,20	0,11	0,16	0,11	0,30	0,08	0,60	0,16	0,22	0,14	0,61	0,08	0,23	0,77	0,08	0,04	0,71	0,09	0,16	0,26	
5	0,13	0,13	1,16	0,06	0,14	0,91	0,11	0,02	0,18	0,07	0,09	0,87	0,10	0,37	0,10	0,19	0,14	0,81	0,12	0,10	0,77	0,07	0,08	0,60	0,20	0,12	0,22	
6	0,06	0,18	1,00	0,04	0,05	0,05	0,13	0,12	0,51	0,21	0,07	0,02	0,13	0,22	0,12	0,11	0,31	0,49	0,13	0,07	0,64	0,17	0,10	0,60	0,11	0,13	0,25	
7	0,09	0,04	1,09	0,22	0,06	0,53	0,07	0,01	0,15	0,17	0,14	0,23	0,15	0,10	0,17	0,01	0,28	0,45	0,15	0,04	0,90	0,04	0,09	0,42	0,01	0,24	0,28	
8	0,05	0,22	1,00	0,22	0,10	0,80	0,05	0,03	0,22	1,14	0,21	0,28	0,08	0,07	0,18	0,08	0,07	0,39	0,13	0,07	0,71	0,23	0,12	0,45	0,08	0,07	0,06	
9	0,08	0,15	0,08	0,28	0,14	0,55	0,10	0,12	0,30	0,10	0,19	0,12	0,17	0,18	0,26	0,09	0,24	0,24	0,12	0,10	0,50	0,06	0,09	0,50	0,06	0,17	0,15	
12	0,09	0,06	0,63	0,30	0,12	0,48	0,02	0,12	0,25	0,14	0,14	0,14	0,13	0,18	0,12	0,02	0,25	0,11	0,09	0,11	0,09	0,17	0,02	0,21	0,45	0,05	0,23	0,09
15	0,10	0,12	0,24	0,38	0,18	0,24	0,13	0,21	0,19	0,14	0,10	0,07	0,15	0,22	0,13	0,18	0,15	0,17	0,15	0,06	0,03	0,11	0,14	0,28	0,06	0,38	0,40	
18	0,22	0,22	0,09	0,19	0,06	0,26	0,11	0,19	0,25	0,20	0,02	0,01	0,23	0,07	0,10	0,22	0,21	0,14	0,16	0,09	0,09	0,16	0,17	0,08	0,14	0,26	1,02	
21	0,05	0,15	0,17	0,18	0,14	0,07	0,14	0,14	0,34	0,08	0,18	0,04	0,07	0,17	0,20	0,06	0,07	0,09	0,12	0,14	0,02	0,04	0,08	0,08	0,02	0,15	0,18	

Tabela A 11 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Cananéia (C1) a 16°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	7,20x10 <sup>2</sup>	8,30x10 <sup>2</sup>	8,50x10 <sup>2</sup>	8,00x10 <sup>2</sup>	± 1,37x10 <sup>2</sup>		1,05x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	1,10x10 <sup>3</sup>	1,05x10 <sup>3</sup>	± 0,10x10 <sup>3</sup>		1,68x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	1,14x10 <sup>3</sup>	1,27x10 <sup>3</sup>	± 0,70x10 <sup>3</sup>	
1	1,60x10 <sup>3</sup>	1,80x10 <sup>3</sup>	2,10x10 <sup>3</sup>	1,83x10 <sup>3</sup>	± 0,49x10 <sup>3</sup>		3,30x10 <sup>3&lt;/sup</sup>											

Tabela A 12 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Cananéia (C1) a 20°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$2,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,83 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,17 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$		
1	$2,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$			$3,50 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3 \pm 0,00$			$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,67 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$		
2	$7,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$5,50 \times 10^3$	$6,33 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$			$5,50 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$7,00 \times 10^3$	$6,67 \times 10^3 \pm 2,04 \times 10^3$			$6,50 \times 10^3$	$5,50 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3 \pm 1,96 \times 10^3$		
3	$1,20 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$1,80 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4 \pm 0,68 \times 10^3$			$8,00 \times 10^3$	$9,00 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$8,33 \times 10^3 \pm 1,13 \times 10^3$			$1,45 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$		
4	$4,75 \times 10^4$	$6,45 \times 10^4$	$5,35 \times 10^4$	$5,52 \times 10^4 \pm 1,69 \times 10^4$			$7,95 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$2,02 \times 10^4 \pm 0,23 \times 10^4$			$4,10 \times 10^4$	$4,65 \times 10^4$	$5,25 \times 10^4$	$4,67 \times 10^4 \pm 1,13 \times 10^4$		
5	$1,15 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5 \pm 0,26 \times 10^5$			$4,95 \times 10^4$	$5,85 \times 10^4$	$5,25 \times 10^4$	$5,35 \times 10^4 \pm 0,90 \times 10^4$			$1,15 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$	$1,57 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$		
6	$2,49 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5 \pm 1,29 \times 10^5$			$1,02 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5 \pm 0,15 \times 10^5$			$3,30 \times 10^5$	$3,95 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$3,82 \times 10^5 \pm 0,91 \times 10^5$		
7	$4,85 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,98 \times 10^5 \pm 0,25 \times 10^5$			$1,93 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$1,86 \times 10^5$	$2,01 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$			$6,85 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	$8,05 \times 10^5$	$7,63 \times 10^5 \pm 1,33 \times 10^5$		
8	$6,60 \times 10^5$	$6,55 \times 10^5$	$6,40 \times 10^5$	$6,52 \times 10^5 \pm 0,20 \times 10^5$			$3,65 \times 10^5$	$4,15 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$			$1,09 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6 \pm 0,12 \times 10^6$		
9	$9,00 \times 10^5$	$8,70 \times 10^5$	$8,25 \times 10^5$	$8,65 \times 10^5 \pm 0,74 \times 10^5$			$5,55 \times 10^5$	$6,45 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5 \pm 1,35 \times 10^5$			$1,56 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$		
12	$1,54 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$	$1,36 \times 10^6 \pm 0,31 \times 10^6$			$1,35 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6 \pm 0,27 \times 10^6$			$5,10 \times 10^6$	$4,05 \times 10^6$	$4,12 \times 10^6$	$4,42 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6$		
15	$1,92 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6 \pm 0,56 \times 10^6$			$1,60 \times 10^6$	$2,73 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$	$2,34 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^6$			$5,10 \times 10^6$	$6,15 \times 10^6$	$5,70 \times 10^6$	$5,65 \times 10^6 \pm 1,03 \times 10^6$		
18	$1,80 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6 \pm 0,36 \times 10^6$			$2,70 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6 \pm 0,00$			$5,85 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	$5,62 \times 10^6$	$5,82 \times 10^6 \pm 0,38 \times 10^6$		
21	$1,41 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6 \pm 0,21 \times 10^6$			$2,01 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6 \pm 0,47 \times 10^6$			$6,60 \times 10^6$	$4,44 \times 10^6$	$6,00 \times 10^6$	$5,68 \times 10^6 \pm 2,19 \times 10^6$		

Tabela A 13 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Cananéia (C1) a 24°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3 \pm 0,00$			$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3 \pm 0,00$			$3,50 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$3,17 \times 10^3 \pm 1,13 \times 10^3$		
1	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3 \pm 0,00$			$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3 \pm 0,00$		
2	$5,00 \times 10^2$	$5,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^3$	$6,67 \times 10^2 \pm 5,66 \times 10^2$			$3,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$2,17 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$			$1,50 \cdot 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3 \pm 0,00$		
3	$1,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$			$6,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$3,83 \times 10^3 \pm 4,42 \times 10^3$			$3,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$		
4	$1,90 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$2,63 \times 10^3 \pm 3,19 \times 10^3$			$1,95 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4$	$5,50 \times 10^3$	$1,28 \times 10^4 \pm 1,38 \times 10^4$			$9,00 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$8,33 \times 10^3 \pm 1,13 \times 10^3$		
5	$4,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$9,00 \times 10^3$	$5,17 \times 10^3 \pm 6,95 \times 10^3$			$4,60 \times 10^4$	$2,55 \times 10^4$	$8,50 \times 10^3$	$2,67 \times 10^4 \pm 3,68 \times 10^4$			$2,45 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4 \pm 0,49 \times 10^4$		
6	$1,82 \times 10^4$	$4,83 \times 10^3$	$5,20 \times 10^4$	$4,77 \times 10^4 \pm 4,77 \times 10^4$			$1,08 \times 10^5$	$4,65 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$	$5,70 \times 10^4 \pm 9,11 \times 10^4$			$5,70 \times 10^4$	$5,60 \times 10^4$	$5,25 \times 10^4$	$5,52 \times 10^4 \pm 0,46 \times 10^4$		
7	$4,53 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$1,71 \times 10^5$	$7,64 \times 10^4 \pm 16,36 \times 10^4$			$2,75 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$4,35 \times 10^4$	$1,41 \times 10^5 \pm 2,35 \times 10^5$			$1,09 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5 \pm 0,35 \times 10^5$		
8	$7,58 \times 10^4$	$1,82 \times 10^4$	$2,21 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5 \pm 2,05 \times 10^5$			$5,80 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$	$9,75 \times 10^4$	$3,14 \times 10^5 \pm 4,81 \times 10^5$			$2,70 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$3,15 \times 10^5$	$2,70 \times 10^5 \pm 0,88 \times 10^5$		
9	$1,77 \times 10^5$	$5,21 \times 10^4$	$3,85 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5 \pm 3,30 \times 10^5$			$1,11 \times 10^6$	$5,40 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5$	$6,10 \times 10^5 \pm 9,19 \times 10^5$			$4,20 \times 10^5$	$3,45 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$	$4,17 \times 10^5 \pm 1,37 \times 10^5$		
12	$3,32 \times 10^5$	$2,97 \times 10^5$	$8,55 \times 10^5$	$4,95 \times 10^5 \pm 6,13 \times 10^5$			$3,45 \times 10^6$	$2,25 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$2,30 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$			$8,70 \times 10^5$	$7,80 \times 10^5$	$7,77 \times 10^5$	$9,20 \times 10^5 \pm 3,34 \times 10^5$		
15	$5,81 \times 10^5$	$6,94 \times 10^5$	$9,27 \times 10^5$	$7,34 \times 10^5 \pm 3,46 \times 10^5$			$3,90 \times 10^6$	$2,32 \times 10^6$	$3,30 \times 10^6$	$3,17 \times 10^6 \pm 1,56 \times 10^6$			$1,57 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	$2,32 \times 10^6$	$1,90 \times 10^6 \pm 0,75 \times 10^6$		
18	$9,57 \times 10^5$	$8,40 \times 10^5$	$9,89 \times 10^5$	$9,29 \times 10^5 \pm 1,54 \times 10^5$			$5,55 \times 10^6$	$3,52 \times 10^6$	$3,60 \times 10^6$	$4,22 \times 10^6 \pm 2,25 \times 10^6$			$1,80 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6$	$2,25 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^6$		
21	$7,90 \times 10^5$	$9,76 \times 10^5$	$1,11 \times 10^6$	$9,59 \times 10^5 \pm 3,15 \times 10^5$			$4,12 \times 10^6$	$3,75 \times 10^6$	$4,20 \times 10^6$	$4,02 \times 10^6 \pm 0,47 \times 10^6$			$9,75 \times 10^5$	$1,27 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	$1,36 \times 10^6 \pm 0,86 \times 10^6$		

Tabela A 14 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (U3) a 16°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP<sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f<sub>1</sub>					
1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	


<tbl\_r cells="18" ix="2" maxcspan="1" max

Tabela A 15 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (U3) a 20°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$3,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,67 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$		
1	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3 \pm 0,00$			$3,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,17 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$3,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$		
2	$7,50 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$7,17 \times 10^3 \pm 1,13 \times 10^3$			$7,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$8,00 \times 10^3$	$7,17 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$			$7,50 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$7,00 \times 10^3$	$7,00 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$		
3	$2,20 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$	$2,10 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4 \pm 0,35 \times 10^3$			$1,00 \times 10^4$	$8,50 \times 10^3$	$1,15 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$			$2,15 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$1,97 \times 10^4 \pm 0,62 \times 10^4$		
4	$8,15 \times 10^4$	$5,65 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$	$6,77 \times 10^4 \pm 2,49 \times 10^4$			$2,35 \times 10^4$	$2,25 \times 10^4$	$3,10 \times 10^4$	$2,57 \times 10^4 \pm 0,91 \times 10^4$			$5,70 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$6,15 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4 \pm 1,14 \times 10^4$		
5	$2,04 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$	$1,83 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$			$6,90 \times 10^4$	$7,20 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$	$8,13 \times 10^4 \pm 3,69 \times 10^4$			$1,59 \times 10^5$	$1,44 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5 \pm 0,27 \times 10^5$		
6	$4,20 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$4,15 \times 10^5$	$4,12 \times 10^5 \pm 0,20 \times 10^5$			$1,85 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$	$2,18 \times 10^5 \pm 0,82 \times 10^5$			$4,45 \times 10^5$	$3,95 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	$4,27 \times 10^5 \pm 0,54 \times 10^5$		
7	$6,20 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$5,60 \times 10^5$	$5,60 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^5$			$3,30 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$	$4,55 \times 10^5$	$3,85 \times 10^5 \pm 1,25 \times 10^5$			$8,15 \times 10^5$	$7,75 \times 10^5$	$7,95 \times 10^5$	$7,95 \times 10^5 \pm 0,39 \times 10^5$		
8	$8,40 \times 10^5$	$6,90 \times 10^5$	$7,35 \times 10^5$	$7,55 \times 10^5 \pm 1,51 \times 10^5$			$4,70 \times 10^5$	$5,35 \times 10^5$	$6,85 \times 10^5$	$5,63 \times 10^5 \pm 2,16 \times 10^5$			$1,21 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6$	$1,17 \times 10^6$	$1,17 \times 10^6 \pm 0,09 \times 10^6$		
9	$1,03 \times 10^6$	$8,40 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5$	$9,23 \times 10^5 \pm 3,73 \times 10^5$			$7,20 \times 10^5$	$8,40 \times 10^5$	$1,12 \times 10^6$	$8,93 \times 10^5 \pm 4,02 \times 10^5$			$1,57 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6 \pm 0,12 \times 10^6$		
12	$1,30 \times 10^6$	$1,24 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6 \pm 0,11 \times 10^6$			$1,50 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$2,49 \times 10^6$	$1,96 \times 10^6 \pm 0,98 \times 10^6$			$4,50 \times 10^6$	$3,97 \times 10^6$	$4,05 \times 10^6$	$4,17 \times 10^6 \pm 0,56 \times 10^6$		
15	$1,57 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,53 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$			$3,00 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6 \pm 0,51 \times 10^6$			$5,16 \times 10^6$	$5,25 \times 10^6$	$5,40 \times 10^6$	$5,27 \times 10^6 \pm 0,24 \times 10^6$		
18	$1,56 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6 \pm 0,09 \times 10^6$			$3,45 \times 10^6$	$2,70 \times 10^6$	$2,40 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^6$			$4,80 \times 10^6$	$4,65 \times 10^6$	$5,32 \times 10^6$	$4,92 \times 10^6 \pm 0,69 \times 10^6$		
21	$1,35 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6 \pm 0,25 \times 10^6$			$1,95 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$	$1,83 \times 10^6 \pm 0,31 \times 10^6$			$4,80 \times 10^6$	$5,25 \times 10^6$	$5,55 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6 \pm 0,74 \times 10^6$		

Tabela A 16 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (U3) a 24°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f <sub>1</sub>					
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$
0	$4,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$3,50 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$			$5,00 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$4,83 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$			$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3 \pm 0,00$		
1	$2,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$			$4,00 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$4,17 \times 10^3 \pm 0,14 \times 10^3$			$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,67 \times 10^3 \pm 0,57 \times 10^3$		
2	$2,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$1,50 \times 10^3$	$2,17 \times 10^3 \pm 1,13 \times 10^3$			$7,00 \times 10^3$	$7,50 \times 10^3$	$6,00 \times 10^3$	$6,83 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$			$2,00 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3 \pm 2,59 \times 10^3$		
3	$4,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3 \pm 2,26 \times 10^3$			$2,10 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$	$1,92 \times 10^4 \pm 0,40 \times 10^4$			$3,00 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$8,50 \times 10^3$	$5,33 \times 10^3 \pm 5,57 \times 10^3$		
4	$1,35 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$7,50 \times 10^3$	$1,13 \times 10^3 \pm 0,65 \times 10^4$			$6,30 \times 10^4$	$5,10 \times 10^4$	$4,95 \times 10^4$	$5,45 \times 10^4 \pm 1,45 \times 10^4$			$1,20 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4 \pm 1,77 \times 10^4$		
5	$4,30 \times 10^4$	$3,25 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$3,15 \times 10^4 \pm 2,36 \times 10^3$			$1,72 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$			$2,40 \times 10^4$	$3,90 \times 10^4$	$6,90 \times 10^4$	$4,40 \times 10^4 \pm 4,49 \times 10^4$		
6	$1,27 \times 10^5$	$7,50 \times 10^4$	$5,40 \times 10^4$	$8,50 \times 10^4 \pm 7,37 \times 10^4$			$4,15 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$4,03 \times 10^5 \pm 0,48 \times 10^5$			$5,70 \times 10^4$	$1,09 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$1,10 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^5$		
7	$2,70 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	$1,30 \times 10^5$	$1,92 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^5$			$7,95 \times 10^5$	$6,15 \times 10^5$	$7,80 \times 10^5$	$7,30 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^5$			$2,00 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$4,95 \times 10^5$	$3,42 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^5$		
8	$4,00 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	$2,40 \times 10^5$	$3,13 \times 10^5 \pm 1,58 \times 10^5$			$1,27 \times 10^6$	$9,90 \times 10^5$	$1,12 \times 10^6$	$1,13 \times 10^6 \pm 0,27 \times 10^6$			$3,80 \times 10^5$	$5,55 \times 10^5$	$7,35 \times 10^5$	$5,57 \times 10^5 \pm 3,48 \times 10^5$		
9	$4,50 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5 \pm 1,38 \times 10^5$			$1,86 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	$1,83 \times 10^6$	$1,83 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$			$7,80 \times 10^5$	$8,10 \times 10^5$	$1,08 \times 10^6$	$8,90 \times 10^5 \pm 3,24 \times 10^5$		
12	$7,05 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$	$6,25 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^5$			$4,80 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6$	$3,70 \times 10^6 \pm 1,96 \times 10^6$			$1,30 \times 10^6$	$1,38 \times 10^6$	$1,53 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^6$		
15	$9,90 \times 10^5$	$9,30 \times 10^5$	$8,10 \times 10^5$	$9,10 \times 10^5 \pm 1,80 \times 10^5$			$4,95 \times 10^6$	$5,25 \times 10^6$	$4,87 \times 10^6$	$5,02 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$			$2,62 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$	$2,77 \times 10^6$	$2,47 \times 10^6 \pm 0,78 \times 10^6$		
18	$8,70 \times 10^5$	$8,40 \times 10^5$	$8,55 \times 10^5$	$8,55 \times 10^5 \pm 0,29 \times 10^5$			$4,80 \times 10^6$	$4,65 \times 10^6$	$5,32 \times 10^6$	$4,92 \times 10^6 \pm 0,69 \times 10^6$			$3,97 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6$	$3,82 \times 10^6$	$3,65 \times 10^6 \pm 0,86 \times 10^6$		
21	$9,90 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6$	$9,45 \times 10^5$	$9,95 \times 10^5 \pm 1,03 \times 10^5$			$4,12 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$4,50 \times 10^6$	$3,87 \times 10^6 \pm 1,53 \times 10^6$			$3,90 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$3,75 \times 10^6$	$3,70 \times 10^6 \pm 0,45 \times 10^6$		

Tabela A 17 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (U5) a 16°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP<sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard f<sub>1</sub>					
1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm$	$2\sigma$	

</tbl\_r

Tabela A 18 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (US) a 20°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>					Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard f <sub>1</sub>				
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$
0	2,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	0,00	3,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	0,00	2,50x10 <sup>3</sup>	2,80x10 <sup>3</sup>	2,10x10 <sup>3</sup>	2,47x10 <sup>3</sup>	0,69x10 <sup>3</sup>
1	2,50x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	2,83x10 <sup>3</sup>	0,57x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	1,70x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	2,90x10 <sup>3</sup>	3,13x10 <sup>3</sup>	0,63x10 <sup>3</sup>
2	1,20x10 <sup>4</sup>	1,15x10 <sup>4</sup>	1,25x10 <sup>4</sup>	1,20x10 <sup>4</sup>	0,10x10 <sup>4</sup>	9,00x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	9,50x10 <sup>3</sup>	9,50x10 <sup>3</sup>	0,98x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	1,30x10 <sup>4</sup>	1,19x10 <sup>4</sup>	1,16x10 <sup>4</sup>	0,30x10 <sup>3</sup>
3	3,35x10 <sup>4</sup>	3,25x10 <sup>4</sup>	2,65x10 <sup>4</sup>	3,08x10 <sup>4</sup>	0,74x10 <sup>4</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	1,25x10 <sup>4</sup>	1,55x10 <sup>4</sup>	1,45x10 <sup>4</sup>	0,34x10 <sup>4</sup>	2,70x10 <sup>4</sup>	5,30x10 <sup>4</sup>	4,05x10 <sup>4</sup>	4,02x10 <sup>4</sup>	2,55x10 <sup>4</sup>
4	7,05x10 <sup>4</sup>	7,65x10 <sup>4</sup>	6,45x10 <sup>4</sup>	7,05x10 <sup>4</sup>	1,18x10 <sup>4</sup>	4,40x10 <sup>4</sup>	3,50x10 <sup>4</sup>	3,65x10 <sup>4</sup>	3,85x10 <sup>4</sup>	0,95x10 <sup>4</sup>	7,05x10 <sup>4</sup>	8,87x10 <sup>4</sup>	6,83x10 <sup>4</sup>	7,58x10 <sup>4</sup>	2,19x10 <sup>4</sup>
5	2,22x10 <sup>5</sup>	2,44x10 <sup>5</sup>	2,31x10 <sup>5</sup>	2,32x10 <sup>5</sup>	0,22x10 <sup>5</sup>	1,47x10 <sup>5</sup>	1,20x10 <sup>5</sup>	1,17x10 <sup>5</sup>	1,28x10 <sup>5</sup>	0,32x10 <sup>5</sup>	2,34x10 <sup>5</sup>	2,31x10 <sup>5</sup>	2,52x10 <sup>5</sup>	2,39x10 <sup>5</sup>	0,22x10 <sup>5</sup>
6	4,85x10 <sup>5</sup>	4,55x10 <sup>5</sup>	4,65x10 <sup>5</sup>	4,68x10 <sup>5</sup>	0,30x10 <sup>5</sup>	3,65x10 <sup>5</sup>	3,15x10 <sup>5</sup>	3,10x10 <sup>5</sup>	3,30x10 <sup>5</sup>	0,60x10 <sup>5</sup>	5,70x10 <sup>5</sup>	4,90x10 <sup>5</sup>	5,10x10 <sup>5</sup>	5,23x10 <sup>5</sup>	0,82x10 <sup>5</sup>
7	6,65x10 <sup>5</sup>	6,55x10 <sup>5</sup>	6,40x10 <sup>5</sup>	6,53x10 <sup>5</sup>	0,25x10 <sup>5</sup>	5,65x10 <sup>5</sup>	4,75x10 <sup>5</sup>	5,10x10 <sup>5</sup>	5,17x10 <sup>5</sup>	0,89x10 <sup>5</sup>	9,45x10 <sup>5</sup>	8,30x10 <sup>5</sup>	8,95x10 <sup>5</sup>	8,90x10 <sup>5</sup>	0,13x10 <sup>5</sup>
8	8,55x10 <sup>5</sup>	8,10x10 <sup>5</sup>	7,95x10 <sup>5</sup>	8,20x10 <sup>5</sup>	0,61x10 <sup>5</sup>	8,55x10 <sup>5</sup>	7,35x10 <sup>5</sup>	7,95x10 <sup>5</sup>	7,95x10 <sup>5</sup>	1,18x10 <sup>5</sup>	1,27x10 <sup>6</sup>	1,18x10 <sup>6</sup>	1,20x10 <sup>6</sup>	1,22x10 <sup>6</sup>	0,09x10 <sup>5</sup>
9	1,05x10 <sup>6</sup>	1,03x10 <sup>6</sup>	1,02x10 <sup>6</sup>	1,03x10 <sup>6</sup>	0,03x10 <sup>6</sup>	1,24x10 <sup>6</sup>	1,05x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	0,19x10 <sup>6</sup>	1,75x10 <sup>6</sup>	1,94x10 <sup>6</sup>	1,70x10 <sup>6</sup>	1,80x10 <sup>6</sup>	0,25x10 <sup>6</sup>
12	1,50x10 <sup>6</sup>	1,42x10 <sup>6</sup>	1,41x10 <sup>6</sup>	1,44x10 <sup>6</sup>	0,10x10 <sup>6</sup>	2,46x10 <sup>6</sup>	2,31x10 <sup>6</sup>	2,31x10 <sup>6</sup>	2,36x10 <sup>6</sup>	0,17x10 <sup>6</sup>	4,87x10 <sup>6</sup>	5,37x10 <sup>6</sup>	4,95x10 <sup>6</sup>	5,06x10 <sup>6</sup>	0,53x10 <sup>6</sup>
15	1,95x10 <sup>6</sup>	1,77x10 <sup>6</sup>	1,72x10 <sup>6</sup>	1,81x10 <sup>6</sup>	0,24x10 <sup>6</sup>	3,60x10 <sup>6</sup>	3,45x10 <sup>6</sup>	3,15x10 <sup>6</sup>	3,40x10 <sup>6</sup>	0,45x10 <sup>6</sup>	5,10x10 <sup>6</sup>	8,30x10 <sup>6</sup>	9,43x10 <sup>6</sup>	7,61x10 <sup>6</sup>	4,40x10 <sup>6</sup>
18	2,47x10 <sup>6</sup>	1,60x10 <sup>6</sup>	1,80x10 <sup>6</sup>	1,96x10 <sup>6</sup>	0,89x10 <sup>6</sup>	2,85x10 <sup>6</sup>	2,70x10 <sup>6</sup>	2,76x10 <sup>6</sup>	2,77x10 <sup>6</sup>	0,15x10 <sup>6</sup>	4,05x10 <sup>6</sup>	6,15x10 <sup>6</sup>	5,93x10 <sup>6</sup>	5,38x10 <sup>6</sup>	2,26x10 <sup>6</sup>
21	1,63x10 <sup>6</sup>	1,39x10 <sup>6</sup>	1,65x10 <sup>6</sup>	1,56x10 <sup>6</sup>	0,28x10 <sup>6</sup>	1,93x10 <sup>6</sup>	2,38x10 <sup>6</sup>	2,14x10 <sup>6</sup>	2,15x10 <sup>6</sup>	0,44x10 <sup>6</sup>	3,06x10 <sup>6</sup>	3,23x10 <sup>6</sup>	3,48x10 <sup>6</sup>	3,26x10 <sup>6</sup>	0,41x10 <sup>6</sup>

Tabela A 19 - Resultados das medidas de fluorescência *in vivo* para o clone de Ubatuba (US) a 24°C, médias ( $\bar{x}$ ) e respectivos intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ )

Tempo (dias)	Meio ASP <sub>2</sub>					Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard f <sub>1</sub>				
	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$	1	2	3	$\bar{x}$	$\pm 2\sigma$
0	3,00x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	2,83x10 <sup>3</sup>	0,57x10 <sup>3</sup>	5,50x10 <sup>3</sup>	4,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	4,50x10 <sup>3</sup>	1,96x10 <sup>3</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	4,50x10 <sup>3</sup>	4,17x10 <sup>3</sup>	0,57x10 <sup>3</sup>
1	1,50x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	1,17x10 <sup>3</sup>	0,73x10 <sup>3</sup>	2,00x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	2,67x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	0,00
2	1,00x10 <sup>3</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>3</sup>	0,98x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	1,96x10 <sup>3</sup>	2,50x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	4,00x10 <sup>3</sup>	3,33x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>
3	1,00x10 <sup>3</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	5,00x10 <sup>2</sup>	6,67x10 <sup>2</sup>	5,66x10 <sup>2</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	6,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	3,50x10 <sup>3</sup>	4,49x10 <sup>3</sup>	5,50x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	8,50x10 <sup>3</sup>	5,15x10 <sup>3</sup>
4	5,50x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	2,00x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	4,27x10 <sup>3</sup>	5,00x10 <sup>3</sup>	2,30x10 <sup>4</sup>	1,10x10 <sup>4</sup>	1,30x10 <sup>4</sup>	1,80x10 <sup>4</sup>	2,00x10 <sup>4</sup>	3,30x10 <sup>4</sup>	2,80x10 <sup>4</sup>	2,70x10 <sup>4</sup>	1,29x10 <sup>4</sup>
5	8,00x10 <sup>3</sup>	1,50x10 <sup>3</sup>	3,00x10 <sup>3</sup>	4,17x10 <sup>3</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	1,20x10 <sup>4</sup>	7,15x10 <sup>4</sup>	2,40x10 <sup>4</sup>	3,58x10 <sup>4</sup>	6,17x10 <sup>4</sup>	4,55x10 <sup>4</sup>	7,50x10 <sup>4</sup>	6,15x10 <sup>4</sup>	6,07x10 <sup>4</sup>	2,89x10 <sup>4</sup>
6	2,40x10 <sup>4</sup>	8,00x10 <sup>3</sup>	1,00x10 <sup>4</sup>	1,40x10 <sup>4</sup>	1,71x10 <sup>4</sup>	3,90x10 <sup>4</sup>	1,35x10 <sup>5</sup>	6,15x10 <sup>4</sup>	7,85x10 <sup>4</sup>	9,84x10 <sup>4</sup>	8,10x10 <sup>4</sup>	11,50x10 <sup>5</sup>	1,15x10 <sup>5</sup>	1,15x10 <sup>5</sup>	0,68x10 <sup>5</sup>
7	6,00x10 <sup>4</sup>	2,00x10 <sup>4</sup>	4,00x10 <sup>4</sup>	4,00x10 <sup>4</sup>	3,92x10 <sup>4</sup>	8,10x10 <sup>4</sup>	2,80x10 <sup>5</sup>	2,10x10 <sup>5</sup>	1,90x10 <sup>5</sup>	1,98x10 <sup>5</sup>	2,40x10 <sup>5</sup>	3,60x10 <sup>5</sup>	3,80x10 <sup>5</sup>	3,27x10 <sup>5</sup>	1,48x10 <sup>5</sup>
8	1,48x10 <sup>5</sup>	4,05x10 <sup>4</sup>	7,05x10 <sup>4</sup>	8,63x10 <sup>4</sup>	10,87x10 <sup>4</sup>	2,70x10 <sup>5</sup>	5,20x10 <sup>5</sup>	3,40x10 <sup>5</sup>	3,77x10 <sup>5</sup>	5,23x10 <sup>5</sup>	4,25x10 <sup>5</sup>	6,30x10 <sup>5</sup>	5,70x10 <sup>5</sup>	5,42x10 <sup>5</sup>	2,07x10 <sup>5</sup>
9	3,30x10 <sup>5</sup>	1,00x10 <sup>5</sup>	1,90x10 <sup>5</sup>	2,07x10 <sup>5</sup>	2,27x10 <sup>5</sup>	5,85x10 <sup>5</sup>	1,02x10 <sup>6</sup>	4,65x10 <sup>5</sup>	6,90x10 <sup>5</sup>	5,78x10 <sup>5</sup>	6,60x10 <sup>5</sup>	9,00x10 <sup>5</sup>	9,00x10 <sup>5</sup>	8,20x10 <sup>5</sup>	2,72x10 <sup>5</sup>
12	6,30x10 <sup>5</sup>	4,50x10 <sup>5</sup>	4,95x10 <sup>5</sup>	5,25x10 <sup>5</sup>	5,84x10 <sup>5</sup>	2,34x10 <sup>6</sup>	3,75x10 <sup>6</sup>	1,47x10 <sup>6</sup>	2,52x10 <sup>6</sup>	6,26x10 <sup>6</sup>	1,15x10 <sup>6</sup>	1,39x10 <sup>6</sup>	1,14x10 <sup>6</sup>	1,23x10 <sup>6</sup>	0,28x10 <sup>6</sup>
15	8,25x10 <sup>5</sup>	7,80x10 <sup>5</sup>	8,10x10 <sup>5</sup>	8,05x10 <sup>5</sup>	0,45x10 <sup>5</sup>	5,77x10 <sup>6</sup>	5,34x10 <sup>6</sup>	3,15x10 <sup>6</sup>	4,75x10 <sup>6</sup>	2,75x10 <sup>6</sup>	1,80x10 <sup>6</sup>	3,22x10 <sup>6</sup>	1,65x10 <sup>6</sup>	2,22x10 <sup>6</sup>	1,70x10 <sup>6</sup>
18	8,70x10 <sup>5</sup>	7,80x10 <sup>5</sup>	9,45x10 <sup>5</sup>	8,65x10 <sup>5</sup>	1,62x10 <sup>5</sup>	4,50x10 <sup>6</sup>	4,50x10 <sup>6</sup>	4,05x10 <sup>6</sup>	4,35x10 <sup>6</sup>	0,51x10 <sup>6</sup>	1,53x10 <sup>6</sup>	4,42x10 <sup>6</sup>	2,85x10 <sup>6</sup>	2,93x10 <sup>6</sup>	2,84x10 <sup>6</sup>
21	1,00x10 <sup>6</sup>	9,00x10 <sup>5</sup>	1,05x10 <sup>6</sup>	9,80x10 <sup>5</sup>	1,50x10 <sup>5</sup>	3,82x10 <sup>6</sup>	4,50x10 <sup>6</sup>	4,42x10 <sup>6</sup>	4,25x10 <sup>6</sup>	0,73x10 <sup>6</sup>	1,62x10 <sup>6</sup>	2,46x10 <sup>6</sup>	1,71x10 <sup>6</sup>	1,93x10 <sup>6</sup>	0,90x10 <sup>6</sup>

Tabela A 20 - Coeficientes de variação das medidas de fluorescência *in vivo* referentes às tabelas

Tempo (dias)	Clone C1					Clone U3					Clone US						
	ASP <sub>2</sub>	Erd-Schreiber	Guillard														
0	0,09	0,12	0,00	0,05	0,10	0,00	0,28	0,13	0,18	0,07	0,12	0,14	0,14	0,09	0,06		
1	0,14	0,20	0,00	0,03	0,00	0,12	0,02	0,11	0,00	0,07	0,00	0,25	0,02	0,25	0,03	0,10	0,00
2	0,05	0,12	0,43	0,04	0,16	0,35	0,07	0,15	0,00	0,00	0,08	0,27	0,09	0,11	0,08	0,13	0,23
3	0,08	0,22	0,50	0,07	0,07	0,59	0,10	0,09	0,20	0,02	0,09	0,35	0,04	0,15	0,10	0,13	0,32
4	0,11	0,16	0,62	0,08	0,06	0,55	0,12	0,07	0,17	0,16	0,19	0,29	0,08	0,18	0,14	0	

Tabela A 21 - Médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e amplitude de variação dos coeficientes de variação das contagens celulares para os clones de Cananéia (C1), Ubatuba(U3) e Ubatuba(U5).

CLONE	METO	16°				20°				24°			
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV	$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV	$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV
C1	ASP <sub>2</sub>	0,10	0,05	0,51	0,05 a 0,22	0,17	0,07	0,40	0,04 a 0,29	0,48	0,41	0,86	0,08 a 1,16
	ERD-SC	0,17	0,12	0,69	0,03 a 0,38	0,17	0,16	0,93	0,05 a 0,68	0,50	0,28	0,56	0,07 a 1,00
	GUILL	0,10	0,06	0,57	0,05 a 0,26	0,13	0,07	0,53	0,01 a 0,21	0,23	0,10	0,45	0,11 a 0,51
U3	ASP <sub>2</sub>	0,21	0,28	1,32	0,02 a 1,14	0,17	0,10	0,58	0,02 a 0,38	0,26	0,25	0,98	0,02 a 0,87
	ERD-SC	0,12	0,05	0,44	0,04 a 0,23	0,24	0,18	0,75	0,03 a 0,60	0,17	0,11	0,63	0,02 a 0,47
	GUILL	0,13	0,08	0,58	0,01 a 0,25	0,20	0,14	0,68	0,07 a 0,58	0,27	0,15	0,54	0,09 a 0,81
U5	ASP <sub>2</sub>	0,12	0,03	0,23	0,07 a 0,16	0,11	0,06	0,56	0,04 a 0,24	0,38	0,33	0,87	0,02 a 0,90
	ERD-SC	0,09	0,07	0,73	0,02 a 0,23	0,10	0,05	0,50	0,01 a 0,21	0,40	0,22	0,56	0,03 a 0,71
	GUILL	0,09	0,06	0,61	0,01 a 0,20	0,19	0,10	0,52	0,07 a 0,40	0,29	0,23	0,81	0,06 a 0,45

Tabela A 22 - Médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e amplitude de variação dos coeficientes de variação das medidas de fluorescência *in vivo* para os clones de Cananéia(C1), Ubatuba(U3) e Ubatuba(U5).

CLONE	METO	16°				20°				24°			
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV	$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV	$\bar{x}$	$\sigma$	CV	AV
C1	ASP <sub>2</sub>	0,10	0,05	0,50	0,01 a 0,22	0,12	0,06	0,12	0,02 a 0,22	0,52	0,38	0,72	0,00 a 1,09
	ERD-SC	0,15	0,12	0,77	0,03 a 0,38	0,10	0,07	0,69	0,00 a 0,28	0,47	0,30	0,63	0,00 a 0,85
	GUILL	0,10	0,06	0,64	0,02 a 0,28	0,10	0,05	0,54	0,02 a 0,20	0,15	0,09	0,61	0,00 a 0,32
U3	ASP <sub>2</sub>	0,12	0,07	0,55	0,00 a 0,21	0,08	0,05	0,64	0,00 a 0,19	0,23	0,13	0,57	0,02 a 0,44
	ERD-SC	0,12	0,06	0,49	0,02 a 0,24	0,16	0,06	0,37	0,08 a 0,25	0,11	0,07	0,61	0,04 a 0,27
	GUILL	0,12	0,07	0,60	0,01 a 0,25	0,08	0,05	0,62	0,02 a 0,20	0,25	0,19	0,75	0,00 a 0,53
U5	ASP <sub>2</sub>	0,11	0,03	0,30	0,06 a 0,16	0,07	0,06	0,84	0,00 a 0,23	0,40	0,27	0,67	0,03 a 0,82
	ERD-SC	0,08	0,05	0,69	0,02 a 0,18	0,09	0,06	0,66	0,00 a 0,25	0,47	0,24	0,52	0,09 a 0,88
	GUILL	0,09	0,06	0,62	0,01 a 0,20	0,12	0,10	0,79	0,01 a 0,32	0,24	0,13	0,53	0,00 a 0,49

Tabela A 23 - Resultados das regressões do número de células contra o tempo após transformação monologarítmica da variável  $y$  ( $y = ax^b + y_0$ ;  $a$  - coeficiente linear;  $b$  - coeficiente angular;  $r$  - coeficiente de correlação linear;  $y'_0$  - estimativa do número de células inicial;  $y'_1$  - estimativa do número de células no fim da fase de crescimento exponencial;  $\mu$  - taxa máxima de crescimento calculada a partir de  $y'_0$  e  $y'_1$

Réplicas	Clone C1 16°																	
	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard					
	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1	4,05	0,32	0,99	$2,35 \times 10^4$	$9,74 \times 10^5$	1,07	4,11	0,47	0,99	$3,75 \times 10^4$	$9,37 \times 10^5$	1,55	4,06	0,34	1,00	$2,47 \times 10^4$	$1,20 \times 10^6$	1,12
R2	4,06	0,32	1,00	$2,43 \times 10^4$	$1,00 \times 10^6$	1,07	4,09	0,48	0,99	$3,70 \times 10^4$	$1,02 \times 10^6$	1,60	4,06	0,35	0,99	$2,59 \times 10^4$	$1,54 \times 10^6$	1,18
R3	4,10	0,30	0,99	$2,52 \times 10^4$	$8,41 \times 10^5$	1,01	4,11	0,48	0,99	$3,87 \times 10^4$	$1,09 \times 10^6$	1,60	4,06	0,35	1,00	$2,63 \times 10^4$	$1,56 \times 10^6$	1,18
$20^\circ$																		
R1	3,59	0,42	0,99	$1,02 \times 10^4$	$1,26 \times 10^5$	1,39	3,73	0,33	0,99	$1,14 \times 10^4$	$2,20 \times 10^6$	1,08	3,75	0,41	1,00	$1,43 \times 10^4$	$4,11 \times 10^6$	1,36
R2	3,73	0,41	1,00	$1,38 \times 10^4$	$1,57 \times 10^5$	1,36	3,80	0,32	1,00	$1,32 \times 10^4$	$2,20 \times 10^6$	1,05	3,84	0,40	0,99	$1,76 \times 10^4$	$4,51 \times 10^6$	1,33
R3	3,76	0,41	0,99	$1,46 \times 10^4$	$1,56 \times 10^6$	1,35	3,97	0,29	0,99	$1,84 \times 10^4$	$2,07 \times 10^6$	0,97	3,79	0,42	1,00	$1,62 \times 10^4$	$5,09 \times 10^6$	1,38
$24^\circ$																		
R1	3,12	0,21	0,72	$2,15 \times 10^3$	$1,10 \times 10^5$	0,71	3,66	0,34	0,98	$1,01 \times 10^4$	$5,45 \times 10^6$	1,13	3,52	0,31	0,98	$6,82 \times 10^3$	$2,17 \times 10^6$	1,04
R2	3,36	0,12	0,54	$3,02 \times 10^3$	$2,55 \times 10^4$	0,38	3,55	0,31	0,97	$7,13 \times 10^3$	$2,05 \times 10^6$	1,02	3,51	0,31	0,98	$6,51 \times 10^3$	$1,80 \times 10^6$	1,01
R3	3,37	0,26	0,91	$4,22 \times 10^3$	$4,78 \times 10^5$	0,85	3,53	0,25	0,91	$6,04 \times 10^3$	$6,19 \times 10^5$	0,83	3,59	0,31	0,97	$8,04 \times 10^3$	$2,47 \times 10^6$	1,03

Réplicas	Clone U3 16°																	
	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard					
	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1	4,14	0,38	0,98	$3,33 \times 10^4$	$4,74 \times 10^5$	1,28	4,09	0,45	0,99	$3,50 \times 10^4$	$8,11 \times 10^5$	1,51	4,05	0,37	0,99	$2,64 \times 10^4$	$4,61 \times 10^6$	1,24
R2	4,13	0,41	0,99	$3,45 \times 10^4$	$5,68 \times 10^5$	1,35	4,10	0,47	0,99	$3,67 \times 10^4$	$9,25 \times 10^5$	1,55	4,07	0,38	0,99	$2,83 \times 10^4$	$5,29 \times 10^6$	1,26
R3	4,10	0,41	0,99	$3,21 \times 10^4$	$5,39 \times 10^5$	1,36	4,06	0,48	1,00	$3,43 \times 10^4$	$9,25 \times 10^5$	1,58	4,05	0,37	0,99	$2,60 \times 10^4$	$4,22 \times 10^6$	1,22
$20^\circ$																		
R1	3,79	0,41	0,98	$1,57 \times 10^4$	$1,72 \times 10^6$	1,35	3,96	0,33	0,99	$1,92 \times 10^4$	$1,73 \times 10^6$	1,08	3,89	0,41	0,99	$1,99 \times 10^4$	$2,29 \times 10^6$	1,37
R2	3,65	0,45	0,99	$1,25 \times 10^4$	$2,15 \times 10^6$	1,48	3,78	0,36	0,99	$1,39 \times 10^4$	$2,02 \times 10^6$	1,20	3,72	0,44	1,00	$1,43 \times 10^4$	$2,24 \times 10^6$	1,46
R3	3,85	0,40	1,00	$1,79 \times 10^4$	$1,84 \times 10^6$	1,34	4,07	0,34	0,99	$2,52 \times 10^4$	$2,63 \times 10^6$	1,12	3,83	0,44	0,99	$1,87 \times 10^4$	$3,05 \times 10^6$	1,47
$24^\circ$																		
R1	3,60	0,32	0,97	$8,37 \times 10^3$	$7,06 \times 10^5$	1,07	3,85	0,39	0,99	$1,73 \times 10^4$	$9,50 \times 10^6$	1,30	3,61	0,32	0,98	$8,58 \times 10^3$	$3,36 \times 10^6$	1,08
R2	3,71	0,28	0,91	$9,65 \times 10^3$	$4,36 \times 10^5$	0,92	3,78	0,38	0,98	$1,44 \times 10^4$	$6,72 \times 10^6$	1,27	3,81	0,34	0,98	$1,39 \times 10^4$	$3,17 \times 10^6$	1,12
R3	3,42	0,30	0,87	$5,15 \times 10^3$	$3,08 \times 10^5$	0,98	3,71	0,39	0,98	$1,26 \times 10^4$	$7,17 \times 10^6$	1,31	3,84	0,34	0,99	$1,50 \times 10^4$	$7,93 \times 10^6$	1,13

Réplicas	Clone US 16°																	
	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard					
	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1	4,14	0,29	0,97	$2,72 \times 10^4$	$2,06 \times 10^5$	0,97	4,00	0,61	0,99	$4,10 \times 10^4$	$6,77 \times 10^5$	2,02	4,19	0,35	0,99	$3,43 \times 10^4$	$4,30 \times 10^6$	1,16
R2	4,10	0,32	0,99	$2,61 \times 10^4$	$2,35 \times 10^5$	1,06	4,01	0,61	0,99	$4,24 \times 10^4$	$7,14 \times 10^5$	2,04	4,18	0,34	0,99	$3,38 \times 10^4$	$3,93 \times 10^6$	1,14
R3	4,10	0,31	0,99	$2,56 \times 10^4$	$2,18 \times 10^5$	1,03	4,02	0,62	1,00	$4,32 \times 10^4$	$7,44 \times 10^5$	2,05	4,21	0,35	0,99	$3,67 \times 10^4$	$4,92 \times 10^6$	1,18
$20^\circ$																		
R1	3,90	0,43	0,99	$2,12 \times 10^4$	$1,07 \times 10^6$	1,41	3,91	0,37	1,00	$1,91 \times 10^4$	$3,20 \times 10^6$	1,23	3,89	0,42	1,00	$2,04 \times 10^4$	$6,84 \times 10^6$	1,40
R2	3,80	0,45	0,99	$1,76 \times 10^4$	$1,14 \times 10^6$	1,50	3,87	0,37	1,00	$1,76 \times 10^4$	$3,05 \times 10^6$	1,24	4,01	0,42	0,99	$2,67 \times 10^4$	$3,35 \times 10^6$	1,39
R3	3,82	0,45	1,00	$1,87 \times 10^4$	$1,16 \times 10^6$	1,49	3,95	0,36	1,00	$2,05 \times 10^4$	$3,14 \times 10^6$	1,21	3,87	0,44	1,00	$2,06 \times 10^4$	$3,35 \times 10^6$	1,47
$24^\circ$																		
R1	3,30	0,27	0,90	$3,74 \times 10^3$	$5,84 \times 10^5$	0,91	3,67	0,28	0,93	$8,93 \times 10^3$	$1,52 \times 10^6$	0,93	3,89	0,30	0,98	$1,55 \times 10^4$	$3,93 \times 10^6$	1,00
R2	3,29	0,18	0,70	$2,97 \times 10^3$	$8,67 \times 10^4$	0,61	3,69	0,33	0,96	$1,06 \times 10^4$	$4,59 \times 10^6$	1,09	3,82	0,32	0,99	$1,40 \times 10^4$	$5,49 \times 10^6$	1,08
R3	3,27	0,23	0,80	$3,21 \times 10^3$	$2,29 \times 10^5$	0,77	3,62	0,32	0,95	$8,74 \times 10^3$	$1,46 \times 10^6$	1,08	3,71	0,35	0,98	$1,15 \times 10^4$	$6,94 \times 10^6$	1,15

Tabela A 24 - Resultados das regressões das medidas de fluorescência *in vivo* contra o tempo após transformação monilogarítmica da variável  $y$  ( $y = ax^b + y_0$ ;  $a$  - coeficiente linear;  $b$  - coeficiente angular;  $r$  - coeficiente de correlação linear;  $y'_0$  - estimativa do número de células inicial;  $y'_1$  - estimativa do número de células no fim da fase de crescimento exponencial;  $\mu$  - taxa máxima de crescimento calculada a partir da  $y'_0$  e  $y'_1$ )

Réplicas		Clone C1 16°																	
		Meio ASP <sub>2</sub>					Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard							
		a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1		2,94	0,31	0,99	$1,79 \times 10^3$	$6,46 \times 10^5$	1,03	3,02	0,50	1,00	$1,05 \times 10^3$	$1,05 \times 10^4$	1,66	3,19	0,36	1,00	$1,55 \times 10^3$	$4,09 \times 10^4$	1,18
R2		2,81	0,41	0,94	$1,65 \times 10^3$	$1,89 \times 10^5$	1,37	3,00	0,50	1,00	$1,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	1,66	3,04	0,43	1,00	$1,10 \times 10^3$	$5,75 \times 10^4$	1,43
R3		3,02	0,29	0,95	$2,04 \times 10^3$	$5,45 \times 10^5$	0,95	3,04	0,50	1,00	$1,09 \times 10^3$	$1,09 \times 10^4$	1,66	3,09	0,41	1,00	$1,21 \times 10^3$	$5,40 \times 10^4$	1,37
20°																			
R1		2,92	0,42	1,00	$2,19 \times 10^3$	$2,78 \times 10^5$	1,40	3,50	0,40	1,00	$7,94 \times 10^3$	$4,92 \times 10^4$	1,31	2,95	0,42	1,00	$2,34 \times 10^3$	$3,05 \times 10^5$	1,40
R2		3,01	0,43	1,00	$2,74 \times 10^3$	$3,87 \times 10^5$	1,43	3,54	0,41	1,00	$8,80 \times 10^3$	$5,72 \times 10^4$	1,35	2,89	0,45	1,00	$2,19 \times 10^3$	$3,73 \times 10^5$	1,48
R3		2,93	0,44	1,00	$2,34 \times 10^3$	$3,57 \times 10^5$	1,45	3,49	0,41	1,00	$7,87 \times 10^3$	$5,16 \times 10^4$	1,36	3,01	0,43	1,00	$2,74 \times 10^3$	$4,03 \times 10^5$	1,44
24°																			
R1		2,48	0,43	0,99	$8,14 \times 10^2$	$4,25 \times 10^4$	1,43	3,45	0,39	1,00	$7,01 \times 10^3$	$6,45 \times 10^5$	1,30	3,08	0,43	1,00	$3,19 \times 10^3$	$6,09 \times 10^4$	1,42
R2		2,99	0,34	0,99	$2,15 \times 10^3$	$4,97 \times 10^4$	1,13	3,34	0,34	0,99	$4,80 \times 10^3$	$2,52 \times 10^5$	1,14	2,88	0,48	1,00	$2,27 \times 10^3$	$6,18 \times 10^4$	1,50
R3		2,59	0,52	0,99	$1,29 \times 10^3$	$1,52 \times 10^5$	1,72	2,91	0,34	0,99	$1,80 \times 10^3$	$9,52 \times 10^4$	1,14	2,99	0,44	1,00	$2,66 \times 10^3$	$5,38 \times 10^4$	1,45
Réplicas		Clone U3 16°										Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard		
		Meio ASP <sub>2</sub>					Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard							
		a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1		3,16	0,27	0,97	$2,71 \times 10^3$	$6,17 \times 10^4$	0,90	2,44	0,52	1,00	$9,04 \times 10^2$	$9,96 \times 10^3$	1,73	2,75	0,39	1,00	$1,40 \times 10^3$	$5,32 \times 10^4$	1,31
R2		3,23	0,26	0,99	$3,07 \times 10^3$	$6,06 \times 10^4$	0,86	2,24	0,61	1,00	$7,11 \times 10^2$	$1,20 \times 10^4$	2,04	2,68	0,43	1,00	$1,27 \times 10^3$	$6,40 \times 10^4$	1,41
R3		3,25	0,24	0,99	$3,09 \times 10^3$	$4,99 \times 10^4$	0,80	2,39	0,54	1,00	$8,50 \times 10^2$	$1,02 \times 10^4$	1,79	2,72	0,40	1,00	$1,31 \times 10^3$	$5,04 \times 10^4$	1,32
20°																			
R1		3,03	0,45	1,00	$2,99 \times 10^3$	$5,06 \times 10^5$	2,14	3,63	0,41	1,00	$1,10 \times 10^4$	$1,88 \times 10^5$	1,37	3,02	0,44	1,00	$2,87 \times 10^3$	$4,35 \times 10^5$	1,45
R2		2,99	0,44	1,00	$2,67 \times 10^3$	$4,10 \times 10^5$	1,45	3,45	0,47	1,00	$8,22 \times 10^3$	$2,04 \times 10^5$	1,54	2,93	0,44	1,00	$2,34 \times 10^3$	$3,86 \times 10^5$	1,47
R3		3,03	0,44	1,00	$2,91 \times 10^3$	$4,56 \times 10^5$	1,46	3,59	0,46	1,00	$1,14 \times 10^4$	$2,74 \times 10^5$	1,53	2,89	0,47	1,00	$2,27 \times 10^3$	$4,91 \times 10^5$	1,55
24°																			
R1		3,12	0,50	1,00	$4,13 \times 10^3$	$1,31 \times 10^5$	1,66	3,43	0,45	1,00	$7,45 \times 10^3$	$4,53 \times 10^5$	1,48	3,10	0,43	0,99	$3,42 \times 10^3$	$1,83 \times 10^5$	1,44
R2		3,22	0,42	1,00	$4,40 \times 10^3$	$8,09 \times 10^4$	1,40	3,42	0,44	1,00	$7,21 \times 10^3$	$3,98 \times 10^5$	1,45	3,27	0,45	0,99	$5,28 \times 10^3$	$3,26 \times 10^5$	1,49
R3		2,87	0,47	1,00	$2,19 \times 10^3$	$5,64 \times 10^4$	1,56	3,33	0,45	1,00	$6,07 \times 10^3$	$3,76 \times 10^5$	1,49	3,55	0,43	1,00	$9,49 \times 10^3$	$4,85 \times 10^5$	1,42
Réplicas		Clone U5 16°										Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard		
		Meio ASP <sub>2</sub>					Meio Erd-Schreiber					Meio Guillard							
		a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$
R1		3,24	0,25	1,00	$3,10 \times 10^3$	$5,57 \times 10^4$	0,83	2,53	0,47	1,00	$9,99 \times 10^2$	$7,53 \times 10^4$	1,56	2,59	0,44	1,00	$1,05 \times 10^3$	$5,84 \times 10^4$	1,45
R2		3,23	0,25	0,99	$3,02 \times 10^3$	$5,47 \times 10^4$	0,84	2,66	0,44	1,00	$1,26 \times 10^3$	$7,25 \times 10^4$	1,46	2,64	0,44	1,00	$1,18 \times 10^3$	$6,55 \times 10^4$	1,45
R3		3,27	0,23	0,98	$3,20 \times 10^3$	$4,58 \times 10^4$	0,77	2,62	0,45	0,99	$1,16 \times 10^3$	$7,11 \times 10^4$	1,48	2,56	0,44	1,00	$9,92 \times 10^2$	$5,54 \times 10^4$	1,45
20°																			
R1		3,09	0,44	0,99	$3,43 \times 10^3$	$5,74 \times 10^5$	1,48	4,21	0,46	1,00	$4,62 \times 10^4$	$3,83 \times 10^5$	1,53	3,06	0,45	1,00	$3,23 \times 10^3$	$6,08 \times 10^5$	1,51
R2		3,14	0,44	1,00	$3,74 \times 10^3$	$5,66 \times 10^5$	1,45	4,09	0,48	1,00	$3,66 \times 10^4$	$3,29 \times 10^5$	1,58	3,26	0,42	0,99	$4,79 \times 10^3$	$6,04 \times 10^5$	1,39
R3		3,13	0,43	1,00	$3,62 \times 10^3$	$5,26 \times 10^5$	1,44	4,11	0,46	1,00	$3,77 \times 10^4$	$3,20 \times 10^5$	1,54	3,14	0,44	0,99	$3,79 \times 10^3$	$6,07 \times 10^5$	1,46
24°																			
R1		3,51	0,42	1,00	$8,47 \times 10^3$	$1,54 \times 10^5$	1,39	2,80	0,43	1,00	$1,69 \times 10^3$	$6,52 \times 10^5$	1,43	3,02	0,39	1,00	$2,59 \times 10^3$	$2,40 \times 10^5$	1,31
R2		2,82	0,47	0,98	$1,96 \times 10^3$	$5,02 \times 10^4$	1,56	3,59	0,37	0,99	$9,00 \times 10^3$	$3,26 \times 10^6$	1,21	3,22	0,40	1,00	$4,12 \times 10^3$	$4,05 \times 10^5$	1,32
R3		3,05	0,47	0,99	$3,34 \times 10^3$	$8,69 \times 10^4$	1,57	3,07	0,44	1,00	$3,27 \times 10^3$	$1,95 \times 10^5$	1,41	3,24	0,38	1,00	$4,18 \times 10^3$	$3,45 \times 10^5$	1,27

Tabela A 25 - Resultados das regressões da quantidade de clorofila a total ( $\text{mg/m}^3$ ) contra o tempo após transformação monologarítmica da variável  $y$  ( $y = ax^b \rightarrow y = a + bx$ ): a - coeficiente linear; b - coeficiente angular; r - coeficiente de correlação linear;  $y'_0$  - estimativa da quantidade de clorofila a total inicial;  $y'_1$  - estimativa da quantidade de clorofila a total no final da fase de crescimento exponencial;  $\mu$  - taxa máxima de crescimento calculado a partir de  $y'_0$  e  $y'_1$

Temp.	Clone C1																														
	Meio ASP <sub>2</sub>						Meio Erd-Schreiber						Meio Guillard																		
	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$	a	b	r	$y'_0$	$y'_1$	$\mu$													
16°	0,77	0,27	0,98	5,94	450,96	0,89	1,19	0,19	0,97	15,66	314,92	0,62	1,30	0,25	0,98	19,83	1076,64	0,82													
20°	-0,28	0,37	0,90	0,53	218,24	1,24	-1,24	0,45	0,97	0,06	77,48	1,48	-0,74	0,49	0,98	0,18	470,36	1,62													
24°	0,08	0,20	0,84	1,21	32,51	0,68	0,58	0,20	0,92	3,83	91,62	0,65	0,29	0,24	0,88	1,93	99,72	0,81													
<hr/>													<hr/>																		
Temp.	Clone U3												<hr/>																		
16°	0,83	0,27	0,99	6,71	541,31	0,90	1,26	0,21	0,98	18,32	536,91	0,70	1,28	0,27	0,97	19,15	1510,53	0,90	<hr/>	<hr/>											
20°	-1,12	0,57	0,98	0,08	773,67	1,89	-0,47	0,38	0,98	0,34	146,60	1,25	-0,42	0,46	0,96	0,38	659,92	1,54	<hr/>	<hr/>											
24°	0,45	0,22	0,93	2,79	96,38	0,73	0,59	0,30	0,97	3,85	508,62	1,01	0,62	0,24	0,94	4,12	196,70	0,80	<hr/>	<hr/>											
<hr/>													<hr/>																		
Temp.	Clone U5												<hr/>																		
16°	1,01	0,23	0,99	10,17	417,46	0,77	1,21	0,25	0,98	16,35	871,20	0,82	1,28	0,29	0,98	19,02	1901,52	0,95	<hr/>	<hr/>											
20°	-0,28	0,45	0,95	0,52	760,49	1,50	0,04	0,30	0,88	1,10	146,66	1,01	0,21	0,37	0,92	1,64	642,75	1,23	<hr/>	<hr/>											
24°	0,17	0,19	0,79	1,48	32,80	0,64	0,62	0,20	0,88	4,21	103,83	0,66	0,58	0,25	0,96	3,79	221,64	0,84	<hr/>	<hr/>											

Tabela A 26 - Resultados das medidas de pH para o clone de Cananéia(C1), Ubatuba(U3) e Ubatuba(U5). Cada valor representa a média de três observações.

Tempo (dias)	Clone C1						Clone U3						Clone U5					
	ASP <sub>2</sub>		Erd-Schreiber		Guillard		ASP <sub>2</sub>		Erd-Schreiber		Guillard		ASP <sub>2</sub>		Erd-Schreiber		Guillard	
	16°	20°	24°	16°	20°	24°	16°	20°	24°	16°	20°	24°	16°	20°	24°	16°	20°	24°
0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
1	8,0	7,9	7,6	8,0	7,9	7,8	8,1	7,9	8,0	8,0	7,9	7,7	8,1	7,9	7,9	8,1	7,9	7,9
2	8,0	7,9	7,6	8,0	8,0	7,8	8,1	8,0	8,0	8,1	8,0	7,6	8,1	8,0	7,8	8,1	8,0	7,9
3	7,9	7,9	7,5	8,0	8,1	7,8	8,1	8,3	8,1	7,9	8,0	7,6	8,0	8,1	7,9	8,0	8,2	8,1
4	8,1	7,9	7,6	8,2	8,2	8,0	8,3	8,3	8,1	8,1	7,9	7,7	8,3	8,1	8,1	8,4	8,2	8,0
5	8,1	7,8	7,6	8,1	8,1	8,1	8,4	8,3	8,1	8,0	8,0	7,7	8,3	8,2	8,1	8,4	8,4	8,2
6	8,1	8,0	7,6	8,1	8,1	8,1	8,4	8,6	8,1	8,0	8,1	7,7	8,3	8,3	8,1	8,4	8,6	8,3
7	8,0	8,0	7,5	8,1	8,3	8,2	8,5	9,1	8,1	8,0	8,1	7,6	8,3	8,5	8,9	8,5	8,6	8,2
8	7,9	8,1	7,7	7,9	8,3	8,5	8,5	9,3	8,4	8,0	8,2	7,9	8,5	8,8	8,8	8,0	8,2	7,7
9	8,3	8,0	7,7	8,8	8,8	8,2	8,8	9,7	9,1	8,8	8,4	8,0	7,8	8,9	8,9	8,4	8,6	9,0
12	8,5	8,1	7,8	9,0	8,7	8,9	10,0	9,4	9,2	8,6	8,3	7,9	9,2	8,6	10,2	9,4	9,2	9,2
15	8,5	7,9	7,8	8,9	8,6	8,9	9,9	9,0	9,2	8,5	8,1	8,0	9,1	8,5	8,5	10,1	8,9	9,2
18	8,5	8,1	7,7	8,9	8,7	8,6	9,7	9,2	8,8	8,5	8,2	7,8	9,0	8,7	8,4	8,5	8,2	8,8
21	8,6	8,3	7,7	8,9	8,6	8,2	9,8	9,2	8,9	8,6	8,3	7,9	9,1	8,6	8,2	8,6	8,3	8,8

Temperatura	Meio	Clone	$\ln$ Variável	Matriz de Covariância												Matriz Determinada				
				$S_x$	$C_{xy}$	$S_y$	$C_{xz}$	$S_z$	$C_{yz}$	$S_{xy}^2$	$C_{xy} S_x S_y$	$C_{xz} S_x S_z$	$C_{yz} S_y S_z$	$S_{xz}^2$	$C_{xz} S_x S_z$	$C_{yz} S_y S_z$				
nº céi./ml	9,31	10,00	10,98	11,81	12,41	13,61	13,50	13,86	14,08	14,74	15,00	15,06	14,98	$\bar{x} = 13,038$	1,816	0,988	3,299	3,931	3,168	
C1	Fluoresc.	6,68	7,51	8,50	9,24	9,57	10,02	11,11	11,37	12,07	12,41	12,79	13,21	13,85	$\bar{y} = 10,825$	2,191	0,974	3,931	4,799	3,812
Clorofila a	1,03	1,75	2,76	3,63	4,23	5,37	5,24	6,08	5,84	6,17	6,58	6,35	5,66	$\bar{z} = 4,514$	1,791	0,972	3,168	3,812	3,207	
nº céi./ml	9,57	10,63	11,58	12,25	13,00	13,12	13,43	13,64	14,05	14,37	15,05	15,18	15,56	$\bar{x} = 13,346$	1,756	0,985	3,085	3,569	3,132	
U3	Fluoresc.	6,77	7,96	8,61	9,39	9,57	10,17	11,16	11,51	12,06	12,42	12,78	13,29	13,30	$\bar{y} = 10,855$	2,062	0,957	3,569	4,253	3,734
ASP <sub>2</sub>	Clorofila a	1,10	1,47	2,78	3,45	3,76	4,48	5,22	5,31	6,32	6,44	6,37	6,76	$\bar{z} = 4,706$	1,863	0,972	3,132	3,734	3,473	
nº céi./ml	9,51	10,46	11,03	11,51	12,22	12,31	13,09	13,34	13,63	14,05	14,35	14,34	14,88	$\bar{x} = 12,855$	1,677	0,994	2,811	3,311	3,050	
U5	Fluoresc.	6,98	7,94	8,59	9,52	9,75	10,12	10,90	11,22	11,91	12,33	12,68	13,03	$\bar{y} = 10,810$	1,987	0,960	3,311	3,946	3,678	
Clorofila a	1,31	2,28	2,91	3,34	4,09	4,30	5,06	5,23	6,22	6,48	7,62	7,18	7,08	$\bar{z} = 4,903$	1,895	0,977	3,050	3,678	3,593	
nº céi./ml	9,55	10,59	11,97	12,84	13,58	13,61	13,63	13,96	14,67	14,36	15,29	15,60	16,12	$\bar{x} = 13,724$	1,912	0,988	3,654	4,169	2,933	
C1	Fluoresc.	6,96	8,10	9,26	10,13	10,79	11,31	11,82	12,31	12,65	12,91	13,43	13,90	$\bar{y} = 11,576$	2,206	0,953	4,169	4,868	3,440	
Clorofila a	1,28	2,31	3,38	3,56	4,32	4,65	4,32	4,94	5,25	5,52	5,47	6,30	7,08	$\bar{z} = 4,774$	1,611	0,968	2,933	3,440	2,595	
nº céi./ml	9,18	10,55	11,79	12,65	13,53	13,96	14,26	14,58	14,87	15,07	15,62	15,85	16,07	$\bar{x} = 13,866$	2,054	0,996	4,220	4,851	3,109	
U5	Fluoresc.	6,68	8,05	9,25	10,12	10,95	11,56	12,28	12,60	13,06	13,30	13,71	14,07	$\bar{z} = 11,762$	2,370	0,993	4,851	5,619	3,568	
Clorofila a	1,29	2,57	3,31	4,04	4,62	5,13	5,42	5,68	6,00	5,77	6,24	6,41	6,41	$\bar{z} = 4,931$	1,555	0,987	3,109	3,568	2,326	
nº céi./ml	9,37	10,55	12,35	13,32	13,39	14,21	14,28	14,62	14,66	15,30	15,94	16,25	16,08	$\bar{x} = 14,049$	2,039	0,983	4,158	4,980	3,795	
U5	Fluoresc.	6,92	8,10	9,28	10,26	11,03	11,51	12,41	12,87	13,39	13,74	14,19	14,63	$\bar{y} = 12,006$	2,490	0,979	4,990	6,198	4,679	
Clorofila a	1,35	2,44	3,33	3,85	4,91	5,45	5,85	6,01	6,41	6,48	7,75	7,20	7,44	$\bar{z} = 5,396$	1,901	0,989	3,795	4,679	3,614	
nº céi./ml	9,16	10,01	11,12	11,95	12,73	13,35	13,99	14,37	14,98	15,14	15,27	15,62	16,12	$\bar{x} = 13,689$	2,329	0,999	5,423	5,435	4,072	
C1	Fluoresc.	7,15	8,00	9,14	9,96	10,74	11,36	12,00	12,54	12,88	13,17	13,64	14,20	$\bar{y} = 11,716$	2,336	0,961	5,435	5,460	4,098	
Clorofila a	1,38	2,57	3,50	4,26	5,08	5,72	5,81	6,18	6,75	6,06	6,78	7,94	7,54	$\bar{z} = 5,429$	1,819	0,964	4,072	4,098	3,309	
nº céi./ml	9,19	9,93	10,99	12,33	12,90	13,10	13,81	14,45	14,98	15,12	15,08	15,54	16,46	$\bar{x} = 13,898$	2,384	0,997	5,684	5,603	4,508	
U5	Fluoresc.	7,28	8,01	9,07	9,99	10,96	11,43	12,26	12,68	13,02	13,27	13,43	14,47	$\bar{y} = 11,808$	2,358	0,964	5,603	5,560	4,452	
Clorofila a	1,27	2,57	3,49	4,23	5,28	5,92	6,34	5,98	7,28	6,98	8,27	7,63	6,59	$\bar{z} = 5,624$	1,961	0,963	4,508	4,452	3,844	
GUIL	U3	Fluoresc.	2,66	3,56	4,17	5,28	5,98	6,49	6,46	7,38	7,51	8,00	8,26	$\bar{z} = 5,851$	2,085	0,968	4,334	4,994	4,356	

ábelas A 27 Determinação das médias ( $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ,  $\bar{z}$ ), quadrados médios das raízes ( $S_x$ ,  $S_y$ ,  $S_z$ ), coeficientes de correlação ( $C_{xy}$ ,  $C_{xz}$ ,  $C_{yz}$ ) e matriz de covariâncias das variáveis  $\ln$  (nº céulas/ml),  $\ln$  (fluorescência in vivo) para os três clones (C1, U3, U5) em todos os experimentos comparativos.

		nº cêl./ml	8,84	9,23	10,29	11,19	12,40	13,37	14,20	14,38	14,63	14,98	15,46	15,43	15,72	15,81	$\bar{x} = 13,281$	2,371	0,970	5,622	5,938	5,808	-
C1	Fluoresc.	7,75	7,82	8,75	7,38	10,92	11,76	12,69	13,12	13,39	13,67	14,12	14,30	14,29	14,09	$\bar{y} = 11,718$	2,583	0,935	5,938	6,671	6,554	-	
	Clorofila a	0,41	0,49	1,42	0,05	1,79	3,16	5,41	6,24	6,74	6,67	6,41	-6,63	6,32	5,98	$\bar{z} = 4,116$	2,621	0,968	5,808	6,554	6,868	-	
	nº cêl./ml	9,16	9,38	10,43	11,34	12,50	13,76	14,49	14,74	15,14	15,33	15,52	15,76	15,80	$\bar{x} = 13,449$	2,331	0,999	5,431	5,397	6,305	-		
ASP,	U3	Fluoresc.	7,75	8,01	8,88	9,93	11,12	12,12	12,93	13,24	13,53	13,74	14,08	14,24	14,23	14,10	$\bar{y} = 11,993$	2,319	0,976	5,397	5,378	6,272	-
	Clorofila a	0,17	0,22	0,45	0,49	2,36	5,10	5,64	6,39	6,46	6,74	6,68	6,81	6,73	6,63	$\bar{z} = 4,398$	2,771	0,976	6,305	6,272	7,678	-	
	nº cêl./ml	9,09	9,59	10,86	11,96	12,82	14,05	14,55	14,67	14,99	15,23	15,59	15,71	15,89	15,88	$\bar{x} = 13,634$	2,282	0,998	5,207	5,267	5,870	-	
U5	Fluoresc.	7,82	7,95	9,39	10,34	11,16	12,35	13,06	13,39	13,62	13,85	14,18	14,41	14,49	14,26	$\bar{y} = 12,162$	2,313	0,964	5,267	5,348	5,984	-	
	Clorofila a	0,45	0,55	0,34	1,76	2,60	5,41	6,23	6,59	6,80	6,64	7,06	6,54	7,10	6,44	$\bar{z} = 4,608$	2,667	0,970	5,870	5,984	7,112	-	
	nº cêl./ml	9,00	9,42	10,18	11,17	11,60	12,60	13,25	13,91	14,48	14,70	15,68	15,97	16,17	15,92	$\bar{x} = 13,146$	2,427	0,994	5,892	5,830	5,964	-	
C1	Fluoresc.	7,95	8,16	8,81	9,03	9,91	10,89	11,61	12,21	12,83	13,25	14,20	14,67	14,81	14,37	$\bar{y} = 11,621$	2,415	0,975	5,830	5,833	6,002	-	
	Clorofila a	0,12	0,49	0,27	0,33	1,45	2,19	3,60	4,69	5,50	5,68	5,99	6,55	6,47	6,26	$\bar{z} = 3,542$	2,521	0,986	5,964	6,002	6,356	-	
	nº cêl./ml	9,20	9,30	10,71	11,14	12,34	13,13	13,79	14,57	15,01	15,11	15,78	16,05	16,19	16,03	$\bar{x} = 13,496$	2,356	0,993	5,552	5,804	5,327	-	
	nº cêl./ml	8,11	8,06	8,88	9,21	10,15	11,31	12,29	12,86	13,24	13,70	14,49	14,96	14,86	14,42	$\bar{y} = 11,896$	2,480	0,968	5,804	6,155	5,619	-	
	Clorofila a	0,52	0,51	0,41	0,74	2,19	3,71	4,17	5,15	6,33	5,51	5,98	6,14	6,11	5,91	$\bar{z} = 3,806$	2,336	0,969	5,327	5,619	5,458	-	
	nº cêl./ml	8,99	9,60	10,92	11,65	12,36	13,45	14,08	14,81	15,11	15,28	15,85	16,10	16,25	16,06	$\bar{x} = 13,608$	2,405	0,992	5,784	5,864	4,992	-	
U5	E.S.	Fluoresc.	8,16	8,16	9,16	9,58	10,56	11,76	12,71	13,16	13,59	13,96	14,67	15,04	14,83	$\bar{y} = 12,137$	2,457	0,947	5,864	6,038	5,226	-	
	Clorofila a	1,16	1,19	1,03	0,74	1,78	4,11	5,00	5,35	5,84	5,65	6,04	6,30	6,32	5,77	$\bar{z} = 4,020$	2,192	0,970	4,992	5,226	4,803	-	
	nº cêl./ml	8,95	9,40	10,51	11,54	12,86	13,42	14,49	15,17	15,40	15,77	16,21	16,46	16,62	16,80	$\bar{x} = 13,829$	2,652	0,994	7,033	7,460	7,053	-	
C1	Fluoresc.	7,68	7,89	8,78	9,68	10,75	11,82	12,85	13,55	13,96	14,28	15,30	15,55	15,58	15,55	$\bar{y} = 12,373$	2,829	0,959	7,460	8,002	7,524	-	
	Clorofila a	0,36	0,43	0,63	1,15	2,26	3,23	5,63	6,74	7,32	7,25	6,68	6,62	6,56	6,95	$\bar{z} = 4,415$	2,774	0,959	7,053	7,524	7,695	-	
	nº cêl./ml	9,00	9,67	10,81	11,60	12,77	13,76	14,86	15,32	15,45	15,87	16,10	16,57	16,54	16,62	$\bar{x} = 13,924$	2,556	0,993	6,685	7,066	6,619	-	
GUIL.	U3	Fluoresc.	7,89	7,82	8,85	9,89	10,94	11,97	12,96	13,97	14,23	15,24	15,48	15,41	15,46	$\bar{y} = 12,407$	2,752	0,960	7,066	7,575	7,033	-	
	Clorofila a	0,68	0,65	0,93	1,97	1,63	4,96	5,88	6,83	7,17	6,81	7,10	6,88	7,06	6,53	$\bar{z} = 4,549$	2,667	0,958	6,619	7,033	7,114	-	
	nº cêl./ml	9,08	9,85	10,98	12,19	13,09	13,96	14,90	15,33	15,57	15,90	16,54	16,52	16,43	16,30	$\bar{x} = 14,044$	2,499	0,994	6,243	6,622	5,497	-	
U5	Fluoresc.	7,81	8,05	9,36	10,60	11,24	12,38	13,17	13,70	14,01	14,40	15,44	15,84	15,50	15,00	$\bar{y} = 12,607$	2,666	0,929	6,622	7,110	5,819	-	
	Clorofila a	1,68	1,46	1,91	2,19	2,46	4,51	6,58	7,11	7,56	7,25	6,89	6,31	6,22	6,22	$\bar{x} = 4,953$	2,367	0,922	5,497	5,819	5,604	-	

		nº cé1./ml	9,00	8,99	8,55	7,97	8,22	9,20	9,94	11,32	12,45	13,20	14,17	14,88	15,29	15,23	$\bar{x} = 11,315$	2,704	0,973	7,312	7,070	5,748
C1	Fluoresc.		7,31	7,31	6,50	6,91	7,87	8,55	10,13	11,24	11,56	12,23	13,11	13,51	13,74	13,77	$\bar{y} = 10,494$	2,687	0,956	7,070	7,219	5,763
	Clorofila a		9,77	0,17	2,15	0,55	1,84	1,88	3,02	4,31	4,49	4,47	5,94	6,45	6,34	6,53	$\bar{z} = 3,494$	2,223	0,965	5,748	5,763	4,940
	nº cé1./ml		9,32	9,04	9,01	9,64	10,80	11,71	12,43	13,77	13,97	14,23	14,33	14,73	14,59	14,77	$\bar{x} = 12,316$	2,228	0,997	4,963	5,229	3,909
U5	Fluoresc.		8,16	7,60	7,68	8,11	9,33	10,36	11,35	12,17	12,65	12,84	13,35	13,72	13,66	13,81	$\bar{y} = 11,056$	2,355	0,972	5,229	5,546	4,164
ASP <sub>2</sub>	U3	Clorofila a	1,52	1,88	1,44	1,85	2,92	3,53	4,72	4,52	4,97	5,44	6,06	5,96	6,85	5,58	$\bar{z} = 4,089$	1,805	0,980	3,909	4,164	3,258
	nº cé1./ml		8,95	8,94	8,93	8,06	8,63	8,81	10,11	11,67	12,92	13,77	14,64	15,07	15,17	15,29	$\bar{x} = 11,497$	2,759	0,986	7,610	7,240	6,096
U5	Fluoresc.		7,95	7,06	6,91	6,50	8,01	8,34	9,55	10,60	11,32	12,24	13,17	13,60	13,67	13,80	$\bar{y} = 10,198$	2,662	0,985	7,240	7,085	5,893
	Clorofila a		1,52	1,62	1,00	0,41	0,79	2,12	3,03	4,17	4,80	5,26	6,21	6,39	6,71	6,12	$\bar{z} = 3,588$	2,244	0,987	6,096	5,893	5,036
	nº cé1./ml		9,27	8,97	9,17	9,79	10,83	11,98	12,96	13,58	14,34	14,79	15,98	16,33	16,58	16,54	$\bar{x} = 12,936$	2,822	0,997	7,962	7,963	4,850
C1	Fluoresc.		8,01	7,75	7,68	8,25	9,46	10,19	10,95	11,86	12,66	13,32	14,65	14,97	15,26	15,21	$\bar{y} = 11,444$	2,831	0,989	7,963	8,013	4,850
	Clorofila a		1,93	1,94	2,16	1,95	2,77	3,35	4,22	5,12	5,01	4,93	5,88	6,58	6,22	6,53	$\bar{z} = 4,185$	1,738	0,986	4,850	4,850	3,020
	nº cé1./ml		9,09	9,13	9,99	11,51	12,59	13,58	14,35	14,84	15,49	15,35	16,00	16,28	16,33	16,15	$\bar{x} = 13,627$	2,594	0,990	6,727	6,678	4,379
U5	Fluoresc.		8,48	8,34	8,83	9,86	10,91	11,90	12,91	13,50	13,94	14,42	15,12	15,43	15,41	15,17	$\bar{y} = 12,444$	2,601	0,973	6,678	6,766	4,312
	Clorofila a		1,18	2,41	2,41	2,28	3,26	4,42	5,25	5,42	5,12	5,01	4,93	5,88	6,58	6,22	$\bar{z} = 4,185$	1,736	0,955	4,312	3,013	3,013
	nº cé1./ml		9,64	9,22	9,17	9,80	11,42	12,15	12,95	13,88	14,41	14,80	16,07	16,59	16,60	16,57	$\bar{x} = 13,098$	2,782	0,997	7,737	7,856	4,996
U5	Fluoresc.		8,41	7,89	7,82	8,16	9,47	10,49	11,27	12,15	12,84	13,44	14,74	15,37	15,29	15,26	$\bar{y} = 11,614$	2,832	0,986	7,856	8,018	5,096
	Clorofila a		2,28	2,16	1,84	2,12	2,52	3,59	4,59	5,23	5,13	5,41	6,48	6,56	6,24	6,92	$\bar{z} = 4,362$	1,821	0,988	4,996	5,096	3,317
	nº cé1./ml		9,06	8,80	9,27	9,69	10,67	11,51	12,58	13,45	14,21	14,60	15,49	16,15	16,34	15,86	$\bar{x} = 12,691$	2,728	0,996	7,443	7,178	5,713
C1	Fluoresc.		8,06	7,60	7,31	7,82	9,03	10,00	10,92	11,67	12,51	12,94	13,73	14,46	14,63	14,12	$\bar{y} = 11,057$	2,640	0,982	7,178	6,972	5,487
	Clorofila a		1,84	0,16	2,22	1,54	2,69	3,26	4,35	4,99	4,83	5,66	6,49	6,57	7,11	6,48	$\bar{z} = 4,156$	2,133	0,974	5,713	5,487	4,552
	nº cé1./ml		9,34	9,18	9,91	10,70	11,54	12,34	13,47	14,31	15,07	15,09	15,48	16,03	16,40	16,42	$\bar{x} = 13,234$	2,588	0,993	6,700	6,828	5,020
GUIL	U3	Fluoresc.		8,41	7,89	8,01	8,58	9,93	10,69	11,61	12,74	13,23	13,70	14,15	14,72	15,11	$\bar{y} = 11,706$	2,655	0,982	6,828	7,052	5,174
	Clorofila a		1,77	2,53	1,96	2,22	3,50	4,39	5,01	5,41	5,79	5,70	6,85	7,33	7,16	7,12	$\bar{z} = 4,767$	1,976	0,986	5,020	5,174	3,904
	nº cé1./ml		9,31	9,24	9,71	10,80	11,76	12,90	13,76	14,36	14,71	15,01	15,44	16,02	15,94	15,85	$\bar{x} = 13,203$	2,470	0,993	6,100	6,085	4,725
U5	Fluoresc.		8,34	8,01	8,11	9,05	10,20	11,01	11,65	12,70	13,20	13,62	14,02	14,61	14,89	14,47	$\bar{y} = 11,706$	2,481	0,992	6,085	6,156	4,741
	Clorofila a		1,76	2,19	1,96	2,55	3,44	4,41	5,25	5,38	5,58	6,02	6,73	6,98	6,86	6,71	$\bar{z} = 4,734$	1,929	0,991	4,725	4,741	3,721

Tabela A 28 Teste da regressão linear das duas variáveis utilizadas para estimativa da biomassa diária ( $n^o$  células/ml, fluorescência *in vivo*) em diversos experimentos. r: coeficiente de correlação linear; a: coeficiente linear; b: coeficiente angular; n: número de pares de observações ( $X_i$  - tempo,  $Y_i$  - contagem ou fluorescência);  $\bar{b}$ : coeficiente angular recalculado;  $\bar{a}$ : coeficiente linear recalculado; ns: não significante; \* significante ao nível  $\alpha = 0,05$ ; \*\*significante ao nível  $\alpha = 0,01$ ; \*\*\*significante ao nível  $\alpha = 0,001$ .

Temp.	Meio	Experimento	Variável	r	a	b	n	Teste de b	$\bar{b}$	$\bar{a}$	Teste de a	Equação ajustada
160	Guillard	Comparação	Contagem	0,964	-12,356	0,096	11	tc = 0,0006 ns	1,013	- 7,775	tc = 3,386*	y = -7,775 + 1,013 x
	Completo	de 3 Clones	Fluorescência	0,973	-10,908	0,097	11	t(0,05)=2,101	1,013	- 6,331	t(0,05)=2,101	y = -6,331 + 1,013 x
200	Guillard	Comparação	Contagem	0,998	-11,033	0,250	7	tc = 0,002 ns	1,121	- 8,417	tc = 3,246*	y = -8,417 + 1,121 x
	Completo	de 3 Clones	Fluorescência	0,986	- 9,306	0,247	7	t(0,05)=2,228	1,121	- 6,682	t(0,05)=2,228	y = -6,682 + 1,121 x
240	Guillard	Comparação	Contagem	0,988	- 3,512	0,510	9	-	1,243	- 2,811	tc = 10,874***	y = -2,811 + 1,243 x
	Completo	de 3 Clones	Fluorescência	0,988	-11,274	0,510	9	b1 - b2	1,243	-10,573	t(0,05)=2,160	y = -10,573 + 1,243 x

## 9.2 ANÁLISE DE VARIÂNCIA TRIFATORIAL

Este programa foi elaborado para a execução de uma análise de variância de um planejamento experimental fatorial empregando-se três operadores especiais sugeridos por Hartley (1962). A análise de outros planejamentos pode ser derivada através de uma redução inicial a um esquema fatorial seguida de uma associação de certos componentes da tabela de análise de variância.

Considerando um dos experimentos fatoriais deste trabalho com três fatores (A,B e C) o fator A apresenta  $i$  níveis, o fator B  $j$  níveis, o fator C  $k$  níveis e as réplicas  $\ell$  níveis. Estas são completamente não relacionadas não se constituindo num fator. Contudo para as objetivos deste programa assumiu-se um planejamento com 4 fatores. ( A,B,C e R ). Consequentemente cada observação de um conjunto de dados pode ser representada na forma :

$$\begin{aligned} Y_{abcr} \text{ onde } & a = 1, 2, \dots, i \\ & b = 1, 2, \dots, j \\ & c = 1, 2, \dots, k \\ & r = 1, 2, \dots, \ell \end{aligned}$$

O princípio geral de procedimento utilizado na análise de variância é inicialmente executar uma análise fatorial formal para em seguida associar determinados componentes conforme o planejamento experimental.

O programa consiste de uma rotina principal e três subrotinas; sua capacidade e formato necessários para os dados de entrada são :

1. Experimentos até 6 fatores

2. Total de observações até 3000. O número total de observações num experimento é dado por  $T = \prod_{i=1}^k (nível i + 1)$  onde o nível  $i$  é o número de

níveis do  $i$ -ésimo fator,  $k$  o número de fatores e  $\prod$  é a notação produtório - ria ( multiplicação cumulativa ).

3. Formato para os cartões com os dados de entrada 12F6.0

Para a entrada dos dados é necessário um cartão de controle para cada conjunto de dados de um experimento o qual é lido pelo programa principal. Este cartão é preparado da seguinte forma:

Colunas	Conteúdo	Experimento
1 - 6	Número do experimento(pode ser alfanumérico)	X
7 - 8	Número de fatores	$n$
9 - 15	Branco	
16	" Label " para o 1º fator	A
17- 20	Número de níveis do 1º fator	$i$
21	"Label " para o 2º fator	B
22- 25	Número de níveis do 2º fator	$j$

Colunas	Conteúdo	Experimento
26	"Label" para o 3º fator	C
27 - 30	Número de níveis do 3º fator	$k$
31	"Label" para o 4º fator	R
32 - 35	Número de níveis do 4º fator	$\ell$

Os dados são introduzidos na seguinte ordem =  $y_{1111}, y_{2111}, \dots, y_{i111}, y_{1211}, y_{2211}, \dots, y_{ij11}, \dots, y_{ijk1}$ .

Os dados são editados da seguinte forma:

Análise de Variância

Experimento X

Níveis dos Fatores

A	$i$
B	$j$
C	$k$
R	$\ell$

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão de Variâncias
-------------------	--------------------	--------------------	----------------	---------------------

A - A,B e C são os efeitos principais

B

AB - AB, AC e BC são as interações de primeira ordem

C

AC - ABC a interação de segunda ordem

BC

ABC - Erro é o resíduo total

R - E é o resíduo no subgrupo (casela)

AR

BR

ABR

CR - Resíduo associado à cada componente

ACR

BCR

ABCR

ERRO

TOTAL

Valores de F (Modelo 1 com réplica) ou (Modelo 1 sem réplica)

Para efeitos principais F1 (A) / R      F1 (A) / (AxBxC)

                F2 (B) / R      F2 (B) / (AxBxC)

                F3 (C) / R      F3 (C) / (AxBxC)

Para Interações de 1º ordem F4 (Ax B) / R      F4 (Ax B) / (Ax BxC)

                F5 (Ax C) / R      F5 (Ax C) / (Ax BxC)

                F6 (BxC) / R      F6 (BxC) / (Ax BxC)

Para Interação de 2º ordem F7 (AxBxC) / R ---

Valores de F ( Modelo 2)

Para Efeitos principais F1 (A) / (AxB) + (AxC) - (AxBxC)

F2 (B) / (AxB) + (BxC) - (AxBxC)

F3 (C) / (AxC) + (BxC) - (AxBxC)

Para Interações de 1º ordem F4 ( AxB ) / ( AxBxC )

F5 ( AxC ) / ( AxBxC )

F6 ( BxC ) / ( AxBxC )

Para Interação de 2º ordem F7 ( AxBxC ) / R

Modelo 1 - os tratamentos são fixos

Modelo 2 - os tratamentos são casualizados.

```

001      C      PROGRAMA PRINCIPAL
002      DIMENSION X(1000),HEAD(6),LEVEL(6),ISTEP(6),KOUNT(6),LASTS(6)
003      DIMENSION SUMSQ(63),NDF(63),SMEAN(63),FMT(15),TITLE(80)
004      1 FORMAT(A4,A2,I2,A4,3X,11(A1,I4)/(A1,I4,A1,I4,A1,I4,A1,I4))
005      2 FORMAT(IH1,' ANALISE DE VARIANCIA      ',A4,A2)
006      3 FORMAT(' NIVEIS DOS FATORES'/(3X,A1,7X,I4))
007      4 FORMAT(IH0,' MEDIA TOTAL',F20,3)
008      5 FORMAT(IH0,69('='),/,' FONTE DE',5X,'GRAUS DE',6X,150MA DOS',9X,'QU
009      *ADRADO',4X,'RAZAO DE'/' VARIACAO',5X,'LIBERDADE',5X,'QUADRADOS',8X
010      *, 'MEDIO',7X,'VARIANCIAS'/' FV',11X,'GL',14X,'SD',15X,'QM',11X,'F'/
011      *1X,69('='))
012      6 FORMAT(IH ,13A1,I4,F17.5,F17.5)
013      7 FORMAT(' TOTAL',8X,I4,F17.5,F17.5/1X,69('='))
014      8 FORMAT(12F6,2)
015      133 FORMAT(80A1)
016      134 FORMAT(80A1/)
017      301 FORMAT(' ERRO',9X,I4,F17.5,F17.5)
018      518 FORMAT(' PARA INTERACAO DE SEGUNDA ORDEM      F1=*,F15,5,*(*,A1,'X*
019      *A1,'X*,A1,'*)')
020      519 FORMAT(' PARA INTERACOES DE PRIMEIRA ORDEM   F2=*,F15,5,*(*,A1,'X*
021      *A1,'*)/36X,'F3=*,F15,5,*(*,A1,'X*,A1,'*)/36X,'F4=*,F15,5,*(*,A1,
022      *'X*,A1,'*)')
023      520 FORMAT(' PARA EFEITOS PRINCIPAIS          F5=*,F15,5,*(*,A1,'*)/3
024      *36X,'F6=*,F15,5,*(*,A1,'*)/36X,'F7=*,F15,5,*(*,A1,'*)')
025      521 FORMAT(IH0,' VALORES DE F (MODELO 2)')/
026      721 FORMAT(IH0,' VALORES DE F (MODELO 1 COM REPLICAS)')/
027      722 FORMAT(IH0,' VALORES DE F (MODELO 1 SEM REPLICAS)')/
028      100 READ(5,1)PR,PR1,K,BLANK,(HEAD(I),LEVEL(I),I=1,K)
029      READ(5,133)(TITLE(I),I=1,80)
030      WRITE(6,2)PR,PR1
031      WRITE(6,134)(TITLE(I),I=1,80)
032      WRITE(6,3)(HEAD(I),LEVEL(I),I=1,K)
033      N=LEVEL(1)
034      DO 102 I=2,K
035      102 N=N+LEVEL(I)
036      READ(5,8)(X(I),I=1,N)
037      CALL AVOAT(K,LEVEL,N,X,L,ISTEP,KOUNT)
038      CALL AVCAL(K,LEVEL,X,L,ISTEP,LASTS)
039      CALL MEANO(K,LEVEL,X,GMEAN,SUMSQ,NDF,SMEAN,ISTEP,KOUNT,LASTS)
040      WRITE(6,4)GMEAN
041      WRITE(6,5)
042      LL=(2*K)-1
043      IF(LEVEL(4).EQ.1)LL=7
044      ISTEP(1)=1
045      DO 105 I=2,K
046      105 ISTEP(I)=0
047      DO 110 I=1,15
048      110 FMT(I)=BLANK
049      NN=0
050      SUM=0,0
051      120 NN=NN+1
052      L=0
053      DO 140 I=1,K
054      FMT(I)=BLANK
055      IF(ISTEP(I))130,140,130
056      130 L=L+1
057      FMT(L)=HEAD(I)
058      140 CONTINUE
059      WRITE(6,6)(FMT(I),I=1,13),NDF(NN),SUMSQ(NN),SMEAN(NN)
060      SUM=SUM+SUMSQ(NN)

```

```

061      IF(NN=LL)145,170,170
062      145 DD 160 I=1,K
063      IF(ISTEP(I))147,130,147
064      147 ISTEP(I)=0
065      GO TO 160
066      150 ISTEP(I)=1
067      GO TO 120
068      160 CONTINUE
069      170 N=N+1
070      SDDQ=0.0
071      LDDQ=0
072      QMDQ=0.0
073      DD 300 I=8,15
074      SDDQ=SDDQ+SUMSQ(I)
075      300 LDDQ=LDDQ+NDF(I)
076      QMDQ=SDDQ/LDDQ
077      IF(LEVEL(4),EQ.,1)GO TO 484
078      WRITE(6,301)LDDQ,SDDQ,QMDQ
079      484 WRITE(6,7)N,SUM
080      C TESTES DE SIGNIFICANCIA (MODELO 1)
081      IF(LEVEL(4),GT,1)GO TO 410
082      C PARA INTERACAO DE SEGUNDA ORDEM(AXBXC)
083      F1=0.0
084      C PARA INTERACOES DE PRIMEIRA ORDEM (AXB),(AXC),(BXC)
085      F2=SMEAN(3)/SMEAN(7)
086      F3=SMEAN(5)/SMEAN(7)
087      F4=SMEAN(6)/SMEAN(7)
088      C PARA EFEITOS PRINCIPAIS (A), (B), (C)
089      F5=SMEAN(1)/SMEAN(7)
090      F6=SMEAN(2)/SMEAN(7)
091      F7=SMEAN(4)/SMEAN(7)
092      GO TO 415
093      C PARA INTERACAO DE SEGUNDA ORDEM(AXBXC)
094      410 F1=SMEAN(7)/QMDQ
095      C PARA INTERACOES DE PRIMEIRA ORDEM (AXB),(AXC),(BXC)
096      F2=SMEAN(3)/QMDQ
097      F3=SMEAN(5)/QMDQ
098      F4=SMEAN(6)/QMDQ
099      C PARA EFEITOS PRINCIPAIS (A), (B), (C)
100      F5=SMEAN(1)/QMDQ
101      F6=SMEAN(2)/QMDQ
102      F7=SMEAN(4)/QMDQ
103      WRITE(6,721)
104      WRITE(6,520)F5,HEAD(1),F6,HEAD(2),F7,HEAD(3)
105      WRITE(6,519)F2,HEAD(1),HEAD(2),F3,HEAD(1),HEAD(3),F4,HEAD(2),
106      *HEAD(3)
107      WRITE(6,518)F1,HEAD(1),HEAD(2),HEAD(3)
108      GO TO 420
109      415 WRITE(6,722)
110      WRITE(6,520)F5,HEAD(1),F6,HEAD(2),F7,HEAD(3)
111      WRITE(6,519)F2,HEAD(1),HEAD(2),F3,HEAD(1),HEAD(3),F4,HEAD(2),
112      *HEAD(3)
113      WRITE(6,518)F1,HEAD(1),HEAD(2),HEAD(3)
114      420 CONTINUE
115      C TESTES DE SIGNIFICANCIA (MODELO 2)
116      C PARA INTERACAO DE SEGUNDA ORDEM(AXBXC)
117      F1=SMEAN(7)/SMEAN(8)
118      IF(LEVEL(4),EQ,1)F1=0.0
119      C PARA INTERACOES DE PRIMEIRA ORDEM (AXB),(AXC),(BXC)
120      F2=SMEAN(3)/SMEAN(7)

```

```

121      F3=SMEAN(5)/SMEAN(7)
122      F4=SMEAN(6)/SMEAN(7)
123      C      PARA EFEITOS PRINCIPAIS (A), (B), (C)
124      P5=SMEAN(1)/(SMEAN(3)+SMEAN(5)+SMEAN(7))
125      F6=SMEAN(2)/(SMEAN(3)+SMEAN(6)+SMEAN(7))
126      F7=SMEAN(4)/(SMEAN(5)+SMEAN(6)+SMEAN(7))
127      WRITE(6,521)
128      WRITE(6,520)F5,HEAD(1),F6,HEAD(2),F7,HEAD(3)
129      WRITE(6,519)P2,HEAD(1),HEAD(2),F3,HEAD(1),HEAD(3),F4,HEAD(2),
130      *HEAD(3)
131      WRITE(6,518)P1,HEAD(1),HEAD(2),HEAD(3)
132      GO TO 100
133      STOP
134      END
001      SUBROUTINE MEANQ(K,LEVEL,X,GMEAN,SUMSQ,NDF,SMEAN,MSTEP,KOUNT,
002      *LASTS)
003      DIMENSION LEVEL(1),X(1),SUMSQ(1),NDF(1),SMEAN(1),MSTEP(1),
004      *KOUNT(1),LASTS(1)
005      N=LEVEL(1)
006      DO 150 I=2,K
007      N=N*LEVEL(I)
008      LASTS(I)=LEVEL(I)
009      DO 178 I=2,K
010      LASTS(I)=LEVEL(I)+1
011      NN=1
012      LL=(2**K)-1
013      IF(LEVEL(4).EQ.1)LL=7
014      MSTEP(1)=1
015      DO 180 I=2,K
016      MSTEP(I)=MSTEP(I-1)*2
017      DO 185 I=1,LL
018      SUMSQ(I)=0.0
019      DO 190 I=1,K
020      KOUNT(I)=0.
021      L=0
022      DO 260 I=1,K
023      IF(KOUNT(I)=LASTS(I))210,250,210
024      210 IF(L)220,220,240
025      220 KOUNT(I)=KOUNT(I)+1
026      IF(KOUNT(I)=LEVEL(I))230,230,250
027      230 L=L+MSTEP(I)
028      GO TO 260
029      240 IF(KOUNT(I)=LEVEL(I))230,260,230
030      250 KOUNT(I)=0
031      260 CONTINUE
032      IF(L)285,285,270
033      270 SUMSQ(L)=SUMSQ(L)+X(NN)*X(NN)
034      NN=NN+1
035      GO TO 200
036      285 FN=N
037      GMEAN=X(NN)/FN
038      DO 310 I=2,K
039      310 MSTEP(I)=0
040      NN=0
041      MSTEP(1)=1
042      320 ND1=1
043      ND2=1
044      DO 340 I=1,K
045      IF(MSTEP(I))330,340,330
046      330 ND1=ND1+LEVEL(I)
047      ND2=ND2*(LEVEL(I)-1)
048      340 CONTINUE
049      FN1=N=ND1

```

```

REAL FUNCTION BSS(N1,Y1,N2,Y2)
INTEGER N1,N2
REAL Y1,Y2
COMMON M,YH
BSS=N1*Y1**2+N2*Y2**2-M*YH**2
RETURN
END
INTEGER N,N1,N2,I,J,N,K,K1
REAL VALOR(96),Y,Y1,Y2,BSS1,YH,SQF,LAMBDA,QHT,GL
COMMON M,YH
READ(5,90) N,L
DO 20 K1=1,L
READ(5,95) SQF,K
QHT=SQF/(N-K)
READ(5,100,END=25)(VALOR(I),I=1,2*N)
25 WRITE(6,110)(VALOR(I),I=1,2*N)

WRITE(6,115)
C 5 I=1,N
M=VALOR(2*I-1)+M
Y=VALOR(2*I)+Y
5 CONTINUE
YH=Y/N
DO 10 I=1,N-L
N1=(N1+VALOR(2*I-1))
Y1=(Y1+(I-1)+VALOR(2*I))/I
DO 15 J=I+1,N
N2=N2+VALOR(2*I-J)
Y2=Y2+VALOR(2*I)
15 CONTINUE
Y2=Y2/(N-I)
BSS1=BSS(N1,Y1,N2,Y2)
LAMBDA=3.141592*BSS1/(2+1.141592*QHT)
GL=N/1.141592
WRITE(6,120) I,BSS1,N1,Y1,N2,Y2,LAMBDA,GL
N2=0
Y2=0
10 CONTINUE
Y=0
M=0
N1=0
Y1=0
WRITE(6,130)
20 CONTINUE
90 FORMAT(2I2)
95 FORMAT(F9.3,I2)
100 FORMAT(4(6(I2,F6.2),/),6(I2,F6.2))
110 FORMAT(4(1X,6(I2,F6.2),/),1X,6(I2,F6.2))
115 FORMAT(26X,"N1",2X,"HEOI A1",3X,"N2",2X,"HEOI A2",/)
120 FORMAT(5X,"BSS(",I2,")=",F12.5,2(2X,I3,F8.4),3X,"LAMBDA=",F8.3,
     1X,"COM",F5.0,"GRAUS DE LIBERDADE")
130 FORMAT(1X,/)
STOP
END

NO ERRORS DETECTED. NUMBER OF CARDS = 53.
COMPILE TIME = 7 SECONDS ELAPSED. 0.90 SECONDS PROCESSING.
D2 STACK SIZE = 11 WORDS. FILESIZE = 140 WORDS.
ESTIMATED CORE STORAGE REQUIREMENT = 493 WORDS.
TOTAL PROGRAM CODE = 219 WORDS. ARRAY STORAGE = 98 WORDS.
NUMBER OF PROGRAM SEGMENTS = 9. NUMBER OF DISK SEGMENTS = 25.
PROGRAM CODE FILE = (ED0000)OBJECT/PROGRAMA ON PACK.

```

```

050      FN2=ND2
051      NN=NN+1
052      SUMSQ(NN)=SUMSQ(NN)/FN1
053      NDF(NN)=ND2
054      SMEAN(NN)=SUMSQ(NN)/FN2
055      IF(NN>LL)345,370,370
056      345 DO 360 I=1,K
057      IF(MSTEP(I))347,350,347
058      347 MSTEP(I)=0
059      GO TO 360
060      350 MSTEP(I)=1
061      GO TO 320
062      360 CONTINUE
063      370 RETURN
064      END
001      SUBROUTINE AVCAL(K,LEVEL,X,L,ISTEP,LASTS)
002      DIMENSION LEVEL(1),X(1),ISTEP(1),LASTS(1)
003      LASTS(1)=L+1
004      DO 145 I=2,K
005      145 LASTS(I)=LASTS(I-1)+ISTEP(I)
006      150 DO 175 I=1,K
007      L=1
008      LL=1
009      SUM=0.0
010      NN=LEVEL(I)
011      FN=NN
012      INCRE=ISTEP(I)
013      LAST=LASTS(I)
014      155 DO 160 J=1,NN
015      SUM=SUM+X(L)
016      L=L+INCRE
017      X(L)=SUM
018      DO 165 J=1,NN
019      X(LL)=FN*X(LL)=SUM
020      LL=LL+INCRE
021      SUM=0.0
022      IF(L=LAST)167,179,179
023      167 IF(L=LAST+INCRE)168,168,170
024      168 L=L+INCRE
025      LL=LL+INCRE
026      GO TO 155
027      170 L=L+INCRE+1-LAST
028      LL=LL+INCRE+1-LAST
029      GO TO 155
030      175 CONTINUE
031      RETURN
032      END
001      SUBROUTINE AVDAT(K,LEVEL,N,X,L,ISTEP,KOUNT)
002      DIMENSION LEVEL(1),X(1),ISTEP(1),KOUNT(1)
003      M=LEVEL(1)+1
004      DO 105 I=2,K
005      105 M=M*(LEVEL(I)+1)
006      N1=M+1
007      N2=N+1
008      DO 107 I=1,N
009      N1=N1+1
010      N2=N2+1
011      107 X(N1)=X(N2)
012      ISTEP(I)=1
013      DO 110 I=2,K
014      ISTEP(I)=ISTEP(I-1)*(LEVEL(I-1)+1)
015      110 DO 115 I=1,K
016      KOUNT(I)=1
017      N1=N1+1
018      DO 135 I=1,N
019      L=KOUNT(I)
020      DO 120 J=2,K
021      120 L=L+ISTEP(J)*(KOUNT(J)-1)
022      N1=N1+1
023      X(L)=X(N1)
024      DO 130 J=1,K
025      IF(KOUNT(J)=LEVEL(J))124,125,124
026      124 KOUNT(J)=KOUNT(J)+1
027      GO TO 135
028      125 KOUNT(J)=1
029      130 CONTINUE
030      135 CONTINUE
031      RETURN
032      END

```