Naira Juliana da Silva

Influência de dinoflagelados potencialmente nocivos sobre o zooplâncton de uma região
costeira subtropical: uma abordagem experimental

Dissertação apresentada ao Instituto
Oceanográfico da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências, Programa de
Oceanografia, área de Oceanografia Biológica

Orientador: Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes

São Paulo
2012

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Influência de dinoflagelados potencialmente nocivos sobre o zooplâncton de uma região
costeira subtropical: uma abordagem experimental

Naira Juliana da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de
Oceanografia Biológica

Julgada em ____/____/____

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

*Para minha família, Nivaldo, Joseja, Nicole, Natália e Márcio,
com muito amor e...
para Camila, com muito carinho.*

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	2
1.1. Florações de microalgas potencialmente nocivas: um breve panorama global	2
1.2. Panorama brasileiro.....	6
1.3. Interações tróficas entre florações de microalgas potencialmente nocivas e copépodes marinhos.....	11
1.4. Contextualização do projeto de mestrado e estrutura da dissertação	16
1.5. Referências bibliográficas	17
 2. Capítulo 1	 24
Influência de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> Balech na alimentação e reprodução de <i>Temora turbinata</i> (Dana, 1849) (Copepoda: Calanoida)	24
2.1. Resumo	25
2.2. Abstract.....	26
2.3. Introdução	27
2.4. Hipóteses	30
2.5. Objetivos.....	31
2.6. Material e métodos.....	33
2.6.1. Determinação das respostas funcional e numérica.....	34
2.6.2. Experimentos de mistura	42
2.7. Tratamento dos dados.....	46
2.7.1. Comportamento alimentar	46
2.7.2. Reprodução	48
2.7.3. Análises estatísticas.....	50
2.8. Resultados.....	51
2.8.1. Experimentos com monoculturas - determinação das respostas funcional e numérica	51
2.8.2. Experimentos com mistura de três microalgas – Determinação da produção de ovos na presença de <i>A. cf. fraterculum</i>	65
2.9. Discussão	66
2.10. Referências bibliográficas	79
2.11. Anexo	88
Função para <i>Counter Coulter</i> comentada.....	88

3. Capítulo 2	91
Efeitos de exsudatos de microalgas e células intactas sobre o zooplâncton marinho de uma região costeira do Brasil (Ubatuba, São Paulo)	91
3.1. Resumo	92
3.2. Abstract.....	93
3.3. Introdução	94
3.4. Hipóteses	96
3.5. Objetivos.....	97
3.6. Material e Métodos	97
3.6.1. Culturas de fitoplâncton.....	97
3.6.2. Experimentos com exsudatos.....	99
3.6.3. Experimentos com células intactas	101
3.7. Resultados.....	102
3.7.1. Exposição a exsudatos de microalgas	102
3.8. Discussão	108
3.9. Referências bibliográficas	114
3.10. Anexo	119
 4. Considerações finais e perspectivas	122
 5. Anexo	127
Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados marinhos - Um manual prático	127

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Introdução geral	1
Figura 1.1. Florações de microalgas nocivas (A) e exemplos de suas principais consequências (B-D).	3
Figura 1.2. Representação esquemática de possíveis ligações entre a entrada de nutrientes, a resposta das microalgas e os efeitos de florações de microalgas potencialmente nocivas.	4
Figura 1.3. Evolução da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2010 (t).	7
Figura 1.4. Representação esquemática simplificada de teias tróficas pelágicas, enfatizando as principais rotas de transferências de toxinas para copépodes.	12
Capítulo 1	23
Influência de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> Balech na alimentação e reprodução de <i>Temora turbinata</i> (Dana, 1849) (Copepoda: Calanoida)	23
Figura 2.1. <i>Temora turbinata</i> (Dana 1849) nos estádios de desenvolvimento triados.	37
Figura 2.2. Resposta funcional de fêmeas de <i>Temora turbinata</i> incubadas em diferentes tratamentos de <i>Alexandrium</i> cf. <i>fraterculum</i> para 12 e 24 horas de incubação. Resposta numérica de fêmeas de <i>T. turbinata</i> incubadas em diferentes tratamentos de <i>A.</i> cf. <i>fraterculum</i> para o período de aclimação, 12 horas e 24 horas de incubação.	52
Figura 2.3. Resposta numérica de fêmeas adultas de <i>Temora turbinata</i> alimentadas com <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> para o período de aclimação e para as primeiras 24 horas de incubação. Resposta funcional de fêmeas adultas de <i>T. turbinata</i> alimentadas com <i>A. tamiyavanichii</i> para duas rodadas subsequentes de 24 horas de incubação.	55
Figura 2.4. Resposta funcional de fêmeas de <i>Temora turbinata</i> incubadas em diferentes tratamentos de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação. Resposta numérica de fêmeas de <i>T. turbinata</i> incubadas em diferentes	

tratamentos de *A. tamiyavanichii* para o período de aclimação, e para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação. 56

Figura 2.5. Resposta funcional de fêmeas de *Temora turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *Prorocentrum minimum* para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação. Resposta numérica de fêmeas de *T. turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *P. minimum* para o período de aclimação, e para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação. 58

Figura 2.6. Possíveis respostas, em termos de produção de ovos ou sucesso de eclosão dos náuplios, em experimentos nos quais uma espécie de fitoplâncton não nociva (X) e uma espécie potencialmente nociva (Y) (nutricionalmente inadequada ou tóxica) são oferecidas para copépodes em diferentes proporções. 61

Figura 2.7. Variação da produção de ovos ($\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), do sucesso de eclosão dos náuplios (%) e da taxa de canibalismo dos ovos (%), em função do aumento da porcentagem, em carbono, do alimento controle (*Prorocentrum minimum*) na dieta, para cada um dos dias de realização do experimento. 62

Figura 2.8. Diferentes tipos de ovos observados para fêmeas de *T. turbinata* alimentadas com *A. tamiyavanichii*. 64

Figura 2.9. Variação da produção de ovos ($\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e do sucesso de eclosão dos náuplios (%) em função de diferentes tratamentos compostos por misturas de três microalgas (F: *Alexandrium* cf. *fraterculum*, T: *A. tamiyavanichii* e P: *Prorocentrum minimum*). 66

3. Capítulo 2 90

Efeitos de exsudatos de microalgas e células intactas sobre o zooplâncton marinho de uma região costeira do Brasil (Ubatuba, São Paulo) 90

Figura 3.1. Experimentos com exsudatos relacionados a efeitos letais. Sobrevivência de *A. lilljeborgi*, *Longipedia*, náuplios de Paracalanidae e tintinídeos (*F. ehrenbergii*) como função da exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de fitoplâncton. 103

Figura 3.2. Experimentos com exsudatos relacionados a efeitos subletais. Mobilidade e sobrevivência de larvas de gastrópodes com função do tempo de exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de fitoplâncton.	104
Figura 3.3. Experimentos com exsudatos não relacionados a efeitos nocivos. Sobrevivência de fêmeas míticas e amíticas e juvenis de rotíferos (<i>B. plicatilis</i>) e de larvas de poliquetas, como função do tempo de exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de dinoflagelados.	106
Figura 3.4. Experimentos com células intactas. Sobrevivência de larvas de gastrópodes (véligers maiores), fêmeas amíticas de rotíferos (<i>B. plicatilis</i>) e zoés de caranguejos (<i>P. transversus</i>) como função do tempo de exposição a diferentes tratamentos com células fitoplanctônicas intactas.	107
5. Anexo	126
Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados marinhos - Um manual prático	126
Figura 5.1. Diversidade dos dinoflagelados. A: Ilustração baseada em análises taxonômicas. B: Ilustração baseada em análises genômicas.	131
Figura 5.2. Exemplo de aplicação alimentar de cultivos de dinoflagelados marinhos: Inclusão de DHA, produzido por <i>C. cohnii</i> , em alimentos industrializados destinados a bebês.	135
Figura 5.3. Principais cuidados de esterilização adotados em laboratório.	145
Figura 5.4. Ilustração de uma série de propagação de cultivo.	152
Figura 5.5. Visão de parte de uma cadeia com um número superior a 20 células de <i>Alexandrium</i> sp. dentro da cavidade da multiplaca de isolamento.	157

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1	23
Influência de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> Balech na alimentação e reprodução de <i>Temora turbinata</i> (Dana, 1849) (Copepoda: Calanoida)	23
Tabela 2.1. Conjuntos experimentais, períodos de execução e espécies de microalgas envolvidas. FRA: <i>Alexandrium cf. fraterculum</i> . TAM: <i>A. tamiyavanichii</i> . PRO: <i>Prorocentrum minimum</i>	33
Tabela 2.2. Detalhes das incubações de experimentos de determinação de respostas funcional e numérica.	39
Tabela 2.3. Detalhes das incubações de experimentos de misturas de microalgas.	43
Tabela 2.4. Experimento de mistura de microalgas 1. Tratamentos alimentares compostos por misturas de fitoplâncton potencialmente nocivo (TAM) e não nocivo (PRO).	44
Tabela 2.5. Experimento de mistura de microalgas 2. Tratamentos alimentares compostos por misturas de fitoplâncton potencialmente nocivo (TAM) e não nocivo (FRA e PRO).	46
3. Capítulo 2	90
Efeitos de exsudatos de microalgas e células intactas sobre o zooplâncton marinho de uma região costeira do Brasil (Ubatuba, São Paulo)	90
Tabela 3.1. Microalgas nocivas, potencialmente nocivas, tratamentos controle e local de origem das cepas empregadas.	98
Tabela 3.2. Informações gerais sobre experimentos com exsudatos.	100
Tabela 3.3. Informações gerais sobre experimentos com células intactas. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.	102

Tabela 3.4. Revisão dos efeitos de células intactas e exsudatos de gêneros de dinoflagelados sobre o zooplâncton, incluindo somente os táxons considerados no presente estudo.	119
5. Anexo	126
Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados marinhos - Um manual prático	126
Tabela 5.1. Composição dos principais meios de culturas líquidos empregados em isolamentos e manutenção de cultivos de dinoflagelados.	140

ÍNDICE DE QUADROS

5. Anexo	126
Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados marinhos - Um manual prático	126
Quadro 5.1. Principais características morfológicas e funcionais dos dinoflagelados.	132

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Rubens Mendes Lopes, muito obrigada pela excelente orientação. Agradeço pelo carinho, amizade, paciência, conselhos e pela avaliação criteriosa. Foram inúmeras as oportunidades de enriquecimento profissional ao longo da minha formação dentro do laboratório, não compreendendo apenas o período do meu mestrado. Obrigada pelo otimismo, pelas ideias e pela confiança, fundamentais para que eu pudesse enfrentar os vários desafios e limitações de uma abordagem experimental.

À Prof^a Betina K. Suzuki, muito obrigada pelo incentivo, pelas oportunidades, por todos os ensinamentos e, principalmente, pela confiança e paciência. Sou imensamente grata por todas as ideias, sugestões, críticas e por todos os conhecimentos atenciosamente compartilhados.

Ao Prof^o Kam W. Tang agradeço pelos valiosos ensinamentos tão pacientemente explicados. Com a sua ajuda pudemos explorar um pouco mais as várias espécies de dinoflagelados isoladas, olhando para nossos questionamentos sobre uma nova perspectiva, uma oportunidade que contribuiu fortemente na minha formação.

Ao Prof^o Luis A. O. Proença pela colaboração mediante execução das análises de toxinas de parte dos dinoflagelados isolados.

À Prof^a June F. Dias, agradeço pelo carinho, amizade e pelas palavras de apoio.

Às técnicas Camila e Marta. Obrigada pela eficiência, dedicação e por aceitarem todas as condições de trabalho, de dia ou de madrugada, sempre com um sorriso no rosto.

Querida Camila, obrigada pela amizade e pelo apoio técnico, logístico e psicológico.

Não foram mil páginas, mas a dedicatória é de todo coração. Querida Marta, agradeço por todos os valiosos ensinamentos relativos ao cultivo de microalgas marinhas.

Obrigada pelo carinho de mãe, por acordar e animar a equipe, pelo apoio imensurável, pelos conselhos e pelas anotações valiosas.

Agradeço a querida amiga Jeanete pela ajuda constante e por tantos conhecimentos compartilhados. Obrigada pelo auxílio nos passos iniciais dos isolamentos, pelas dicas, dúvidas solucionadas por email e pela revisão do Anexo. Agradeço também pelo treinamento inicial em técnicas biomoleculares, contribuindo ainda mais para a minha formação.

À técnica Flávia, agradeço pelo carinho e amizade, pelo auxílio em inúmeras dúvidas, pelas dicas para melhoria nos cultivos e pelo empréstimo das câmaras de sedimentação.

Aos amigos que fiz em Ubatuba, obrigada pelas conversas, pelo apoio nos experimentos e pela companhia nos finais de semana. Em especial agradeço à Dona Cida, Vânia, Beth, Cristiano, Jamison, Oziel e Daíco pelo convívio alegre e recepções sempre carinhosas.

Agradeço também a todos os amigos que fiz durante a minha estadia na base de Ubatuba. Em especial, à Bianca, Fábio, Luciana, Ricardo e Vivian, pela companhia alegre e pelo apoio.

À minha querida Bia Frank, agradeço a companhia alegre durante vários períodos de análises de amostras. Sua presença e amizade foram muito importantes.

Aos amigos do LIPO, Luis Fabiano, Helena e Jonathan. Agradeço pelos bons momentos e pelo grande apoio nos experimentos. Jonathan, obrigada pela prontidão para resolver todos os nossos problemas logísticos.

Cássia e Newton, minha família em Ubatuba, muito obrigada por todo carinho e por serem sempre meu porto seguro. Newton, muito obrigada pelo zelo, pelo constante auxílio dentro do laboratório e ao longo de tantas coletas. Cássia, muito obrigada pelo auxílio em laboratório e pela cuidadosa revisão da Introdução geral.

Aos maravilhosos amigos do LAPS, membros novos e antigos, de Santa Catarina, passando por São Paulo e Pernambuco, ao Pará. Contando ainda com participações internacionais. Obrigada pela amizade incomparável, pelas recepções sempre alegres em tantas idas e vindas do meu mestrado, pelo convívio sempre caloroso, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Tenho por muitos de vocês um carinho de irmã e agradeço de todo meu coração por toda ajuda e por tantas palavras de incentivo.

À minha amada “Juventude Reunida”, muito obrigada pelos abraços, pelas conversas e pelo constante incentivo. Estas poucas palavras são incapazes de traduzir toda a minha gratidão pela energia e carinho, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

No tocante ao preparo da dissertação, agradeço a Catarina pela revisão atenciosa de várias partes do texto e a Izadora pelo gentil auxílio no último conjunto de experimentos.

Agradeço também aos amigos do IO-USP, em especial, a Camilla Garbini, Cláudia, Caia, Fany, Isa, Jana, Renata, Sílvia e Lourdes pelo carinho e apoio.

Ao Márcio (Bur), meu eterno amigo do ano, agradeço por toda a ajuda e conselhos ao longo destes três anos.

Aos amigos do Laboratório de Dinâmica Bêntica, Maurício, Betina, Karen, Paula e Arthur. Muito obrigada pelos cafés e por sempre me acolherem com tanto carinho.

Aos meus amores Bia, Noelle, Nair e Sofia. Obrigada pela amizade incondicional e pela compreensão pela ausência. Querida Noelle, obrigada pela parceria e pela gentil revisão de várias partes deste texto!

Ao amigo Fernando, agradeço pelas sugestões e troca constante de ideias.

Márcio, muito obrigada pela amizade e pela ajuda nas análises estatísticas e por disponibilizar tão gentilmente códigos que eu levaria meses para escrever.

Júlio, muito obrigada pela revisão atenciosa do Anexo.

Querida Érica, obrigada pelas conversas, conselhos, pela torcida e por tantos momentos divertidos.

Ao querido Yatchan, agradeço pelo incentivo, carinho e amizade incondicionais.

À secretaria de Pós-graduação, obrigada pela amizade e pelo auxílio.

A todo pessoal da biblioteca, obrigada pelo auxílio nos levantamentos bibliográficos.

Aos meus pais, Nivaldo e Josefa, e aos meus irmãos, Nicole, Natália e Marcinho.

Obrigada pelo amor e apoio incondicionais. Ao meu pai agradeço por sempre me fazer sorrir, mesmo enfrentando problemas muito maiores do que os meus.

Em memória, gostaria de agradecer ao meu querido amigo Masami. Pela assídua companhia virtual nas manhãs de domingo em Ubatuba, me ensinando a olhar para o meu exuberante ambiente de trabalho através do fascinante universo da fotografia.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto Oceanográfico, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio logístico e financeiro.

Introdução geral

1. Introdução geral

1.1. Florações de microalgas potencialmente nocivas: um breve panorama global

As florações de algas nocivas (FANs), internacionalmente designadas como “HABs” (*Harmful Algal Blooms*), são fenômenos naturais com inúmeros registros de ocorrência ao longo da história, cuja intensidade, duração e distribuição geográfica têm exibido um aparente incremento (Halegraeff, 2010).

Estes eventos envolvem uma ampla diversidade de organismos, características dinâmicas e mecanismos de impacto (Zingone e Oksfeldt, 2000), bem como uma elevada heterogeneidade espaço-temporal (Anderson, 1997). São vários os critérios considerados para sua definição, incluindo densidade celular, características fisiológicas, níveis de toxicidade e efeitos deletérios (Basterretxea *et al.*, 2007).

O aumento da ocorrência de florações ao longo das três últimas décadas tem sido atribuído a quatro explicações principais: (i) aumento da atenção científica para espécies potencialmente nocivas, (ii) incremento na utilização de águas costeiras para a aquicultura, (iii) estimulação de florações de espécies planctônicas devido à eutrofização ou condições climatológicas incomuns, (iv) e transporte de cistos fitoplanctônicos de resistência via água de lastro ou associados com o deslocamento de estoques de mariscos e de outros produtos da aquicultura (Hallegraeff, 2003). Atualmente novos episódios têm sido associados também às mudanças climáticas (Hallegraeff, 2010).

No âmbito ecológico, as florações de microalgas tóxicas causam uma série de impactos (Figura 1): produção de compostos tóxicos ou inibitórios bioacumulativos; depleção de oxigênio devido à alta taxa de respiração fitoplanctônica e bacteriana durante a decomposição da floração; impacto na saúde dos organismos, como por exemplo, danos teciduais ou obstruções nas brânquias de peixes; e baixa qualidade

nutricional de algas não nocivas, afetando especialmente o recrutamento e a produção secundária dos consumidores (Hallegraeff, 2003).

Florações de espécies não tóxicas podem também ter efeitos negativos quando a acumulação ocorre em número suficiente para que algumas das principais consequências destes fenômenos sejam evidentes (Anderson, 1997) (Figura 1.1). Por esse motivo, as espécies nocivas são incluídas em dois grupos: (i) espécies produtoras de toxinas, as quais podem ser responsáveis pela morte ou contaminação de recursos marinhos e (ii) espécies produtoras de alta biomassa, as quais podem causar anoxia e mortalidade indiscriminada da vida marinha após atingirem altas concentrações. Muitas espécies nocivas possuem características desses dois grupos (GEOHAB, 2001).

Figura 1.1. Florações de microalgas nocivas (A) e exemplos de suas principais consequências (B-D). A: Floração de *Noctiluca sp.* (ilustração adaptada de Bushaw-Newton & Sellner, 1999). B: Piscicultores japoneses inspecionam os cultivos após a ocorrência de uma devastadora maré vermelha; fonte da ilustração: <<http://www.whoi.edu/page.do?pid=11913&tid=441&cid=5501&ct=61&article=2483>>. C: Peixes mortos por uma floração de *Karenia brevis* no Texas; fonte da ilustração: <<http://www.whoi.edu/redtide/>>. D: Mortalidade em massa de lagostas devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido em decorrência de uma floração de microalgas (costa oeste da África do Sul); fonte da ilustração: <<http://www.waterencyclopedia.com/A-Bi/Algal-Blooms-in-the-Ocean.html#b>>.

Para os dois casos, o estudo das consequências de cada fenômeno, muitas vezes intensificado por atividades antrópicas em ambientes costeiros, é de grande complexidade (Figura 1.2). Neste contexto, a ênfase em explicitar o termo “potencialmente nocivo” pode evitar atitudes alarmistas (Villac *et al.*, 2006).

Figura 1.2. Representação esquemática de possíveis ligações entre a entrada de nutrientes, a resposta das microalgas e os efeitos de florações de microalgas potencialmente nocivas (baseado em Glibert & Pitcher, 2001 e Villac *et al.*, 2006).

Os impactos potenciais enumerados por Glibert e Pitcher (2001) relacionados aos efeitos sobre o ecossistema remetem apenas a efeitos base-topo, contudo controles topo-base não podem ser desconsiderados. A visão de que o comportamento alimentar contribui igualmente para a composição e tamanho da comunidade fitoplanctônica observada (controle topo-base) encontra-se em lenta ascensão, e as consequências das

interações entre os controle base-topo e topo-base são consideradas carentes de avaliações completas (Strom, 2002).

Dentre as 4000 espécies de organismos fitoplanctônicos marinhos existentes (Sournia *et al.*, 1991), 300 espécies podem eventualmente ocorrer em número elevado, enquanto somente 80 espécies são capazes de produzir toxinas potentes (ficotoxinas) (Hallegraeff, 2003), número este que, conforme Zingone e Oksfeldt (2000), não está associado a uma única classe algal ou a poucos gêneros, mas distribui-se ao longo de diversos grupos taxonômicos e tem aumentado nos últimos anos.

As ficotoxinas são metabólitos secundários de composição química variada que podem ter distintos mecanismos de ação sobre os organismos intoxicados (Proença e Mafrá, 2005). Conforme os mesmos autores, ao contrário de metabólitos primários, são produzidas em pequenas quantidades, apresentando baixo peso molecular e, geralmente, uma estrutura molecular complexa. Segundo Granéli e Hansen (2006) estas moléculas estão associadas a processos naturais de competição e defesa das próprias microalgas no ambiente marinho.

Entretanto, é possível que esses metabólitos estejam associados a outros processos, tais como acumulação de nitrogênio, síntese de ácidos nucleicos, organização da estrutura de cromossomos, bioluminescência ou endossimbiose bacteriana, mais do que a mecanismos de defesa contra predadores (Cembella, 2003). Muitas ficotoxinas podem também estar envolvidas em mecanismos de alelopatia, os quais inicialmente ocasionam efeitos deletérios sobre outras espécies de fitoplâncton (Fistarol, 2004). Estudos indicam também que determinadas espécies de dinoflagelados heterotróficos podem produzir toxinas capazes de imobilizar predadores metazoários (Berge *et al.*, 2012). As presas são então consumidas coletivamente, promovendo a taxa de

crescimento dos predadores. O ataque observado pelos pesquisadores foi rápido (aproximadamente 15 min) e os efeitos dependentes da densidade de dinoflagelados.

As ficotoxinas induzem um número de síndromes crônicas e agudas, exemplificadas mais amplamente por: PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*), NSP (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*) e CFP (*Ciguatera Fish Poisoning*) (Zingone e Oksfeldt, 2000), descritas e agrupadas conforme o tipo molecular da toxina, o vetor de contaminação, os organismos afetados e os sintomas envolvidos (Proença e Mafra, 2005). Em termos mundiais o número de casos de envenenamento por consumo de peixes ou moluscos contaminados aproxima-se de 2000 a cada ano, sendo que cerca de 15% dos mesmos serão provavelmente fatais (Hallegraeff, 2010).

1.2. Panorama brasileiro

O Brasil possui uma grande extensão costeira (7367 km de linha de costa, Lourenço e Vieira, 2004), onde os principais gêneros de microalgas envolvidos em florações de microalgas possuem ocorrência registrada (Proença e Mafra, 2005; Villac et al., 2006; Barrera-Alba et al., 2011), sendo algumas vezes relacionados a impactos sobre a fauna (Méndez, 1995), pesca local e saúde humana (Proença et al., 2007). Como explicar que estes fenômenos não representem, até o presente momento, um problema frequente ou crônico em nossas águas? Porque foram tidos por muitos anos como raros e incomuns (Proença e Mafra, 2005)?

Além da existência de assembleias planctônicas e parâmetros de influência certamente distintos aos de países que anualmente sofrem grandes perdas naturais e socioeconômicas por FANs, a explicação também pode estar em falhas na detecção de

eventos e diagnósticos de envenenamento (Proença e Mafra, 2005) e na falta de interesse científico pelo tema (Villac, 2006).

Em uma das poucas revisões detalhadas sobre a ocorrência destes fenômenos na região costeira do Brasil, Odebrecht et al. (2002) mostraram um número reduzido de registros (17 ocorrências no período de 1913 a 2000), concentrado na porção sul-sudeste da costa ao sul do Rio de Janeiro; o número é surpreendente pequeno se o período de tempo analisado e a extensão da costa compreendida forem considerados. Conforme os mesmos autores, a existência de mais informações na região sul-sudeste se deve, sem dúvida, ao maior número de pesquisadores ali sediados.

A expressão “Quem procura, acha!”, usada por Villac (2006) em trabalhos de divulgação do projeto intitulado “Florações de microalgas potencialmente nocivas do litoral do Estado de São Paulo (Biota FAPESP)”, o primeiro estudo sistemático voltado para a detecção e monitoramento destas espécies no litoral do estado, traduz de forma didática o panorama nacional ilustrado por Odebrecht et al. (2002). Um cenário que parece começar a mudar juntamente com a atual fase de incentivo à atividade de maricultura de moluscos bivalves (mitilicultura), incluindo o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Evolução da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) comercializados em Santa Catarina entre 1990 e 2010 (t). Dados numéricos obtidos de Santos et al. (2011).

No Brasil, a produção gerada pela maricultura cresceu entre 1990 e 2011 (Figura 1.3), período no qual a mitilicultura se destacou nos Estados de Santa Catarina (SC), Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP) (dados detalhados podem ser encontrados nos relatórios do IBAMA, 2000-2006). A maricultura em Santa Catarina surgiu como uma alternativa à pesca artesanal decadente, em decorrência do aumento da pesca industrial e do desrespeito ao período de defeso de algumas espécies (SEBRAE, 2011). Embora tenha sido vislumbrada como uma alternativa complementar para os pescadores artesanais, com o decorrer dos anos a atividade passou a representar sua principal fonte de renda (ICEPA, 2004).

A produção do estado, o principal produtor brasileiro de moluscos bivalves e o segundo maior da América Latina, aumentou de aproximadamente de 190 para 15,6 toneladas de 1990 a 2010, notando que de 2009 a 2010 o aumento foi de 25,5%, a maior taxa já registrada para o estado (Santos et al., 2010). Exceto para os anos de 2008 e 2009, nos quais as colheitas foram comprometidas por chuvas excessivas, o crescimento tem sido registrado ano após ano (SEBRAE, 2011) (Figura 1.3).

No litoral do Estado de São Paulo a mitilicultura iniciou-se na década de 1980, com implantação efetiva na década de 1990, e tem se expandido gradualmente de forma planejada com o apoio do Instituto de Pesca e da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, cujas atuações resultaram no aumento do número de produtores de 9 para 90 de 1999 a 2007 (Gelli, 2007). Conforme o mesmo estudo, a produção total de mexilhões no Estado foi de 100 t em 2006, cerca de 1% da produção total de mexilhões cultivados no país no mesmo ano (Gelli, 2007, em comparação com Epagri, 2007) e, embora esta porcentagem ainda seja pouco significativa no cenário nacional, o Estado continua investindo em pesquisas científicas e tecnológicas para o desenvolvimento da atividade na região.

O período de crescimento da maricultura nacional, sobretudo nos estados mencionados anteriormente, foi o principal fator que contribuiu para o aumento do interesse em florações de microalgas nocivas no país (Proença, 2004). Ainda que alguns estudos focados na detecção de espécies e toxinas (Proença et al., 1999) ou na divulgação de impactos de florações de microalgas nocivas sob a fauna local (Garcia et al. 1994; Méndez, 1995) tenham sido conduzidos no início do século 20, somente na última década o tema tem sido diretamente incorporado em programas de monitoramento (Alves et al., 2010) e se tornado o foco principal de projetos de pesquisa.

Neste sentido, a pesquisa sobre o tema no país costuma ser dividida em duas fases: 1) Fase descritiva, na qual os primeiros registros da ocorrência de episódios (a partir do início do século 20); e 2) Fase descritivo-experimental, a partir de 1995, na qual foram incluídos os estudos sobre toxinas (Odebrecht et al., 2002). A transição da primeira para a segunda fase foi impulsionada pela criação do programa “Harmful Algal Blooms (COI-UNESCO)”¹ e seu desdobramento regional, o programa “Floraciones Algales Nocivas en Sudamerica”, em 1991, e consequente participação de pesquisadores brasileiros em atividades internacionais (Villac, 2006).

As recentes iniciativas podem determinar uma mudança no cenário anteriormente descrito, com o delineamento de uma terceira fase de estudos. Um exemplo interessante pode ser destacado no Estado de Santa Catarina, onde em apenas nove meses (Março – Dezembro/2009) de monitoramento em 40 pontos estratégicos para a mitilicultura, seis florações de *Dinophysis acuminata* foram detectadas, levando à suspensão da colheita e da venda de mexilhões provenientes de áreas afetadas (Souza et

¹ Website: < <http://www.ioc-unesco.org/hab/> >

al., 2009). O gênero *Dinophysis* pode causar sérios impactos mesmo em baixas concentrações (Hallegraeff, 2010),

No Litoral de São Paulo, em um levantamento realizado de 2004 a 2005, foram encontradas várias espécies citadas como causadoras de florações, algumas delas com efeitos nocivos para a biota marinha, turismo, maricultura, pesca ou para a saúde. As espécies encontradas foram as diatomáceas *Asterionellopsis glacialis*, *Cerataulina pelagica*, *Coscinodiscus wailesii*, *Guinardia delicatula*, *Leptocylindrus minimus*; os dinoflagelados *Ceratium fusus*, *C. hircus*, *Prorocentrum micans*, *Dinophysis caudata*, *D. tripos*, *Noctiluca scintillans*, *Peridinium cf. quinquecorne*, e o silicoflagelado *Dictyocha fíbula* (Villac et al., 2006).

O número de florações registradas para a região (quatro eventos: Dias, 1992; Zavala-Camin e Yamanaka, 1980; CETESB, 1983; Giancesella-Galvão et al., 1995) é provavelmente subestimado, sendo que inúmeros eventos, observados especialmente no período do verão, são divulgados apenas na mídia e não em publicações científicas (Villac et al., 2004). Porque nenhuma destas espécies representou até o momento um risco às atividades regionais de aquicultura? Este panorama pode mudar com o passar dos anos? Quais fatores governam sua abundância e sucessão? Para estas e muitas outras perguntas ainda não existem respostas.

A maioria dos fatores apontados como responsáveis pelo aumento destes fenômenos está presente em nossas águas. Deste modo, os problemas relacionados às florações de microalgas nocivas em nossa costa podem não ser diferentes, tendendo a seguir o aumento e a expansão verificada no contexto mundial (Proença, 2004).

1.3. Interações tróficas entre microalgas potencialmente nocivas e copépodes marinhos

Copépodes adultos são considerados metazoários dominantes em ecossistemas marinhos, em termos de abundância (55-95%, Longhurst, 1985) e biomassa (superior a 80%, Kiørboe, 1998). Incluindo sua fase larval (náuplios) os copépodes são os metazoários mais abundantes do planeta (Strom et al., 1997). Considerando a idade filogenética, diversidade, adaptabilidade, dominância e densidade do grupo, a subclasse Copepoda demonstra um processo evolutivo não menos surpreendente do que o dos insetos, cujo sucesso é tido como o maior exemplo ao longo da história da Terra entre os metazoários (Schminke, 2007), tanto que Huys & Boxshall (1991) os designaram como “insetos dos mares”.

Deste modo, o táxon possui importância expressiva na transferência de matéria orgânica e energia para outros níveis tróficos via consumo (Vargas et al., 2010) e nos ciclos biogeoquímicos, por meio da produção de matéria orgânica dissolvida (excreção e respiração) e particulada (produção de pelotas fecais, carcaças, mudas e ovos) (Frangoulis et al., 2005). Os processos de excreção são importantes por disponibilizarem nutrientes inorgânicos que podem ser diretamente assimilados por produtores primários e a produção de pelotas fecais possibilita o transporte vertical de matéria particulada. Pelotas fecais podem ainda ser consumidas por organismos pertencentes ao mesmo nível trófico (Eskinazi-San’Anna, 2000), por meio de um comportamento denominado coprofagia e responsável por eventuais retardamentos dos fluxos verticais de matéria orgânica ao longo da coluna de água (Gonzáles e Smetacek, 1994).

Em teias tróficas clássicas (Lindeman, 1942; Pomeroy, 1974) os copépodes são os principais consumidores de células fitoplanctônicas e o principal alimento de peixes

planctívoros (parte superior da Figura 4), ao passo que, em teias tróficas microbianas (Azam et al., 1983; Pomeroy et al., 2007) estes crustáceos obtêm energia por um número maior de níveis, simplificados na porção inferior da Figura 1.4.

Figura 1.4. Representação esquemática simplificada de teias tróficas pelágicas, enfatizando as principais rotas de transferências de toxinas para copépodes (Ilustração adaptada de Sopanen, 2009). 1: Transferência por meio de teias tróficas clássicas (consumo direto do fitoplâncton - B - pelo mesozooplâncton - A). 2: Transferência por meio da teia microbiana pela assimilação de matéria orgânica (E) e/ou consumo direto (setas azuis) ou indireto (setas verdes) de outros organismos plânctônicos (C e D). Fontes das ilustrações utilizadas na confecção da figura: *Temora* spp.: <<http://cdn.manhattanreefs.com/blog/wp-content/uploads/2011/10/copepod.jpg>>, dinoflagelados: <<http://www.sciencephoto.com>> e diatomáceas: <http://www.up.ethz.ch/education/term_paper/Marconi_term_paper_fs07_final.pdf>.

As duas vias de fluxo de matéria descritas podem coexistir, porém sua significância relativa pode variar espaço-temporalmente (Sopanen, 2009). Assim, a

transferência de toxinas de microalgas para copépodes em ecossistemas marinhos (Figura 1.4) consiste em um processo de complexidade considerável. O predomínio de uma via, em detrimento de outra, pode favorecer a bioacumulação desproporcional nas diferentes frações de tamanho dos níveis tróficos envolvidos (Turner et al., 2000) indicada, por exemplo, pela detecção de elevados sinais de toxinas em copépodes herbívoros.

Como consumidores primários e vetores potenciais de bioacumulação, os copépodes têm sido foco principal de trabalhos envolvendo interações entre o zooplâncton e microalgas potencialmente nocivas.

Em âmbito experimental, são vários os exemplos contemplando estudos da alimentação de copépodes sob a assembleia natural do plâncton marinho durante a ocorrência de florações de microalgas nocivas (Kozlowsky-Suzuki et al., 2003; Kozlowsky-Suzuki et al., 2006; Teegarden et al., 2008; Setälä et al., 2009; Waggeett et al., 2012) e sob dietas compostas por culturas laboratoriais de microalgas nocivas e não nocivas (Jónasdóttir et al., 1998; Colin e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005; Buttino et al., 2009; Schultz e Kiorbøe, 2009).

Os efeitos do consumo de microalgas tóxicas podem variar significativamente (Sopanen, 2009). Além de causar mortalidade (Bagøien et al., 1996; Cohen et al., 2007), estudos experimentais indicam que, após o consumo, toxinas podem se acumular nos tecidos dos copépodes (Lehtiniemi et al., 2002), sendo redirecionadas para os ovos, comprometendo o sucesso reprodutivo, ou eliminadas via pelotas fecais ou por excreção na forma dissolvida (Guisande et al., 2002). Efeitos subletais abrangem redução na alimentação, fecundidade ou na taxa de eclosão dos náuplios, devido à rejeição comportamental antes da ingestão ou pela incapacitação fisiológica após a ingestão da toxina (Frangópulos et al., 2000). Estudos voltados para a observação comportamental

indicam ainda possíveis alterações no fotocomportamento e na velocidade de natação (Cohen et al., 2007). Ainda que estádios adultos não sejam consideravelmente afetados pelo consumo, náuplios podem ser sensíveis apenas à exposição a células intactas (Huntley et al., 1987) ou exsudatos (Bagøien et al., 1996), levando à imobilidade seguida por mortalidade.

A acumulação de toxinas nestes crustáceos contribui para o aumento da transferência destas substâncias para aves marinhas (Turner et al., 2000), peixes (Steidinger, 1983), baleias (Anderson e White, 1992), golfinhos (Gerachii et al., 1983) e outros predadores (Turner e Tester, 1997; Avery e Dam, 2007).

Embora o número de trabalhos seja extenso, a dificuldade de reprodução das condições naturais para estudos dos processos envolvidos ainda enfrenta grandes desafios, sendo que as estratégias de seleção, consumo, adaptação e evolução destes metazoários frente aos fenômenos de florações de microalgas potencialmente nocivas compõem uma das perguntas mais intrigantes dentro do campo da ecologia marinha de ambientes pelágicos.

No Brasil, como abordado anteriormente, os riscos associados ao consumo de recursos marinhos contaminados por toxinas têm fomentado estudos voltados para a detecção (e.g.: Nascimento *et al.*, 2008; Nascimento, 2012), identificação (Naves *et al.* 2006; Menezes *et al.*, 2010) e monitoramento de microalgas produtoras de toxinas (Souza *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010), bem como para a construção de históricos e avaliação do conhecimento existente sobre o tema (Proença, 2004; Proença e Mafra, 2005). Entretanto, não existem no país trabalhos publicados sobre o papel dessas microalgas na sobrevivência e recrutamento do zooplâncton marinho.

A linha de pesquisa é até o presente momento incipiente, em parte, possivelmente devido à dificuldade dos trabalhos experimentais, conduzidas pelo

grande número de variáveis a serem controladas para melhor obtenção de resultados e também à reduzida infraestrutura necessária nos laboratórios voltados para temas relacionados, expressa pela carência de instrumentos que possibilitem a semi-automação e aceleração das análises.

Em prática, a inserção de ferramentas semi-automáticas no desenho experimental pode reduzir etapas de análise, permitindo a realização de mais experimentos e aumentando, em consequência, a confiabilidade dos resultados obtidos.

Embora as dificuldades e a aparente baixa manifestação de florações de algas nocivas em nossa costa reduzam a atenção para o tema até a presente data, faz-se necessária a realização de mais trabalhos experimentais no país, levando ao aprimoramento das técnicas e a uma melhor compreensão das interações tróficas envolvendo o micro- e mesozooplâncton e o fitoplâncton.

1.4. Contextualização do projeto de mestrado e estrutura da dissertação

Como abordado, as possíveis interações entre o zooplâncton e espécies de fitoplâncton potencialmente nocivas são variáveis de forma espécie-específica, exigindo a aplicação de diferentes estratégias experimentais. Neste sentido, foram conduzidos experimentos de alimentação e produção com um componente do mesozooplâncton (Copepoda) e experimentos voltados para a exposição a células intactas e exsudatos com componentes do micro- e merozooplâncton (Brachyura, Copepoda, Gastropoda, Polychaeta, Rotifera e Tintinnina). Assim, o texto da dissertação encontra-se dividido em dois capítulos principais, redigidos na forma de manuscritos:

Capítulo I - Influência do dinoflagelado potencialmente nocivo *Alexandrium tamiyavanichii* na alimentação e reprodução de *Temora turbinata* (Dana, 1849) (Copepoda: Calanoida).

Capítulo II - Efeitos de exsudatos e células intactas de microalgas sobre o zooplâncton marinho de águas costeiras do Brasil.

Um terceiro documento, introduzido na forma de anexo, descreve as etapas iniciais de isolamento, cultivo e estabelecimento de parte das cepas utilizadas, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de um número maior de estudos com dinoflagelados:

Anexo - Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados marinhos - Um manual prático.

1.5. Referências bibliográficas (Introdução Geral)

- ALVES, T. P.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. Implementação e avaliação do monitoramento de algas nocivas e de ficotoxinas em um cultivo de moluscos em Florianópolis - SC. **Atlântica**, v. 32, n. 1, p. 71-77, 2010.
- ANDERSON, D. M. Turning back the harmful red tide. **Nature**, v. 388, p. 513-514, 1997.
- ANDERSON, D. M.; WIIITE, A.H. Marine biotoxins at the top of the food chain. **Oceanus**, v. 35, n. 3, p. 55-61, 1992.
- AVERY, D. E.; DAM, H. G. Newly discovered reproductive phenotypes of a marine copepod reveal the costs and advantages of resistance to a toxic dinoflagellate. **Limnol. Oceanogr.**, v. 52, n. 5, p. 2099-2108, 2007.
- AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 10, p. 257-263, 1983.
- BAGØIEN E.; MIRANDA A.,; REGUERA B.; FRANCO J. M. Effects of two paralytic shellfish toxin roducing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod Euterpina acutifrons. **Mar Biol.**, 126: 361-369, 1996.
- BASTERRETXEA, G.; GARCÉS, E.; JORDI, A.; ANGLÈS, S.; MASÓ, M. Modulation of near shore harmful algal blooms by *in situ* growth rate and water renewal. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 352, p. 53-65, 2007.
- BERGE, T.; POULSEN, L. K.; MOLDRUP, M.; DAUGBJERG, N.; HANSEN, P. J. Marine microalgae attack and feed on metazoans. **ISME. J.**, v. 06, n. 10, p. 1926-1936.
- BUSHAW-NEWTON, K. L.; SELLNER, K. G. 1999. **Harmful Algal Blooms**. In: NOAA's State of the Coast Report. Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponível em: <http://state-of-coast.noaa.gov/bulletins/html/hab_14/hab.html>. Acessado em 10 de setembro de 2012. 40p.
- BUTTINO, I.; IANORA, A.; BUONO, S.; VITELLO, V.; SANSONE, G.; MIRALTO, A. Are monoalgal diets inferior to plurialgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*? **Mar. Biol.**, v. 156, n. 6, p. 1171-1182, 2009.
- CEMBELLA, A. D. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. **Phycologia**, v. 42, p. 420-447, 2003.

- CETESB. Relatório sobre a ocorrência de “maré vermelha” no litoral do Estado de São Paulo, em agosto de 1983. São Paulo, **CETESB**, Relatório Técnico, 88p., 1983.
- COHEN, H. H.; TESTER, P. A.; FORWARD J. R., R. B. Sublethal effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on marine copepod behavior. **J. Plankt. Res.**, v. 29, n. 3, p. 301-315, 2007.
- COLIN, S.P.; DAM, H.G. Comparison of the functional and numerical responses of resistant versus non-resistant populations of the copepod *Acartia hudsonica* fed the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. **Harmful Algae**, v. 6, p. 875-882, 2007.
- DAM, H. G.; COLIN, S. P. *Prorocentrum minimum* (clone Exuv) in nutritionally insufficient, but not toxic to the copepod *Acartia tonsa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 575-584, 2005.
- DIAS, E. R. A. Mortandade de peixes causada por maré vermelha em Cananéia. **Ass. Bras. Patologia Organismos Aquáticos, Bol. Informativo**, v. 1, p. 5-5, 1992.
- FISTAROL, G. O.; LEGRAND, C.; GRANÉLI, E. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 255, p. 115-125, 2003.
- FRANGÓPULOS, A.; GUISANDE, C.; MANEIRO, I.; RIVEIRO, I.; FRANCO, J. Shortterm and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 203, p. 161-169, 2000.
- FRANGOULIS, C.; CHRISTOU, E. D.; HECQ, J. H. Comparison of Marine Copepod Outfluxes: Nature, Rate, Fate and Role in the Carbon and Nitrogen Cycles. **Adv. Mar. Biol.**, v. 47, p. 254-309, 2005.
- FUKUYU, Y., IMAI, I., KODAMA, M., TAMAI, K. Red tides and others harmful algal blooms in Japan. In: PICES. **Harmful Algal Blooms in the PICES region of the North Pacific**, Sidnei: PICES, p. 7-21, 2002.
- GARCIA, V. M. T.; ODEBRECHT, C.; RÖRIG, L. R. Florações nocivas do fitoplâncton na costa brasileira. In: **Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo, 101. COI/UNESCO**, p. 9-14, 1994.
- GELLI, V. C. **Avaliação dos impactos econômicos do potencial de desenvolvimento da mitilicultura no município de Ubatuba-SP**, 2007. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Centro de Aqüicultura, São Paulo.
- GEOHAB. **Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan**. Baltimore e Paris: SCOR e IOC, 87p., 2001.
- GERACI, J. R.; ANDERSON, J. R.; TIMPERI, R. J.; AUBIN, D. J. S.; PRESCOTT, G. A. E. J. H.; MAYO, C. A. Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 46, p. 1895-1898, 1989.

- GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F., COSTA, M. P. F.; KUTNER, M. B. B. Bloom of *Oscillatoria* (*Trichodesmium*) erythraea (Ehr.) Kutz. in coastal waters of the Southern Atlantic. **Publ. esp. Inst. Oceanogr. S. Paulo**, v. 11, p. 133-140, 1995.
- GLIBERT, P. M.; PITCHER, G. (Ed). **Global ecology and oceanography of harmful algal blooms (GEOHAB), science plan**. Baltimore:SCOR; Paris: IOC, 86 p., 2001.
- GRANÉLI, E.; HANSEN, P. J. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources?. In: GRANÉLI, E. e TURNER, J.T. (Ed.), **Ecology of Harmful Algae**, Berlin: Springer- Verlag, p. 189-201, 2006.
- GUISANDE, C.; FRANGÓPULOS, M.; CAROTENUTO, Y.; MANEIRO, I.; RIVEIRO, I.; VERGARA, A. R. Fate of paralytic shellfish poisoning toxins ingested by the copepod *Acartia clausi*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 240, p. 105-115, 2002.
- HUNTLEY, M. E.; CIMINIELLO, P.; LOPEZ, M. D. G. Importance of food quality in determining development and survival of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida). **Mar. Biol.**, v. 95, n. 1, p.: 103-113, 1987.
- HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: a global overview. In: HALLEGRAEFF, G. M., ANDERSON, D. N.; CEMBELLA, A. D. **Manual Harmful Marine Microalgae**. Paris: UNESCO, p. 25-49, 2003.
- HALLEGRAEFF, G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. **J. Phycol.**, v. 46, p. 220-235, 2010.
- HUYS, R.; BOXSHALL, G. A. **Copepod evolution**. London: Ray Society, 468p., 1991.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2000**. Brasília, 124p., 2000. Disponível em: <
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Fcategory%2F40%3Fdownload%3D2453%253A2000.p&ei=WpavUJ-jMoqQ0QH1q4HwCA&usg=AFQjCNFI_enV_aXtk6buryKscwIGsst_Fw>
 Acesso em 22 nov. 2012.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2001**. Brasília, 124p., 2003. Disponível em: <
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Fcategory%2F40%3Fdownload%3D2454%253A2001.p&ei=CpevUJHVJOSB0QG_l4GYBA&usg=AFQjCNG4cLiWXYZOxEP7J52RjAgaFNa3OQ>
 Acesso em 22 nov. 2012.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2002**. Brasília, 129p., 2004a. Disponível em <
<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Fcategory%2F40%3Fdownload%3D2455%253A200>>

2.p&ei=QZevUIyuH7KP0QHxg4HoDg&usg=AFQjCNFYJbCMXY-1WX14DIKBc494g0BqA>
Acesso em 22 nov. 2012.

IBAMA. **Estatística da pesca 2003**. Brasília, 137p., 2004b. Disponível em <
<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Fcategory%2F40%3Fdownload%3D2456%253A2003.p&ei=CpmvUL3pIo-t0AGZ1YD4DQ&usg=AFQjCNGFEktKtmHv2McvNQvZa88dvE2mLQ>>
Acesso em 22 nov. 2012.

IBAMA. **Estatística da pesca 2004**. Brasília, 136p., 2005. Disponível em <
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Findex.php%3Foption%3Dcom_phocadownload%26view%3Dcategory%26download%3D2457%3A2004.p%26id%3D40%26Itemid%3D331&ei=O5mvUIXWMai30AHy1YD4DQ&usg=AFQjCNG3OPNrWKUcDCpPUQBCdnWRzq8UCg>
Acesso em 22 nov. 2012.

IBAMA. **Estatística da pesca 2005**. Brasília, 108p., 2006. Disponível em: <
http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ibama.gov.br%2Findex.php%3Foption%3Dcom_phocadownload%26view%3Dcategory%26download%3D2458%3A2005.p%26id%3D40%26Itemid%3D331&ei=gZmvUMT2JMm40QGA3IHACw&usg=AFQjCNFW6b8ipy0rTBYmqlT8Quq0PpeUXg> Acesso
em 22 nov. 2012.

ICEPA. **Síntese Anual da Agricultura Catarinense**. Florianópolis, 321p., 2004. Disponível em: <
http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2011/sintese%202010-2011.pdf> Acesso em 22
nov. 2012.

JÓNASDÓTTIR, S. H.; KJØRBOE, T.; TANG, K. W.; JOHN, M. S. T.; VISSER, A. W.; SAIZ, E.;
DAM, H. G. Role of diatoms in copepod production: good, harmless or toxic? **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 172, p. 305-308, 1998.

KJØRBOE, T. Population regulation and role of mesozooplankton in shaping marine pelagic food webs.
Hydrobiologia, v. 363, p. 13-27, 1998.

KOZŁOWSKY-SUZUKI, B.; CARLSSON, P.; RUHL, A.; GRANÉLI, E. Food selectivity and grazing
impact on toxic *Dinophysis* spp. by copepods feeding on natural plankton assemblages. **Harmful Algae**, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2006.

KOZŁOWSKY-SUZUKI, B.; KARJALAINEN, M.; LEHTINIEMI, M.; ENGSTRÖM-ÖST, J.;
CARLSSON, P. Feeding, reproduction and toxin accumulation by the copepods *Acartia bifilosa*
and *Eurytemora affinis* in the presence of the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 249, p. 237-249, 2003.

- LEHTINIEMI, M.; ENGSTROM-OST, J.; KARJALAINEN, M.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; VIITASALO, M. Fate of cyanobacterial toxins in the pelagic food web: transfer to copepods or to fecal pellets? **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 241, p. 13-21, 2002.
- LINDEMAN, R. L. The trophic-dynamic aspect of ecology. **Ecology**, v. 23, p. 399-418.
- LONGHURST, A. R. The structure and evolution of plankton communities. **Prog. Oceanogr.**, v. 15, p. 1-35, 1985.
- LOURENÇO, S. O.; VIEIRA, A. A. H. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. **Nova Hedwigia**, v. 79, p. 149-173, 2004.
- MÉNDEZ, S. Bivalve mortality on Southwest Atlantic shores. **Harmful Algae News**, v. 10, n. 11, p. 12-12, 1995.
- NASCIMENTO, S. M.; DINIZ, B. S.; ALENCAR, A. G.; MENGUELI, A. C.; MENEZES, M. First record of the ciguatera causing genus *Gambierdiscus* in Brazil. **Harmful Algae News**, v. 45, p. 8-9, 2012.
- NASCIMENTO, S. M.; MONTEIRO, P. O.; FERREIRA, C. E. L.; GONZÁLES-RODRÍGUEZ, E. *Ostreopsis ovata* blooms on Rio de Janeiro coast. **Harmful Algae News**, v. 37, p. 1, 3-4, 2008.
- ODEBRECHT, C.; AZEVEDO, S. M. F. O.; GARCIA, V. M. T.; HUSZAR, V. L. M.; MAGALHÃES, V. F.; MENEZES, M.; PROENÇA, L. A. O.; RÖRIG, L. R.; TENENBAUM, D. R.; VILLAC, M. C.; YUNES, J. S., Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERA, B. (Eds.) **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano**. Vigo: Instituto Español de Oceanografía, p. 219-233, 2002.
- POMEROY, L. R.; WILLIAMS, P. J. I. B.; AZAM, F.; HOBBIIE, J. E. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28-33, 2007.
- POMEROY, L. R. The oceans's food web, a changing paradigm. **BioScience**, v. 24, n. 9, p. 499-504, 1974.
- PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; ALVES, T. P. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful Algae News**, v. 33, p. 19-20, 2007.
- PROENÇA, L. A. O. Algal blooms in Coastal Zones: Examples of Harmful Impacts from the Brazilian Coast. **J. Coastal Res.**, v. 39, p. 76-78, 2004.
- PROENÇA, L. A. O.; MAFRA, L. L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: SBFIC. (Org.). **Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 57-77, 2005.

- PROENÇA, L. A. O.; SCHMITT, F.; GUIMARÃES, S. P.; RÖRIG, L. R. Análise de toxinas diarreicas em duas espécies de *Prorocentrum* (Dinophyceae) isoladas em área de cultivo de moluscos. **Notas Téc. Facimar**, v. 3, p. 41-45, 2005.
- SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; RUPP, G. S.; SOUZA, R. V.; COSTA, S. W. In: EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura 2011**, 2011. Disponível em: http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=173. Acesso em 25 abr. 2012.
- SCHMINKE, H. K. Entomology for the copepodologist. **J. Plank. Res.**, v. 29, p.149-162, 2007. Suplemento.
- SCHULTZ, M.; KIØRBOE, T. Active prey selection in two pelagic copepods feeding on potentially toxic and non-toxic dinoflagellates. **J. Plankt. Res.**, v. 31, n. 5, p. 553-561, 2009.
- SEBRAE. **Santa Catarina em números: Pesca e Aqüicultura**. Florianópolis: SEBRAE/SC, 57p, 2011.
- SETÄLÄ, O.; SOPANEM, S.; AUTIO, R.; ERLER, K. Grazing and food selection of the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Acartia biflosa* feeding on plankton assemblages containing *Dinophysis* spp. **Boreal Env. Res.**, v. 14, p. 837-849, 2009.
- SOPANEM, S. Interactions between harmful algae and calanoid copepods in the Baltic Sea. **Walter and Andrée de Nottbeck Foundation Scientific Reports**, v. 35, 58p., 2009.
- SOURNIA, A.; CHRDTIENNOT-DINET, M. J.; RICARD, M. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? **J. Plank. Res.**, v. 13, p. 1093-1099, 1991.
- SOUZA, R. V.; NOVAES, A. L. T.; SANTOS, A. A.; RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle higiênico sanitário de moluscos bivalves no Litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, v. 116, p. 55-59, 2009.
- STEIDINGER, K. A. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. **Prog. Phycol. Res.** v. 2, p. 147-188, 1983.
- STROM, S.; BENNER, R.; ZIEGER, S. DAGG, M. J. Planktonic grazers are a potentially important source of marine dissolved organic carbon. **Limnol. Oceanogr.**, v. 46, n. 06, p. 1364-1374.
- STROM, S. Novel interactions between phytoplankton and microzooplankton: their influence on the coupling between growth and grazing rates in the sea. **Hydrobiology**, v. 480, p. 41-54, 2002.
- TEEGARDEN, G. J.; CAMPBELL, R. G.; ANSON, D. T.; OUELLETT, A.; WESTMAN, B. A.; DURBIN, E. G. Copepod feeding response to varying *Alexandrium* spp. Cellular toxicity and cell concentration among natural plankton samples. **Harmful Algae**, v. 7, p. 33-44, 2008.

- TURNER, J. T.; DOUCETTE, G. J.; POWELL, C. L.; KULLIS, D. M.; KEAFER, B. A.; ANDERSON, D. M. Accumulation of red tide toxins in larger size fractions of zooplankton assemblages from Massachusetts Bay, USA. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 203, p. 95-107, 2000.
- TURNER, J. T.; TESTER, P. A. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, n. 5 (parte 2), p. 1203-1214, 1997.
- VARGAS, C. A.; MARTÍNEZ, R. A.; ESCRIBANO, R.; LAGOS, N. A. Seasonal relative influence of food quantity, quality, and feeding behaviour on zooplankton growth regulation in coastal food webs. **J. Mar. Biol. Assoc. UK.**, v. 90, p. 1189- 120, 2010.
- VILLAC, M. C. Ocorrência e distribuição de microalgas potencialmente nocivas na costa brasileira: quem procura acha? In: XI Congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre Algas Nocivas, 2006, Itajaí. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-Americano sobre Algas Nocivas. Itajaí: UNIVALI, 2006.** Disponível em: <<http://www.biota.org.br/publi/banco/index?show+3311809>>. Acesso em 22 nov. 2012.
- VILLAC, M. C.; COBRA, V. A. P.; SANTOS, D. B. Florações de microalgas potencialmente nocivas do litoral do Estado de São Paulo. In: **CETESB. Relatório de qualidade das águas litorâneas no Estado de São Paulo**, p.181-191, 2006. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 25 abr. 2012,
- VILLAC, M. C.; SANTOS, D.; CABRAL, V.; BASSANELLO, R. Estudos de florações de microalgas potencialmente nocivas. In: **Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo - Balneabilidade das Praias - 2004**, 331p., 2004.
- ZAVALA-CAMIN, L. A.; YAMANAKA, N. Notas sobre um caso de mortandade de peixes, ocorrida em Itanhaém, São Paulo, Brasil. **Bolm. Inst. Oceanogr.**, v. 29, p. 377-377, 1980.
- ZINGONE, A.; ENEVOLDSEN, H. O. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. **Ocean Coast. Manage.**, v. 43, p. 725-748, 2000.
- WAGGETT, R. J.; HARDISON, D. R.; TESTER, P. A. Toxicity and nutritional inadequacy of *Karenia brevis*: synergistic mechanisms disrupt top-down grazer control. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 444, p. 15-30, 2012.

Capítulo 1

Influência de *Alexandrium tamiyavanichii* Balech na
alimentação e reprodução de *Temora turbinata* (Dana, 1849)

(Copepoda: Calanoida)

2.1. Resumo

Florações de microalgas potencialmente nocivas têm aumentado em termos globais e causado impactos na aquicultura, no turismo, na saúde humana e em vários aspectos do funcionamento dos ecossistemas. No Brasil, uma atenção cada vez maior tem sido dada ao tema, em virtude do elevado potencial de nossas águas para o cultivo de bivalves marinhos, um dos grupos de invertebrados mais afetados. Deste modo, a preocupação com a contaminação de consumidores humanos tem gerado projetos voltados para a detecção de espécies potencialmente nocivas e de suas toxinas, mas ainda há poucos estudos sobre interações alimentares entre as espécies de fitoplâncton e zooplâncton. A espécie de copépode escolhida para o presente trabalho, *Temora turbinata*, é uma espécie invasora que se tornou uma das mais abundantes nos ecossistemas costeiros do Brasil ao longo dos últimos anos, porém aspectos ecológicos de suas populações permanecem pouco estudados. O presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do dinoflagelado potencialmente nocivo *Alexandrium tamiyavanichii* na alimentação e reprodução do copépode planctônico marinho *T. turbinata*. Taxas de produção de ovos e sucesso de eclosão naupliar foram estimadas para fêmeas alimentadas em misturas de *A. tamiyavanichii* e do dinoflagelado *Prorocentrum minimum*, tratado aqui como alimento controle. A concentração de alimento permaneceu constante e a proporção de cada dinoflagelado foi variada proporcionalmente. Em experimentos de monocultura, ainda que as duas dietas tenham sustentado taxas de ingestão e produção de ovos elevadas, taxas de canibalismo de *T. turbinata* incubadas com *P. minimum* foram significativamente maiores do que as verificadas para copépodes incubados em *A. tamiyavanichii* em todos os períodos de incubação, sugerindo uma insuficiência nutricional do dinoflagelado controle. Em experimentos de mistura, a insuficiência nutricional foi confirmada, uma vez que *A. tamiyavanichii* não conferiu nenhum efeito tóxico, suplementando a carência nutricional da espécie controle (*P. minimum*). Mesmo na presença de uma segunda microalga controle (*Alexandrium cf. fraterculum*) copépodes tiveram preferência por células de *A. tamiyavanichii*, indicada por taxas maiores de produção em tratamentos contendo a espécie, em combinação com *P. minimum*.

Palavras-chave: Copepoda, *Temora turbinata*, *Alexandrium tamiyavanichii*, *Alexandrium cf. fraterculum*, *Prorocentrum minimum*, florações, algas tóxicas, produção de ovos, controle base-topo, controle topo-base.

2.2. Abstract

Harmful algae blooms have increased globally and caused impacts in aquaculture, tourism, and human health and in various aspects of ecosystem functioning. In Brazil, increasing attention has been given to this issue, because of the high potential of our waters for marine bivalve farming. Therefore, there are risks of contamination of the crops, and consequent poisoning of the consumers. This concern has led research projects to mostly focus on the detection of potentially harmful species and their toxins, with few initiatives to understand feeding interactions among species of phytoplankton and zooplankton. The copepod species *Temora turbinata* corresponds to an invasive species that has become one of the most abundant zooplankton in coastal ecosystems in Brazil, over the last two decades. However, ecological aspects of their populations remain poorly studied. This study aims to evaluate the influence of the potentially harmful dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* on *T. turbinata* feeding and reproduction. Egg production rates and hatching success were estimated for females fed on mixtures of *A. tamiyavanichii* and *P. minimum*. The concentration of food remained constant and the proportion of each dinoflagellate was proportionally varied. In monoculture experiments, although both diets have sustained ingestion rates and higher egg production, rates of *T. turbinata* cannibalism on their eggs during incubation with *P. minimum* were significantly higher than those observed for copepods incubated in *A. tamiyavanichii* in all experiments, suggesting a nutritional insufficiency of the control dinoflagellate. In mixture experiments, *P. minimum* nutritional insufficiency was confirmed, since *A. tamiyavanichii* not conferred any toxic effect, but supplemented instead the nutritional deficiency of the control species (*P. minimum*). Even in the presence of a second control microalgae (*Alexandrium* cf. *fraterculum*) *T. turbinata* had preference for *A. tamiyavanichii*, as demonstrated high production rates in treatments containing this species in combination with *P. minimum*.

Keywords: Copepod, *Temora turbinata*, *Alexandrium tamiyavanichii*, *Alexandrium* cf. *fraterculum*, *Prorocentrum minimum*, blooms, toxic algae, egg production, bottom-up control, top-down control.

2.3. Introdução

A alimentação dos copépodes calanóides é um dos mais importantes processos trofodinâmicos dos oceanos (Hwang et al., 1998), governado por mecanismos complexos e altamente variáveis, de forma inter e intraespecífica (Duren e Videler, 1995). Quando este processo é abordado dentro do contexto das florações de algas nocivas (FANs) os questionamentos tornam-se ainda mais desafiadores, uma vez que um segundo conjunto de fatores, relacionados à composição específica de presas e predadores, compostos químicos envolvidos e à dinâmica espaço-temporal destes eventos, é somado a esta variabilidade. Com a acentuada expansão destes fenômenos nas três últimas décadas, em frequência e intensidade de distribuição (Hallegraeff, 2010), também se tornou crescente a necessidade de uma compreensão detalhada das interações entre espécies fitoplanctônicas potencialmente nocivas e seus primeiros consumidores, dentre os quais copépodes desempenham um importante papel.

Calanóides planctônicos da família Temoridae são amplamente distribuídos em águas tropicais, subtropicais, temperadas e boreais (Ara, 2002), correspondendo a um dos membros mais importantes de comunidades mesozooplanctônicas de regiões estuarinas, neríticas, oceânicas, epipelágicas (0-500m) e de águas profundas e, além de ecossistemas de água doce (Tseng et al., 2011). Na costa do Atlântico três espécies do gênero *Temora* são registradas: *T. longicornis*, *T. stylifera* e *T. turbinata* (Bradford-Grieve et al., 1999).

A espécie alvo do presente estudo, *Temora turbinata* (Dana, 1849), distribui-se amplamente em águas tropicais, subtropicais e temperadas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Villac et al., 2009), com exceção do leste do Pacífico (Bradford-Grieve et al., 1999). No Brasil a espécie é considerada invasora, devido provavelmente à deslambres de navios oriundos do Indo-Pacífico e posterior dispersão via correntes

marítimas, ocorrendo atualmente em toda a extensão da zona costeira (Villac et al., 2009). A distribuição das populações desta espécie, em termos de abundância, sinaliza uma contribuição sazonal importante para a comunidade mesozooplânctônica da plataforma continental sul e sudeste (Araújo e Montú, 1993; Eskinazi-Sant'Anna e Björnberg, 1995; Muxagata e Gloeden, 1995; Lopes et al., 1998; De La Rocha, 1998; Sartori e Lopes, 2000; Cunha, 2008; Melo Júnior, 2009; Miyashita et al., 2009), norte (Brandini et al., 1997; Krumme e Liang, 2004) e nordeste (Neumann-Leitão et al., 1999; Vieira, 2000; Moura, 2000; Neumann-Leitão et al., 2008).

Além de desempenhar um papel importante nos ecossistemas marinhos locais, como componente frequente e abundante do mesozooplâncton e item principal da dieta de algumas espécies de peixes, incluindo peixes de importância comercial (Contente et al., 2010), *T. turbinata* possui aspectos interessantes do ponto de vista ecológico ainda pouco estudados. Existem indícios de vantagens sobre a espécie nativa (*T. stylifera*) em relação à utilização de recursos alimentares e comportamento reprodutivo (Cunha, 2008), entretanto, ainda não experimentalmente avaliados. Adicionalmente, os elevados valores de abundância observados em campo não são compatíveis com as baixas taxas de produção sob condições experimentais (Melo Júnior, 2009).

Temora turbinata é uma espécie relativamente bem estudada em outras regiões do oceano mundial, com contribuições sobre: (i) seu desenvolvimento e crescimento (Pillai, 1975; Koga, 1984); (ii) relações peso-comprimento e composição química corporal (Bandaranayake e Gentien, 1982; Ara, 2001); (iii) variação temporal e produção secundária (Ara, 2004; Hsu et al., 2008; Melo Júnior, 2009); (iv) preferências alimentares com base na exposição a culturas laboratoriais de fitoplâncton (Paffenhöfer e Knowles, 1978), em comunidades naturais para estágios naupliares (Roff et al., 1995) e para adultos (Turner et al., 1998), bem como mediante análise de pelotas fecais

(Eskinazi-Sant'Anna, 2000); (v) comportamento natatório na presença de predadores (Waggett e Buskey, 2006; Waggett e Buskey, 2007; Wu et al., 2010) e (vi) metabolismo de determinadas substâncias provenientes de atividades antrópicas (Shih-Hui et al., 2010). Contudo, existem poucos estudos sobre a influência de florações de microalgas nocivas sobre o seu comportamento alimentar e/ou sucesso reprodutivo.

Dentro deste contexto, sabe-se apenas que *T. turbinata* pode coexistir com florações do dinoflagelado tóxico *Karenia brevis* (Lester et al., 2008) e, sob condições experimentais, foi também demonstrado que o mesmo dinoflagelado não possui efeitos significativos sobre sua natação e fotocomportamento (Cohen et al., 2007).

O dinoflagelado alvo do presente estudo, *Alexandrium tamiyavanichii* Balech, foi isolado e sua taxonomia estudada por meios morfológicos e moleculares (Menezes et al., 2010). Relacionado a florações tóxicas na Tailândia (Tamiyavanich et al., 1985) e no Japão (Hashimoto et al., 2002; Oh et al., 2009), suas principais toxinas correspondem ao N-sulfo-carbamoil e a gonyaulotoxina (C-2 e GTX4, respectivamente), com concentrações menos expressivas de neosaxitoxinas (neoSTX) e saxitoxinas (STX) (Oh et al., 2009).

Todas as 54 cepas analisadas por Oh et al. (2009), isoladas em condições de floração de quatro diferentes localidades, eram produtoras de toxinas. A porcentagem de suas principais toxinas (C-2 e GTX4) foram próximas às verificadas para cepas de *A. tamarense* e *A. catenella*; contudo toxinas mais potentes (gonyaulotoxina GTX2+3 e STX) foram detectadas em concentrações maiores. Adicionalmente, os autores também detectaram uma toxicidade média de *A. tamiyavanichii* maior do que a verificada em *A. tamarense* e *A. catenella*.

A influência do mesmo clone aplicado no presente estudo sobre o comportamento natatório de *T. turbinata* foi avaliado por Baldasso (2010), que

verificou maiores velocidades médias de copépodes na presença de camadas finas de *A. tamiyavanichii* do que nos experimentos controle com *Tetraselmis gracilis*. Também foram identificadas rápidas respostas comportamentais e clara tendência de diminuição das velocidades após a exposição inicial com o dinoflagelado.

O presente estudo tem por objetivo principal contribuir para a compreensão do comportamento de uma espécie de copépode abundante na presença de uma microalga potencialmente produtora de toxinas. A resposta do copépode *T. turbinata*, em termos de produção e sucesso de eclosão naupliar, ao dinoflagelado potencialmente nocivo, *Alexandrium tamiyavanichii* (isolado de região costeira do Brasil, Menezes et al., 2010), foi examinada mediante a aplicação da técnica de determinação de toxicidade ou inadequação nutricional por meio de misturas de presas (conforme Jónasdóttir et al. 1998).

2.4. Hipóteses

- **Hipótese 1:** A taxa de ingestão, produção de ovos e eclosão dos náuplios de *Temora turbinata* é negativamente influenciada pela ingestão de *Alexandrium tamiyavanichii*;
- **Hipótese 2:** A taxa de produção de ovos de *T. turbinata* é favorecida pela presença de *Prorocentrum minimum* em mistura com *A. tamiyavanichii*;
- **Hipótese 3:** A taxa de produção de ovos de *T. turbinata* é favorecida pela presença de *A. cf. fraterculus* em mistura com *A. tamiyavanichii* e *P. minimum*.

2.5. Objetivos

Objetivo principal

O principal objetivo do presente capítulo foi investigar, em experimentos com culturas laboratoriais de fitoplâncton, a influência de um dinoflagelado potencialmente nocivo (*Alexandrium tamiyavanichii*), isolado de uma região costeira do litoral do país (Porto Seguro, BA), no comportamento alimentar e na reprodução do copépode planctônico marinho *Temora turbina*, em comparação com um dinoflagelado não nocivo, também proveniente de águas brasileiras (*Prorocentrum minimum*, Baía de Guanabara, RJ).

Objetivos específicos

Etapas 1: Experimentos com monoculturas - Determinação de curvas de respostas funcional e numérica

(i) Determinar as taxas de ingestão e produção de *T. turbinata* alimentada com soluções compostas por diferentes concentrações de *A. tamiyavanichii* em crescimento exponencial (determinação das respostas funcional e numérica, respectivamente - espécie potencialmente nociva);

(ii) Determinar as taxas de ingestão e produção de *T. turbinata* alimentada com soluções compostas por diferentes concentrações de *P. minimum* em crescimento exponencial (determinação das respostas funcional e numérica, respectivamente - espécie não nociva 1);

(iii) Determinar as taxas de ingestão e produção de *T. turbinata* alimentada com soluções compostas por diferentes concentrações de *A. cf. fraterculus* em

crescimento exponencial (determinação das respostas funcional e numérica, respectivamente - espécie não nociva 2).

Etapa 2: Experimentos com misturas de microalgas - Mistura 1

(iv) Com base nas curvas de resposta funcional e numérica, determinar a concentração de saturação (aquela onde a taxa de ingestão e de produção atingem o máximo) do alimento em carbono para as duas espécies de dinoflagelados;

(v) Determinar as taxas de produção e o sucesso de eclosão dos náuplios de *T. turbinata* alimentada com soluções compostas por misturas de *A. tamiyavanichii* e *P. minimum*, em cinco diferentes proporções;

(vi) Avaliar a toxicidade ou inadequação nutricional de *A. tamiyavanichii* para *T. turbinata* através do método proposto por Jónasdóttir et al., (1998), Colin e Dam (2002) e Dam e Colin (2005).

Etapa 3: Experimentos com misturas de microalgas - Mistura 2 (adicional)

(vii) Com base nas curvas de resposta funcional e numérica, determinar a concentração de saturação do alimento em carbono para *A. cf. fraterculum*. Determinar as taxas de produção e o sucesso de eclosão dos náuplios de *T. turbinata* alimentada com soluções compostas por misturas de *A. tamiyavanichii*, *A. cf. fraterculum* e *P. minimum*, em seis diferentes proporções.

2.6. Material e métodos

Conjuntos experimentais

Três conjuntos experimentais foram realizados em novembro de 2010, outubro de 2011 e dezembro de 2011 contemplando os dinoflagelados potencialmente nocivos *A. tamiyavanichii* (TAM) e duas microalgas controles, os dinoflagelados *A. cf. fraterculum* (FRA) e *P. minimum* (PRO). Nos dois primeiros conjuntos foram caracterizadas as curvas de resposta numérica e funcional para todas as espécies, ao passo que no último conjunto foram realizados dois experimentos envolvendo misturas de duas (PRO e TAM) e três microalgas (FRA, PRO e TAM) (Tabela 2.1). Ressalta-se que as variações nos desenhos presentes nos dois primeiros conjuntos experimentais (incubações de 24 horas, utilização de garrafas experimentais de 65 mL, e aplicação de diferentes temperaturas de incubação, como detalhadamente explicado nas sessões a seguir) ocorreram em função da realização de conjuntos experimentais tentativos, cujos dados foram incluídos nas análises do presente estudo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Conjuntos experimentais, períodos de execução e espécies de microalgas envolvidas. FRA: *Alexandrium cf. fraterculum*. TAM: *A. tamiyavanichii*. PRO: *Prorocentrum minimum*.

Experimentos	Determinação das respostas funcional e numérica			Mistura
Conjuntos	1	2	3	4
Data	10 - 12. Nov. 10	15 - 18. Fev. 11	13 - 15. Out. 11 e 18 - 20. Out. 11	10 - 17. Dez. 11
Dinoflagelados	FRA	TAM	TAM e PRO	FRA, TAM e PRO
Abreviação dos experimentos	AF	AT1	AT2 e PM	M1 e M2
Legenda		Desenhos experimentais tentativos		Desenho experimental final

2.6.1. Determinação das respostas funcional e numérica

Espécies controle

Alexandrium cf. *fraterculum* é uma espécie de dinoflagelado não associada à produção de toxinas (Noguchi et al., 1985; Proença et al., 2002; Mackenzie et al., 2004). Encontrado em águas quentes, possui ampla distribuição ao longo do Atlântico Sul (Balech, 1995). A ocorrência da espécie no Brasil é reportada com frequência em Santa Catarina tanto em baixas concentrações (Rörig et al., 1998; Proença et al., 2002), quanto em condições de floração (Omachi et al., 2007).

Prorocentrum minimum é um dinoflagelado nerítico frequente que, embora seja relacionado à formação de florações, tem sido comumente utilizado como dieta em estudos experimentais devido a sua ampla disponibilidade de clones e facilidade de cultivo (Heil et al., 2005). Em estudos voltados para a nutrição do zooplâncton marinho, *P. minimum* está presente em numerosos trabalhos envolvendo a análise da alimentação e reprodução de copépodes calanóides sob diferentes dietas monoalgais e pluralgais (e.g.: Besiktepe e Dam, 2002; Colin e Dam, 2002; Ianora et al., 2004; Dam e Colim, 2005; Ismar et al., 2008; Buttino et al., 2009; Ianora et al., 2011).

Condições laboratoriais

As cepas utilizadas no presente estudo foram provenientes do LIPO (Laboratório Integrado de Processos Oceanográficos, Base Clarimundo de Jesus, Base Norte do IO-USP, Ubatuba, SP) (*Alexandrium* cf. *fraterculum* e *A. tamiyavanichii*) e do BMM (Banco de Microorganismos Marinhos do IO-USP) (*Prorocentrum minimum*). *Alexandrium* cf. *fraterculum* foi isolado da região costeira de Ubatuba (SP), *A. tamiyavanichii* foi reisolado de uma cepa cedida pelo Laboratório de Algas Nocivas da

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALE), e *P. minimum*, proveniente da Baía de Guanabara (RJ), foi apenas adaptado às condições de cultivo adotadas para as outras duas espécies.

As espécies foram cultivadas no LIPO em balões de 3 ou 6 L, em água do mar filtrada, coletada na costa de Ubatuba, numa câmara de germinação (Fanem[®] - 347CDG ou Eletrolab[®] - EL202), em intensidade luminosa de $100 \mu\text{E}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 horas, temperatura de 23°C e salinidade de 35 psu. Inóculos foram mantidos em erlenmeyers de 500 (FRA e TAM) ou 250-300 mL (PRO) por um período de 6 a 10 dias, até a obtenção de elevadas densidades de dinoflagelados na superfície do frasco de cultivo (FRA e TAM) ou quando a observação do aspecto, natação e coloração das células sob microscópio (PRO) sugeria condições ótimas de crescimento.

Após esta primeira fase, os cultivos foram transferidos para balões de 3 L nos quais foram mantidos na fase exponencial mediante a diluição em meio “f/2” (Guillard, 1975), sem sílica², a cada três dias (procedimento comumente adotado em abordagens experimentais similares; por exemplo Dam e Colin, 2005) ou conforme necessário, mediante acompanhamento do crescimento com o auxílio de um contador de partículas (*Z Series Coulter Counter - Beckman Coulter*[®]).

Obtenção das amostras de zooplâncton

Os copépodes destinados à execução dos ensaios experimentais foram coletados com rede de zooplâncton de abertura de malha de 200 μm com copo coletor fechado. As coletas de plâncton foram realizadas a bordo de uma embarcação de alumínio com motor de popa (Nautilus IO-USP), no canal do Boqueirão (23°31,61’/45°05,11’, Ubatuba, São Paulo), nas proximidades da Base Norte do IO-USP. O material foi obtido a partir de arrastos oblíquos com a embarcação à deriva ou na menor marcha possível

² Soluções de silício foram omitidas na preparação do meio de cultura.

para o motor e duração máxima de 3 minutos. O número de arrastos foi determinado de acordo com a concentração aparente dos organismos, obtida pela verificação visual das amostras no copo coletor. Dependendo da concentração, novos arrastos foram realizados. Para evitar a introdução de espécimes danificados por contato a seco com a rede, esta não foi lavada antes da retirada dos organismos do copo coletor.

Após as coletas, o zooplâncton foi transferido cuidadosamente para um balde com capacidade de 20 L, contendo água do mar proveniente do local de coleta. No momento da coleta, a temperatura da superfície da água foi verificada com um termômetro manual e água do mar da superfície foi coletada e armazenada em galões plásticos de 20 L. O material coletado foi protegido da luz, levado para o laboratório em até 20 minutos e mantido na temperatura verificada em campo (conjuntos experimentais 1 e 2 - experimentos AF e AT1) ou em temperatura fixa de 23 °C (conjuntos experimentais 3 e 4 – experimentos AT2, PM, M1 e M2) (conforme Tabela 2.1).

Triagem e manipulação dos copépodes

A espécie *T. turbinata* (Figura 2.1) foi escolhida para os experimentos em função de: (i) embora muito abundante, ainda ser pouco estudada em âmbito experimental (sessão 2.1); (ii) sua elevada frequência de ocorrência na região de estudo (Melo Júnior, 2009); (iii) resistência em condições experimentais (iv) e por apresentar características morfológicas que facilitam a triagem (tamanho relativamente grande, em comparação com as demais espécies que ocorrem na região, e facilidade de detecção do sexo e estágio de maturidade).

Figura 2.1. *Temora turbinata* (Dana 1849) nos estádios de desenvolvimento triados. A: Visão lateral de uma fêmea portando oócitos em amadurecimento. B: Visão lateral de um macho adulto. Fonte das ilustrações: http://www.tafi.org.au/zooplankton/imagekey/copepoda/calanoida/temoridae/temora_turbinata.html>. Acesso em 21 de setembro de 2012.

O material coletado foi rapidamente conduzido para câmaras de temperatura controlada do LIPO, onde os experimentos foram realizados. Pequenas alíquotas foram retiradas do balde e as fêmeas e machos de *T. turbinata* foram cuidadosamente triados com auxílio de pipetas esterilizadas, sob microscópio estereoscópico (Nikon® - SMZ800) com luz baixa. Foi dada preferência às fêmeas que apresentavam segmento genital dilatado ou faixas paralelas escuras e longitudinais na região dorsal do tórax, denotando ovários com oócitos em amadurecimento. Após a triagem, a morfologia e a natação dos organismos foram observadas para evitar a incubação de indivíduos em más condições como, por exemplo, com antenas ou ramo caudal quebrados e movimentos natatórios lentos. Os copépodes selecionados foram distribuídos em placas de Petri plásticas de 10 mL contendo água do mar filtrada, em filtros com porosidade de 0,7 µm (filtros GF/F), na proporção de três fêmeas para cada dois machos (experimentos AF e AT1) ou oito fêmeas para cada dois machos (experimentos AT1, AT2, PM). Copépodes foram mantidos nestas condições durante o processo de triagem e preparação das primeiras soluções alimentares (período máximo de 2 horas), sendo que as primeiras

placas triadas foram as primeiras a serem introduzidas nas garrafas.

Desenho experimental

Para a preparação dos tratamentos, a densidade inicial das culturas foi diariamente determinada com o auxílio do contador de partículas. As culturas foram cuidadosamente homogeneizadas e amostradas diretamente no recipiente para contagem ou com o auxílio de uma pipeta automática. Para FRA e PRO, alíquotas da cultura foram diluídas em água do mar filtrada ($< 0.7 \mu\text{m}$) (diluição de pelo menos 2 e 10 vezes, respectivamente). Cada amostra foi analisada de três a seis vezes no contador de partículas, de modo que a densidade da cultura foi calculada efetuando-se a média das leituras obtidas. O procedimento de diluição foi adotado a fim de adequar a amostra à escala de leitura do equipamento e para reduzir a probabilidade de contaminação entre leituras (Lourenço, 2006). As densidades foram determinadas apenas para células situadas dentro dos intervalos de tamanho de partículas adequados para cada espécie (FRA: 10-35 μm ; TAM: 15-40 μm ; PRO: 8-14 μm). Os principais métodos empregados para cada um dos experimentos estão sumarizados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Detalhes das incubações de experimentos de determinação de respostas funcional e numérica: descrição do experimento, espécies de microalgas testadas, dias, temperaturas (T) de incubação, nome das culturas empregadas (BN - balão seguido pelo número), observações sobre o crescimento das culturas, valores médios de diâmetro, biovolumes e densidades celulares, volumes dos frascos experimentais, períodos de incubação aplicados e número (Nº) de fêmeas (♀) e machos (♂) incubados. (^{TC}): Temperatura de campo. (^{TF}): Temperatura fixa. (^{CP}) Valores obtidos com base no contador de partículas. (---): Ausência de informações. Obs.: Observações. Exp.: Experimento. DP: Desvio padrão. Abreviações dos nomes das microalgas como citadas na Tabela 2.1. (*) Para este experimento foram utilizadas garrafas de 65 mL em caráter tentativo. (**) Para este período experimental, em especial, copépodes foram transferidos para frascos menores, em virtude da obtenção de reduzidas densidades celulares, inviabilizando a realização dos experimentos em garrafas de 620 mL.

Conjunto experimental (Experimento)	Microalga	Exp.: Dia	T (°C)	Culturas (idade em dias)	Obs. sobre o crescimento	Diâmetro médio ± DP - μm^{CP} (biovolume médio ± DP - μm^3) ^{CP}	Densidades Médias (cél. L ⁻¹)**	Frascos (mL)	Tempo de Incubação (h)	Nº de copépodes	
										♀	♂
1 (Determinação de respostas numérica e funcional)	FRA	Ac.: 10/Nov/10 – 11/Nov/10*	25 ^{TC}	B1FRA	Cultura visualmente saudável, sem acúmulo de células no fundo; Manutenção mediante observação em microscópio e diluição em meio f/2 aproximadamente a cada três dias	26,38±2,59 (9949±2675)	4,4 x 10 ³	65	24	3	2
		12h: 11/Nov/10 – 12/Nov/10*		B1FRA		25,70±3,15 (9267±3082)	4,8 x 10 ³		24		
		24h: 11/Nov/10 – 12/Nov/10*		B1FRA		26,50±2,97 (10105±3118)	3,8 x 10 ³		12		
2 (Determinação de respostas numérica e funcional)	TAM1	Ac.: 15/Fev/11 – 16/Fev/11	26 ^{TC}	B3TAM	Culturas visualmente saudáveis, porém com baixa densidade, sendo necessária a mistura de balões para obtenção da bioamassa necessária	24,32±5,83 (8906±6907)	1,6 x 10 ³	620	24	8	2
		24h1: 16/Fev/11 – 17/Fev/11		B1TAM +B2TAM		24,53±7,28 (9887±8811)	1,0 x 10 ³				
		24h2: 17/Fev/11 – 18/Fev/11**		B4TAM		23,23±5,47 (7767±6573)	6 x 10 ²	65		3	2
3 (Determinação de respostas numérica e funcional)	TAM2	Ac.: 13/Out/11 - 14/Out/11	23 ^{TF}	B3TAM (15)	Acompanhamento do crescimento mediante observação em microscópio e confecção de curvas de crescimento simultâneas e, conforme necessidade, diluição em meio f/2 aproximadamente a cada três dias	26,38±7,41 (11994±9890)	1,3 x 10 ³	620	12	8	2
		12h1: 14/Out/11 - 14/Out/11		B3TAM (16)		25,88±7,20 (14054±11205)	1,2 x 10 ³				
		12h2: 14/Out/11 - 15/Out/11		B4TAM (16)		25,70±6,86 (10993±9195)	1,7 x 10 ³				
3 (Determinação de respostas numérica e funcional)	PRO	Ac.: 18/Out/11 - 19/Out/11	23 ^{TF}	B1PRO (8)	Acompanhamento do crescimento mediante observação em microscópio e confecção de curvas de crescimento simultâneas e, conforme necessidade, diluição em meio f/2 aproximadamente a cada três dias	10,13±0,96 (558,4± 163,0)	7,9 x 10 ⁷	620	12	8	2
		12h1: 19/Out/11 - 20/Out/11		B1PRO (9)		10,19 ±0,97 (569,3±166,2)	7,7 x 10 ⁷				
		12h2: 20/Out/11 - 20/Out/11		B1PRO (10)		10,59±1,12 (637,7±182,6)	7,9 x 10 ⁷				

Com base nas densidades iniciais, foram inicialmente preparadas soluções correspondentes aos tratamentos de maior concentração (tratamento #5). A densidade celular das soluções correspondes ao tratamento #5 foram aferidas com o auxílio do contador de partículas. Na ocorrência de densidades distintas do esperado, a solução foi diluída, ou recebeu o volume de cultura necessário para a eventual correção. Após a confirmação das densidades, para a preparação dos demais tratamentos, a solução em maior volume (#5), foi quantitativamente misturada com água do mar filtrada (0,7 µm, GF/F) de forma a obter as proporções desejadas para os tratamentos de menor densidade (#1, #2, #3, #4).

Os tratamentos consistiram, deste modo, em diluições compondo concentrações de aproximadamente: (i) 100 - 1000 µg C L⁻¹ (AF); (ii) 100 - 1000 µg C L⁻¹ (AT1); (iii) 60 - 600 µg C L⁻¹ (primeiras 12 horas) e 120 - 1200 µg C L⁻¹ (12 horas finais de incubação) (PM); e (iv) 60 - 600 µg C L⁻¹ (primeiras 12 horas) e 120 - 1200 µg C L⁻¹ (12 horas finais de incubação) (AT2). Para os experimentos AT2 e PM, o intervalo de concentrações foi alterado, com a inclusão de tratamentos com densidades um pouco menores (60 µg C L⁻¹) e mais elevados (1200 µg C L⁻¹) para possibilitar a extensão do intervalo de tratamentos aplicado.

Quando possível, em função do número de fêmeas disponível na amostra, um tratamento adicional foi introduzido (tratamento #0), composto apenas por água do mar filtrada (#AMF), a fim de avaliar diferenças nas taxas de produção de ovos entre fêmeas em jejum e fêmeas submetidas aos tratamentos experimentais.

No primeiro dia, após a preparação das dietas, cada conjunto de 5 (3 fêmeas e 2 machos – experimentos AF e AT1) ou 10 (8 fêmeas e 2 machos – experimentos PM, AT1 e AT2) indivíduos adultos de *T. turbinata* foi incubado em garrafas de polycarbonato de 65 (experimentos AF e AT1) ou 620 mL (experimentos PM, AT1 e

AT2) nos diferentes tratamentos, por 12 ou 24 horas, respectivamente. Para cada tratamento foram utilizadas três e quatro réplicas para garrafas de incubação de 620 e 65 mL, respectivamente.

Garrafas controle (sem copépodes) em igual número de réplicas também foram utilizadas. Os frascos foram cuidadosamente vedados com plástico parafilme para inibir a formação de bolhas de ar no interior das garrafas. As garrafas foram mantidas sob rotação (1 rpm) em uma roda de plâncton, em laboratório dotado de sistema de temperatura controlada ($\pm 0,1$ °C). Para FRA (experimento AF) e o primeiro experimento efetuado com TAM (AT1), a temperatura de incubação correspondeu à da água da superfície verificada no momento da coleta (25 e 26 °C, respectivamente). Para os dois conjuntos de experimentos finais, que incluíram os experimentos AT2 e PM, foi adotada uma temperatura fixa correspondente à temperatura de crescimento dos dinoflagelados nas duas câmaras de germinação utilizada (23°C) (Tabela 2.2).

As 12 ou 24 horas iniciais de incubação foram consideradas como período de aclimação às condições laboratoriais. Após este período, as garrafas foram filtradas sequencialmente em redes de tamanho adequado para separação dos copépodes e para retenção dos náuplios, ovos e cascas. Em virtude da diferença de tamanho entre as microalgas, foram utilizadas malhas de tamanhos distintos a fim de evitar a retenção de células (*Alexandrium* spp. - 40 μ m; *P. minimum* - 20 μ m). Os mesmos copépodes foram incubados por mais 24 ou 48 horas em novas suspensões algais, para duas novas séries experimentais (Tabela 2.2).

Para cada dia, antes da incubação, amostras de cada tratamento foram acondicionadas, mantidas sob refrigeração e contadas com o auxílio do contador de partículas. Após o período de aclimação, alíquotas de 50 mL do conteúdo de cada garrafa destinadas à contagem dos itens alimentares foram preservadas em solução de

formaldeído tamponado 0,4%, sendo o restante filtrado conforme descrito anteriormente. Para o caso de experimentos conduzidos em garrafas de 65 mL todo o conteúdo foi preservado.

A determinação das concentrações finais dos itens alimentares nos frascos de incubação foi efetuada também com o auxílio do contador de partículas, seguindo os mesmos intervalos de contagem aplicados para a preparação dos tratamentos alimentares. As amostras fixadas de fitoplâncton foram homogeneizadas, transferidas para os frascos de leitura (rotacionados 10 vezes) e contadas de três a seis vezes, de acordo com a variação entre os resultados obtidos.

Determinação da resposta numérica: experimento de reprodução (produção de ovos)

O experimento de reprodução foi realizado simultaneamente ao experimento de alimentação. Após os experimentos, as contagens foram realizadas sob microscópio estereoscópico do número de fêmeas, cascas, náuplios e ovos retidos no final das incubações. Após a contagem, o material foi preservado em formaldeído 4% para realização de medidas e conversão das taxas de produção (com base no número de ovos e náuplios) para estimativas em termos de carbono (conforme equações descritas em sequência, na sessão 2.7. Tratamento dos dados).

2.6.2. Experimentos de mistura

O experimento foi conduzido por seis dias correspondentes ao período de aclimação (12 horas), produção de ovos (duas rodadas subsequentes de 12 horas) e sucesso de eclosão dos náuplios (48 horas de incubação). Dados detalhados das culturas e do desenho experimental aplicado para experimentos de misturas podem ser observados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Detalhes das incubações de experimentos de misturas de microalgas: descrição do experimento, espécies de microalgas testadas, dias, temperaturas (T) de incubação, nome das culturas empregadas (BN: balão seguido pelo número), observações sobre o crescimento das culturas, valores médios de diâmetro, biovolume e densidades celulares, volumes dos frascos experimentais, tempo de incubação (I) aplicados e número (Nº) de fêmeas (♀) e machos (♂) incubados. (T^{TF}): Temperatura fixa. (C^P) Valores obtidos com base no contador de partículas. (---): Ausência de informações. Obs.: Observações. Exp.: Experimento. DP: Desvio padrão. Abreviações dos nomes das microalgas como citadas na Tabela 2.1. (*): Acompanhamento do crescimento mediante observação em microscópio e confecção de curvas de crescimento simultâneas e, conforme necessidade, diluição em meio f/2 aproximadamente a cada três dias.

Conjunto experimental (Experimento)	Misturas	Exp.: Dia	T (°C)	Culturas (idade em dias)*			Diâmetro médio ± DP - µm ^{CP} (biovolume médio ± DP - µm ³) ^{CP}			Densidades médias**			Frascos (ml)	I (h)	Nº de copépodes	
				FRA	PRO	TAM	FRA	PRO	TAM	FRA	PRO	TAM			♀	♂
5 (Determinação de respostas numérica e funcional)	M1 (PRO/TAM)	Ac.: 11/Dez/11 - 12/Dez/11	23 ^{TF}	---	B1PRO(7)	B6TAM(11)	---	10,05±0,99 (539±165,3)	25,82±6,07 (10586±7842)	---	1,3 x 10 ⁵	2,4 x 10 ³	620	12	8	2
		12h1: 12/Dez/11 - 12/Dez/11		---	B1PRO(8)	B4TAM(12)	---	11,22±1,25 (765,4±248,1)	23,71±6,23 (8581±7835)	---	9,6 x 10 ⁴	1,3 x 10 ³				
		12h2: 12/Dez/11 - 13/Dez/11		---	B1PRO(9)	B5TAM(12)	---	11,46±1,24 (839,2±259,4)	25,96±6,34 (10894±8463)	---	1,2 x 10 ⁵	3,0 x 10 ³				
	M2(FRA/TAM/PRO)	Ac.: 15/Dez/11 - 16/Dez/11		B1FRA(3)	B1PRO(10)	B6TAM(15)	28,13±4,10 (12367±4634)	10,47±1,00 (617,5±181,1)	25,11±5,92 (9751±7442)	2,5 x 10 ³	9,1 x 10 ⁴	2,7x 10 ³				
		12h1: 16/Dez/11 - 16/Dez/11		B1FRA(4)	B1PRO(11)	B6TAM(16)	27,84±3,83 (11823±4314)	10,02±0,95 (538,4±156,2)	24,78±5,83 (9385±7312)	3,0 x 10 ³	1,2 x 10 ⁵	2,8 x 10 ³				
		12h2: 16/Dez/11 - 17/Dez/11		B1FRA(4)	B1PRO(11)	B6TAM(16)	29,05±4,59 (13758±5716)	10,31±0,99 (599,4±172,8)	24,36±5,63 (8863±6907)	4,2 x 10 ³	1,2 x 10 ⁵	3,0 x 10 ³				

Um número conhecido de copépodes (8 fêmeas para cada 2 machos) foi incubado em cinco tratamentos compostos de misturas de fitoplâncton potencialmente nocivo (TAM) e não-nocivo (PRO), na fase exponencial de crescimento (conforme o experimento de determinação das respostas funcional e numérica) (Tabela 2.4). Culturas foram mantidas na fase exponencial mediante a diluição em meio f/2, sem sílica, a cada dois ou três dias, ou conforme necessário (Dam e Colin, 2005). Todos os tratamentos foram compostos por uma concentração constante de alimento, suficientemente alta para sustentar a produção de ovos, mas não acima do ponto de saturação das respostas funcional e numérica estimadas para as espécies de copépodes escolhidas ($450 \mu\text{g C L}^{-1}$ - definida através do conjunto experimental 3).

Tabela 2.4. Experimento de mistura de microalgas 1 (M1). Tratamentos alimentares compostos por misturas de fitoplâncton potencialmente nocivo (TAM) e não nocivo (PRO). Abreviações dos nomes das microalgas como citadas na Tabela 2.1.

Tratamentos	Porcentagem nominal da	Porcentagem nominal
	espécie potencialmente nociva TAM	da espécie não nociva PRO
#1 - TAM100	100	0
#2 - TAM75/PRO25	75	25
#3 - TAM50/PRO50	50	50
#4 - TAM25/PRO75	25	75
#5 - PRO100	0	100

Para a preparação dos tratamentos, a densidade das culturas de microalgas foi diariamente determinada com o auxílio do contador de partículas, conforme procedimento anteriormente descrito. Com base nas densidades iniciais, foram preparadas soluções correspondentes aos tratamentos compostos apenas por monoculturas de microalgas (tratamentos #1 e #5, conforme a Tabela 2.4).

A densidade celular das duas primeiras soluções preparadas foi aferida com o auxílio do contador de partículas e corrigida conforme a necessidade. Após a confirmação das densidades e preparação das misturas, as soluções #1 e #5 (em maior volume) foram quantitativamente misturadas de forma a obter as proporções desejadas para os tratamentos (#2, #3 e #4). No dia 1, garrafas experimentais (com copépodes) foram incubadas com soluções de cada tratamento (período de aclimação ao alimento e temperatura experimental), as quais foram vedadas e colocadas em rotação por 12 horas, conforme as mesmas condições anteriormente apresentadas.

No dia 2, para cada tratamento, foram incubadas três garrafas experimentais seguindo o mesmo procedimento do dia 1. Após 12 horas o conteúdo das garrafas foi filtrado em redes de 150 μm para a separação das fêmeas e machos, e 40 μm para retenção dos náuplios, ovos e cascas. Após contagem, sob microscópio estereoscópico do número de fêmeas e machos e de cascas, ovos e náuplios foram transferidos para frascos plásticos limpos de 50 mL contendo água do mar filtrada. O material foi mantido na mesma temperatura de incubação na roda de plâncton (23 °C) por pelo menos 48 h adicionais (dias 4 - 6). Após este período, o conteúdo dos frascos foi preservado em formaldeído 4 % para posterior contagem e obtenção de medidas. O sucesso de eclosão dos ovos foi estimado dividindo o número de ovos eclodidos (mediante o número de náuplios e/ou cascas) pelo número inicial de ovos incubados (conforme equações descritas em sequência, na sessão 2.7. Tratamento dos dados).

Etapa 3: Experimento de reprodução adicional

Como descrito anteriormente, além do experimento envolvendo duas microalgas, um ensaio adicional foi elaborado utilizando misturas de uma espécie de fitoplâncton

potencialmente nociva (TAM) e duas espécies de fitoplâncton não-nocivas (FRA e PRO) na fase exponencial de crescimento na concentração constante de $450 \mu\text{g C L}^{-1}$ (definida através do conjunto experimental 3 - Tabela 2.1) (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Experimento de mistura de microalgas 2 (M2). Tratamentos alimentares compostos por misturas de fitoplâncton potencialmente nocivo (TAM) e não nocivo (FRA e PRO). Abreviações dos nomes das microalgas como citadas na Tabela 2.1.

Tratamentos	Porcentagem nominal da espécie potencialmente nociva	Porcentagem nominal da espécie não nociva	
	TAM	FRA	PRO
#1 - FRA100	0	100	0
#2 - TAM50/PRO50	50	---	50
#3 - TAM50/FRA50	50	50	---
#4 - FRA50/PRO50	---	50	50
#5 - TAM33/FRA33/PRO33	33,33	33,33	33,33

2.7. Tratamento dos dados

2.7.1. Comportamento alimentar

Processamento das amostras de fitoplâncton

Para as análises realizadas no contador de partículas (experimentos envolvendo apenas uma espécie de microalga e as estimativas de densidades iniciais), os arquivos de cada leitura gerados pelo *software* do equipamento (Z2 AccuComp[®]) foram exportados para planilhas Excel e a concentração de cada amostra foi obtida mediante a utilização de uma rotina desenvolvida no programa R (R Development Core Team 2011) (Anexo - Função para *Counter Coulter*[®] comentada). A função desenvolvida possui como entradas e saídas as planilhas de Excel com as contagens obtidas e um vetor de densidades celulares médias de cada leitura, dentro de intervalos de contagem determinados pelo usuário, respectivamente. Três leituras foram executadas por tratamento.

Cálculo das concentrações médias nos frascos de incubação para estimativa das taxas de filtração e ingestão (resposta funcional)

As concentrações médias nos frascos de incubação (C - equação I), taxas de filtração (F - equação II) e ingestão (I - equação III) dos copépodes foram estimadas de acordo com as equações propostas por Frost (1972) e modificadas por Kiørboe *et al.* (1982). O desaparecimento de partículas nas garrafas experimentais, ao longo do tempo de incubação, foi contrastado com as concentrações nas garrafas controle:

$$C (\mu\text{g C L}^{-1}) = C_2^* - C_1^* / \ln(C_2^* / C_1^*) \text{ Eq. I}$$

Onde C^* ($\mu\text{g C L}^{-1}$) corresponde às concentrações nos frascos de experimento nos períodos inicial (C_1^*) e final (C_2^*).

$$F (\text{L fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = (V/Nt) \cdot \ln((C_1^* \cdot C_2) / (C_1 \cdot C_2^*)) \text{ Eq. II}$$

Onde V representa o volume (L) nos frascos de incubação, N o número total de indivíduos incubados em cada frasco, t (h) o período total de incubação e C as concentrações nos frascos controle nos tempos inicial (C_1) e final (C_2).

$$I (\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = C \times F \text{ Eq. III}$$

Onde C representa a concentração média nos frascos de incubação e F a taxa de filtração média.

Cálculo das concentrações de carbono

Os cálculos das concentrações de carbono para dinoflagelados foram efetuados mediante a aplicação de do fator de conversão de $0,13 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Edler, 1979), a partir dos biovolumes (em μm^{-3}) obtidos pelo contador de partículas.

2.7.2. Reprodução

Cálculo das taxas diárias de produção de ovos (resposta numérica)

Para a obtenção de medidas de diâmetro dos ovos as contagens do material fixado foram posteriormente efetuadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico, acoplado a uma mesa digitalizadora *Summagraphics*, utilizando o *software ZooBiom (Zooplankton Biomass)*. Taxas de produção (P) foram obtidos a partir do seguinte cálculo:

$$P = ((NO+NN)*T)/(24*NF) \text{ Eq. IV}$$

Onde: **NO** e **NN** representam o número de ovos e náuplios produzidos, respectivamente, **NF** o número de fêmeas incubadas e **T** o tempo total de incubação. Com base no volume médio (calculado a partir do diâmetro médio dos ovos) os dados de concentração em carbono foram obtidos utilizando o fator de conversão $0,14 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{g C } \mu\text{m}^{-3}$ (Kiørboe et al., 1985). Os valores foram expressos sob a forma de $\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

As fêmeas que morreram durante o período de 12 ou 24 horas foram excluídas dos cálculos de produção de ovos. Nas amostras onde o número de cascas encontrado superou o número de náuplios eclodidos, as cascas excedentes foram contabilizadas na produção total de ovos e consideradas como ovos consumidos pelas fêmeas.

Para os casos onde o número de ovos consumidos foi elevado, os valores médios da porcentagem de canibalismo (C) foram obtidos a partir do seguinte cálculo:

$$C = (NC - NN)/(NTO+NN)*100 \text{ Eq. V}$$

Onde: **NC** representa o número de cascas, **NN** o número de náuplios e **NTO** o número total de ovos produzidos (obtido pela soma do número de ovos e de cascas não provenientes de eclosão). Os valores foram expressos sob a forma de porcentagem.

Avaliação da insuficiência nutricional ou toxicidade de espécie(s) de microalga potencialmente nociva(s)

A avaliação da insuficiência nutricional ou toxicidade subletal do alimento potencialmente nocivo sobre *T. turbinata* foi efetuada com base no teste para efeitos nocivos de presas no zooplâncton (Jónasdóttir et al., 1998; Colin e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005; Waggett et al., 2012). Este método é baseado na premissa de que o crescimento, expresso através da taxa de produção ou sucesso de eclosão dos náuplios, é linearmente dependente da porcentagem da dieta não-nociva e potencialmente nociva, isto é, o alimento potencialmente nocivo é diluído pelo alimento não nocivo. Se o crescimento é menor do que o previsto pela diluição, então a toxicidade do alimento potencialmente nocivo é sugerida. Por outro lado, se o crescimento é maior do que o esperado devido à diluição, então o alimento não nocivo suplementa a insuficiência nutricional do alimento potencialmente nocivo (Jónasdóttir et al., 1998).

2.7.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram executadas no programa R (R Development Core Team, 2011).

Estatística paramétrica:

- Verificação da normalidade (Teste AD) e homocedasticidade dos dados (Teste de Bartlett);
- Nos dados que atenderam aos pressupostos foi aplicado o teste de ANOVA e posteriormente, para os casos de rejeição da hipótese nula, foi aplicado o Teste de Tukey (teste de comparações múltiplas).

Estatística não-paramétrica:

- Nos dados que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis (validado mediante a aplicação do Teste de Levene para verificação da homocedasticidade) e, posteriormente, para os casos de rejeição da hipótese nula, foi aplicado o Teste de Tukey Não-Paramétrico.

2.8. Resultados

2.8.1. Experimentos com monoculturas - determinação das respostas funcional e numérica

Para o gênero *Alexandrium* foram executados experimentos com as espécies *A. cf. fraterculum* e *A. tamiyavanichii*. Para *A. cf. fraterculum*, o único experimento realizado (experimento AF) foi conduzido mediante uma incubação de 12 horas seguida de uma incubação de 24 horas. Assim, como abordado em sequência, foram considerados os dados provenientes das duas incubações. Para *A. tamiyavanichii*, o primeiro experimento foi conduzido mediante duas incubações de 24 horas (experimento AT1). Deste modo, foi necessária a realização de mais um experimento com essa espécie (experimento AT2), para refinamento dos resultados até então obtidos e determinação das taxas de ingestão e produção de *T. turbinata* em 12 horas de incubação, intervalo posteriormente também adotado em experimentos com *P. minimum* (experimento PM) e de mistura (experimentos M1 e M2), visando a redução do canibalismo sobre os ovos.

Alexandrium cf. fraterculum

No período de aclimação, para o qual foram estimadas apenas taxas de produção, diferenças significativas entre os tratamentos foram encontradas somente entre as concentrações mais baixas (52 - 98,3 $\mu\text{g C L}^{-1}$: cerca de $0,1 \pm 0,03 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as duas concentrações) e o tratamento de mais alta concentração (867,6 $\mu\text{g C L}^{-1}$: $0,3 \pm 0,2 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Kruskal-Wallis; comparações com $n=4$; $p<0,02$).

Taxas de ingestão médias de *T. turbinata* sob *A. cf. fraterculum*, em períodos de 12 e 24 horas de incubação, considerando estimativas positivas e negativas, corresponderam a,

respectivamente $3,1 \pm 8,1$ e $4,5 \pm 2,5$ $\mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e resultaram em valores médios de produção de $0,2 \pm 0,2$ e $0,1 \pm 0,1$ $\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Curvas de respostas funcional e numérica para os períodos designados podem ser observadas na Figura 2.2.

Figura 2.2. Resposta funcional (taxa de ingestão em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas de *Temora turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *Alexandrium cf. fraterculus* para 12 (B1-2) e 24 horas (D1-2) de incubação. Resposta numérica (taxa de produção em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas de *T. turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *A. cf. fraterculus* para o período de aclimação (A1-2), 12 horas (C1-2) e 24 horas (E1-2) de incubação. Barras verticais representam o erro padrão calculado para médias com n=4, considerados os valores positivos das taxas.

Para 12 horas de incubação, não foram encontradas diferenças significativas entre taxas de ingestão para os cinco tratamentos aplicados (teste de Kruskal-Wallis; $n=20$; $p=0,3$), entretanto a análise visual da disposição dos pontos indica que a saturação da taxa de ingestão ocorreu entre os tratamentos quatro ($696,5 \mu\text{g C L}^{-1}$: $4,6 \pm 2,1 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e cinco ($1011,2 \mu\text{g C L}^{-1}$: $4,9 \pm 2 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Esta observação está de acordo com a saturação da taxa de produção de ovos, uma vez que diferenças significativas (teste de Levene, $n=20$, $p=0,01$) foram verificadas apenas para condições extremas, isto é, entre o primeiro ($109,3 \mu\text{g C L}^{-1}$: $0 \pm 0,01 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e o último tratamento ($1011,2 \mu\text{g C L}^{-1}$: $0,6 \pm 0,5 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey não paramétrico; $n=4$; $p<0,001$), indicando que a saturação da taxa de produção de ovos ocorreu a partir de $281,6 \mu\text{g C L}^{-1}$ ($0,09 \pm 0,2 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (Figura 2.2. C1-2).

Para as 24 horas subsequentes de incubação, tanto as taxas de ingestão (teste de Kruskal-Wallis; $n=20$; $p=0,004$), quanto as taxas de produção de ovos (teste de Levene; $n=20$; $p=0,03$) variaram em função dos tratamentos aplicados. Considerando a ingestão, diferenças significativas foram encontradas entre os tratamentos 1 ($84,5 \mu\text{g C L}^{-1}$ - $0,84 \pm 0,07 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e todos os demais (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=4$, $p<0,001$); e entre o tratamento 2 ($391,3 \mu\text{g C L}^{-1}$: $4,3 \pm 0,6 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e os tratamentos extremos ($901,5 \mu\text{g C L}^{-1}$: $7 \pm 0,9 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$; $1072,8 \mu\text{g C L}^{-1}$: $6,7 \pm 1,6 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=4$, $p<0,001$), indicando que a saturação da taxa de ingestão esteve situada entre as concentrações 3 e 5 ($732,7$ - $1072,8 \mu\text{g C L}^{-1}$) (Figura 2.2. D1-2).

Em relação à produção de ovos, foram encontrados resultados próximos: diferenças significativas entre o tratamento 1 ($109,3 \mu\text{g C L}^{-1}$: produção nula) e os tratamentos 4 ($901,5 \mu\text{g C L}^{-1}$: $0,3 \pm 0,3 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e 5 ($1072,8 \mu\text{g C L}^{-1}$: $0,3 \pm 0,2 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)

(teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=4$, $p<0,001$), apontando para a ocorrência da saturação da taxa de produção de ovos a partir do segundo tratamento (Figura 2.2. E1-2).

Alexandrium tamiyavanichii - Experimento 1

O primeiro experimento realizado com *A. tamiyavanichii* indicou uma possibilidade de inadequação nutricional do dinoflagelado para *T. turbinata*, expressa por baixos valores de produção de ovos no período de aclimação ($0,02 \pm 0,02 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e nas primeiras 24 horas de incubação ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), com uma tendência de redução em direção às maiores concentrações de alimento. Em adição, taxas de produção de ovos não foram verificadas nas 24 horas subsequentes de incubação (Figura 2.3. A-B).

Contudo, a redução nas taxas de produção verificada para as primeiras 24 horas de incubação não foi significativa (teste de Kruskal-Wallis, $n=15$, $p=0,1$).

Considerando todas as estimativas, valores médios das taxas de ingestão corresponderam a $1,1 \pm 5,7$ e $1,6 \pm 1,5 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para os dois períodos consecutivos de 24 horas de incubação. Para as primeiras 24 horas de incubação, não foram verificadas diferenças para nenhum dos tratamentos aplicados (teste de Kruskal-Wallis; $n=15$; $p=0,3$), ao passo que para as 24 horas finais de incubação taxas médias de ingestão dos tratamentos 1 ($58,1 \mu\text{g C L}^{-1}$ - $0,04 \pm 0,2 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e 2 ($216,9 \mu\text{g C L}^{-1}$ - $1 \pm 0,5 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foram diferentes das médias verificadas para o tratamento 5 ($894,2 \mu\text{g C L}^{-1}$ - $3,6 \pm 1,9 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey; comparações com $n=3$; $p<0,04$). Deste modo, a saturação da taxa de ingestão foi obtida sob concentrações relativamente baixas ($216,9 \mu\text{gC L}^{-1}$).

Figura 2.3. Resposta numérica (taxa de produção em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas adultas de *Temora turbinata* alimentadas com *Alexandrium tamiyavanichii* para o período de aclimação (A1-2) e para as primeiras 24 horas (B1-2) de incubação. Resposta funcional (taxa de ingestão em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas adultas de *T. turbinata* alimentadas com *A. tamiyavanichii* para duas rodadas subsequentes de 24 horas de incubação (C1-2 e D1-2). Barras verticais representam o erro padrão calculado para médias com n=3, considerados os valores positivos das taxas.

Alexandrium tamiyavanichii - Experimento 2

Para o segundo experimento, taxas médias individuais de produção de fêmeas de *T. turbinata* alimentadas com *A. tamiyavanichii* foram mais altas: $0,3 \pm 0,2$ e $0,3 \pm 0,2 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação (Figura 2.4. C e E), porém sem diferenças entre os tratamentos testados (12 horas iniciais de incubação: ANOVA, n=15, p=0,9; 12 horas finais de incubação: ANOVA, n= 15, p=0,6).

Figura 2.4. Resposta funcional de fêmeas de *Temora turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *Alexandrium tamiyavanichii* (taxa de ingestão em função da concentração de alimento em carbono) para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação (B1-2 e D1-2). Resposta numérica (taxa de produção em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas de *T. turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *A. tamiyavanichii* para o período de aclimação (A1-2), e para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação (C1-2 e E1-2). Barras verticais representam o erro padrão calculado para médias com n=3, considerados os valores positivos das taxas.

Nas primeiras 12 h de incubação, a redução nas taxas de alimentação encontrada em $612,6 \mu\text{g C L}^{-1}$ resultou em um consumo significativamente diferente do verificado para os três tratamentos intermediários ($70,9 - 324,7 \mu\text{g C L}^{-1}$) (teste de Tukey; comparações com n=3; $p < 0,009$). Embora este resultado tenha impossibilitado uma definição confiável da

concentração de saturação das taxas de ingestão, a saturação da produção de ovos claramente ocorreu a partir do terceiro tratamento aplicado ($216,9 \mu\text{g C L}^{-1}$) (Figura 2.4. C1-2). Nas últimas 12 horas de incubação variações nas taxas médias de ingestão nos diferentes tratamentos não foram significativas (ANOVA, $n=15$, $p=0,4$); entretanto, as taxas de produção de ovos indicaram a ocorrência de condições de saturação a partir de $617,7 \mu\text{g C L}^{-1}$). No período de aclimação nenhuma das variáveis mensuradas variou significativamente (ANOVA, comparações com $n=15$, $p>0.09$).

Prorocentrum minimum

No período de aclimação, as taxas de produção de ovos de *P. minimum* não variaram significativamente para nenhum dos diferentes tratamentos aplicados (ANOVA, $n=15$, $p=0,07$). Neste período, apenas a porcentagem de canibalismo dos ovos foi maior na menor concentração de alimento ($126 \mu\text{g C L}^{-1}$: $78,9 \pm 13,2\%$), quando comparada com a média encontrada em condições extremas ($627 \mu\text{g C L}^{-1}$: $11,4 \pm 6,6\%$) (teste de Tukey, $n=3$, $p=0,02$).

Nas 12 horas subsequentes de incubação, a alimentação de *T. turbinata* sobre dinoflagelados da espécie *P. minimum* resultou em taxas médias de ingestão e produção menores do que as verificadas para *A. tamiyavanichii* (primeiras 12 horas: $0,24 \pm 2,9 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,1 \pm 0,03 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$; 12 horas finais de incubação: $0,6 \pm 1,4 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $0,1 \pm 0,1 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (Figura 2.5. B-E).

Para as primeiras 12 horas de incubação, embora taxas de produção de ovos e de canibalismo não tenham variado significativamente entre os tratamentos testados (ANOVA, comparações com $n=15$, $p>0.2$), taxas de ingestão nas concentrações mais baixas ($119 \mu\text{g C L}^{-1}$: $3,1 \pm 0,4 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $172 \mu\text{g C L}^{-1}$: $2,9 \pm 1 \mu\text{g C copépode}^{-1}$) foram

significativamente maiores do que as verificadas para os demais tratamentos ($247 - 585,4 \mu\text{g C L}^{-1}$: $0,2 \pm 0,2 - -3,7 \pm 0,4 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=3$, $p<0,001$).

Figura 2.5. Resposta funcional de fêmeas de *Temora turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *Prorocentrum minimum* (taxa de ingestão em função da concentração de alimento em carbono) para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação (B1-2 e D1-2). Resposta numérica (taxa de produção em função da concentração de alimento em carbono) de fêmeas de *T. turbinata* incubadas em diferentes tratamentos de *P. minimum* para o período de aclimação (A1-2), e para duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação (C1-2 e E1-2). Barras verticais representam o erro padrão calculado para médias com $n=3$, considerados os valores positivos das taxas.

Nas 12 horas subsequentes de incubação, nas quais taxas de ingestão assumiram um padrão crescente, diferenças foram encontradas apenas entre as concentrações mais baixas ($183,8 - 340,2 \mu\text{g C L}^{-1}$: $-1 \pm 0,9 - 0,1 \pm 0,2 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e a concentração de $500,9 \mu\text{g C L}^{-1}$ ($2,3 \pm 1 \mu\text{g C copépode}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=3$, $p<0,001$), apontando para condições de saturação das taxas de ingestão entre $340,2$ e $849,8 \mu\text{g C L}^{-1}$. No mesmo período, verificou-se que taxas de produção de fêmeas alimentadas $183,8$ e $340,2 \mu\text{g C L}^{-1}$ (cerca de $0,1 \pm 0,1$ e $\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para as duas concentrações) foram diferentes apenas das taxas exibidas por fêmeas incubadas em $849,8 \mu\text{g C L}^{-1}$ ($0,3 \pm 0,04 \mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (teste de Tukey, comparações com $n=3$, $p<0,048$). Deste modo, assim como verificado para a taxa de ingestão, a saturação da produção de ovos para a dieta em questão ocorreu a partir de $340,2 \mu\text{g C L}^{-1}$.

Comparação de Alexandrium tamiyavanichii e Prorocentrum minimum

Considerando o segundo experimento realizado com *A. tamiyavanichii* e experimento efetuado com *P. minimum*, comparáveis estatisticamente em virtude da aplicação do mesmo desenho experimental (Tabela 2.1), ainda que as taxas de ingestão (considerando todos os tratamentos) não sejam diferentes para nenhum dos períodos (primeiras 12 horas de incubação: teste t, $n=15$, $p=0,7$; últimas 12 horas de incubação: teste de Mahn-Whitney, $n=15$, $p=0,4$), fêmeas alimentadas com *P. minimum* ingeriram significativamente mais ovos tanto no período de aclimatação (médias de $7,9 \pm 12\%$ em *A. tamiyawanichii* e $53,6 \pm 20,8\%$ em *P. minimum*; Teste de Mann-Whitney, $n=13-15$, $p<0,001$), quanto nas 12 horas subsequentes de incubação (12 horas iniciais: médias de $7,7 \pm 7,1\%$ em *A. tamiyawanichii* e $61,2 \pm 20,7\%$ em *P. minimum*; 12 horas finais: médias de $3,3 \pm 6,6\%$ em *A. tamiyawanichii* e $57,1 \pm 22,4\%$ em *P. minimum*; teste de Mann-Whitney,

comparações com $n=10-13$, $p<0,001$). Nas 12 horas iniciais de incubação a predação sobre os ovos reduziu significativamente a produção de ovos (teste t, $n=15$, $p<0,001$).

2.8.2. Experimentos com mistura de duas microalgas – Determinação da toxicidade ou inadequação alimentar de *Alexandrium tamiyavanichii*

Conforme o modelo de avaliação de toxicidade ou inadequação nutricional (Jónasdóttir et al., 1998; Colin e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005; Waggett et al., 2012), se as observações (produção de ovos ou sucesso de eclosão dos náuplios) estiverem distribuídas junto da linha de diluição (i), o alimento suspeito não tem valor nutricional, acima da linha (ii) é nutricionalmente insuficiente e, em adição, o alimento controle suplementa a observação testada ou abaixo da linha (iii) é caracterizado como tóxico ou não tóxico, porém de baixo valor nutricional, levando à e predação seletiva, conforme (Figura 2.6).

Figura 2.6. Possíveis respostas, em termos de produção de ovos ou sucesso de eclosão dos náuplios, em experimentos nos quais uma espécie de fitoplâncton não nociva (X) e uma espécie potencialmente nociva (Y) (nutricionalmente inadequada ou tóxica) são oferecidas para copépodes em diferentes proporções. A concentração total em termos de biomassa deve ser constante e abaixo de níveis de saturação. A linha de diluição (ou referência) é definida como a linha que conecta as observações (produção de ovos ou sucesso de eclosão dos náuplios) de 100% de Y (A) a 100% de X (B) e pode estar em qualquer lugar entre as linhas 1 e 2. Dependendo da qualidade de Y as observações para as dietas intermediárias (misturas) poderão cair acima, sobre ou abaixo da linha de referência (conforme texto). Dados sobre a linha 1: Y é tão bom quanto X. Dados sobre a linha de diluição/referência, na área 2 ou na área 3: interpretação no texto. Ilustração baseada em Jónasdóttir et al. (1998).

Em todos os períodos de execução do experimento de reprodução (dias 1-3: aclimação, primeiras 12 horas de incubação e últimas 12 horas de incubação), verificou-se uma inclinação negativa para as linhas de diluição traçadas, com observações intermediárias distribuídas acima da linha (com exceção apenas de uma das estimativas médias, situada abaixo da linha de referência - produção de ovos relativa a 25% de contribuição da dieta controle - Figura 2.7. A1-3). Em adição, o mesmo padrão foi observado nos resultados relativos à eclosão dos náuplios (Figura 2.7. B1-3).

Figura 2.7. Variação da produção de ovos ($\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (A1-3), do sucesso de eclosão dos náuplios (%) (B1-3) e da taxa de canibalismo dos ovos (%) (C1-3), em função do aumento da porcentagem, em carbono, do alimento controle (*Prorocentrum minimum*) na dieta, para cada um dos dias de realização do experimento. Barras verticais representam o erro padrão calculado para médias com $n=3$. Pontos representam observações individuais ou médias para duas observações. Baseado no modelo de avaliação de toxicidade ou inadequação nutricional, proposto por Jónasdóttir *et al.* (1998), Colin e Dam (2002) e Dam e Colin (2005). Nos gráficos A1, B3 e C3, estimativas intermediárias são inexistentes devido à morte de todas as fêmeas após o término da incubação anterior (primeiras 12 horas).

No período de aclimação às condições laboratoriais, foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de produção de ovos, de eclosão dos náuplios e de canibalismo dos ovos (ANOVA/teste de Kruskal-Wallis; comparações com $n=14$ ou 15 ; $p<0,04$). As diferenças detectadas para taxas de produção estiveram situadas apenas entre as proporções compostas por aproximadamente 50 e 100% de *A. tamiyavanichii* (teste de Tukey, comparações com $n=3$, $p=0,03$). As taxas de eclosão dos náuplios de fêmeas alimentadas em 100% de *P. minimum* (Figura 2.7. B1) foram significativamente menores quando em comparação com todos os outros tratamentos, devido à elevada taxa de canibalismo dos ovos (teste de Tukey ou teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=3$, $p<0,001$) (Figura 2.7. A3).

Por outro lado, para as primeiras 12 horas de incubação não foram encontradas diferenças significativas entre as variáveis anteriormente mencionadas para nenhum dos tratamentos (primeiras 12 horas: ANOVA/Teste de Kruskal-Wallis; comparações com $n=12$ a 15 ; $p>0,1$). Para o segundo período de 12 horas, comparações entre taxas de eclosão e de canibalismo nos diferentes tratamentos não foram efetuadas, pois o número de ovos e náuplios disponíveis para o cálculo das razões foi muito reduzido (inferior a 10 para muitos casos), inviabilizando as comparações. Para a produção, diferenças significativas entre os tratamentos não foram encontradas (12 horas finais de incubação: ANOVA; comparações com $n=12$; $p=0,3$).

Em termos globais (considerando todo o período experimental) e com base apenas na linha de referência, pode-se inferir que a dieta suspeita (*A. tamiyavanichii*) expressou maior valor nutricional do que a dieta controle (*P. minimum*), sendo que a inadequação nutricional de *P. minimum* parece ter sido mais expressiva no período de aclimação.

Em termos qualitativos apenas para fêmeas alimentadas com *A. tamiyavanichii* foi observada a produção de três tipos diferentes de ovos: ovos de tamanho pequeno (A), ovos de tamanho normal (B) e ovos de tamanho grande (C), sendo que, para o último caso, a constituição foi aparentemente distinta, isto é, ovos apresentaram aspecto opaco e mais denso, ocasionando difícil remoção do fundo da placa, de forma que as tentativas de sucção com frequência levavam à sua destruição (ovos não fecundados) (Figura 2.8). As observações destes ovos foram feitas durante os procedimentos de filtração e contagens de fêmeas, machos, cascas, ovos e náuplios e puderam ser confirmadas após a obtenção de medidas do material preservado.

Figura 2.8. Diferentes tipos de ovos observados para fêmeas de *T. turbinata* alimentadas com *A. tamiyavanichii*. A: ovos de tamanho pequeno, B: ovos de tamanho normal e C: ovos de tamanho maior - ovos não fecundados. Números localizados à direita das barras representam o número total de ovos medidos para cada um dos períodos experimentais. Ac.: Período de aclimação. 12h1: Primeiras 12 horas de incubação. 12h2: últimas 12 horas de incubação. Para o período de aclimação do experimento realizado com a microalga *P. minimum*, medidas dos ovos não foram obtidas, pois as contagens do número de cascas e ovos foram executadas no momento do experimento.

2.8.2. Experimentos com mistura de três microalgas – Determinação da produção de ovos na presença de *Alexandrium cf. fraterculum*

Para o experimento de misturas das três microalgas, *A. cf. fraterculum*, *A. tamiyavanichii* e *P. minimum* (Figura 2.9), diferenças significativas entre taxas de produção de ovos foram encontradas apenas para as 12 h finais de incubação (Aclimatação: ANOVA, $n=15$, $p=0,04$; primeiras 12 horas de incubação: teste de Kruskal-Wallis; $n=15$; $p=0,06$; últimas 12 horas de incubação: teste de Kruskal-Wallis; $n=15$, $p=0,04$) (Figura 2.9. A1 e A3).

Para as 12 horas finais de incubação, além de uma produção de ovos para fêmeas em jejum significativamente menor do que a verificada para todos os demais tratamentos (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=3$, $p<0,001$), também foram observados mais indícios de melhor qualidade nutricional de *A. tamiyavanichii*, uma vez que fêmeas alimentadas em dietas compostas por maiores proporções da espécie (50% *A. tamiyavanichii* com 50% de *P. minimum*; 50% *A. tamiyavanichii* com 50% de *A. cf. fraterculum*; 33% de *A. cf. fraterculum*, com 33% de *A. tamiyavanichii* e 33% de *P. minimum*) produziram significativamente mais ovos em comparação com dietas sem esta microalga (100% de *A. cf. fraterculum*; 50% de *P. minimum* com de 50% *A. cf. fraterculum*) ou em baixas proporções da mesma (33% de *A. cf. fraterculum*, com 33% de *A. tamiyavanichii* e 33% de *P. minimum*) (teste de Tukey não paramétrico, comparações com $n=3$, $p<0,001$) (Figura 2.9. A3).

Figura 2.9. Variação da produção de ovos ($\mu\text{g C fêmea}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (A1-3) e do sucesso de eclosão dos náuplios (%) (B1-3) em função de diferentes tratamentos compostos por misturas de três microalgas (F: *Alexandrium* cf. *fraterculum*, T: *A. tamiyavanichii* e P: *Prorocentrum minimum*). Barras verticais correspondem ao erro padrão para cada uma das médias obtidas ($n=3$). Estimativas com ausência da barra vertical representam médias com n inferior a 10 ovos. Rótulos inseridos nas barras relativas ao sucesso de eclosão correspondem ao número médio de ovos (e seu respectivo desvio padrão) presente em cada uma das amostras.

2.9. Discussão

Os resultados desse trabalho indicam que, nas concentrações aplicadas, *Alexandrium tamiyavanichii* suplementou a produção e o sucesso de eclosão dos ovos de *Temora turbinata*, apontando que, em condições de mistura com *Prorocentrum minimum* (espécie não nociva), copépodes demonstraram uma maior preferência pelo alimento potencialmente nocivo (*A. tamiyavanichii*).

Considerando o experimento de mistura de duas microalgas, alguns fatores podem ter contribuído para inibir a produção total e o sucesso de eclosão dos náuplios de *T. turbinata* sob maiores proporções de *Prorocentrum minimum* (i): não expressão de toxicidade pelas culturas de *A. tamiyavanichii* empregadas nos experimentos, tendo em vista que análises de toxinas não foram efetuadas; (ii) contaminação da cultura-estoque por bactérias, provocando um efeito deletério sobre a produção de *T. turbinata* nos tratamentos compostos por maiores contribuições de *P. minimum* em termos de carbono; (iii) baixa concentração de oxigênio dissolvido nas culturas estoques de *P. minimum*, devido a presença de elevada atividade bacteriana; (iv) expressão de toxicidade pelas culturas de *P. minimum* empregadas nos experimentos; (v) ocorrência de maior canibalismo dos ovos na ausência de células de *A. tamiyavanichii* nos tratamentos compostos por maiores porcentagens de *P. minimum*; (vi) consumo seletivo de células de *A. tamiyavanichii* associado ao seu tamanho e/ou conteúdo nutricional, mesmo sob a menor proporção deste item (proporção nominal de 25%), revertendo em uma resposta numérica mais acentuada do que na presença apenas do alimento controle (*P. minimum*).

Dentre os fatores levantados, os quatro primeiros podem ser considerados menos prováveis. Considerando a primeira alternativa levantada (inexpressão de toxicidade), ressalta-se que, em experimentos com exsudatos e células intactas, o mesmo clone da espécie *A. tamiyavanichii* (clone A1PSA produtor de saxitoxinas - 3.4 pg cell^{-1} , 67.06% - Menezes et al., 2010), sob as mesmas condições de cultivo (volume próximo de inóculo, temperatura, nutrientes disponibilizados, volume aproximado de cultivo e iluminação) (ver sessão 4. Anexo), foi nocivo para náuplios de copépodes, bem como para outros grupos zooplancctônicos (ver Capítulo III). Em adição, o mesmo clone, também sobre as mesmas condições de manutenção, demonstrou causar alterações no comportamento natatório de *T.*

turbinata (Baldasso, 2010). Ainda que a toxicidade de um mesmo clone seja reconhecidamente variável em função de diversos parâmetros (Flynn e Flynn, 1995), ocasionando complexas ou inconsistentes interações entre microalgas tóxicas e seus predadores (Turner e Tester, 1997), a detecção de efeitos nocivos de uma mesma cepa em outros experimentos constitui um forte indício de que os copépodes da espécie *T. turbinata* incubados tenham sido expostos a compostos potencialmente nocivos. Ressalta-se também que a possibilidade de produção de outros compostos bioativos não pode ser descartada.

Em relação à segunda hipótese, todas as culturas empregadas nos experimentos foram manipuladas sob as mesmas condições não axênicas de cultivo (todos os cuidados tomados podem ser acompanhados na sessão 5. Anexo), estando igualmente sujeitas à proliferação bacteriana.

A terceira explicação é tampouco provável, devido à considerável diluição (cerca de 20, 15 e 24 vezes para culturas de *P. minimum* para os períodos de aclimação e para as duas rodadas subsequentes de 12 horas de incubação) das culturas-estoque durante a preparação dos tratamentos alimentares e consequente redução da possibilidade de ocorrência de baixos níveis de oxigenação. Ressalta-se também que as culturas empregadas foram diluídas em meio de cultura f/2 no dia anterior ao início do experimento de mistura. Frascos experimentais de 620 mL, como os aplicados nos experimentos de misturas, são amplamente utilizados em abordagens experimentais similares (Kozlowsky-Suzuki et al., 2006; Schultz e Kiorbøe, 2009), sem alusão a problemas de oxigenação ou recomendações quanto a aferição de concentrações de oxigênio dissolvido. Em adição, os copépodes vivos encontravam-se ativos e aparentemente saudáveis após os períodos de incubação.

Em relação à quarta hipótese, a toxicidade de *P. minimum* para copépodes planctônicos não é considerada suficientemente clara (Dam e Colin, 2005). Os mesmos

autores destacaram que o dinoflagelado é usado com frequência como uma dieta controle em estudos para avaliação do efeito de diferentes microalgas na reprodução de copépodes (Lacoste et al., 2001; Besiktepe e Dam, 2002; Carotenuto et al., 2002; Ceballos e Ianora, 2003; Colin e Dam, 2002; Ianora et al., 2004; Dam e Colim, 2005; Ismar e Sommer, 2008; Buttino et al., 2009; Ianora et al., 2011), e seus próprios resultados demonstraram apenas um caráter nutricional insuficiente do dinoflagelado para fêmeas de *Acartia tonsa*.

Em experimentos de com espécies individuais de dinoflagelados, taxas médias de canibalismo para fêmeas alimentadas apenas com *P. minimum*, considerando os cinco tratamentos empregados, foram significativamente maiores em todos os intervalos de incubação (aclimação, primeiras 12 horas e últimas 12 horas), resultando em estimativas significativamente menores de produção total para as 12 horas iniciais de incubação. O comportamento canibal sobre ovos e náuplios é também reportado para as espécies congêneras *T. longicornis* (Daan et al., 1988; Jansen et al., 2006) e *T. stylifera* (Buttino et al., 2009) na ausência de uma fonte alimentar alternativa. Como descrito em sequência, estes resultados concordam com as duas últimas hipóteses elaboradas: (v) maior canibalismo dos ovos na ausência de *A. tamiyavanichii* combinado com (vi) predação seletiva deste item em condições de mistura.

A composição bioquímica de uma dada espécie do fitoplâncton pode variar expressivamente sob diferentes fases de crescimento (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989). Conforme o mesmo autor, ainda que outros fatores, como por exemplo, o tamanho celular, a digestibilidade e eventualmente toxicidade, possam influenciar a seleção dos itens alimentares, o conhecimento das características bioquímicas específicas é importante para a avaliação da adequação da dieta.

O suplemento de fosfoglicerídeos, triglicerídeos, proteínas, carotenóides e carboidratos constitui a base para maturação dos ovários e acumulação de nutrientes pelos oócitos em crustáceos (Harrison, 1990). A quantificação de alguns destes componentes em células de *P. minimum* por Campos et al. (2010) corrobora a quinta hipótese levantada. Em estudo realizado para determinação da composição bioquímica de um conjunto de dez microalgas, *P. minimum* recebeu destaque juntamente com *Ischrysis galbana* e *Tetraselmis gracilis*, por apresentar elevadas concentrações de proteínas. Segundo os mesmos autores, apesar de demonstrar uma baixa taxa de crescimento, os elevados teores de proteínas da espécie sugeriram alta eficiência na conversão de nutrientes em biomassa, sendo esta uma característica favorável ao sucesso reprodutivo de seus potenciais predadores.

Entretanto, o mesmo trabalho apontou que, embora a espécie possa produzir quantidades consideráveis de lipídeos, sua taxa de produção de ácidos graxos poliinsaturados esteve entre os três menores valores encontrados. Conforme Harrison (1990) os ácidos graxos poliinsaturados são os maiores componentes dos fosfoglicerídeos, os quais desempenham um papel fundamental na estrutura da membrana celular e são importantes precursores de hormônios responsáveis por processos-chave ao longo da reprodução de crustáceos marinhos. Essas substâncias constituem ainda uma importante fonte de energia para ovos jovens lipovitelínicos, garantindo o sucesso da eclosão naupliar e o desenvolvimento dos juvenis (Kattner et al., 2007) e, como copépodes são incapazes de sintetizá-las, a obtenção por meio da alimentação é de extrema importância (Bell et al. 2007). Em termos específicos, copépodes requerem quantidade críticas de ácidos graxos do tipo ômega 3 de cadeia longa: os ácidos docosaexaenóico (DHA - 22 : 6 ω 3) e seu precursor, o ácido eicosapentaenóico (EPA - 20: 5 ω 3) (Chen et al., 2012). Em um estudo comparativo da composição de ácidos graxos de cinco microalgas do gênero *Alexandrium*

spp., a presença de EPA foi somente detectada em *A. tamiyavanichii*, o qual também foi o único a expressar uma razão entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados (PUFA:SFA) positiva (Usup et al., 2008), sugerindo uma elevada qualidade nutricional desta microalga.

Além da qualidade do alimento disponível, a produção de ovos em copépodes marinhos é também regulada por outros fatores, como por exemplo, a temperatura e o peso das fêmeas (Bunker e Hirt, 2004; Mauchline, 2008). Para os experimentos com monoculturas realizados em outubro de 2011 (AT2 e PM, Tabela 2.5), bem como para os experimentos de mistura (envolvendo *A. cf. fraterculum*, *A. tamiyavanichii* e *P. minimum*, M1 e M2, Tabela 2.6), todas as fêmeas de *T. turbinata* foram submetidas a uma mesma temperatura diária de incubação (23°C) e foram incubados somente indivíduos com características morfológicas semelhantes. Nesta etapa um cuidado especial foi tomado para a triagem apenas de fêmeas de maior tamanho, com segmento genital dilatado ou faixas paralelas escuras e longitudinais na região dorsal do tórax, denotando ovários com oócitos em amadurecimento. Por vezes, foram necessários vários dias de espera para obtenção de um número suficiente de fêmeas nestas condições, em uma mesma população.

Com base nestas informações pode-se inferir que a predação seletiva de *A. tamiyavanichii*, quinta hipótese levantada, pode ser mais realista se considerarmos que as células de *P. minimum* possuíam qualidade bioquímica inferior ao alimento suspeito. Estudos experimentais com copépodes da espécie *T. stylifera* expostos a misturas de *P. minimum* com *Rhodomonas baltica* indicam que a mistura do dinoflagelado com uma microalga de boa qualidade pode reverter em uma produção de ovos até 66 vezes maior do que a verificada quando o mesmo é oferecido de forma isolada (Buttino et al., 2009). Conforme os mesmos autores, quando oferecido isoladamente, *P. minimum* favoreceu a ocorrência de maiores taxas de canibalismo sobre os ovos. Deste modo, na ausência, ou em

menores concentrações de *A. tamiyavanichii*, as taxas de produção de ovos podem ter sido comprometidas pela carência de compostos importantes para a reprodução.

Em adição, em condições de misturas das duas microalgas, *A. tamiyavanichii* pode também ter sido selecionado por tamanho (sexta hipótese levantada). Ou seja, o maior diâmetro esférico equivalente (ESD) de *A. tamiyavanichii* ($40,5 \mu\text{m}^3$) pode ter proporcionado uma razão predador:presa maior (17:1, considerando copépodes da espécie *T. turbinata* com ESD igual a $844,3 \mu\text{m}^4$), quando em comparação com *P. minimum* (ESD de $11,18 \mu\text{m}^3$ e razão de 76 : 1, considerando copépodes da espécie *T. turbinata* com ESD igual a $844,3 \mu\text{m}^4$), e mais próxima dos valores aproximados esperados por Hansen et al. (1994) para copépodes (10:1 a 30:1, com média de 18:1) e *T. longicornis* (6:1 a 30:1, com média de 15:1). Contudo, a seletividade relacionada a parâmetros morfométricos não é dependente somente da razão de tamanho, sendo que características estruturais como a estabilidade mecânica de uma célula também devem ser levadas em consideração (Jansen et al., 2006). Neste ponto ressalta-se que não existem estudos que apontem para diferenças entre a proteção mecânica de células de *Alexandrium* spp. e *Prorocentrum* spp. em virtude das distintas arquiteturas e propriedades materiais, como já reportado para diferentes ordens de diatomáceas (Hamm et al. 2003).

Informações sobre o hábito alimentar de *T. turbinata* são escassas na literatura, de forma que a predação sobre gênero *Alexandrium* spp. ou outros dinoflagelados é pouco reportada. Respostas alimentares, reprodutivas ou comportamentais de copépodes da família Temoridae expostos a culturas laboratoriais ou assembléias naturais com presença de gêneros de dinoflagelados potencialmente nocivos encontram-se, até o presente

³ Medidas obtidas através da FlowCAM®;

⁴ Medidas obtidas através do Zooscan.

momento, relativamente bem estudadas para as espécies *T. longicornis* (*Dinophysis acuminata* - Maneiro et al., 2000; *Alexandrium* spp. - Hassett, 2003; *Dinophysis norvegica* - Jansen et al., 2006; *Dinophysis* spp. - Kozlowsky-Suzuki, 2006; *Karenia mikimotoi* - Schultz e Kiørboe, 2009), *Eurytemora affinis* (*Dinophysis* spp. - Setälä et al., 2009) e *E. herdimani* (*Alexandrium fundyense* - Teegarden et al., 2003; *Alexandrium* spp. - Teegarden et al., 2008).

Os principais resultados destes estudos apontam para dois comportamentos alimentares em condições de mistura: (i) supressão da alimentação em altas densidades de clones tóxicos e reduzida seletividade em baixas concentrações, resultando em um consumo tão elevado quanto o verificado para células não tóxicas (Teegarden et al. 2008) e suportando a hipótese de que a rejeição alimentar ocasionada pela toxicidade é somente efetiva em altas concentrações celulares (Teegarden et al., 2001) e (ii) alimentação ativa sobre espécies tóxicas combinada com comportamento seletivo, direcionando a alimentação para presas não-tóxicas, mesmo em baixas concentrações (Maneiro et al., 2000; Kozlowsky-Suzuki, 2006).

Em experimentos de mistura, nos quais copépodes foram expostos a uma concentração total de aproximadamente $450 \mu\text{g C L}^{-1}$, em tratamentos compostos apenas por *A. tamiyavanichii* as concentrações residiram em aproximadamente $2,3$ e $2,9 \times 10^5$ células L^{-1} , para as 12 horas iniciais e finais de incubação, respectivamente. Ao passo que durante a exposição a monoculturas (experimentos *A. tamiyavanichii* 1 e 2), concentrações máximas ficaram entre $5,4$ e $7,1 \times 10^5$ células L^{-1} (*A. tamiyavanichii* 1 - $947,3$ e $894,2 \mu\text{g CL}^{-1}$) e entre $3,5$ e $7,3 \times 10^5$ células L^{-1} (*A. tamiyavanichii* 2 - $612,9$ e $921,7 \mu\text{g CL}^{-1}$). Ainda que concentrações da ordem de 10^5 células L^{-1} sejam elevadas, estando próximas a condições de florações para outras espécies do gênero na costa brasileira (florações tóxicas:

A. tamarensis, 2×10^5 cel. L^{-1} , Odebrecht *et. al.*, 1997; *A. minutum*, 1 to 4.3×10^2 a 10^5 cel. L^{-1} , Menezes *et al.*, 2007; florações não tóxicas: *A. fraterculum*, 7.0×10^4 to 8.8×10^5 cel. L^{-1} , Omachi *et al.*, 2007), estão distantes da ordem de 10^7 células L^{-1} , verificada para algumas das culturas aplicadas em experimentos com células intactas e exsudatos (Capítulo II), onde efeitos letais e subletais foram observados. Destaca-se ainda que uma das maiores concentrações experimentais obtidas ($947,3 \mu g C L^{-1}$ - $6,7 \times 10^5$ células L^{-1}) suprimiu acentuadamente produção de ovos de *T. turbinata* (experimento AT1 - Figura 2.3. B2).

Deste modo, considerando a possibilidade de expressão de toxicidade por células das culturas de *A. tamiyavanichii* empregadas, as concentrações aplicadas em condições de mistura podem não ter sido elevadas o suficiente para promover a supressão de taxas de alimentação (conforme o comportamento i). Em condições de mistura apenas com *P. minimum* (experimento M1) ou com *P. minimum* e *A. cf. fraterculum* (experimento M2), nas quais a diluição foi superior, o ambiente pode ter sido ainda mais favorável à predação de células de *A. tamiyavanichii*, maiores e possivelmente mais adequadas em termos bioquímicos e, ainda que potencialmente nocivas, disponíveis em densidades baixas (conforme comportamento ii). Ainda que pertencentes ao mesmo gênero, células de *A. cf. fraterculum* reverteram em uma produção de ovos inferior (Figura 2.9), indicando uma composição bioquímica provavelmente menor do que a de *A. tamiyavanichii*.

Além dos dois fatores anteriormente analisados, toxicidade individual de itens alimentares e concentração relativa a outras presas, a ingestão consiste ainda no resultado final de uma sequência de eventos: encontro, perseguição, ataque, captura, manipulação e ingestão. A taxa, duração e eficiência de cada um destes componentes do processo de predação, juntamente com a disponibilidade alimentar, definem a resposta funcional. Mesmo considerando um predador específico, todos estes parâmetros podem ser variar para

diferentes presas, o que implica na ocorrência de distintas taxas de ingestão para diferentes itens alimentares (alimentação seletiva) (Kiørboe, 2008).

Em outras palavras, tem sido demonstrado que copépodes possuem um surpreendente repertório de comportamentos alimentares, incluindo, por exemplo, habilidades para configurar campos de fluxos, cujas propriedades melhoram a detecção de itens alimentares (Strickler, 1982). A captura de partículas alimentares é possivelmente executada por meio de um sistema de detecção em escala nanométrica e uma aguda sensibilidade fisiológica que permitem a distinção entre sinais microfluídicos de diferentes presas móveis (Yen e Strickler, 1986). Tais comportamentos indicam que estes crustáceos possuem uma percepção aguçada do ambiente alimentar no qual se encontram inseridos e estão intimamente relacionados à estratégia alimentar, desenvolvida especialmente para a obtenção do alimento de melhor qualidade nutricional, de acordo com a teoria do forrageamento ótimo (Demott, 1989).

Ainda que os complexos componentes da estratégia alimentar também incluam uma resposta para a aparente “qualidade” do alimento disponível (Cowles et al., 1988), mais facilmente compreendida por meio da análise de perfis bioquímicos de microalgas, diante dos conceitos anteriormente apresentados, também não pode ser descartada a possibilidade de ocorrência da quinta hipótese elaborada (predação seletiva de *A. tamiyavanichii*) como resultado de um conjunto de outros fatores dificilmente previsíveis e não detectáveis na abordagem experimental aplicada. Abordagens com incubações em garrafas, como a empregada no presente estudo, são verdadeiras caixas pretas, onde as células que desaparecem são consideradas como consumidas, não revelando mecanismos de seleção, os quais requerem a observação direta da captura e rejeição de presas (Schultz e Kiørboe, 2009).

Para *T. turbinata*, em âmbito nacional, Eskinazi-Sant'Anna (2000) avaliou o conteúdo de pelotas fecais de espécimes provenientes de uma região próxima ao local de coleta do presente estudo (São Sebastião, São Paulo), revelando a ingestão preferencial de diatomáceas (cêntricas e penatas), material amorfo e espinhos de protozoários, mesmo na presença de espécies de dinoflagelados que podem deixar vestígios no material fecal (*Dinophysis* sp., *Prorocentrum* sp. e *Gonyaulax* sp.). Estes dados poderiam sugerir que, em condições naturais o grupo não é representativo entre os itens alimentares preferencialmente selecionados pela espécie. Contudo, ressalta-se que os resultados obtidos por Eskinazi-Sant'Anna (2000) podem ter sido comprometidos pela difícil identificação de dinoflagelados desintegrados, ou ainda por uma reduzida abundância dos mesmos durante coletas para análise de pelotas fecais.

Em um dos primeiros estudos experimentais contemplando informações sobre a predação da espécie sobre um dinoflagelado potencialmente nocivo, Cohen et al. (2007) observaram que populações simpátricas de *T. turbinata* se alimentaram sobre *K. brevis* somente em concentrações intermediárias, cessando o consumo no tratamento de maior concentração. Também foi observado aumento significativo da mortalidade e redução da porcentagem de indivíduos em natação em altas concentrações celulares do dinoflagelado, bem como perda da fotosensibilidade e redução da fototaxia positiva após 24 horas de exposição a concentrações subletais de células de *K. brevis* ou de PbTx-2 (brevetoxinas) dissolvida. Estes resultados, juntamente com as observações de Baldasso (2010), sugerem uma propensão ao desenvolvimento de respostas subletais, principalmente comportamentais. Este tipo de resposta possui implicações importantes, tendo em vista que torna os copépodes potencialmente mais vulneráveis à predação (Cohen et al., 2007).

Respostas subletais podem também ser encontradas no comprometimento do sucesso reprodutivo (Ianora et al., 2004). Ianora e Poulet (1993) demonstraram que sobre condições alimentares menos favoráveis em termos bioquímicos, *T. stylifera* pode maximizar a sua produção total de ovos, mas não a sua viabilidade. Ainda que diferenças significativas nas taxas de eclosão dos náuplios não tenham sido verificadas para *A. tamiyavanichii* (experimento AT2) e *P. minimum* (experimento PM), é curioso o fato de que a variabilidade nos tamanhos dos ovos de fêmeas alimentadas com *A. tamiyavanichii* tenha sido mais acentuada nas últimas 12 horas de incubação (Figura 2.8), com um número maior de ovos possivelmente não fecundados, onde as maiores concentrações de alimento foram aplicadas (120 - 1200 $\mu\text{g C L}^{-1}$). Nas primeiras 12 horas a amplitude de diâmetros esteve próxima à observada para ovos provenientes de fêmeas alimentadas com *P. minimum*, mesmo com a obtenção do diâmetro de 611 ovos.

As lacunas existentes no conhecimento de seus hábitos alimentares e ciclo de vida, aliadas ao histórico de invasão e segregação espacial da espécie nativa (*T. stylifera*) para regiões mais oceânicas, levando à exploração de diferentes nichos (Cunha, 2008), tornam *T. turbinata* uma espécie intrigante do ponto de vista ecológico. A capacidade de sustentar altas taxas de produção de ovos ainda que na presença de espécies potencialmente nocivas, as quais podem não ser itens obrigatórios em sua dieta natural (Eskinazi-Sant'Anna, 2000), confere mais indícios de que a versatilidade alimentar é uma de suas principais vantagens sobre *T. stylifera*.

Como uma espécie comprovadamente invasora (Villac et al., 2009), *T. turbinata* pode ser mais resistente devido à exposição pretérita a populações potencialmente nocivas em outros ambientes (populações simpátricas), assim como observado por Colin e Dam (2007) para populações resistentes de *A. hudsonica*. É possível também que informações

adicionais sobre o efeito da espécie de dinoflagelado testada possam ser obtidas por meio da aplicação de técnicas de observação comportamental, como no ensaio delineado em Baldasso (2010), ou ainda que os efeitos nocivos realmente só sejam expressivos para estágios juvenis, como observado nos experimentos contemplados no Capítulo II, exigindo análises mais detalhadas da morfologia de seus ovos ou náuplios. Estas considerações apontam para a necessidade de mais estudos experimentais envolvendo espécies de copépodes abundantes em águas brasileiras. Também é demonstrado as interações tróficas entre fito e zooplâncton não podem ser excluídas de estudos futuros envolvendo a modelagem da dinâmica de populações de espécies potencialmente nocivas, escopo fundamental dentro do panorama nacional de grande incentivo às atividades de mitilicultura.

2.10. Referências bibliográficas

- ARA, K. Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 445, p. 205-215, 2001.
- ARA, K. Temporal variability and production of *Temora turbinata* (Copepoda: Calanoida) in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brasil. **Sci. mar.**, v. 66, n. 4, p. 399-406, 2002.
- ARA, K. Temporal Variability and Production of the Planktonic Copepod Community in the Cananéia Lagoon Estuarine System, São Paulo, Brazil. **Zool. Stud.**, v. 43, n. 2, p. 179-186, 2004.
- ARAÚJO, H. M. P; MONTÚ, M. Novo registro de *Temora turbinata* (Dana, 1894) (Copepoda: Crustacea) para águas Atlânticas. **Nauplius**, v. 1, p. 89-90, 1993.
- BALDASSO, L. F. **Explorando camadas finas: Respostas natatórias de *Temora turbinata* (Copepoda, Calanoida) a agregados de microalgas tóxicas e não tóxicas.** 2010. 28p. Monografia (Bacharelado em Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Departamento de Oceanografia Biológica, São Paulo.
- BANDARANAYAKE, W. M.; GENTIEN, P. Carotenoids of *Temora turbinata*, *Centropages furcatus*, *Undinula vulgaris* and *Euchaeta russelli*. **Comp. Biochem. Phys. B.**, v. 72, n. 03, p. 409-414, 1982.
- BELL, M. V.; DICK, J. R.; ANDERSON, T. R.; POND, D. Application of liposome and stable isotope tracer techniques to study polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine zooplankton. **J. Plankton. Res.**, v. 29, p. 417-422, 2007.
- BESIKTEPE, S.; DAM, H. G. Coupling of ingestion and defecation as a function of diet in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 229, p. 151-164, 2002.
- BRADFORD-GRIEVE, J. M; MARKHASEVA, E. L., ROCHA, C. E. F.; ABIAHY, B. Copepoda. In: BOLTOVSKOY, D. (ed). **South Atlantic Zooplankton.** Vol. 2. The Netherlands: Backhuys Publishers, p. 869-1098, 1999.
- BRANDINI, F. P.; LOPES, R. M; GUTSEIT, K. S.; SPACH, H. L.; SASSI, R. **Planctonologia na plataforma continental do Brasil - Diagnose e revisão bibliográfica.** Rio de Janeiro: FEMAR, 196p., 1997.

- BUNKER, A. J.; HIRST, A. G. Fecundity of marine planktonic copepods: global rates and patterns in relation to chlorophyll *a*, temperature and body weight. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 279, p. 161-181, 2004.
- BUTTINO, I.; IANORA, A.; BUONO, S.; VITELLO, V.; SANSONE, G.; MIRALTO, A. Are monoalgal diets inferior to plurialgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*? **Mar. Biol.**, v. 156, n. 6, p. 1171-1182, 2009.
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.
- CAROTENUTO, Y.; IANORA, A.; BUTTINO, I.; ROMANO, G.; MIRALTO, A. Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 276, p. 49-66, 2002.
- CEBALLOS, S.; IANORA, A. Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 294, p. 189-202, 2003.
- CHEN, M.; LIU, H.; CHEN, B. Effects of dietary essential fatty acids on reproduction rates of a subtropical calanoid copepod, *Acartia erythraea*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 455, p. 95-110, 2012.
- COHEN, J. H.; TESTER, P. A.; FORWARD J. R. Sublethal effects of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on marine copepod behavior. **J. Plankton. Res.**, v. 29, n. 03, p. 301-315, 2007.
- COLIN, S. P.; DAM, H. G. Testing for toxic effects of prey on zooplankton using sole versus mixed diets. **Limnol. Oceanogr.**, v. 47, p. 1430-1437, 2002.
- COLIN, S. P.; DAM, H. G. Comparison of the functional and numerical responses of resistant versus non-resistant populations of the copepod *Acartia hudsonica* fed the toxic dinoflagellate. **Harmful Algae**, v. 6, p. 875-882, 2007.
- CONTENTE, R. F.; STEFANONI, M. F.; SPACH, H. L. Feeding ecology of the Brazilian silverside *Atherinella brasiliensis* (Atherinopsidae) in a sub-tropical estuarine ecosystem. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, v. 91, n. 06, 2011.
- COWLES, T. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W. Food selection by copepods: discrimination on the basis of food quality. **Mar. Biol.**, v. 100, p. 41-49, 1988.
- CUNHA, R. M. **Estudo comparativo dos copepodes *Temora stylifera* e *T. turbinata* na plataforma continental sudeste do Brasil no verão e inverno de 2002**. 2008. 134p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Departamento de Oceanografia Biológica, São Paulo.

- DAM, H. G.; COLIN, S. P. *Prorocentrum minimum* (clone Exuv) in nutritionally insufficient, but not toxic to the copepod *Acartia tonsa*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 575-584, 2005.
- DE LA ROCHA, C. L. **Variação temporal da comunidade zooplanctônica e produção anual do copepoda *Acartia lilljeborgi* na enseada da Praia do Segredo (São Sebastião - SP)**. 1998. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Ecologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências Departamento de Ecologia, São Paulo.
- DEMOTT, W. R. Optimal foraging theory as a predictor of chemically mediated food selection by suspension-feeding copepods. **Limnol. Oceanogr.**, v. 34, n. 01, p. 140-154, 1989.
- DUREN, L. A. D.; VIDELER, J. J. Swimming behaviour of developmental stages of the calanoid copepod *Temora longicornis* at different food concentrations. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 126, p. 153-161, 1995.
- EDLER, L. Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. **Balt. Mar. Biolog. Publ.**, n.05, p. 1-38, 1979.
- ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M. **Estudo da dieta natural de *Parvocalanus cassirostris*, *Paracalanus quasimodo*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata* (Copepoda, Calanoida), no Canal de São Sebastião**. 2000. 317p. Tese (Doutorado em Ciências, área de Ecologia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia, São Paulo.
- ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; BJÖRNBERG, T. K. S. **Sobre a ocorrência de *Temora turbinata* em águas costeiras e de plataforma do Brasil**. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DEL MAR - COLACMAR, 6, 1995. **Resumos...** Mar del Plata, 1995. p. 73.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; PEREZ-CAMACHO, A.; FERREIRO, M. J.; BLANCO, J.; PLANAS, M.; CAMPOS, M. J.; LABARTA, U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven marine microalgae. **Aquaculture**, v. 83, p. 17-37, 1989.
- FLYNN, K. J.; FLYNN, K. Dinoflagellate physiology, nutrient stress and toxicity. In: LASSUS P.; ARZUL, G.; LE DENN, E. E.; GENTEN, P.; MARCAILLOU, C. (Eds). **Harmful marine algal blooms.**, Paris: Lavoisier Intercept, p. 541- 550, 1995.
- FROST, B. W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 17, n. 6, p. 805-815, 1972.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds). **Culture of Marine Animals**. New York: Plenum Book Publ. Corp., p. 26-60, 1975.

- HALLEGRAEFF, G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. **J. Phycol.**, v. 46, p. 220-235, 2010.
- HANSEN, B.; BJØRNSSEN, P. K.; HANSEN, P. J. The size ratio between planktonic predators and their prey. **Limnol. Oceanogr.** v. 39, p. 395-403, 1994.
- HARRISON, K. E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapods crustaceans: a review. **J. Shellfish Res.**, v. 9, p. 1-28, 1990.
- HASHIMOTO, T.; MATSUOKA, S.; YOSHIMASTSU, S.; MIKI, K.; NISHIBORI, N.; NISHIO, S.; NOGUCHI, T. First paralytic shellfish poison (PSP) infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyabanichii*, in the southeast coasts of the Seto, Inland Sea, Japan. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, v. 43, p. 1-5, 2002.
- HAMM, C. E.; MERKEL, R.; SPRINGER, O.; JURKOJC, P.; MAIER, C.; PRECHTEL, K.; SMETACEK, V. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. **Nature**, v. 421, p. 841-843, 2003.
- HASSET, R. P. Effect of toxins of the 'red-tide' dinoflagellate *Alexandrium* spp. on the oxygen consumption of marine copepods. **J. Shellfish Res.**, v. 25, n. 02, p. 185-192, 2003.
- HEIL, C. A.; GLIBERT, P. M.; FAN, C. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. **Harmful Algae**, v. 4, p. 449-470, 2005.
- HSU, P.; LO, W.; SHIH, C. The Coupling of Copepod Assemblages and Hydrography in a Eutrophic Lagoon in Taiwan: Seasonal and Spatial Variations. **Zool. Stud.**, v. 47, n. 02, p. 172-184, 2008.
- HWANG, J. S.; CHEN, Q. C.; WONG, C. K. Taxonomic composition and grazing rate of calanoid copepods in Coastal Waters of Northern Taiwan. **Crustaceana**, v. 71, n. 04, p. 378-389, 1998.
- IANORA, A.; MIRALTO, A.; POULET, S. A.; CAROTENUTO, Y.; BUTTINO, I.; ROMANO, G.; CASOTTI, R.; POHNERT, G.; WICHARD, T.; COLUCCI-D'AMATO, L.; TERRAZZANO, G.; SMETACEKIANORA, V. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. **Nature**, v. 429, p. 403-407, 2004.
- IANORA, A.; ROMANO, G.; CAROTENUTO, Y.; ESPOSITO, F.; RONCALLI, V.; BUTTINO, I.; MIRALTO, A. Impacto of the diatom oxylipin 15S-HEPE on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. **Hydrobiologia**, v. 666, p. 265-275, 2011.
- IANORA, A.; POULET, S. A. Egg viability in the copepod *Temora stylifera*. **Limnol. Oceanogr.**, v. 38, n. 8, p. 1613-1626, 1993.

- ISMAR, S. M. H.; HANSEN, T.; SOMMER, U. Effect of food concentration and type of diet on *Acartia* survival and naupliar development. **Mar. Biol.**, v. 154, p. 335-343, 2008.
- JANSEN, S.; RISER, C. W.; WASSMANN, P.; BATHMANN, U. Copepod feeding behaviour and egg production during a dinoflagellate bloom in the North Sea. **Harmful Algae**, v. 05, p. 102-112, 2006.
- JÓNASDÓTTIR, S. H.; KJØRBOE, T.; TANG, K. W.; ST JOHN, M.; VISSER, A. W.; SAIZ, E.; DAM, H. G. Role of diatoms in copepod production: good, harmless or toxic? **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 172, p. 305-308, 1998.
- KATTNER, G.; JONASDOTTIR, S. H.; MADSEN, M. L.; MAYZAUD, P.; MULLER-NAVARRA, D.; NICHOLS, P. D.; PAFFENHOFER, G. A.; POND, D.; SAITO, H.; STUBING, D.; VIRTUE, P.; HAGEN, W.; LEE, R. F.; CAMPBELL, R.; DEIBEL, D.; ANDFALK-PETERSEN, S.; GRAEVE, M.; HANSEN, B. W.; HIRCHE, H. J. Perspectives on marine zooplankton lipids. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, v. 64, p. 1628-1639, 2007.
- KJØRBOE, T. A. **Mechanistic Approach to Plankton Ecology**. Princeton: University Press, 228p., 2008.
- KJØRBOE, T.; MØHLENBERG, F.; NICOLAISEN, H. Ingestion rate and gut clearance in the planktonic copepod *Centropages hamatus* (Lilljeborg) in relation to food concentration and temperature. **Ophelia**, v. 21, n. 2, p. 182-194, 1982.
- KJØRBOE, T.; MØHLENBERG, F.; RIISGARD, H.U. In situ feeding rates of planktonic copepods: a comparison of four methods. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 88, p. 67-81, 1985.
- KOGA, F. The developmental stages of *Temora turbinata* (Copepoda: Calanoida). **Bull. Plankt. Soc. Japan**, v. 31, n. 1, p. 43-52, 1984.
- KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; CARLSSON, P.; RUHL, A.; GRANÉLI, E. Food selectivity and grazing impact on toxic *Dinophysis* spp. by copepods feeding on natural plankton assemblages. **Harmful Algae**, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2006.
- KRUMME, U.; LIANG, T. Tidal-Induced Changes in a Copepod-Dominated Zooplankton Community in a Macrotidal Mangrove Channel in Northern Brazil. **Zool. Stud.**, v. 43, n.02, p. 404-414, 2004.
- LESTER, K. M.; HEIL, C. A.; NEELY, M. B.; SPENCE, S. M.; HOPKINS, T. L.; SUTTON, T. T.; BURGHART, S. T.; BOHRER, R. N.; REMSEN, A. W.; VARGO, G. A.; WALSH, J. J. Zooplankton and *Karenia brevis* in the Gulf of Mexico. **Cont. Shelf. Res.**, v. 28, p. 99-111, 2008.

- LOPES, R. M.; VALE, R.; BRANDINI, F. P. Composição, abundância e distribuição espacial do zooplâncton no complexo estuarino de Paranaguá durante o inverno de 1993 e o verão de 1994. **Rev. Bras. Oceanogr.**, v. 46, n. 2, p. 195-211, 1998.
- LOURENÇO, S. O. Coleções de Microalgas em Cultivo. In: Lourenço, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, p. 345-385, 2006.
- MACKENZIE, L.; SALAS, M.; ADAMSON, J.; BEUZENBERG, V. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: comparative morphology, toxicity and molecular genetics. **Harmful Algae**, v. 3, p. 71-92, 2004.
- MANEIRO, I.; FRANGÓPUROS, M.; GUISANDE, C.; FERNÁNDEZ, M.; REGUERA, B.; RIVEIRO, I. Zooplankton as a potential vector of diarrhetic shellfish poisoning toxins through the food web. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 205, p. 155-163, 2000.
- MAUCHLINE, J. The biology of calanoid copepods. **Adv. Mar. Biol.**, v. 33, p.1-710, 1998.
- MELO JÚNIOR, M. **Produção secundária e aspectos reprodutivos de copépodes pelágicos ao largo de Ubatuba (SP, Brasil)**. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica). 2009. 186p. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Departamento de Oceanografia Biológica, São Paulo.
- MENEZES M.; BRANCO, S.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMANN, M. A. Bloom of *Alexandrium minutum* Halim on Rio de Janeiro coast: occurrence and toxicity. **Harmful Algal News**, v. 34, p. 7-9, 2007.
- MENEZES M.; VARELA D.; PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; PAREDES, J. Identification of the toxic alga *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) from northeastern Brazil: a combined morphological and rDNA sequence (partial LSU and ITS) approach. **J. Phycol.** v.46, p. 1-13, 2010.
- MIYASHITA, L. K.; MELO JÚNIOR, M.; LOPES, R. M. Estuarine and oceanic influences on copepod abundance and production of a subtropical coastal area. **J. Plankt. Res.**, v. 31, n. 8, p. 815-826, 2009.
- MOURA, M. C. DE O. **Zooplâncton do Sistema Estuarino do Rio Goiana**. Dissertação (Mestrado em Ciências). 2000. 72p. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Oceanografia, Pernambuco.
- MUXAGATA, E.; GLOEDEN, I. M. Ocorrência de *Temora turbinata* Dana, 1849 (Crustacea: Copepoda) no Estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Nauplios**, v.03, p.163-164, 1995.
- NEUMANN-LEITÃO, S.; ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; GUSMÃO, L. M. O.; NASCIMENTO-VIEIRA, D. A.; PARANAGUÁ, M. N.; SCHWAMBORN, R. Diversity and distribution of the mesozooplankton in the tropical Southwestern Atlantic. **J. Plankt. Res.**, v. 30, n. 7, p. 795-805, 2008.

- NEUMANN-LEITÃO, S.; GUSMÃO, L. M. O.; SILVA, T. A.; NASCIMENTO-VIEIRA, D. A.; SILVA, A. P. Mesozooplankton biomass and diversity in coastal and oceanic waters off north-eastern Brazil. **Arch. Fish. Mar. Res.**, v. 47, n. 2-3, p. 153-165, 1999.
- NOGUCHI, T.; MARUYAMA, J.; IKEDA, T.; FUKUYO, Y.; HASHIMOTO, K. 1985. *Protogonyaulax fratercula* as a nontoxic plankton. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, v. 51, n. 8, p.1373.
- ODEBRECHT, C.; MÉNDEZ, S.; GARCIA, V. M. T. Oceanographic processes and HAB in the subtropicsouthwestern Atlantic (28 - 36oS). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 8, 1997, Vigo, Spain. **Abstract...** Vigo: International Society for the Study of Harmful Algae, 1997. p.152.
- OH, S. J.; MATSUYAMA, Y.; NAGAI, S.; ITAKURA, S.; YOON, Y. H.; YANG, H. S. Comparative study on the PSP component and toxicity produced by *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) strains occurring in Japanese coastal water. **Harmful Algae**, v. 08, n. 02, p. 362-368, 2009.
- OMACHI, C. Y.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. Bloom de *Alexandrium fraterculus* in coastal waters off Itajaí, SC, Southern Brazil. **Braz. J. Oceanogr.**, v. 55, n. 01, p. 57-61, 2007.
- PAFFENHÖFER, G. A.; KNOWLES, S. C. Feeding of marine planktonic copepods on mixed phytoplankton. **Mar. Biol.**, v. 48, p. 143-152, 1978.
- PILLAI, P. P. Post-naupliar development of the Calanoid copepod *Temora turbinata* (Dana), with remarks on the distribution of the species of the genus *Temora* in the Indian Ocean. **J. mar. biol. Ass. India**, v. 17, n. 01, p. 87-95, 1975.
- PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; RESGALLA JR., C. Toxicity of the aqueous extract of *Alexandrium fraterculus* Balech. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 10, 2002, St. Petersburg. **Abstracts...** St. Petersburg: International Society for the Study of Harmful Algae, 2002. p.235.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.
- ROFF, J. C.; TURNER, J. T.; WEBBER, M. K.; HOPCROFT, R. R. Bacterivory by tropical copepod nauplii: extent and possible significance. **Aquat. Microb. Ecol.**, v. 09, p. 165-175, 1995.
- ROFF, J. C.; HOPCROFT, R. R. High-precision microcomputer based measuring system for ecological research. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 2044-2048, 1986.

- RÖRIG, L. R.; GUIMARÃES, S. C. P.; LUGLI, D. O.; PROENÇA, L. A. O.; MANZONI, G. C.; MARENZI, A. C. Monitorização de microalgas planctônicas potencialmente tóxicas na área de maricultura da enseada de Armação do Itapocoroy-Penha-SC. **Notas Téc. FACIMAR**, v. 2, p. 71-79, 1998.
- SARTORI, L. P.; LOPES, R. M. Seasonal variability of pelagic copepod assemblages on the inner continental shelf off Paraná, Brazil. **Nauplius**, v. 8, n. 1, p. 79-88, 2000.
- SCHULTZ, M.; KIØRBOE, T. Active prey selection in two pelagic copepods feeding on potentially toxic and non-toxic dinoflagellates. **J. Plankt. Res.**, v. 31, n. 5, p. 553-561, 2009.
- SETÄLÄ, O.; SOPANEM, S.; AUTIO, R.; ERLER, K. Grazing and food selection of the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Acartia bifilosa* feeding on plankton assemblages containing *Dinophysis* spp. **Boreal Env. Res.**, v. 14, p. 837-849, 2009.
- SHIH-HUI, H.; JIANG-SHIOU, H.; TIEN-HIS, F. The heterogeneity of the contents of trace metals in the dominant copepod species in the seawater around northern Taiwan. **Crustaceana**, v. 83, n. 02, p. 179-194, 2010.
- STRICKLER, J. R. Calanoid copepods, feeding currents, and the role of gravity. **Science**, v. 218, p. 158-160, 1982.
- TAMIYAVANICH, S.; KODAMA, M.; FUKUYO, Y. The occurrence of paralytic shellfish poisoning in Thailand. In: ANDERSON, D. M.; WHITE, A. W.; BADEN, D. G. (Eds). **Toxic Dinoflagellates**. New York: Elsevier, p. 521-524, 1985.
- TEEGARDEN, G. J.; CAMPBELL, R. G.; DURBIN, E. G. Zooplankton feeding behavior and particle selection in natural plankton assemblages containing toxic *Alexandrium* spp. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 218, p. 213-226, 2001.
- TEEGARDEN, G. J.; CEMBELLA, A. D.; CAPUANO, C. L.; BARRON, S. H.; DURBIN, E. G. Phycotoxin accumulation in zooplankton feeding on *Alexandrium fundyense*-vector or sink? **J. Plankt. Res.**, v. 25, n. 4, p. 429-443, 2003.
- TEEGARDEN, G. J.; CAMPBELL, R. G.; ANSON, D. T.; OUELLETT, A.; WESTMAN, B. A.; DURBIN, E. G. Copepod feeding response to varying *Alexandrium* spp. Cellular toxicity and cell concentration among natural plankton samples. **Harmful Algae**, v. 7, p. 33-44, 2008.
- TSENG, L. C.; KUMAR, R.; CHEN, Q. C.; HWANG, J. S. Faunal shift between two copepod congeners (*Temora discaudata* and *T. turbinata*) in the vicinity of two nuclear power plants in southern east

- China sea: spatiotemporal patterns of population trajectories over a decade. **Hydrobiologia**, v. 666, p. 301-315, 2011.
- TURNER J. T.; TESTER P. A. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, p. 1203-1214, 1997.
- TURNER, J. T.; HOPCROFT, R. R.; LINCOLN, J. A.; HUESTIS, C. S.; TESTER, P. A.; ROFF, J. C. Zooplankton Feeding Ecology: Grazing by Marine Copepods and Cladocerans upon Phytoplankton and Cyanobacteria from Kingston Harbour, Jamaica. **Mar. Ecol.**, v. 19, n. 03, p. 195-208, 1998.
- USUP, G.; HAMID, S. Z.; CHIET, P. K.; WAH, C. K.; AHMAD, A. Marked differences in fatty acid profiles of some planktonic and benthic marine dinoflagellates from Malaysian waters. **Phycologia**, v. 47, n. 01, p. 105-11, 2008.
- VIEIRA, D. A. N. **Macrozooplâncton recifal da Baía de Tamandaré, PE – Brasil. Pernambuco.** Tese (Doutorado em Oceanografia) 2000. 107p. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Oceanografia, Pernambuco.
- VILLAC, M. C.; LOPES, R. M.; RIVERA, I. N. G.; BASSANELLO, R. T.; CUNHA, D. R.; MARTINELLI FILHO, J. E.; SANTOS, D. B. Plâncton. In: LOPES, R. M.; (Ed). **Informe sobre as Espécies Exóticas Invasoras Marinhas no Brasil/Ministério do Meio Ambiente**, Brasília: MMA/SBF, p. 39-95, 2009.
- WAGGETT, R. J.; BUSKEY, E. J. Calanoid copepod escape behavior in response to a visual predator. **Mar. Biol.**, v. 150, p. 599-607, 2007.
- WAGGETT, R. J.; BUSKEY, E. J. Copepod sensitivity to flow fields: detection by copepods of predatory ctenophores. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 323, p. 205-211, 2006.
- WAGGETT; R. J.; HARDISON, D. R.; TESTER, P. A. Toxicity and nutritional inadequacy of *Karenia brevis*: synergistic mechanisms disrupt top-down grazer control. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 444, p. 15-30, 2012.
- WU, C.; DAHMS, H.; BUSKEY, E. J.; STRICKLER, J. R.; HWANG, J. Behavioral Interactions of the Copepod *Temora turbinata* with Potential Ciliate Prey. **Zool. Stud.**, v. 49, n. 02, p. 157-168, 2010.
- YEN, J.; STRICKLER, J. R. Advertisement and concealment in the plankton: what makes a copepod hydrodynamically conspicuous. **Invertabr. Biol.**, v. 115, n. 03, p. 191-205.

2.11. Anexo

Função para *Counter Coulter* comentada

Help

modelo package:unknown R Documentation

Description:

CONCENTRATIONS.MEAN calcula um vetor de valores correspondentes às concentrações médias considerando todas as

contagens executadas para uma única amostra (pseudoreplicagens) em um contador de partículas,

dentro de um intervalo de tamanho específico.

Usage:

CONCENTRATIONS.MEAN (REPLICATES1, REPLICATES2, D.UPPER, D.LOWER)

Arguments:

EXP.LIST: Um vetor de caracteres; um vetor contendo os nomes dos arquivos de leitura (.XLS/.CSV/.TXT) provenientes

preferencialmente de contadores automáticos de partículas (ex. .Z2 exportados para .XLS/.CSV/.TXT);

REPLICATES1: Um vetor de números; um vetor contendo o número de vezes que cada uma das amostras foi analisada/

numero de arquivos correspondentes a uma mesma amostra/ numero de subamostragens de cada amostra;

REPLICATES2: Um vetor de números; contendo o número de réplicas adotadas para frascos correspondentes às concentrações

iniciais, frascos controles (sem organismos) e frascos experimentais (com organismos);

D.UPPER: diâmetro superior do espectro de distribuição de tamanho da microalga empregada;

D.LOWER: diâmetro inferior do espectro de distribuição de tamanho da microalga empregada.

Value:

Retorna um vetor de números

ALL.CONCENTRATIONS: vetor contendo a concentração média de todas as contagens efetuadas para uma única amostra

no contador de partículas.

```
#### FUNÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE DADOS DO COUNTER COULTER® COMENTADA####
#####EXEMPLO: RESPOSTA FUNCIONAL ALEXANDRIUM. CF. FRATERCULUM 24H#####
```

LEGENDA DE CORES DO TEXTO:

Código em linguagem R

#Comentários

Dados inseridos pelo usuário

```
#####
```

require(plotrix) #Carrega o pacote "plotrix", necessário para o cálculo de desvios padrões

#Conferindo os arquivos dentro do diretório de trabalho;

CONCENTRATIONS.MEAN =function(REPLICATES1.G1, REPLICATES2.G1, D.UPPER,
D.LOWER){

EXP.LIST.G1 <- list.files(pattern=".XLS\$")

#Cria um vetor de caracteres contendo os nomes dos arquivos com extensão “.xls”;

REPLICATES1.G1 <- c(4, 4, 3, 4, 3, 4, 4, 4, 4, #1

5, 4, 4, 4, 2, 3, 3, 4, 4, #2

3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, #3

4, 4, 4, 4, 5, 4, 4, 4, 4, #4

4, 4, 4, 5, 4, 4, 4, 5, 5) #5

#Vetor contendo o numero exato de contagens efetuadas para cada amostra no contador de partículas;

REPLICATES2.G1 <- c(1, 4, 4, #1

1, 4, 4, #2

1, 4, 4, #3

1, 4, 4, #4

1, 4, 4) #5

#Vetor contendo o numero exato de réplicas aplicadas para amostras iniciais, frascos experimentais e frascos
controles (nesta ordem);

```
#####LEITURA DOS ARQUIVOS DE CONTAGEM#####
```

```

ALL.FILES.G1 <- list()
#Cria uma lista vazia para armazenar todos os arquivos do experimento;
for (i in 1:length(EXP.LIST.G1))
{
#Corre o vetor contendo o nome dos arquivos para armazenamento dos dados dentro da lista;

x <- read.table(EXP.LIST.G1[i], skip=37, nrows=255, header=TRUE, sep="\t")
#Lê o arquivo correspondente ao nome da posição "i" do vetor e armazena em um objeto temporário;

x1<- data.frame(x)
#Cria um data.frame com os dados do arquivo e armazena em um segundo objeto temporário;

ALL.FILES.G1[i] <- list(x1)
#Armazena o objeto temporário (data.frame) em sua respectiva posição na lista;
}

##CALCULO DAS DENSIDADES CELULARES DENTRO DE INTERVALOS DE TAMANHO ##
ALL.CONCENTRATIONS.G1 <- rep(0, each= length(ALL.FILES.G1))
#Cria um vetor nulo para armazenar os valores de densidades a serem extraídos;

for(i in 1:length(ALL.FILES.G1))
{
#Corre a lista de que contendo todos os arquivos;

x3 <- sum(ALL.FILES.G1[[i]]$X.mL[ALL.FILES.G1[[i]]$sum<( D.UPPER) &
ALL.FILES.G1[[i]]$sum>( D.LOWER)
#Extraí as densidades dentro dos intervalos de tamanho desejado para cada um dos arquivos;

ALL.CONCENTRATIONS.G1[i] <- x3
#Armazena as densidades extraídas em um novo vetor.
return(ALL.CONCENTRATIONS)
}

```

Capítulo 2

Efeitos de exsudatos de microalgas e células intactas sobre
o zooplâncton marinho de uma região costeira do Brasil

(Ubatuba, São Paulo)

3.1. Resumo

Florações de algas nocivas (FANs) afetam águas costeiras ao redor do mundo e frequentemente levam à interrupção da colheita e comercialização de frutos do mar, devido a danos potenciais à saúde humana associados ao consumo de bivalves, crustáceos e peixes contaminados. FANs são comumente causadas por dinoflagelados produtores de toxinas, os quais estão sujeitos ao controle topo-base por organismos zooplancctônicos. O principal objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de exsudatos de dinoflagelados e células intactas na sobrevivência e mobilidade de táxons zooplancctônicos de uma região subtropical (Ubatuba, Brasil). Efeitos letais foram observados em cinco dos seis táxons testados, três dos quais (náuplios de copépodes, tintinídeos e larvas de gastrópodes) quando expostos a exsudatos e dois (rotíferos e larvas de braquiúros) quando expostos a células intactas. Em adição, larvas de gastrópodes demonstraram comprometimento da mobilidade após exposição à exsudatos. Apenas larvas de poliquetas não foram aparentemente afetadas no curso dos experimentos. As respostas do zooplâncton variaram de acordo com as espécies de dinoflagelados testadas. Por exemplo, exsudatos de *Alexandrium tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. e *Gymnodinium* sp. reduziram a sobrevivência de náuplios de copepodes planctônicos, mas não afetaram náuplios de harpacticóides. Estes resultados sugerem que os eventos de FANs não causam uma mortalidade indiscriminada no zooplâncton, mas podem gerar lacunas na comunidade e complexos efeitos em cascata através de tramas tróficas bênticas e pelágicas. Monitoramentos espécie-específicos das respostas zooplancctônicas a FANs constituem então um importante passo para a compreensão das implicações ecológicas de florações de dinoflagelados em regiões costeiras e seu impacto em atividades de maricultura.

Palavras-chave: Dinoflagelados, exsudatos, florações de algas nocivas, zooplâncton, sobrevivência.

3.2. Abstract

Harmful algal blooms (HABs) affect coastal waters worldwide and very often lead to the disruption of seafood harvesting and commercialization, because of potential hazards to human health associated with the consumption of contaminated mussels, crustaceans and fish. HAB events are frequently caused by outbreaks of toxin-producing dinoflagellates, which are subject to top-down control by zooplankton. The aim of this study was to analyze the effects of dinoflagellate exudates and intact cells on the survivorship and mobility of zooplankton taxa from a subtropical location (Ubatuba, Brazil). Lethal effects were observed in five out of six taxa investigated, three of which (copepod nauplii, tintinnids and gastropod larvae) when exposed to dinoflagellate exudates and two (rotifers and brachyuran zoeae) when exposed to intact cells. In addition, gastropod larvae displayed mobility impairment during exposure to dinoflagellate exudates. Only polychaete larvae were not apparently affected during the course of the experiments. Zooplankton responses usually varied according to the dinoflagellate species tested. For instance, exudates from *Alexandrium tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. and *Gymnodinium* sp. decreased survivorship of planktonic copepod nauplii but did not affect bottom-dwelling harpacticoid nauplii, which were in turn killed by exudates from *Prorocentrum lima*, a epibenthic dinoflagellate. These results suggest that HAB events do not cause indiscriminate zooplankton mortality, but may instead generate community shifts and complex cascading effects through the pelagic and benthic food web. Species-specific monitoring of zooplankton responses to HABs is therefore a important step to understand the ecological implications of dinoflagellate outbreaks in coastal waters, and their impact on marine farming activities.

Keywords: Dinoflagellates exudates, HABs, zooplankton, survivorship.

3.3. Introdução

Nas últimas décadas tem sido testemunhado um aparente aumento em intensidade, duração e distribuição geográfica de florações de algas nocivas (FANs ou HABs - *Harmful Algal Blooms*), o qual pode estar relacionados à perturbações humanas em regiões costeiras e à mudanças climáticas globais (Chatterjet et al., 2009). Estes eventos podem causar severos impactos econômicos, ao ecossistema e à saúde humana, particularmente em regiões que carecem de monitoramentos efetivos e programas de contingência (Hallegraeff, 2010).

Os efeitos de florações de microalgas tóxicas sobre tramas tróficas marinhas por meio do consumo direto pelo zooplâncton, especialmente copépodes, são frequentemente estudados *in situ* durante episódios de florações (Kozlowsky-Suzuki et al., 2006), ou por meio de experimentos com misturas de culturas laboratoriais de microalgas tóxicas e não tóxicas (Schultz e Kiorbøe, 2009). Estes efeitos podem ser diversos e altamente espécie-específicos. Exemplos de efeitos subletais seguidos por ingestão incluem redução na alimentação, fertilidade, taxa de eclosão dos ovos, ou incapacitação fisiológica (Frangópulos et al., 2000).

Mais recentemente, estudos têm sido focados na compreensão da influência de florações de algas tóxicas sobre outros grupos pelágicos em adição a copépodes, tais como protozoários e larvas meroplânctônicas (Almeda et al., 2011). A exposição direta a células intactas ou seus exsudatos pode ter efeitos negativos, tais como redução das taxas de filtração e ingestão (Thompson, 1994), alterações comportamentais (Buskey e Stoecker, 1989; Bagøien et al., 1996), redução das taxas de sobrevivência (Hansen, 1989, 1992;

Ajuzie e Houvenaghel, 2000) e comprometimento da reprodução e recrutamento (Ajuzie, 2007).

A costa brasileira compreende toda a extensão tropical e subtropical do litoral Atlântico Sudoeste. Ao longo desta extensa costa são poucos os relatos de FANs devido à falta de continuidade em programas de monitoramento do fitoplâncton (Odebrecht et al., 2002). Recentemente, o crescimento da indústria de cultivo do bivalve *Perna perna* (Linnaeus, 1758) tem levado à estabilização de programas de monitoramento da qualidade da água e certificação da saúde de fazendas de mexilhões situadas na costa subtropical do sul do país. FANs tem recebido uma crescente atenção depois da ocorrência de um evento de envenenamento paralisante (DSP) em Santa Catarina (sul do Brasil), quando pelo menos 150 pessoas foram afetadas (Proença et al., 2007).

A produção anual de mexilhões na costa de Santa Catarina, o maior produtor de moluscos bivalves do país e o segundo maior da América Latina, aumentou de 190 para 15,635 toneladas de 1990 para 2010 (Santos et al., 2010). A pesquisa sobre FANs em águas costeiras do país é concentrada nesta região (Odebrecht et al., 2002), onde florações tóxicas (e.g. *Dinophysis cf. acuminata*, Proença et al., 2007; *Dinophysis acuminata*, Souza et al., 2009) e não tóxicas (e.g. *Alexandrium fraterculum*, Omachi et al., 2007) tem sido reportadas. Em outras regiões brasileiras, o crescimento da indústria de aquicultura e os riscos associados ao envenenamento de frutos do mar têm fomentado estudos para detecção e monitoramento de microalgas tóxicas (e.g.: Nascimento et al., 2012).

Alguns estudos e notas descrevem eventos de mortalidade da fauna bêntica na costa Sudeste do Atlântico associados com a ocorrência de dinoflagelados: (i) mortalidade de moluscos associada com *Gymnodinium* sp. (Machado, 1979), (ii) mortalidade de poliquetas, moluscos, cnidários e equinodermas associada com *Gymnodinium cf. aureolum* (Rosa e

Buselato, 1981), (iii) mortalidade de invertebrados bênticos de região interdital, principalmente bivalves, associada com *Gymnodinium cf. aureolum*, *Dinophysis acuminata* e *Noctiluca scintillans* (Garcia et al., 1994), e (iv) mortalidade de bivalves associada com *D. caudata*, *D. acuminata* e outros dinoflagelados (Méndez, 1995). Entretanto, a despeito de sua importância na compreensão da dinâmica e dos impactos de eventos de FANs, não existem estudos sobre a resposta de organismos zooplancônicos expostos a dinoflagelados potencialmente nocivos.

Experimentos laboratoriais foram conduzidos para investigar a sobrevivência e o comportamento de organismos zooplancônicos expostos a exsudatos ou células intactas de diversos dinoflagelados potencialmente nocivos. Os grupos zooplancônicos testados (náuplios de copépodes, tintinídeos, rotíferos, estágios larvais de gastrópodes, poliquetas e braquiúros) estão entre os táxons neríticos mais comuns ao longo da costa brasileira e deste modo, efeitos deletérios sobre os mesmos, poderiam facilmente ocasionar severos impactos em ecossistemas costeiros da região.

3.4. Hipóteses

- **Hipótese 1:** Táxons pertencentes ao zooplâncton marinho são diretamente afetados pela exposição à exsudatos de dinoflagelados potencialmente nocivos (efeito letal - redução da sobrevivência);

- **Hipótese 2:** Táxons pertencentes ao zooplâncton marinho são indiretamente afetados pela exposição à exsudatos de dinoflagelados potencialmente nocivos (efeito subletal - alteração da mobilidade, reprodução, recrutamento, dentre outros);

▪ **Hipótese 3:** Táxons pertencentes ao zooplâncton marinho são diretamente afetados pela exposição à culturas de dinoflagelados potencialmente nocivos (efeito letal - redução da sobrevivência);

▪ **Hipótese 4:** Espécies pertencentes ao zooplâncton marinho são indiretamente afetadas pela exposição à culturas de dinoflagelados potencialmente nocivos (efeito subletal - alteração da mobilidade, reprodução, recrutamento, dentre outros).

3.5. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o efeito letal ou subletal de exsudatos ou células intactas de dinoflagelados marinhos isolados (*Alexandrium tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. e *Gymnodinium* sp., Ubatuba, São Paulo) ou registrados (*Prorocentrum lima*, Vigo, Espanha) em águas brasileiras, sobre táxons abundantes no zooplâncton marinho de regiões costeiras do Brasil (Copepoda, Brachyura, Gastropoda, Rotifera, Polychaeta e Tintinnina).

3.6. Material e Métodos

3.6.1. Culturas de fitoplâncton

Os dinoflagelados tóxicos *Alexandrium tamiyavanichii*, isolado de Porto Seguro, Brasil, e *Prorocentrum lima*, proveniente de Vigo, Espanha, foram cedidos pelo Laboratório de Algas Nocivas (Universidade do Vale do Iatajaí - UNIVALI, Santa Catarina); *P. lima* é também registrado para águas brasileiras (Nascimento et al., 2012).

A avaliação da toxicidade das duas espécies foi reportada por Menezes et al. (2010) (cepa AIPSA, detecção de sete toxinas com predomínio de STX) e por Bravo et al. (2001) (cepa PL2V, detecção de dinophysistoxina - DTX1), respectivamente. *Gonyaulax* sp. e *Gymnodinium* sp. foram isolados da região costeira de Ubatuba e não demonstraram toxicidade em análises efetuadas para ácido ocadáico, dinofisistoxina 1 e 2, yessotoxina (Ytx), homo Ytx, 45 hyd-ytx, 45 hyd-homoYtx, azaspirácidos 1,3 e 3, pectenotoxina 1 e 2, gymnodimina e espirolídeo (Proença, comunicação pessoal). Entretanto, a possibilidade de presença de outros metabolitos bioativos não pode ser desconsiderada.

Tratamentos compostos por água do mar filtrada foram aplicados como controle; em alguns experimentos também foram incluídas microalgas não-tóxicas para a realização de comparações (Tabela 3.1). Todas as espécies de fitoplâncton foram cultivadas em meio f/2 (com adição de silicato no caso de diatomáceas), salinidade de 35 psu, intensidade luminosa de $100 \mu\text{E}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12:12 h e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 3.1. Microalgas nocivas, potencialmente nocivas, tratamentos controle e local de origem das cepas empregadas.

Tratamentos	Cepa (Local de isolamento)	Abreviações dos tratamentos	Toxicidade	Concentração (células L^{-1})
Tratamentos controle				
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Dun. Ter (Cabo Frio, Brasil)	DUN	---	1.0×10^8
<i>Isochrysis galbana</i>	Iso.g.-Th1 (Tahiti)	ISO	---	$2.0 \times 10^7 - 2.0 \times 10^{10}$
<i>Tetraselmis gracilis</i>	Tetra.g. - C1 (Cananéia, Brasil)	TET	---	$2.3 \times 10^6 - 2.2 \times 10^9$
Mistura de diatomáceas	---	DMIS	---	$5.9 \times 10^7 - 4.6 \times 10^8$
Água do mar filtrada	---	AMF	---	-
Tratamentos potencialmente nocivos				
<i>Alexandrium tamiyavanichii</i>	(Porto Seguro, Brasil)	ALEX	Positivo; Menezes et al., 2010	$2.5 \times 10^5 - 1.5 \times 10^7$
<i>Gonyaulax</i> sp.	(Ubatuba, Brasil)	GO	Negativo para diversas toxinas; ver texto	$1.1 \times 10^5 - 1.2 \times 10^7$
<i>Gymnodinium</i> sp.	(Ubatuba, Brasil)	GYM	Negativo para diversas toxinas; ver texto	$1.1 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7$
<i>Prorocentrum lima</i>	(Vigo, Espanha)	PRO	Positivo; Bravo et al. (2001)	$4.4 \times 10^5 - 8.8 \times 10^6$

3.6.2. Experimentos com exsudatos

Exsudatos foram coletados mediante filtração das culturas de microalgas através de filtros de fibra de vidro (GF/F) sobre a menor pressão possível. Antes da filtração, densidades celulares de cada cultura foram estimadas com o auxílio de um contador de partículas (*Beckman Z2 Series Coulter Counter*[®], Tabela 3.1). Filtrados foram utilizados imediatamente ou estocados antes da realização dos experimentos por intervalos inferiores a 1 hora.

Grupos zooplancctônicos foram coletados em Ubatuba (São Paulo, Brasil) com redes de plâncton de 15 ou 50 µm e copo coletor fechado, com exceção apenas de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), os quais foram obtidos de culturas do IOUSP e zoés de caranguejos (*Pachygrapsus transversus*), obtidas de fêmeas ovadas coletadas no costão rochoso da Praia do Lamberto (Ubatuba, São Paulo) antes da realização dos experimentos. Zoés foram testadas no primeiro dia de eclosão (zoea I).

Experimentos foram conduzidos em multiplacas de 12 ou 24 poços, dependendo do tamanho do grupo testado. Nos primeiros experimentos realizados (dezembro, 2010) exsudatos foram diretamente adicionados às cavidades. Em experimentos posteriores (janeiro-fevereiro, 2011), exsudatos foram primeiramente filtrados em um filtro com porosidade de 0,2 µm. Este passo foi adicionado devido à verificação de contaminação bacteriana em muitos tratamentos durante os primeiros experimentos executados. A sobrevivência e a mobilidade dos animais foram observadas sobre microscópio estereoscópico em intervalos regulares. As multiplacas foram mantidas a 23°C em fotoperíodo natural. A exposição à luz solar direta foi evitada.

A Tabela 3.2 sumariza as incubações em exsudatos, conduzidas com náuplios de copépodes (*Acartia lilljeborgii*, *Paracalanus* sp. e *Longipedia* sp.), tintínídeos (*Favella*

ehrenbergii), rotíferos (*B. plicatilis*), larvas de gastrópodes (larvas não identificadas) e larvas de poliquetas (trocóforas não identificadas).

Tabela 3.2. Informações gerais sobre experimentos com exsudatos. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

Data	Taxas zooplancônicas	# réplicas	# indivíduos	Treatments	Período de incubação (h)
Dez 02, 2010	<i>Acartia lilljeborgii</i>	6	10	DUN, DMIS, AMF, GO, ISO, PRO, TAM, TET	22.6 – 29.6
Dez 04, 2010	<i>Longipedia</i> sp.	6	10	AMF, GO, PRO, TAM, TET	31.9 – 36.3
Dez 05, 2010	<i>Favella ehrenbergii</i>	6	10	AMF, GO, PRO, TAM	23.8 – 24.9
Dez 08, 2011	<i>Paracalanus</i> sp.	6	10	AMF, GO, GYM, ISO, TAM, TET	30.5 – 32.5
Jan 24, 2011	<i>Brachionus plicatilis</i> (adultos)	6	10	AMF, GO, PRO, ISO, TAM, TET	28.5 – 35.4
Jan 26, 2011	<i>B. plicatilis</i> (juvenis)	6	10	DMIS, AMF, GO, PRO, ISO, TAM, TET	47.7 – 50.5
Fev 23, 2011	Larvas de Gastropoda	4	10	AMF, GO, GYM, TAM	33.4 – 39.6
Fev 23, 2011	Larvas de Polychaeta	12	1	AMF, GO, GYM, TAM, TET	32.3 – 35.6

Ortonáuplios de copépodes foram separados de amostras recentes (coletadas no mesmo dia) e alimentados com *Isochrysis galbana* antes do início dos experimentos (aproximadamente 10h). No caso de tintinídeos, taxas de sobrevivência foram ajustadas considerando os novos indivíduos produzidos por reprodução assexuada durante as incubações. Juvenis e fêmeas de rotíferos foram separados por tamanho, ou seja, organismos de tamanhos similares ao de rotíferos recém-eclodidos foram selecionados como juvenis, ao passo que organismos de tamanho maior e/ou portando ovos foram identificados como fêmeas. Fêmeas foram também separadas em amícticas (provenientes de reprodução partenôgênica) ou mícticas (provenientes de reprodução sexuada), exceto para o primeiro experimento, no qual as mesmas foram utilizadas em combinação. Larvas de gastrópodes foram separadas em duas classes de tamanho: véligers pequenos, usados em experimentos com exsudatos e véligers maiores, aplicados em experimentos com células intactas. Para os experimentos com larvas de poliquetas, foram selecionados indivíduos de

tamanho médio. Tratamentos com aparente contaminação bacteriana foram excluídos das análises.

Quando possível, a porcentagem de saturação de oxigênio dissolvido foi verificada mediante aferição com um sensor de membrana no término dos experimentos. Períodos de incubação foram determinados com base em dois critérios: (i) ocorrência de elevada mortalidade (valores mínimos de 60%; comumente entre 80 e 100%) em um tratamento composto por células ou exsudatos de uma microalga potencialmente nociva em contraste com elevada sobrevivência em um dos tratamentos controle, e (ii) para os casos nos quais nenhum efeito adverso foi verificado após aproximadamente 30h de incubação, cavidades foram monitoradas até a verificação de proliferação bacteriana (tipicamente entre 48 e 60 horas), evidenciada pela detecção de um biofilme na interface ar-água da cavidade.

3.6.3. Experimentos com células intactas

Rotíferos, larvas de gastrópodes (maiores) e zoés de caranguejo foram expostas a células intactas de fitoplâncton sobre concentrações em níveis de saturação ($1000 \mu\text{g C L}^{-1}$) (Table 3.3). Biovolumes celulares (μm^{-3}) foram estimados com base em medidas realizadas com contador de partículas e o conteúdo celular em carbono foi então calculado com base em fatores de conversão (Edler, 1979). Larvas de gastrópodes e fêmeas amícticas carregando ovos foram incubadas individualmente em multiplacas com 12 cavidades. Dez réplicas foram aplicadas para cada tratamento. Para zoés de caranguejo, experimentos foram conduzidos em multiplacas com seis cavidades com seis réplicas para cada tratamento. Placas foram mantidas sob iluminação durante todo o período experimental para permitir a realização de fotossíntese e produção de oxigênio. Tratamentos com aparente contaminação com bactérias foram desconsiderados nas análises. Períodos de

incubação foram determinados de acordo com o mesmo critério descrito para os experimentos conduzidos com exsudatos.

Tabela 3.3. Informações gerais sobre experimentos com células intactas. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

Data	Grupo Taxonômico	Tratamentos	Período de incubação (h)
Dez 6, 2010	Larvas de Gastropoda (tamanho maior)	DUN, AMF, GO, PRO, TAM, TET	44.8 - 45.3
Dez 7, 2010	Zoés de Brachyura (<i>Pachygrapsus transversus</i>)	DUN, AMF, GO, TAM, TET	36.3
Fev 13, 2011	Rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i> , fêmeas amícticas)	AMF, GO, GYM, ISO, TAM, TET	55.9

3.7. Resultados

3.7.1. Exposição à exsudatos de microalgas

Náuplios de *A. lilljeborgii* incubados em água do mar filtrada ou exsudatos de misturas de diatomáceas, *D. tertiolecta*, *I. galbana* e *T. gracilis* demonstraram mortalidade relativamente baixas (entre 2 e 23%) depois de 25h de incubação. Em comparação, exsudatos de *P. lima* levaram a taxas de mortalidades maiores (31%). Os efeitos mais expressivos foram encontrados para exsudatos de *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp., os quais causaram 88 - 100% de mortalidade dentro de um período de 29,6 horas de exposição (Figura 3.1 A). Para náuplios de *Longipedia*, somente exsudatos de *P. lima* causaram elevada mortalidade em comparação com água do mar filtrada e outros tratamentos (70% dos náuplios morreram depois de 35 horas de exposição) (Figura 3.1 B). Para náuplios paracalanídeos, exsudatos de *A. tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. e *Gymnodinium* sp. resultaram em uma redução na sobrevivência, quando em comparação com água do mar filtrada e exsudatos de *T. gracilis* (Figura 3.1 C). Para *A. tamiyavanichii* também foi observada paralização dos náuplios, os quais ficaram imóveis e com as antenas contorcidas

para cima por vários minutos antes de falecerem. Tintinídeos da espécie *F. ehrenbergii* foram fortemente afetados por exsudatos de *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp., com decréscimos na sobrevivência de 10 a 20% dentro de 25 horas (Figura 3.1 D); em contraste, incubações em água do mar filtrada ou exsudatos de *P. lima* resultaram em elevada sobrevivência (aproximadamente 75%).

Figura 3.1. Experimentos com exsudatos relacionados a efeitos letais. Sobrevivência de *A. lilljeborgi* (A), *Longipedia* (B), náuplios de Paracalanidae (C) e tintinídeos (*F. ehrenbergii*) (D) como função da exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de fitoplâncton. Barras verticais: erro padrão considerando seis réplicas. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

A mobilidade de larvas de gastrópodes pequenos foi reduzida para 55% em água do mar filtrada após 35 horas de incubação (Figura 3.2 A), embora sua sobrevivência tenha sido fortemente afetada (Figura 3.2 B). A exposição à exsudatos de *A. tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. e *P. lima* foi responsável por uma redução acentuada da mobilidade e da sobrevivência (Figura 3.2 A-B).

Figura 3.2. Experimentos com exsudatos relacionados a efeitos subletais. Mobilidade (A – porcentagem de indivíduos em natação) e sobrevivência (B – porcentagem de indivíduos vivos) de larvas de gastrópodes como função do tempo de exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de fitoplâncton. Barras verticais: erro padrão considerando seis réplicas. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

Exsudatos de *A. tamiyavanichii* imobilizaram todos os indivíduos dentro de um dia e exsudatos de *Gonyaulax* sp. e *Gymnodinium* sp. reduziram as porcentagens de indivíduos ativos para 3 e 17%, respectivamente. A retração visceral em larvas de gastrópodes foi também observada durante a exposição à exsudatos de *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp. Ao final do experimento, somente 34 a 48% dos véligers permaneceram vivos nos três tratamentos citados.

Efeitos nocivos não foram detectados para fêmeas e juvenis de *B. plicatilis*, para os quais taxas de sobrevivência permaneceram elevadas ($\geq 90\%$) e comparáveis com as taxas verificadas para organismos incubados apenas em água do mar filtrada (Figura 3.3 A-B).

A sobrevivência de larvas de poliquetas em exsudatos de dinoflagelados foi reduzida para 75-85% depois de 27 horas, mas permaneceu estável nas horas subsequentes de observação (Figura 3.3 C); efeitos sobre a mobilidade não foram aparentes.

Figura 3.3. Experimentos com exsudatos não relacionados a efeitos nocivos. Sobrevivência de fêmeas míticas e amíticas (A) e juvenis (B) de rotíferos (*B. plicatilis*) e de larvas de poliquetas (C), como função do tempo de exposição a diferentes tratamentos compostos por exsudatos de dinoflagelados. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

3.7.2. Exposição à células intactas

Larvas maiores de gastrópodes não mostraram sensibilidade à exposição à dinoflagelos quando taxas de sobrevivência são comparadas com as verificadas para água do mar filtrada ou outras microalgas (Figura 3.4). Entretanto, *A. tamiyavanichii* e

Gymnodinium sp. ocasionaram um efeito negativo sobre fêmeas amícticas de *B. plicatilis* (Figura 3.4 B), reduzindo sua sobrevivência a 0 e 17%, respectivamente.

Figura 3.4. Experimentos com células intactas. Sobrevivência de larvas de gastrópodes (véligers maiores) (A), fêmeas amícticas de rotíferos (*B. plicatilis*) (B) e zoés de caranguejos (*P. transversus*) (C) como função do tempo de exposição a diferentes tratamentos com células fitoplanctônicas intactas. Abreviações dos tratamentos como apresentadas na Tabela 3.1.

Para o mesmo experimento, a mortalidade verificada em água do mar filtrada, similar à observada para *Gonyaulax* sp., indica a ocorrência de efeitos deletérios por escassez de alimento. Zoés de caranguejo não foram afetadas por *Gonyaulax* sp., mas todas

as larvas incubadas em *A. tamiyavanichii* morreram depois de 23 horas de incubação (Figura 3.4 C). Antes da morte, foram observadas mudanças no comportamento natatório incluindo movimentos erráticos e redução da mobilidade.

3.8. Discussão

O zooplâncton pode ser afetado por microalgas potencialmente nocivas quando as mesmas são ingeridas, mas ainda que determinadas espécies não sejam capazes de predar sobre uma floração (devido ao tamanho inadequado das microalgas presentes ou desenvolvimento de predação seletiva) a exposição a estas microalgas pode causar impactos negativos, como sumarizados na Tabela 3.4 (Sessão 3.10. Anexo).

Exsudatos testados nos experimentos foram coletados de culturas densas de dinoflagelados (e.g.: $2,5 \times 10^5$ a $1,7 \times 10^7$ células L^{-1} de *A. tamiyavanichii*), sendo que as concentrações mais baixas aplicadas estiveram próximas de condições de floração, conforme os registros para a costa brasileira (*A. tamarensis*, 2×10^5 células L^{-1} , Odebrecht et al., 1997; *A. fraterculum*, $7,0 \times 10^4$ to $8,8 \times 10^5$ cells L^{-1} , Omachi et al., 2007). Microalgas produtoras de toxinas podem frequentemente se agregar em camadas finas (Sullivan et al., 2010), onde concentrações celulares podem ser tão altas quanto 10^5 - 10^7 células L^{-1} (Rines et al., 2010). Deste modo, pode-se considerar que os experimentos foram conduzidos sobre concentrações possivelmente experienciadas pelo zooplâncton em condições de campo.

Em experimentos com exsudatos, náuplios de copépodes, tintínídeos e véligers pequenos sofreram uma mortalidade substancialmente maior em tratamentos provenientes de culturas de dinoflagelados em comparação com água do mar filtrada ou outras

microalgas, indicando claramente um efeito tóxico em adição a possíveis interferências pela escassez de alimento (Figuras 3.1 e 3.2).

A mortalidade após exposição à exsudatos de *P. lima*, também como inativação naupliar durante a exposição à exsudatos de *Alexandrium*, como descrito anteriormente, foram reportados por Ajuzie e Houvenaghel (2000) para náuplios de *Artemia salina*, e por Bagøien et al. (1996) para náuplios de *Euterpina acutifrons* (Table 3.4), respectivamente. Este resultado contrasta com as observações obtidas para indivíduos adultos, as quais comumente revelam sensibilidade a exsudatos somente após longos períodos de exposição, como por exemplo, cinco dias para (*A. minutum*, Bagøien et al., 1996).

Náuplios de copépodes morreram em períodos de tempo surpreendentemente pequenos. Enquanto Bagøien et al. (1996) encontraram uma inatividade máxima de 52% para *E. acutifrons* após três dias de incubação, no presente estudo, foram observadas taxas de mortalidade de náuplios de copépodes variando de 70 a 100% após cerca de apenas 30 horas de exposição à exsudatos de dinoflagelados (Figura 3.4 C). Estes resultados suportam a hipótese de que a liberação de toxinas pode não representar um mecanismo de defesa efetivo contra copépodes adultos (Barreiro et al., 2007), sendo a inibição do desenvolvimento naupliar pela exposição à exsudatos potencialmente nocivos uma importante estratégia de sobrevivência de dinoflagelados via supressão de futuras populações de predadores (Tester e Turner, 1997). Esta estratégia inclui os efeitos bem conhecidos sobre o desenvolvimento embrionário levando ao comprometimento do sucesso de eclosão dos náuplios (Frangópulos et al., 2000).

Os efeitos de exsudatos de *Alexandrium* sobre o tintínídeo *F. ehrenbergii* foram previamente estudados por Hansen (1989), Hansen et al., (1992), Hansen et al., (2004) e Fulco (2007) (Tabela 3.4), os quais observaram uma recorrente alteração comportamental:

reversão do batimento ciliar e natação contínua para trás, com subsequente morte. Usando o mesmo desenho experimental, os resultados encontrados no presente estudo indicaram redução na sobrevivência após a exposição à exsudatos de microalgas, sem alterações aparentes no comportamento natatório, a despeito da progressiva letargia. Esta observação pode ser associada à variações na toxicidade de diferentes espécie de *Alexandrium* e cepas investigadas. Embora os efeitos sobre tintinídeos sejam agudos sobre condições experimentais, eles parecem não ser aparentes em campo, talvez pela capacidade de excreção de toxinas após determinados períodos de interação com a presa (*A. minutum*; 24 horas de interação; Kamiyama e Suzuki, 2006).

Embora véligers maiores demonstrem resistência aos dinoflagelados (Figura 3.4 - experimentos com células intactas), véligers pequenos foram sensíveis (Figura 3.2 - experimentos com exsudatos). Deste modo, se uma floração de microalgas coincidir com a fase de recrutamento larval, a população de gastrópodes poderia sofrer severos impactos. As observações relativas à alterações comportamentais de larvas maiores após a ingestão, designadas como “morbidez” (retração visceral), estão de acordo com os resultados de Juhl et al. (2008) (Tabela 3.4).

Alguns dos grupos zooplânctônicos testados não foram adversamente afetados pelos tratamentos aplicados. Alguns estádios de rotíferos (fêmeas míticas e amíticas adultas e juvenis) e larvas de poliquetas, por exemplo, demonstraram-se resistentes à possível liberação de toxinas, não exibindo qualquer efeito após exposição (Figura 3.3). Por outro lado, a exposição a células intactas levou a uma acentuada mortalidade de rotíferos (amíticas) e zoés de caranguejos (Figura 3.4).

A sensibilidade de zoés de decápodes a espécies de *Alexandrium* potencialmente nocivas foi também descrita por Hinz et al. (2001), Sulkin e Perez (2005), Garcia et al.

(2011) (Tabela 3.4) e Sulkin et al. (2003). Ainda que as espécies de dinoflagelados testadas sejam diferentes, perturbações locomotoras, concomitantes com reduções nas taxas de consumo de oxigênio, são consistentes com os resultados de Sulkin et al. (2003). Para larvas de poliquetas, nossos resultados coincidem com os reportados por Winson (1981), onde exsudatos e células intactas de dinoflagelados pertencentes aos gêneros *Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Prorocentrum* e *Scrippsiella* não ocasionaram efeito nas larvas examinadas (Tabela 3.4).

Náuplios de *Acartia* e *Paracalanus* foram fortemente afetados por exsudatos de *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp., mas não por exsudatos de *P. lima*. Por outro lado, náuplios de *Longipedia* foram fortemente afetados por exsudatos de *P. lima*, mas não pelos outros. Este resultados sugerem que exsudatos de *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp. possuem substâncias tóxicas similares (comumente toxinas PSP - Tabela 3.5), as quais devem ser diferentes dos compostos provenientes de *P. lima* (comumente toxinas DSP - Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Características do perfil de toxinas das espécies de dinoflagelados analisadas no presente estudo.

Espécie de dinoflagelado (cepa)	Toxinas	Referências
<i>Alexandrium tamiyavanichii</i> (A1PSA)	STX (3.4 pg cell ⁻¹ - 67.06%) neoSTX (0.39 pg cell ⁻¹) GTX4 (1.6139 pg cell ⁻¹) GTX3 (baixas concentrações) dcGTX2 (baixas concentrações) dcGTX3 (baixas concentrações)	Menezes et al. (2010)
<i>Gymnodinium</i> sp.	Toxinas PSP	Hallegraeff (2004)
<i>Gonyaulax</i> sp.	Yessotoxinas	Rhodes et al. (2006)
<i>Prorocentrum lima</i> (PL2V)	OA (8.75 pg cell ⁻¹) OA ester (8.11 pg cell ⁻¹) DTX (3.02 pg cell ⁻¹)	Bravo et al. (2001)

Diferenças nos perfis de toxicidade das duas espécies podem também refletir as diferenças nos ciclos de vida destes organismos: enquanto *P. lima* está presente na coluna de água, células da espécie também demonstram tendência à viverem aderidas a macroalgas (Foden et al., 2005), e *Longipedia*, como uma copépode harpacticóide tende a residir próximo ao fundo. A associação espacial entre *P. lima* e *Longipedia* no ambiente pode ter levado ao desenvolvimento de uma toxicidade específica para *Longipedia*. De foram similar, para os dinoflagelados planctônicos *A. tamiyavanichii* e *Gonyaulax* sp. o desenvolvimento de efeitos tóxicos podem ser específicos para predadores presentes na coluna de água.

A acentuada variação dos efeitos sobre organismos zooplanctônicos como os detectados nos experimentos do presente estudo destacam que a propagação de efeitos de florações de microalgas potencialmente nocivas em ecossistemas da costa Brasileira poderia não ser uniforme. Dependendo das espécies envolvidas, florações poderiam dizimar determinadas espécies do zooplâncton, sem que alterações fossem observadas em comunidades compostas por espécies mais resistentes. Florações de *A. tamiyavanichii*, *Gonyaulax* sp. ou *Gymnodinium* sp., por exemplo, poderiam favorecer espécies como *Longipedia* e larvas de poliquetas, ao passo que florações de *P. lima* poderiam afetar grupos harpacticóides, mas expressar efeitos relativamente menores em outras espécies zooplanctônicas. Mudanças na composição de espécies zooplanctônicas poderiam então repercutir em efeitos ao longo das tramas tróficas. A obtenção de respostas táxon-específicas também aponta para a necessidade de desenvolvimento de estratégias de monitoramento, avaliação e mitigação espécie-específicas. Ainda que eventos de florações tenham sido tratados com infrequentes ou inexistentes na maior parte das áreas da costa Brasileira (Odebrecht et al., 2002), um elevado número de eventos tem sido registrados

para os últimos 10 anos, levando, em alguns casos, à suspensão da colheita e comercialização de mexilhões em áreas afetadas (Souza et al., 2009). Neste contexto, informações sobre interações ecológicas sobre espécies fitoplanctônicas potencialmente nocivas, zooplâncton e outros componentes da cadeia alimentar são de extrema importância para o manejo adequado e o crescimento de atividades de aquicultura no país.

3.9. Referências bibliográficas

- AJUZIE, C. C. Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 513-519, 2007.
- AJUZIE, C. C.; HOUVENAGHEL, G. T. *Prorocentrum lima* (Microalgae: Dinoflagellata): killer food for zooplankton. **C.M. - International Council for the Exploration of the Sea, CM 2000(M:01)**, Copenhagen: ICES[s.l.], p. 8, 2000.
- ALMEDA, R.; MESSMER, A. M.; SAMPEDRO, N., GOSSELIN, L. A. Feeding rates and abundance of marine invertebrate planktonic larvae under harmful algal bloom conditions off Vancouver Island. **Harmful Algae**, v. 10, p. 194-206.
- BAGØIEN, E.; MIRANDA, A.; REGUERA, B.; FRANCO, J. M. Effects of two paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. **Mar. Biol.**, v. 126, p. 361-369, 1996.
- BARREIRO, A.; GUISANDE, C.; MANEIRO, I.; VERGARA, A. R.; RIVEIRO, I.; IGLESIAS, P. Zooplankton interactions with toxic phytoplankton: Some implications for food web studies and algal defense strategies of feeding selectivity behaviour, toxin dilution and phytoplankton population diversity. **Acta Oecologica**, v. 32, p. 279-290, 2007.
- BRAVO, I.; FERNÁNDEZ, M. L.; RAMILO, I.; MARTÍNEZ, A. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). **Toxicon**, v. 39, p. 1537-1545, 2001.
- BUSKEY, E. J.; STOECKER, D. K. Behavioral responses of the marine tintinnid *Favella* sp. to phytoplankton: influence of chemical, mechanical and photic stimuli. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 132, p. 1-16, 1989.
- CHATTERJET, S.; VENTURINO, E.; CHAKRABORTY, S.; CHATTOPADHYAY, J. A simple mathematical model for seasonal planktonic blooms. **Math. Meth. Appl. Sci.** v. 32, p. 1738-1750, 2009.
- COLIN, S. P.; DAM, H. G. Comparison of the functional and numerical responses of resistant versus non-resistant populations of the copepod *Acartia hudsonica* fed the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. **Harmful Algae**, v. 6, p. 875-882, 2007.
- EDLER, L. (Ed). Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. **Baltic Mar. Biol. Publ.**, v. 5, p. 1-38, 1979.

FODEN J, PURDIE DA, MORRIS S, NASCIMENTO S. Epiphytic abundance and toxicity of *Prorocentrum lima* populations in the Fleet Lagoon, UK. **Harmful algae**, v. 4, p. 1063-1047, 2005.

FRANGÓPULOS, A.; GUISANDE, C.; MANEIRO, I.; RIVEIRO, I.; FRANCO, J. Shortterm and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 203, p. 161-169, 2000.

FULCO, V. K. Harmful effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the tintinnids *Favella taraikaensis* and *Eutintinnus sp.* **J. Mar. Biol. Ass. U.K.**, v. 87, p. 1085-1088, 2007.

GARCIA, R.; SULKIN, S.; LOPEZ, M. Effects on larval crabs of exposure to algal toxin via ingestion of heterotrophic prey. **Mar. Biol.**, v.158: 451-460, 2011.

GARCIA, V. M. T.; ODEBRECHT, C.; RÖRIG, L. R. Florações nocivas do fitoplâncton na costa brasileira. In: **Taller Regional de planificación científica sobre floraciones algales nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo, 101**, Montevideo: Comisión Oceanográfica Intergubernamental, p. 9-14, 1994.

HALLEGRAEFF, G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. **J. Phycol.**, v. 46, p. 220-235, 2010.

HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: a global overview. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M., CEMBELLA, A. D. (Eds.). **Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on oceanographic methodology 11**, France: UNESCO, p. 25-49, 2004.

HANSEN, P. J. The red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarense*: effects on behaviour and growth of a tintinnid ciliate. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 53, p. 105-116, 1989.

HANSEN, P. J.; CEMBELLA, A. D.; MOESTRUP, Ø. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. **J. Phycol.**, v. 28, p. 597-603, 1992.

IGNOFFO, T. R.; BOLLENS, S. M.; BOCHDANSKY, A. B. The effects of thin layers on the vertical distribution of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 316, p. 167-181, 2005.

JUHL, A. R.; MARTINS, C. A.; ANDERSON, D. M. Toxicity of *Alexandrium lusitanicum* to gastropod larvae is not caused by paralytic-shellfish-poisoning toxins. **Harmful Algae**, v. 7, p. 567-573, 2008.

KAMIYAMA, T., SUZUKI, T. Lack of accumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in the tintinnid ciliate *Favella taraikaensis* feeding on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 317, p. 57-65, 2006.

KIM, D.; SATO, Y.; ODA, T.; MURAMATSU, T.; MATSUYAMA, Y.; HONJO, T. Specific Toxic effect of dinoflagellate *heterocapsa circularisquama* on the Rotifer *Brachionus plicatilis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 12, p. 2719-2722, 2000.

KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; CARLSSON, P.; RUHL, A.; GRANÉLI, E. Food selectivity and grazing impact on toxic *Dinophysis* spp. by copepods feeding on natural plankton assemblages. **Harmful Algae**, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2006.

KUBANEK, J.; SNELL, T. W.; PIRKLE, C. Chemical defense of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* against rotifer grazing. **Limnol. Oceanogr.**, v. 52, n. 3, p. 1026-1035, 2007.

MÉNDEZ, S. Bivalve mortality on Southwest Atlantic shores. **Harmful Algae News**, v. 10, p. 11-12, 1995.

MENEZES, M.; VARELA, D.; PROENÇA, L. A. O.; TAMANAHA, M. S.; PAREDES, J. Identification of the toxic alga *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) from northeastern Brazil: a combined morphological and rDNA sequence (partial LSU and ITS) approach. **J. Phycol.**, v. 46, p. 1-13, 2010.

NASCIMENTO, S. M.; DINIZ, B. S.; GUIOTI, A. A.; MENEGUELI, C.; MENEZES, M. First record of the ciguatera causing genus *Gambier discus* in Brazil. **Harmful Algal News**, v. 45, p. 8-9, 2012.

ODEBRECHT, C.; AZEVEDO, S. M. F. O.; GARCIA, V. M. T.; HUSZAR, V. L. M.; MAGALHÃES, V. F.; MENEZES, M.; PROENÇA, L. A. O.; RÖRIG, L. R.; TENENBAUM, D. R.; VILLAC, M. C.; YUNES, J. S. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERA, B. (EDs.) **Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano Instituto Español de Oceanografía**, Vigo, p. 219-233, 2002.

ODEBRECHT, C.; MÉNDEZ, S.; GARCIA, V. M. T. Oceanographic processes and harmful algae blooms in the Subtropical Southwestern Atlantic (28° 36°S). In: **VIII International Conference on Harmful Algae**, Abstracts, Vigo, p. 52, 1997.

OMACHI, C. Y.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. Bloom of *Alexandrium fraterculum* in coastal waters off Itajaí, SC, southern Brazil. **Braz. J. Oceanogr.**, v. 55, n. 1, p. 57-61, 2007.

PEREZ, M. F.; SULKIN, S. D. Palatability of autotrophic dinoflagellates to newly hatched larval crabs. **Mar. Bio.**, v. 146, p. 771-780, 2005.

PROENÇA, L. A. O.; SCHRAM, M. A.; TAMANAHA, M. S.; ALVEZ, T. P. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. **Harmful Algal News**, v. 33, p. 19-20, 2007.

RHODES, L.; MCNABB, P.; SALAS, M.; BRIGGS, L.; BEUZENBERG, V.; GLADSTONE, M. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. **Harmful Algae**, v. 5, p. 148-55, 2006.

RINES, J. E. B.; MCFARLAND, M. N.; DONAGHAY, P. L.; SULLIVAN, J. M. Thin layers and species-specific characterization of the phytoplankton community in Monterey Bay, California, USA. **Cont. Shelf. Res.**, v. 30, p. 66-80, 2010.

ROSA, Z. J.; BUSELATO, T. C. Sobre a ocorrência de floração de *Gyrodinium aureolum* Hulburt (Dinophyceae) no litoral sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 28, p. 169-179, 1981.

SANTOS, A. A.; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; RUPP, G. S.; SOUZA, R. V.; COSTA, S. W. In: EPAGRI. **Síntese Informativa da Maricultura 2010**, 2010. Disponível em: <http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=doc_viewandgid=357&dtmpl=component&format=raw&ItemId=173> Acesso em 25 abri. 2012.

SCHULTZ, M.; KIØRBOE, T. Active prey selection in two pelagic copepods feeding on potentially toxic and non-toxic dinoflagellates. **J. Plank. Res.**, v. 31, n. 5, p. 553-561, 2009.

SOUZA, R. V.; NOVAES, A. L. T.; SANTOS, A. A., RUPP, G. S.; SILVA, F. M. Controle Higiênico-sanitário de moluscos bivalves do Litoral de Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, v. 116, p. 55-59, 2009.

SULKIN, S.; HINZ, S.; RODRIGUEZ, M. Effects of exposure to toxic and non-toxic dinoflagellates on oxygen consumption and locomotion in stage 1 larvae of the crabs *Cancer oregonensis* and *C. magister*. **Mar. Biol.**, v. 142, p. 205-211.

SULLIVAN, J. M.; HOLLIDAY, D. V.; MCFARLAND, M.; MACMANUS, M.; CHERITON, O. M.; BENOIT-BIRD, K. J.; WANG, L. G.; RYAN, J. P.; STACEY, M.; GREENLAW, C.; MOLINE, M. A. Layered organization in the coastal ocean: An introduction to planktonic thin layers and the LOCO project. **Cont. Shelf. Res.**, v. 30, p. 1-6, 2010.

THOMPSON, P. A.; MONTAGNES DJS, SHAW BA, HARRISON PJ. The influence of three algal filtrates on the grazing rate of larval oysters (*Cassostrea gigas*), determined by fluorescent microspheres. **Aquaculture**, v. 119, p. 237-247, 1994.

TURNER, J. T.; TESTER, P. A. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, n. 5, p. 1203-1214, 1997.

VAN DOLAH, F. M. Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence. **Environ. Health Persp.**, v. 108, n. 1, p. 133-141, 2000.

WANG, L.; YAN, T.; YU, R.; ZHOU, M. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Harmful Algae**, v. 4, p. 371-382, 2005.

WILSON, D. P. An experimental search for phytoplanktonic algae producing external metabolites which condition natural seawaters. **J. Mar. Biol. Ass. U. K.**, v. 61, p. 585-607, 1981.

3.10. Anexo

Tabela 3.4. Revisão dos efeitos de células intactas e exsudatos de gêneros de dinoflagelados sobre o zooplâncton, incluindo somente os táxons considerados no presente estudo. Adv.: Efeito adverso (letal ou subletal). N: Ausência de efeito. (---): Não execução de experimentos (não se aplica).

Táxon zooplanctônico	Espécie de dinoflagelado	Cepa	Espécies do zooplâncton	Células intactas	Exsudatos	Autor (Ano)
Tintinnina	tóxico <i>A. tamarens</i>	Ply173a	<i>Favella ehrenbergii</i>	Adv.	Adv.	Hansen (1989)
		LF1		Adv.	Adv.	
		LF2		Adv.	Adv.	
		LF3		Adv.	Adv.	
		LF4		Adv.	Adv.	
		Wh7		Adv.	N	
	tóxico <i>A. ostensfeldii</i>	LF37	<i>Favella taraikaensis</i>	Adv.	Adv.	Hansen et al (1992)
		LF38		Adv.	Adv.	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	AT2B	<i>Eutintinnus</i> sp. <i>Favella taraikaensis</i>	N	N	Fulco (2007)
				Adv.	N	
tóxico <i>A. tamiyavanichii</i> não tóxico <i>Gonyaulax</i> sp.	---	<i>Favella ehrenbergii</i>	---	Adv.	Presente estudo	
	---		---	Adv.		
Gastropoda (larva)	tóxico <i>A. minutum</i>	18-1T	<i>Nassarius</i> sp.	Adv.	N	Julh et al (2008)
	não tóxico <i>A. minutum</i>	18-1NT			N	
	tóxico <i>A. tamiyavanichii</i> não tóxico <i>Gonyaulax</i> sp. não tóxico <i>Gymnodinium</i> sp.	---	---	N	Adv.	Presente estudo
		---		N	Adv.	
		---		N	Adv.	
Rotifera	tóxico <i>A. minutum</i>	---	<i>Brachionus plicatilis</i>	N	---	Wang et al (2005)
	tóxico <i>A. minutum</i>	---		N	---	
	não tóxico <i>A. tamarens</i>	AT-6		N	---	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	ATHK#		Adv.	---	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	AT5-1#		Adv.	---	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	AT5-3#		Adv.	---	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	ATCI02#		Adv.	---	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	ATCI03#		Adv.	---	
	tóxico <i>Alexandrium</i> sp. 1	---		Adv.	---	
	tóxico <i>Alexandrium</i> sp. 2	---		Adv.	---	
	tóxico <i>Alexandrium</i> sp. não tóxico <i>Gonyaulax</i> sp. não tóxico <i>Gymnodinium</i> sp.	---		Adv.	N	Presente estudo
		---		Adv.	N	
		---		Adv.	N	
Brachyura (zoé I)	tóxico <i>A. fundyense</i>	1719 (Af)	<i>Cancer magister</i>	Adv.	Adv.	Hinz et al (2001)
				Adv.	Adv.	
	tóxico <i>A. tamarens</i>	115 (A5)	<i>Glebocarcinus oregonensis</i>	Adv.	N	
			<i>Cancer magistes</i>	Adv.	N	
			<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Adv.	N	
			<i>Rhinolithodes wosnessenskii</i>	Adv.	N	
			<i>Glebocarcinus oregonensis</i>	Adv.	N	
	não tóxico <i>A. tamarens</i>	118 (A8)				

		<i>Cancer magistes</i>	Adv.	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Adv.	---	
		<i>Rhinolithodes</i>	Adv.	---	
		<i>wosnessenskii</i>			
não tóxico <i>G. spinifera</i>	409 (Gs)	<i>Cancer magister</i>	N	---	Perez & Sulkin (2005)
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N		
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
não tóxico <i>A. catenella</i>	1911 (Ac)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
tóxico <i>A. fundyense</i>	1719 (Af)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
não tóxico <i>A. tamarensis</i>	115 (A5)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
tóxico <i>A. tamarensis</i>	118 (A8)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
tóxico <i>G. catenatum</i>	1937 (G37)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
não tóxico <i>G. catenatum</i>	1940 (G40)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		
tóxico <i>A. andersoni</i>	1718 (Aa)	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Adv.	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	Adv.		
tóxico <i>A. fundyense</i>	1719 (Af) CCMP	<i>Cancer magister</i>	N	---	
		<i>Cancer oregonensis</i>	N	---	
		<i>Cancer productos</i>	N	---	
		<i>Cancer gracilis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	N	---	
		<i>Hemigrapsus nudus</i>	N		

	tóxico <i>A. andersonii</i>	1718 (Aa)	<i>Glebocarcinus oregonensis</i>	Adv.	---	Garcia et al (2011)
			<i>Cancer magistes</i>	Adv.	---	
			<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Adv.	---	
	tóxico <i>A. fundyense</i>	1719 (Af)	<i>Glebocarcinus oregonensis</i>	Adv.	---	
			<i>Cancer magistes</i>	Adv.	---	
			<i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Adv.	---	
	tóxico <i>Alexandrium</i> sp.	---	<i>Pachygrapsus transversus</i>	Adv.	---	Presente estudo
	non tóxico <i>Gonyaulax</i> sp.	---		N	---	
Copepoda	<i>Gymnodinium simplex</i>	---	<i>Calanus pacificos</i>	N	---	Huntley et al (1987)
Copepoda	tóxico <i>A. minutum</i>	A12V	<i>Euterpina acutifrons</i>	Adv.	Adv.	Bagøien et al (1996)
	tóxico <i>G. catenatum</i>	GC7B		Adv.	---	
	tóxico <i>A. minutum</i>	A11V		Adv.	---	
	tóxico <i>A. tamiyavanichii</i>	---	<i>Acartia lilljeborgii</i>	---	Adv.	Presente estudo
			<i>Longipedia</i> sp.	---	N	
			<i>Paracalanus</i> sp.	---	Adv.	
	non tóxico <i>Gonyaulax</i> sp.	---	<i>Acartia lilljeborgii</i>	---	Adv.	
			<i>Longipedia</i> sp.	---	N	
			<i>Paracalanus</i> sp.	---	Adv.	
	tóxico <i>Prorocentrum lima</i>	---	<i>Acartia lilljeborgii</i>	---	N	
			<i>Longipedia</i> sp.	---		
			<i>Paracalanus</i> sp.		Adv.	

Considerações finais e perspectivas

4. Considerações finais e perspectivas

A presente dissertação teve como foco principal avaliar, com base em diferentes estratégias experimentais, a influência de microalgas potencialmente nocivas isoladas de águas brasileiras, no comportamento alimentar, reprodutivo e na sobrevivência de grupos zooplanctônicos importantes. Abordagens semelhantes são muito comuns na literatura internacional, porém ainda escassas dentro do cenário nacional, sendo que a padronização de métodos e adequação de técnicas ainda é repleta de desafios.

Em termos gerais, buscou-se responder três perguntas principais:

1. Em experimentos de misturas em microcosmos, o dinoflagelado potencialmente nocivo *A. tamiyavanichii* é tóxico ou apenas nutricionalmente insuficiente para copépodes da espécie *T. turbinata*?
2. A resposta obtida para o primeiro questionamento pode mudar, caso uma segunda espécie do gênero *Alexandrium* (não tóxica) seja incluída na dieta?
3. As culturas de microalgas potencialmente nocivas isoladas ou seus exsudatos conferem algum risco à sobrevivência de grupos zooplanctônicos menores, muitas vezes incapazes de consumi-las?

Para o Capítulo I as principais conclusões corresponderam a:

- Considerando experimentos de monocultura, as três dietas oferecidas, *A. cf. fraterculum*, *A. tamiyavanichii* e *P. minimum* foram consumidas e sustentaram adequadamente a produção de ovos de *T. turbinata*. Porém em altas concentrações de *A.*

tamiyavanichii, foram obtidos indícios de supressão da produção de ovos da espécie de copépode testada;

- De forma contrária às duas primeiras hipóteses levantadas (Hipóteses 1 e 2 - influência nociva de *A. tamiyavanichii* sobre taxas de ingestão, produção de ovos e sucesso de eclosão dos náuplios, em comparação com o alimento não nocivo), considerando os experimentos de misturas de duas microalgas (*A. tamiyavanichii* e *P. minimum*), o dinoflagelado potencialmente nocivo *A. tamiyavanichii* não teve efeito nocivo sobre a taxa de produção de ovos ou sobre o sucesso de eclosão dos náuplios do copépode planctônico marinho *T. turbinata*, em comparação com a dieta controle (*P. minimum*).

- De forma similar, para os experimentos de misturas de três microalgas (*A. cf. fraterculum*, *A. tamiyavanichii* e *P. minimum*), a produção de ovos de fêmeas de *T. turbinata* não foi negativamente influenciada pela espécie potencialmente nociva (*A. tamiyavanichii*), ainda que na presença de uma espécie controle do mesmo gênero (*A. cf. fraterculum*), contrariando a terceira hipótese levantada (Hipótese 3 - influência nociva de *A. tamiyavanichii* sobre taxas produção de ovos e sucesso de eclosão dos náuplios, em comparação com a espécie congênera não tóxica).

Para o Capítulo II as principais conclusões corresponderam a:

- De acordo com o esperado pelas duas primeiras hipóteses levantadas (Hipóteses 1 e 2 - sensibilidade à exsudatos), organismos relativamente menores pertencentes ao zooplâncton marinho são sensíveis à exposição à exsudatos de microalgas potencialmente nocivas, sendo detectados efeitos nocivos para três dos cinco grupos incubados em exsudatos (Copepoda, Gastropoda e Tintinnina);

- De acordo com o esperado pelas duas últimas hipóteses levantadas (Hipóteses 3 e 4 - sensibilidade à células intactas), alguns dos organismos pertencentes ao zooplâncton marinho testados podem não ser sensíveis à exposição à exsudatos de microalgas potencialmente nocivas, mas podem ser afetados quando expostos à células intactas das mesmas microalgas, sendo detectados efeitos nocivos para todos os grupos expostos à culturas dos dinoflagelados (Brachyura, Gastropoda e Rotifera);
- Os resultados sugerem que dinoflagelados potencialmente nocivos afetam a sobrevivência e o comportamento de grupos zooplancônicos marinhos e que esta influência é variável de acordo com o grupo taxonômico considerado;
- Como implicações ecológicas, em uma situação de floração de uma determinada microalga potencialmente nociva, não apenas as espécies capazes de ingerir as microalgas podem ser afetadas, mas também organismos menores, sensíveis aos metabólitos acumulados na coluna de água. Em outras palavras, considerando uma teia trófica complexa, os efeitos de uma floração podem não ser lineares, seguindo os primeiros consumidores e seus predadores, mas muito mais complexos, atingindo indiretamente grupos menores, muitas vezes incapazes de predação os dinoflagelados, e conseqüentemente seus predadores potenciais.

Como conclusões gerais, com base nos resultados apresentados nos Capítulos I e II, foi constatado que o dinoflagelado *A. tamiyavanichii*, em densidades relativamente baixas, constitui um alimento de boa qualidade, capaz de sustentar altas taxas de produção e eclosão naupliar, as quais são ainda maiores quando o mesmo é combinado com o dinoflagelado *P. minimum*. Os resultados obtidos são coerentes com os perfis bioquímicos das duas microalgas, disponíveis na literatura, sobretudo quando considerada a quantidade

de ácidos graxos determinantes para o sucesso reprodutivo. Contudo, em altas densidades, foram verificados indícios de efeitos deletérios sobre a produção de ovos de *T. turbinata* e uma clara resposta negativa sobre a sobrevivência ou comportamento de cinco (náuplios de copépodes, tintinídeos, larvas de gastrópodes, rotíferos e zoés de caranguejos) dos seis grupos zooplantônicos de menor tamanho testados. Os resultados encontrados indicam que os efeitos de microalgas potencialmente nocivas podem ser altamente variáveis, sendo influenciadas principalmente: (i) pelas espécies de microalgas envolvidas, (ii) pelas espécies de zooplâncton presentes e (iii) pelas densidades celulares de exposição.

Dentro de uma perspectiva nacional, também fica claro o extenso campo de pesquisa que o tema confere. Os resultados encontrados não retratam toda a gama de possíveis respostas do meso- e microzooplâncton costeiro típico de águas brasileiras, mas abre espaço para o surgimento de muitos questionamentos, para a necessidade de aplicação de novas vertentes experimentais e ressalta a necessidade da execução de mais estudos voltados para o tema no país.

Anexo

Comentários sobre o cultivo de dinoflagelados

- Um manual prático

ÍNDICE

PREFÁCIO	106
<i>Alguns aspectos teóricos de importante conhecimento para o cultivo</i>	<i>114</i>
<i>Aspectos conceituais e históricos da técnica de cultivo de dinoflagelados marinhos ..</i>	<i>107</i>
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	107
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS NECESSÁRIOS	116
<i>Equipamentos necessários</i>	<i>116</i>
<i>Produtos químicos e materiais de consumo</i>	<i>116</i>
<i>Cultivo em média escala</i>	<i>119</i>
CAPÍTULO 3 – CUIDADOS DE LABORATÓRIO	120
<i>Lavagem e esterilização de materiais</i>	<i>120</i>
<i>Preparação de meios de cultura</i>	<i>122</i>
CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO.....	126
<i>Informações qualitativas sobre o crescimento das cepas estabelecidas</i>	<i>132</i>
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
7 – ANEXOS	142

PREFÁCIO

Durante o trabalho diário com o cultivo de dinoflagelados, é possível perceber que cada espécie possui características próprias, com peculiaridades dificilmente encontradas em livros especializados, mas determinantes para o domínio e sucesso das técnicas de cultivo e, em consequência, de todo o estudo a ser conduzido.

“Quando tratamos de cultivos de microalgas, às vezes um pequeno detalhe pode fazer uma enorme diferença, que pode implicar em muitos dias a mais de trabalho desnecessário”. Palavras sábias e inspiradoras da Profa. Dra. Elisabete Barbarino. Este manual é, em essência, uma contribuição adicional às informações disponíveis nos guias de cultivo do fitoplâncton marinho.

Nosso objetivo principal é a apresentação de dicas que possam facilitar o dia a dia de trabalho de pesquisadores e estudantes que iniciam seus estudos no tema. A ideia é fruto de um trabalho de mais de três anos, no qual uma iniciação científica e uma dissertação de mestrado foram confeccionadas com as mesmas cepas de dinoflagelados, as quais foram isoladas, adaptadas e mantidas estáveis mediante um exercício constante de observação e procura por melhores condições de cultivo.

A partir das cepas isoladas, são também descritas características qualitativas recorrentes para alguns dos principais gêneros isolados, com objetivo de permitir uma adaptação mais rápida dos leitores às feições de cada cultivo. Procuramos disponibilizar informações que muitas vezes não são reportadas e/ou passam despercebidas dentro do contexto mais complexo de artigos científicos, teses e dissertações.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Aspectos conceituais e históricos da técnica de cultivo de dinoflagelados marinhos

O termo “dinoflagelado” (Divisão Pyrrhophyta, Filo Dinophyta, Classe Dinophyceae) designa algas microscópicas predominantemente unicelulares, eucariontes e flageladas (Taylor, 1987), que podem ser autotróficas, heterotróficas ou ambos (mixotróficos) (Steindinger, 1983). Dinoflagelados heterotróficos e mixotróficos possuem mecanismos de ingestão variados que permitem a predação sobre diversos itens incluindo bactérias, picoeucariontes, nanoflagelados, diatomáceas, outros dinoflagelados, protistas heretotróficos e metazoários. Em contrapartida, eles são consumidos por muitos tipos de predadores, caracterizando um papel trófico muito diverso (Jeong et al., 2010).

Desse modo, a classe compõe um grupo fitoplanctônico importante nos ecossistemas aquáticos, sendo a adaptação de seus membros a uma ampla variedade de ambientes um reflexo da elevada diversidade de formas (Figura 5.1. A-B) e da versatilidade alimentar (Hackett, 2004).

Além da importância para a produção primária e, em consequência, para ciclos biogeoquímicos, os dinoflagelados podem ser responsáveis por grandes impactos econômicos, em virtude da produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários – incluindo um amplo espectro de toxinas – que podem causar danos severos ao ecossistema marinho, atividades de pesca e aquicultura (Wisecaver e Hackett, 2011).

Figura 5.1. Diversidade dos dinoflagelados. **A:** Ilustração baseada em análises taxonômicas (Taylor, 1987).

B: Ilustração baseada em análises genômicas (Wisecaver e Hackett, 2011).

Seja vivendo como células solitárias, associados com macroalgas, sedimentos, recifes de corais ou gramas marinhas (Faust, 1991), ou como simbioses dentro de um hospedeiro invertebrado, todos os dinoflagelados vivos possuem algumas características em comum (Steindinger, 1983; Taylor, 1987; Hackett, 2004) sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 5.1. Principais características morfológicas e funcionais dos dinoflagelados.

Características principais de dinoflagelados

- (i) Presença de um *dinokaryon* – um núcleo proeminente e único contendo cromossomos permanentemente condensados (Taylor, 1987) e de um padrão único de mitose (Spector, 1984) – características que os distinguem de células eucariontes e procariontes, levando à proposição de um novo reino, *Mesokaryota*, por Dodge (1985);
- (ii) Presença de uma fase *mastigonte*;
- (iii) Presença ou ausência de parede celular (Taylor, 1987) – as formas “nuas” ou “não armadas” possuem uma membrana plasmática exterior em torno de uma única camada de vesículas achatadas, ao passo que dinoflagelados armados possuem placas de celulose (ou outros polissacarídeos) dentro de cada vesícula (Hackett, 2004);
- (iv) Presença de vacúolos – estruturas modificadas (*púsculas*). Formadas por invaginações da membrana plasmática, essas organelas se abrem nas imediações da base dos flagelos e são mais desenvolvidas em espécies heterotróficas, estando relacionadas a funções de osmorregulação, absorção de macromoléculas orgânicas e secreção celular (Lourenço, 2006);
- (v) Muitas espécies fotossintetizantes possuem clorofilas *a* e *c2*, beta-caroteno e um grupo de xantofilas que parece ser único para dinoflagelados, tipicamente *peridinin*, *dinoxantina* e *diadinoxantina* – esses pigmentos são responsáveis pela coloração marrom dourada de muitas espécies;
- (vi) Presença de esteróis únicos: *dinosterol* e *amphisterol*;
- (vii) Nas células móveis, presença de dois flagelos:
 - Nas formas *dinocontes* um flagelo é achatado, na forma de fita, circundando a célula na forma de um sulco transversal, proporcionando propulsão e o segundo dirigido posteriormente ao longo de um sulco longitudinal, atuando como um leme para a direção (Hackett, 2004);
 - Nas formas *desmocontes*, que representam uma porcentagem menor dos dinoflagelados, os dois flagelos são inseridos anteriormente (Taylor, 1970). Segundo Lourenço (2006) um desses flagelos pode circundar a célula ao longo de um sulco discreto e de difícil visualização em microscopia óptica.

O primeiro dinoflagelado cultivado com sucesso foi o não fotossintetizante *Gymnodinium* (agora *Gyrodinium*) *fucorum* por Küster em 1908, mantido por seis meses em água do mar (Guillard e Keller, 1984). A partir de então, outras espécies foram cultivadas por pequenos períodos de tempo principalmente por taxonomistas que desejavam identificar organismos seguindo seu ciclo de vida. Essas culturas caracterizavam-se comumente pela presença de bactérias e pela mistura frequente de diversas espécies, sem atenção para a determinação de condições ótimas de cultivo (Sweeney, 1951).

Mesmo quando cultivos axênicos eram adquiridos, a obtenção de uma densidade celular que viabilizasse estudos fisiológicos e bioquímicos representava uma grande dificuldade. Fatores que determinaram, por muitos anos, a existência de um número maior de estudos para outros grupos de microalgas, como por exemplo, algas verdes e diatomáceas (Dixon e Syrett, 1988).

Embora essa consideração tenha sido publicada há mais de 20 anos e melhoras significativas nas técnicas tenham sido obtidas, permitindo o crescimento de grupos considerados incultiváveis (e.g.: *Dinophysis acuminata* - Park et al., 2006; *D. caudata* - Nishitani et al., 2008), dificuldades para manutenção do grupo ainda é uma realidade em muitos laboratórios.

Seria tedioso descrever todo o histórico dos métodos, bem como todas as culturas que foram gradualmente estabelecidas com sucesso. Desse modo, destacamos algumas referências consideradas chave para a compreensão da evolução da técnica de cultivo de dinoflagelados marinhos e dos principais problemas envolvidos: (i) Guillard e Keller (1984) descrevem na forma de um capítulo de livro uma completa revisão contemplando o histórico dos esforços de cultivo, técnicas de isolamento e cultivo e meios de cultura

testados; (ii) Keller e Guillard (1985) reportam importantes aspectos qualitativos observados durante o cultivo de dinoflagelados marinhos em meio “K”.

A partir das contribuições de Keller et al. (1987) os meios de cultura “K” e “L1” têm sido mundialmente empregados para o cultivo do grupo. As receitas desses meios podem ser facilmente encontradas na internet⁵ e são também descritas no Capítulo 2 do presente manual.

Atualmente, dinoflagelados são cultivados com sucesso em várias instituições de pesquisa e vários são os estudos voltados para a elucidação de necessidades nutricionais (e.g.: Flynn et al., 1993; Rodríguez et al., 2009), interações tróficas (e.g.: Sherr e Sherr, 2007; Tillmann e Hansen, 2009; Yu et al., 2010), taxonomia tradicional (e.g.: Lim et al., 2007), taxonomia molecular (e.g.: Litaker et al., 2007), estudos genômicos (uma completa revisão pode ser encontrada em Wisecaver e Hackett, 2011), dentre outros exemplos.

Eles são também considerados fontes cada vez mais importantes de toxinas com elevado valor para programas de pesquisas toxicológicas (e.g.: Hackett et al., 2009), químicas (uma recente revisão pode ser encontrada em Sasso et al., 2012) e biomédicas (e.g.: ação antifúngica de *Gambierdiscus toxicus* - Donia e Hamann, 2003); contudo, as dificuldades de cultivo em biorreatores limitam o desenvolvimento de novos produtos (Rodríguez et al., 2010). Conforme os mesmos autores, o meio “L1” e outros meios comumente indicados para o crescimento de dinoflagelados têm demonstrado não suportar elevadas densidades celulares.

⁵ O NCMA (*National Center for Marine Algae and Microbiota*), <<https://ncma.bigelow.org/>>, é um exemplo de portal onde receitas dos meios “L1” e “K” podem ser encontradas para confecção ou compra.

Um exemplo interessante da aplicação biotecnológica de dinoflagelados marinhos, corresponde à inclusão de DHA (Ácido Docosahexaenóico, 22:6n-3), um ácido graxo poliinsaturado pertencente ao grupo ômega 3, em alimentos industrializados destinados a bebês (Kroes et al., 2003) (Figura 5.2). Conforme Mendes et al. (2009) alguns microorganismos marinhos podem crescer heterotroficamente em substratos orgânicos sem luz, oferecendo a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de células sob condições controladas e monitoradas, resultando em um nível muito elevado de qualidade do produto. Segundo o mesmo autor, dentre esses microorganismos, *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornicky (Ordem Gonyaulacales) (Figura 5.2 A), recebeu destaque e investimentos, pois não produz quantidades significativas de outros ácidos graxos, fator que torna a purificação do DHA atrativa, particularmente para aplicações farmacêuticas e nutracêuticas. O DHA é um componente estrutural abundante na massa cinzenta do cérebro e da retina dos olhos e um componente-chave do tecido cardíaco. Desse modo, o composto é importante para o desenvolvimento dos olhos e cérebros de crianças (Lima et al., 2004) e favorece a saúde cardiovascular de adultos (Casanova e Medeiros, 2011).

Figura 5.2. Exemplo de aplicação alimentar de cultivos de dinoflagelados marinhos: Inclusão de DHA, produzido por *C. cohnii*, em alimentos industrializados destinados a bebês (Kroes et al., 2003). Fontes das ilustrações: A: Células de *Cryptocodinium cohnii* <<http://www.lamolina.net/cryptocodiniumcohnii.html>> e B: Exemplo de produto com inclusão de DHA <http://www.kuhlstores.com/product_Enfamil-Lipil-Infant-Formula-with-Iron-Milk--Based-Powder--6-Pack.html>.

Do ponto de vista genômico, os dinoflagelados são considerados enigmáticos, demonstrando novas características exclusivas e extremamente naturais (Wisecaver e Hackett, 2011), com desafios codificados por genomas muitas vezes maiores do que os de seres humanos (Moran e Armbrust, 2007).

Tanto os estudos primeiramente citados, dependentes da obtenção de elevada biomassa algal, quanto investigações genômicas, possibilitadas pela obtenção de pequenos volumes de cultivo (suficientes apenas para a reprodutibilidade dos estudos), são dependentes da existência de mais pesquisas voltadas para o aprimoramento de técnicas de cultivo.

Quando olhamos para o ecossistema marinho, com foco na diversidade, ecologia e dinâmica de organismos planctônicos, cujos padrões alimentares refletirão em todos os níveis tróficos subsequentes, grandes lacunas também são dependentes de mais estudos sobre o grupo. *“Quais estratégias, em termos de ecofisiologia e crescimento, que levaram os dinoflagelados a uma exploração cada vez mais bem sucedida em águas costeiras a nível mundial, à alteração no comportamento de florações de microalgas nocivas e a desempenharem um papel proeminente na expansão global destes fenômenos”?* A questão levantada por Smayda (2002) é apenas um de inúmeros exemplos de processos marinhos que permanecem intrigantes.

Alguns aspectos teóricos de importante conhecimento para o cultivo

Nesta sessão apresentamos algumas considerações importantes, específicas para dinoflagelados, que merecem muita atenção ao longo do desenvolvimento dos cultivos:

- (a) Alguns dinoflagelados podem ter seu crescimento inibido por material particulado, em qualquer meio de cultura. Para assegurar o crescimento das células é necessária a filtração do meio autoclavado por uma membrana de poros pequenos (Keller e Guillard, 1985);
- (b) O meio “K” pode conter uma pequena, mas normalmente insignificante quantidade de compostos precipitados. Para dinoflagelados sensíveis a esse material, o meio deve ser filtrado após autoclavagem (item a). Alternativamente, as soluções de fosfato e metais traço estéreis podem ser adicionadas asépticamente após a autoclavagem. Esses detalhes podem complicar a preparação do meio de cultura, mas podem ser fundamentais para o cultivo de clones sensíveis ou de células recém-isoladas (Keller e Guillard, 1985);
- (c) Dinoflagelados parecem ser especialmente sensíveis à íons metálicos ativos em meio de cultura ou *in situ*, particularmente ao cobre (Anderson e Morel, 1978), o qual pode ocasionar perda de mobilidade ou redução da fixação de carbono por meio da fotossíntese. Neste estudo a aplicação dos quelantes tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) demonstraram que a toxicidade do cobre é uma característica única de sua forma iônica.
- (d) Dinoflagelados morrem ou passam facilmente para estágios de resistência por uma grande variedade de fatores, de forma que os mesmos devem ser protegidos de

condições adversas ou mudanças abruptas (assumindo as condições de campo como as mais favoráveis) (Keller e Guillard, 1985). Em outras palavras, como abordado em sequencia, recomenda-se que sejam mantidos valores de temperatura e salinidade próximos aos verificados em condições de campo;

- (e) O enriquecimento de amostras de água natural com os nutrientes do meio “K” (preferencialmente com uma reduzida quantidade de cloreto de amônio - NH_4Cl - 10-25 μM) pode facilitar o isolamento de uma variedade maior de células (Keller & Guillard, 1985).

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS NECESSÁRIOS

Em geral, não é necessária a existência de muitas facilidades laboratoriais para que culturas não axênicas saudáveis de dinoflagelados sejam instauradas. Os pontos principais para a obtenção de sucesso são limpeza, observação e manutenção, como descrito a seguir.

Equipamentos mínimos necessários

1. Estereomicroscópio (permite a visualização de algumas espécies), microscópio ou microscópio invertido;
2. Autoclave vertical;
3. Microondas;
4. Câmara de germinação;
5. Bico de Bunsen;
6. Capela;
8. Refratômetro;

9. Sensores de temperatura e pH (opcional).

Produtos químicos e materiais de consumo essenciais

1. Capilares de vidro e/ou Pipetas tipo Pasteur novas ou esterilizadas;
2. Placas de Petri novas ou esterilizadas;
3. Lâminas de microscopia novas ou esterilizadas;
4. Béqueres de vidro de volumes variáveis novos ou esterilizados;
5. Balde plástico novo ou limpo;
6. Rede de plâncton com abertura de malha de 15-20 μm (preferencialmente com copo coletor fechado);
7. Cabo para rede de plâncton;
8. Frasco plástico novo ou limpo com tampa rosqueável (500-1000 mL);
09. Álcool 70%;
10. Ácido clorídrico (HCl) P.A.

Para o caso de necessidade de preparo de soluções estoque de nutrientes é necessária a aquisição de reagentes e confecção das soluções listadas na Tabela 5.1:

Tabela 5.1. Composição dos principais meios de culturas líquidos empregados em isolamentos e manutenção de cultivos de dinoflagelados (meio f/2 - Guillard e Ryther 1962 e Guillard 1975; meio L1 - Guillard e Hargraves, 1993). Em destaque, elementos adicionais presentes do meio L1. *A solução estoque $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ pode ser omitida para o cultivo de dinoflagelados⁶.

Meio de cultura	Soluções estoque	Componentes	Concentração Molar Final
f/2	Solução de macronutrientes (nitrato, fosfato e silicato)	NaNO_3	$8,82 \times 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$3,62 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}^*$	$1,06 \times 10^{-4} \text{ M}$
	Solução de metais traço	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,93 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,60 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,65 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,20 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,10 \times 10^{-7} \text{ M}$
		Tiamina $\cdot \text{HCl}$ (vit. B_1)	$2,96 \times 10^{-7} \text{ M}$
	Solução de vitaminas	Biotina (vit. H)	$2,05 \times 10^{-9} \text{ M}$
		Cianocobalamina (vit. B_{12})	$3,69 \times 10^{-10} \text{ M}$
L1	Solução de macronutrientes (nitrato, fosfato e silicato)	NaNO_3	$8,82 \times 10^{-4} \text{ M}$
		$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$3,62 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}^*$	$1,06 \times 10^{-4} \text{ M}$
	Solução de metais traço	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5} \text{ M}$
		$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	$9,09 \times 10^{-7} \text{ M}$
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$8,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$5,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$8,22 \times 10^{-8} \text{ M}$
		H_2SeO_3	$1,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		Na_3VO_4	$1,00 \times 10^{-8} \text{ M}$
		Tiamina $\cdot \text{HCl}$ (vit. B_1)	$2,96 \times 10^{-7} \text{ M}$
	Solução de vitaminas	Biotina (vit. H)	$2,05 \times 10^{-9} \text{ M}$
		Cianocobalamina (vit. B_{12})	$3,69 \times 10^{-10} \text{ M}$

Para cultivo em pequena escala (bioensaios que necessitem de pequenos volumes de dinoflagelados) os seguintes materiais devem ser considerados:

⁶Soluções de silício não precisam ser empregadas na preparação do meio de cultura, pois este elemento não é essencial para o crescimento das espécies estudadas, sendo que o uso de silício é restringido somente ao cultivo de diatomáceas e silico-flagelados (Lourenço, 2006). A adição deste macronutriente poderia favorecer o crescimento de diatomáceas que poderiam competir com os dinoflagelados (Naves, 2002).

11. Tubos de ensaio de borossilicato autoclavável, com tampa autoclavável (muitas empresas comercializam tampas não autoclaváveis que derretem facilmente após poucas esterilizações). O volume mais adequado para o cultivo de dinoflagelados é 25 mL (normalmente 15 cm de altura: 2 cm de largura);

12. Frascos erlenmeyers de borossilicato autoclavável, com boca larga reforçada (os frascos com boca reforçada duram mais e resistem mais ao manuseio entre autoclavagens), novos ou esterilizados;

13. Pipetas Pasteur novas ou esterilizadas;

14. Ponteiras para pipeta automática (1, 5 e 10 mL) novas ou esterilizadas;

15. Papeis filtros tipo qualitativo (14 μm de porosidade) ou, preferencialmente, filtros de fibra de vidro ou celulose com porosidade inferior a 1,5 μm (kits de filtração serão necessários se filtros para análise forem utilizados);

16. Béqueres de vidro de diferentes volumes novos ou esterilizados;

17. Provetas de vidro/policarbonato de 500-1000 mL novas ou limpas;

18. Algodão hidrófilo;

19. Gaze cirúrgica;

20. Barbante;

21. Funil plástico novo ou limpo (1000 mL).

Cultivo em média escala

Para cultivos de dinoflagelados em média escala (bioensaios nos quais volumes de aproximadamente 3 a 10 litros de dinoflagelados são necessários), além dos materiais listados anteriormente são necessários:

22. Erlenmeyers de borossilicato autoclavável, como boca larga e reforçada (500 mL) novos ou esterilizados;

23. Balões de borossilicato autoclavável, com boca larga e reforçada (3 e 6 L) novos ou esterilizados;

24. Provetas de vidro/policarbonato (1-2 L) novas ou esterilizadas.

CAPÍTULO 3 – CUIDADOS DE LABORATÓRIO

Lavagem e esterilização de materiais

A lavagem cuidadosa e adequada constitui uma etapa determinante no sucesso de cultivos de dinoflagelados. A organização do processo de lavagem também representa um passo extremamente importante que assegura agilidade e segurança nos procedimentos executados. É conveniente existir uma ordem espacial e temporal de trabalho e pelo menos três conjuntos de frascos para manutenção das cepas, de forma que enquanto um esteja em uso para manutenção e outro em lavagem, um terceiro esteja pronto para utilização.

Toda a vidraria deve ser regularmente lavada conforme os passos descritos a seguir (métodos adaptados de Freshney, 2000; Kawachi e Noël, 2005; Lourenço, 2006):

1. Lavagem com escova para vidraria em água corrente da torneira. Nessa etapa, restos de cultura acumulados nas paredes dos frascos devem ser cuidadosamente removidos, ressaltando-se que qualquer acúmulo pode inibir o crescimento de dinoflagelados;

2. Secagem em temperatura ambiente ou estufa (60-100°C);

3. Imersão em solução de HCl 10%⁷ por um período não inferior a 24 horas. Nessa etapa, muitas publicações recomendam a imersão completa de frascos de cultivo em HCl, porém apenas deixar o ácido em contato com as paredes do frasco (por meio de um enxágue rápido com uma pequena quantidade de ácido) é suficiente para a limpeza. Esse procedimento reduz o volume de ácido ao qual o usuário será exposto, bem como o resíduo gerado pela lavagem. Também é importante ressaltar que uma mesma solução de HCl pode ser reutilizada algumas vezes por meio da filtração em papel filtro qualitativo. Recomenda-se que a mesma seja descartada após atingir uma coloração muito amarela.

4. Enxágue em água da torneira corrente. Nessa etapa, os frascos devem ser exaustivamente enxaguados em água da torneira no mínimo 10 vezes;

5. Enxágue em água destilada. Nessa etapa, os frascos devem ser exaustivamente enxaguados em água destilada no mínimo 10 vezes;

6. Secagem em estufa (60 - 100 °C).

Frascos e materiais não empregados nos cultivos de culturas (provetas, béqueres, funis e frascos utilizados apenas com água do mar ou água destilada autoclavadas) podem ser lavados em ácido diluído (Passo 3) ou apenas por imersão em detergente neutro diluído

⁷ Durante a manipulação do ácido clorídrico (HCL) recomenda-se que sejam evitados contatos com o líquido ou com o seu vapor. Em caso de acidente, as pessoas devem ser mantidas afastadas e o material deve ser isolado e removido. Recomenda-se o uso de neblina de água para baixar o vapor e para manipulação e/ou remoção do material devem ser usadas luvas, botas e roupas de borracha butílica, PVC, ou polietileno clorado, e máscara de respiração autônoma. Estas informações foram extraídas da Ficha de Informações de Segurança de produtos químicos (FISPQ) para HCL da CETESB: disponível em <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=%C1CIDO%20CLOR%CDDRICO&cod=%C1CIDO%20CLOR%CDDRICO>, acesso em novembro de 2012. Porém outras fichas podem ser facilmente consultadas via internet.

a 1% por um período não inferior a 24 horas e enxaguados cuidadosamente (pelo menos 3 vezes) em água da torneira e água destilada.

Após a lavagem, toda a vidraria deve ser esterilizada preferencialmente por calor úmido em autoclave pelo período de 30 minutos e à pressão de 1 atm (Lourenço, 2006). Alternativamente, a vidraria pode ser esterilizada por calor seco mediante exposição em forno com ar quente por pelo menos duas horas a 160 °C, ou conforme metodologias mais rigorosas, por um período de três a quatro horas a 250 °C (Lourenço, 2006).

Preparação de meios de cultura

A preparação dos meios de cultura pode ser efetuada por meio da aplicação de técnicas de esterilização por calor úmido em autoclave (Figura 5.3) ou por microondas. O método mais adequado deve ser escolhido com base no volume de meio de cultura necessário em cada ocasião e pelo tempo disponível para sua preparação.

Figura 5.3. Principais cuidados de esterilização adotados em laboratório. A: Bico de Bunsen. B: Autoclave vertical. Fotos por Naira Juliana da Silva.

Devido às altas temperaturas verificadas durante a esterilização na autoclave (cerca de 100 °C) e a elevação no pH, acompanhada pela perda de gás carbônico, precipitados podem ser formados pela combinação de constituintes inorgânicos da água do mar ou componentes provenientes do enriquecimento. Esses precipitados podem ser deletérios para muitas células fitoplanctônicas. A esterilização por autoclave também consome algumas horas, especialmente se o tempo de resfriamento de líquidos for incluído (Keller *et al.*, 1988; Kawachi e Noël, 2005). Desse modo, a técnica de esterilização em fornos de micro-ondas pode ser alternativamente adotada em algumas ocasiões pela maior facilidade, praticidade, rapidez de preparo de pequenos volumes de meio de cultura, menor custo e

maior eficácia, sugerida pela reduzida precipitação de elementos provenientes das soluções estoque de nutrientes. Este fator permite que os nutrientes sejam esterilizados juntamente com a água do mar, diminuindo fontes de contaminação posterior (Keller et al., 1988; Lourenço, 2006).

Um melhor crescimento das células é esperado para meios de cultura preparados com água do mar coletada preferencialmente em localidades mais distantes da costa, com uma quantidade menor de matéria orgânica dissolvida.

Em laboratório, a água deve ser filtrada em filtros de fibra de vidro com 0,7 μm de porosidade (GF/F) e esterilizada em autoclave pelo período de 60 minutos, na temperatura de 100 °C e à pressão de 1 atm (Kawachi e Noël, 2005; Lourenço, 2006) ou em um forno de micro-ondas (10 minutos para 1 L de meio de cultura) (Keller et al., 1988). Alternativamente, podem ser empregados filtros de fibra de vidro tipo GF/A (1,6 μm), GF/B (1 μm) ou GF/C (1,2 μm).

O procedimento de filtração da água do mar deve ser adotado, pois, em alguns casos, pode ocorrer precipitação de material orgânico e consequente opacidade após o processo de esterilização. A formação desse material é atribuída por Vieira (comunicação pessoal) à utilização de algodão hidrófobo (que não possui afinidade com a água), recomendando-se, desse modo, a confecção de tampões com algodão hidrófilo (que possui afinidade com a água).

A inibição do crescimento de clones de *Gonyaulax polyedra* por material particulado foi relatada por Keller e Guillard (1985), os quais recomendaram a filtração do meio autoclavado por uma membrana de poros pequenos, como descrito anteriormente.

Após esterilização e esfriamento da água do mar até a temperatura ambiente, o meio de cultura deve ser preparado por meio da adição de soluções estoque de nutrientes. A composição dos dois meios de culturas f/2 (Guillard e Ryther 1962, Guillard 1975) e L1 (Guillard e Hargraves, 1993), ambos sem sílica, pode ser observada na Tabela 5.1.

Embora todas as espécies possam crescer nas duas receitas, em meio L1 os cultivos crescem mais rápido, com colorações mais intensas e permanecem mais tempo em fase exponencial. Quando propagadas em meio f/2, algumas espécies, sobretudo às pertencentes aos gêneros *Gymnodinium* e *Gonyaulax*, precisam de mais atenção, devido ao crescimento mais lento e decaimento mais acelerado. Contudo, ressalta-se que esta pode ser uma característica indicativa de que os gêneros necessitam de mais tempo de adaptação a este meio, não sendo possível afirmar que sua aplicação é inadequada.

Durante a preparação de meio de cultura em micro-ondas, soluções estoque devem ser adicionadas antes da esterilização, com exceção da solução de vitaminas, a qual pode ser inserida posteriormente para evitar sua desnaturação (Keller et al., 1988). Conforme a necessidade, a salinidade do meio obtido deve ser ajustada para a faixa de 35-36, mediante adição de água destilada autoclavada.

Eventualmente, caso seja verificada elevada precipitação de sílica (proveniente dos frascos de borossilicato) após a esterilização, o meio de cultura deve, como último passo, ser transferido para um recipiente esterilizado após pelo menos 24 horas de sedimentação do material particulado, a fim de evitar interferência do precipitado no crescimento das células. O procedimento citado deve ser efetuado nas proximidades do bico de Bulsen. Em laboratório, foi observado que em meios de culturas com muito precipitado, dinoflagelados dificilmente crescem saudáveis e sem deformações.

Os procedimentos de adição de nutrientes e de filtração da solução final devem ser executados nas proximidades da chama de um bico de Bunsen (Figura 5.3. B).

CAPÍTULO 4 – ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO

No estudo que originou o presente manual, células de fitoplâncton foram isoladas a partir de amostras coletadas na superfície da coluna de água, com o auxílio de balde plástico, ou em um ponto de coleta fixo. Nesse segundo caso, a coleta foi realizada a bordo de uma embarcação de alumínio, com o auxílio de uma rede de fitoplâncton com 20 µm de abertura de malha, arrastada sob a menor velocidade possível para o motor empregado. Para exemplificação, a lista de dinoflagelados isolados durante a dissertação de mestrado que originou o presente texto encontra-se inserida no Anexo.

Sob estereomicroscópio ou microscópio invertido, cada célula de dinoflagelado isolada deve ser lavada pelo menos três vezes em gotas de meio de cultura para eliminar outros micro-organismos (isolamento por pipetagem e diluição sucessiva - Hoshaw e Rosowski, 1973; Gonzalez et al., 1995; Naves, 2002; Andersen & Kawachi, 2005; Lourenço, 2006) e transferida para multiplacas acrílicas estéreis de 24 cavidades com meio de cultura f/2 ou L1, ambos preparados sem adição de sílica. Uma dúvida comum neste ponto é se o poço da placa deve ser preenchido antes ou depois do isolamento. A ordem não fará diferença, porém a inserção do dinoflagelado em uma pequena gota no fundo do poço e posterior preenchimento facilita o controle do processo de isolamento, uma vez que é possível verificar se a célula realmente foi transferida da placa de lavagem para a placa de isolamento.

É conveniente que a triagem seja executada a partir de uma pequena gota da amostra, diluída em um volume apenas um pouco maior de meio de cultura. Nessa etapa, quanto menor o volume de amostra colocado na placa de petri ou na lâmina de isolamento, mais fácil torna-se o trabalho. Quanto mais líquido for introduzido, maior será a quantidade de microalgas e de outros organismos indesejáveis.

Durante esse procedimento, uma atenção especial deve ser dada ao cuidado na limpeza de todos os instrumentos utilizados e à temperatura. Uma boa dica é flambar a ponta do capilar de isolamento, bem como a superfície de lâminas ou placas de petri que estejam sendo utilizadas. Por esse motivo, alguns pesquisadores optam por trabalhar sempre nas proximidades do bico de Bunsen.

Muitas células frequentemente ficam imóveis durante a manipulação, retomando sua natação logo após a inserção nos poços de isolamento. Desse modo, o isolamento é válido mesmo que a célula encontre-se imóvel. Quanto mais poços forem confeccionados, maiores serão as chances de obtenção de pelo menos um cultivo unialgal.

Para facilitar a triagem de dinoflagelados, a amostra pode ser eventualmente concentrada por meio de filtração por malhas de 10 ou 20 μm . Se a amostra coletada for bem diluída (pelo menos na razão de 1 unidade de volume da amostra: 2 unidades de volume água do mar filtrada) e acondicionada adequadamente, isto é, em condições próximas às verificadas em campo, é possível trabalhar com o mesmo material por alguns dias. Uma segunda opção é diluir uma pequena quantidade da amostra em meio de cultura recém-preparado. Esse procedimento pode fomentar o crescimento de bactérias, mas pode também possibilitar o crescimento de espécies alvo do isolamento.

Multiplacas devem ser mantidas em câmara de germinação com temperatura próxima à verificada em campo ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para espécies da costa sudeste do Brasil) e fotoperíodo de 12:12 horas no mesmo meio de cultura empregado durante os isolamentos. Do mesmo modo, valores de salinidade devem ser próximos aos verificados no local de isolamento (35 a 36 ppm para espécies da costa sudeste do Brasil).

As placas devem ser monitoradas com o auxílio de um estereomicroscópio ou de um microscópio invertido para observação da multiplicação, sobrevivência das células e eventual proliferação de contaminação em cada uma das cavidades. Para as cavidades isentas de contaminação, após atingirem a fase exponencial de crescimento, as células devem ser transferidas com o auxílio de pipetas Pasteur autoclavadas ou de uma micropipeta dotada de ponteiros plásticos autoclavados para tubos de ensaio contendo meio de cultura. Nessa etapa, sobretudo para células de maior tamanho, recomenda-se que a ponta da ponteira seja cortada para evitar a destruição das células e reduzir o impacto da manipulação durante a transferência.

Culturas estabelecidas em meio f/2 sem sílica podem posteriormente ser transferidas para o meio L1 sem sílica, o qual foi adotado na manutenção de todos os cultivos (relativos ao estudo que originou o presente manual) em função da observação visual de menor tempo para obtenção da fase exponencial de crescimento e aspecto mais saudável da cultura (menor proporção de células com deformações, maior mobilidade e maior sobrevivência da cultura).

Depois de estabilizadas, as culturas podem ser periodicamente propagadas em duas séries independentes de cultivo: erlenmeyers de 125 ou 500 mL, por exemplo, e tubos de ensaio, mediante a inoculação de um pequeno volume de cultura no recipiente de destino

(geralmente 0,4 mL para frascos erlenmeyers de 125 mL e 0,2 mL para tubos de ensaio) previamente preenchido com meio L1 sem sílica. Para cada série de propagação devem ser mantidos simultaneamente dois frascos, o primeiro correspondente à cultura mais antiga, doadora do inóculo, e o segundo a cultura nova, recém repicada (Lourenço, 2006) (Figuras 5.4. A-B).

Como será descrito em sequência, na sessão relativa a aspectos qualitativos de algumas espécies, alguns dos dinoflagelados poderão exigir mais atenção durante a repicagem, de forma que o volume de inóculo pode variar para algumas espécies de crescimento frequentemente mais lento.

Todos os procedimentos de propagação devem ser realizados em câmara de fluxo laminar ou próximos à chama de um bico de Bunsen.

Figura 5.4. Ilustração de uma série de propagação de cultivo. Série de propagação em tubos de ensaio, em destaque, “cultura filha” (1: *Alexandrium* sp., L1 Si⁻, S=35, 01.07.10) recém repicada de uma “cultura mãe”, doadora do inóculo (1: *Alexandrium* sp., L1 Si⁻, S=35, 19.05.10). A cultura mãe é mantida em cultivo até a próxima repicagem. Da direita para a esquerda, câmaras de germinação 1 e 2 no Laboratório Integrado de Processos Oceanográficos (LIPO, Ubatuba) (B). Em cada uma das câmaras uma série independente de cultivo tem sido mantida. ITA: Itajaí. SC: Santa Catarina.

As placas de isolamento devem ser mantidas como reserva, recebendo gotas de meio de cultura no mínimo a cada 2 dias, até o estabelecimento das culturas em frascos maiores, monitorado periodicamente mediante a observação sob microscópio invertido. Enquanto as placas estiverem livres de contaminação é possível tentar transferir novamente cepas não estabilizadas para tubos de ensaio ou ainda reisolar células que cresceram bem nos poços,

porém com contaminantes (fungos ou outras microalgas). Neste caso, as chances são maiores, pois as densidades serão superiores do que as esperadas para uma amostra natural.

Após o estabelecimento e aclimação de todas as cepas, e criação dos frascos de reserva do banco de cultivos, o padrão de propagação pode ser alterado de forma a estender o intervalo entre as repicagens sem comprometer a saúde dos cultivos.

Temperaturas diferentes podem ser adotadas para minimizar o risco de perda de espécies aparentemente mais sensíveis a temperaturas de cultivo mais baixas, geralmente pertencentes ao gênero *Prorocentrum* sp., que demonstrou elevada sensibilidade a temperaturas de cultivo inferiores a 21 °C.

Frascos erlenmeyers podem ser inicialmente repicados a cada 10 a 12 dias e posteriormente a cada 25 a 35 dias, sendo o período determinado de acordo com a observação visual ou sob microscópio do estado de crescimento das culturas. Períodos menores de repicagem podem ser inicialmente adotados para permitir a aclimação das cepas às condições de cultivos e, em consequência, posterior resistência a intervalos maiores de propagação. Essa transição é importante para que o pesquisador não execute propagações muito próximas sem necessidade.

Cultivos mantidos em tubos de ensaio podem ser inicialmente repicados em intervalos de tempo de no mínimo 15 dias e posteriormente em intervalos de 25-35 ou 40-45 dias.

Ressalta-se que o intervalo de trabalho de 40-45 dias foi alcançado, em laboratório, mediante: (i) incremento de 50% na quantidade das soluções estoque de macronutrientes, metais traço e vitaminas, (ii) redução da temperatura de incubação em cerca de 1 °C e inoculação de volume menor de cultura (0,2 e 0,4 mL para tubos de ensaio de 15 e 30 mL,

respectivamente), conforme o método de manutenção de tubos de ensaio adotado no BMM (Banco de Microorganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo).

Para a obtenção desse intervalo é importante que todas as etapas anteriores sejam cuidadosamente cumpridas. Cultivos de dinoflagelados são geralmente mais sensíveis do que de flagelados e diatomáceas, sendo a adaptação às condições de cultivo um ponto fundamental para que as etapas posteriores sejam atingidas com tranquilidade.

Séries em duplicata devem ser adotadas sempre que possível para reduzir o risco de eventual contaminação e/ou perda dos cultivos após a propagação (Lourenço, 2006)

Um aspecto importante da manutenção de cultivos corresponde ao fato de que a manipulação das cepas a qualquer momento pode fazer com que as células estejam em momentos distintos de seu ciclo de divisão celular. Para a realização de estudos detalhados sobre fisiologia ou composição bioquímica de espécies é necessário que a divisão celular das cepas seja o mais sincronizada possível. Isso pode ser tentativamente obtido envolvendo os frascos em papel alumínio por períodos de 24, 48 ou 72 horas, de forma a estimular que todas as células iniciem seu ciclo de divisão aproximadamente ao mesmo tempo (Naves, comunicação pessoal).

Informações qualitativas sobre o crescimento das cepas estabelecidas

Para espécies dos gêneros *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, em alguns casos, cultivos foram estabelecidos com maiores dificuldades, devido à elevada oscilação do padrão de crescimento ao longo das repetidas propagações. Para estes táxons, culturas saudáveis e com rápido crescimento foram obtidas após meses de observação e repicagens

de 10-12 dias, ao passo que culturas dos gêneros *Ostreopsis* e *Prorocentrum* foram satisfatoriamente estabelecidas em poucas semanas, geralmente com crescimento rápido e reduzida incidência de deformações logo após a retirada do inóculo das placas de isolamento e transferência para frascos de cultivo.

A sensibilidade dos gêneros *Alexandrium*, *Gonyaulax* e *Gymnodinium* às condições de cultivo e a decorrente dificuldade de estabelecimento de culturas podem ser, em parte, atribuídas aos ciclos de reprodução complexos e pouco estudados, caráter mixotrófico de algumas espécies e à possível carência de nutrientes limitantes ainda não definidos e não encontrados nos meios de cultura mais tradicionalmente empregados.

Dentre os três gêneros, especialmente para *Gymnodinium*, foi verificado, mais de uma vez, o completo desaparecimento das células, sem a verificação de cistos, mesmo com a execução rigorosa dos procedimentos descritos. Para contornar esse problema, além do aumento do inóculo de repicagem, frascos adicionais foram introduzidos ao longo das repicagens (manutenção da cultura “avó”, da cultura “mãe” e de duas a três culturas “filhas”). Embora esse procedimento aumente a etapa de lavagem e o gasto de meio de cultura, é uma alternativa quando a existência da cepa é crucial para o desenvolvimento de determinada pesquisa. Destaca-se que a perda da cepa nunca foi detectada em todos os tubos das duas incubadoras, o que ressalta a importância de um bom conjunto de frascos reserva para substituição de cepas perdidas. Em cultivos saudáveis de *Gymnodinium* sp. é frequente a formação de grumos amarelo-amarronzados (muco), associados à liberação extracelular de polissacarídeos (reportada por alguns autores como, por exemplo, Kim e Martin, 1974 e Sogawa et al., 1998) e a verificação de natação rápida das células. A elevada variabilidade no tamanho das células, facilmente visível em microscópio, também é

comum, em virtude das várias fases do ciclo de vida presentes (Steidinger, 1975; Figueroa et al., 2008).

Algumas espécies de dinoflagelados aparentemente não se adaptam ao novo padrão de propagação mais prolongado (30-35 dias para frascos e 40- 45 dias para tubos de ensaio), não multiplicando ou alcançando densidade reduzida após semanas de inoculação (*Alexandrium* sp. e *Gonyaulax* sp.). O problema pode ser contornado com observações mais frequentes em microscópio e aumento do inóculo durante as repicagens, de forma que todas as cepas passem a ser repicadas em intervalos maiores.

Durante o crescimento em placas de isolamento, células do gênero *Alexandrium*, isolado a partir de amostras coletadas em Ubatuba, em meio de cultura L1 sem sílica, formaram longas cadeias (Figura 5.5). A formação de cadeias ocorre geralmente em condições de cultivo favoráveis, demonstrando escolha adequada das condições adotadas (Naves, comunicação pessoal).

Figura 5.5. Visão de parte de uma cadeia com um número superior a 20 células de *Alexandrium* sp. dentro da cavidade da multiplaca de isolamento. Foto por Jeanete Lopes Naves.

Após a inoculação em frascos maiores, a formação de cadeias também foi verificada, sendo as mesmas compostas por um número menor de células e presentes apenas na fase exponencial do crescimento. O mesmo padrão de formação de duplas de células e cadeias reduzidas (3-4 células) também foi verificado para a espécie *A. tamiyavanichii*, reisolada a partir de uma cepa contaminada proveniente de Itajaí (Santa Catarina). Este padrão foi observado após alguns meses de propagação, evidenciando mais uma vez que o estabelecimento satisfatório do gênero exige um longo período de adaptação às condições de cultivo.

Para *Ostreopsis*, cultivos saudáveis normalmente crescem formando projeções mucosas que podem se estender até o fundo dos frascos de cultivo. Para o caso deste gênero, o muco pode facilitar a aderência a substratos, os quais comumente correspondem a macroalgas (Nascimento et al., 2012). As cepas são em geral muito resistentes, sendo

possível a repicagem e a recuperação de cultivos em estágio avançado de decaimento (culturas extremamente pálidas). Para as cepas do grupo, culturas saudáveis tiveram coloração alaranjada quando em pleno crescimento exponencial.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à dificuldade de cultivo e manutenção de dinoflagelados marinhos, em função da constante variabilidade e sensibilidade das cepas, existem poucos estudos com foco em análises experimentais e moleculares com células vivas em âmbito nacional. Desse modo, espera-se que o presente material possa contribuir para o desenvolvimento de novos estudos voltados para diferentes temas da ecologia, fisiologia e taxonomia desse importante grupo do plâncton marinho.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, R. A., KAWACHI, M. Tradicional Microalgae Isolation Techniques. In: Andersen, R. A. 2005. **Algal Culturing Techniques**. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press. p. 83-101.
- ANDERSON, D. M., MOREL, F. M. M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. **Limnology and Oceanography**, 23(2): 283-295.
- CASANOVA, M. A., MEDEIROS, F. 2011. Recentes evidências sobre os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 na doença cardiovascular. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, 10(3): 74-80.
- DIXON, G. K., SYRETT, P. J. 1988. The growth of dinoflagellates in laboratory cultures. **New Phytologist**, 109(3): 297-302.
- DODGE, J. D. 1985. **Atlas of Dinoflagellates**. (ed). Ferrand Press, Londo, 119p.
- DONIA, M., HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. 2003. **Infectious Diseases**, 3: 334-348.
- FAUST, M. A. 1991. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. **J. Phycol.** 27: 642-648.
- FIGUEROA, R. I.; BRAVO, I.; RAMILO, I.; PAZOS, Y.; MORONO, A. 2008. New life-cycles of *gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): laboratory and field observations. **Aquatic Microbial Ecology**, 52: 13-23.
- FLYNN, K., FLYNN, K. J., JONES, K. J. 1993. Changes in dinoflagellate intracellular amino acids in response to diurnal changes in light. **Marine Ecology Progress Series**, 100: 245-253.
- FRESHNEY, R. I. 2000. **Culture of animal cells, a manual of basic technique**. 4 ed. Wiley liss, 121-147p.
- GONZALEZ, M. A., PARRA, O. O. Y., CIFUENTES, A. S. 1995. Técnicas de Cultivo de Microalgas em Laboratório. In: **Manual de Métodos Ficológicos**, edited by K.. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira y E. Sar., Universidade de Concepción - Concepción Chile. P. 219-250.

GUILLARD, R. R. L., HARGRAVES, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. **Phycologia**, 32: 234-236.

GUILLARD, R. R. L., RYTHER, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. **Can. J. Microbiol.**, 8: 229-239.

GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L.; Chanley, M. H. (Eds). **Culture of Marine Animals**. Plenum Press, p. 26-60.

HACKETT, J. D., ANDERSON, D. M., ERDNER, D. L., BHATTACHARYA, D. 2004. Dinoflagellates: A Remarkable Evolutionary Experiment. **American Journal of Botany**, 91(10): 1523-1534.

HACKETT, J. D., TONG, M., KULIS, D. M., FUX, E., HESS, P. BIRE, R., ANDERSON, D. M. 2009. DSP toxin production de novo in cultures of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae) from North America. **Harmful Algae**, 8: 873:879.

HOSHAW, R. W., ROSOWSKI, J. R. 1973. Methods for microscopic algae. In: **Handbook of Phycological Methods**. Culture Methods & Growth Measurements, edited by Janet R. Stein. Cambridge University Press, 53-85p.

JEONG, H. J., YOO Y. D., KIM, J. S., SEONG, K. W., KANG, N. S., KIM, T. H. 2010. Growth, Feeding and Ecological Roles of the Mixotrophic and Heterotrophic Dinoflagellates in Marine Planktonic Food Webs. **Ocean Sci. J.** 45(2): 65-91.

KAWACHI, M., NOËL, M. Sterilization and Sterile Technique. In: Andersen, R. A. 2005. **Algal Culturing Techniques**. San Diego, California: Elsevier Academic Press. p. 65-83.

KAWACHI, M., NOËL, M. Sterilization and Sterile Technique. In: Andersen, R. A. 2005. **Algal Culturing Techniques**. San Diego, California: Elsevier Academic Press. p. 65-83.

KELLER, M. D., BELLOWS, W. K., GUILLARD, R. R. L. 1988. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 117:279-283.

KELLER, M.D., GUILLARD, R.R.L. 1984. Culturing Dinoflagellares. In: Spector, D.L. (ed). **Dinoflagellates**, Academic Press, London, UK, p. 391-435.

- KELLER, M.D., GUILLARD, R.R.L. 1985. Factors significant to marine dinoflagellates cultures. In: Andersom, D. M., White, A.W., Baden, D.G. (ed). **Toxic Dinoflagellates**, Elsevier Academic Press, New York, p. 113-116.
- KIM, Y. S., MARTIN, D. F. 1974. Effects of salinity on synthesis of DNA, acidic polysaccharide, and ichthyotoxin in *Gymnodinium breve*. **Phytochemistry**, 13(3): 533-538.
- KROES, R., SCHAEFER, E. J., SQUIRE, R. A., WILLIAMS, G. M. 2003. A review of the safety of DHA45-oil. **Food and Chemical Toxicology**, 41(11): 1433-1446.
- LIM, P., LEAW, P., OGATA, T.. 2007. Morphological variation of two *Alexandrium* species responsible for paralytic shellfish poisoning in Southeast Asia. **Botanica Marina**, 50: 14–21.
- LITAKER, R. W., MARK W. VANDERSEA, STEVEN R. KIBLER, KIMBERLY, S. R., STOKES, N. A., LUTZONI, F. M., YONISH, B. A., WEST, M. A., BLACK, M. N. D., TESTER, P. A. 2007. Recognizing dinoflagellate species using its rdna sequences. **Journal of Phycology**., 43, 344–355.
- LOURENÇO, S. O. 2006. Coleções de Microalgas em Cultivo. In: Lourenço, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, p. 345-385.
- MORAN, M. A., ARMBRUST, V. 2007. Genome of sea microbes. **Oceanography**, 20(2): 47-55.
- NAVES, L. J. 2002. Uma abordagem da toxicidade em extratos de cultivos de Dinoflagelados, gêneros *Prorocentrum* e *Alexandrium* do Canal de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia). Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo. 83p.
- NAVES, L. J. 2008. Estudos sobre dinoflagelados isolados da Costa Norte do Estado de São Paulo: monitoramento. Aspectos moleculares, biológicos e químicos. Tese. (Doutorado em Ciências, na Área de Fisiologia). Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 122p.
- NASCIMENTO, S. M., CORRÊA, E. V., MENEZES, M., VARELA, D., PAREDES, J., MORRIS, S. 2012. Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brasil. **Harmful algae**, 13: 1-9.
- NISHITANI, G, NAGAI, S, SAKIYAMA, S, KAMIYAMA, T. 2008. Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis caudata* (Dinophyceae). **Plankton Benthos Research**, 3(2): 78–85.

PARK, G. M., KIM, S., KIM, H. S., MYUNG, G., KANG, Y. G., YIH, W. 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. **Aquatic Microbial Ecology**, 45: 101-106.

RODRÍGUEZ, J. J. G., MIRÓN, A. S., CAMACHO, F. G., GARCÍA, M. C. C., BELARBI, E. H., GRIMA, E. M. 2010. Culture of dinoflagellates in a fed-batch and continuous stirred-tank photobioreactors: Growth, oxidative stress and toxin production. **Process Biochemistry**, 45(5): 660-666.

RODRÍGUEZ, J. J. G., MIRÓN, A. S., GARCÍA, M. C. C., BELARBI, E. H., CAMACHO, F. G., CHISTI, Y., GRIMA, E. M. 2009. Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. **Harmful Algae**, 8: 239-246.

SASSO, S., POHNERT, G., LOHR, M., MITTAG, M., HERTWECK, C. 2012. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, 36: 761-785.

SHERR, E. B., SHERR, B. F. 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, 352: 187-197.

SMAYDA, T. J. 2002. Adaptive Ecology, Growth Strategies and the Global Bloom Expansion of Dinoflagellates. **Journal of Oceanography**, 58: 281-294.

SOGAWA, K., SUMIDA, T., HAMAKAWA, H., YAMADA, T., MATSUMOTO, K., MATSUDA, K., ODA, H., MIYAKE, H., TASHIRO, S., OKUTANI, K. 1998. Inhibitory effect of a marine microalgal polysaccharide on the telomerase activity in K562 cells. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol.**, 99(3): 259-265.

STEIDINGER, K. A. 1975. Implications of dinoflagellates life cycles on initiation of *Gymnodinium breve* red tides. **Environmental letters**, 9(2): 129-139.

STEIDINGER, K. A. 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagelates biology and ecology. **Progress in Phicological Research**, 2: 147-187.

SWEENEY, B. M. 1951. Culture of the dinoflagellate *Gymnodinium* with soil extract. **American Journal of Botany**, 38(9): 669-677.

TAYLOR, F.J.R. 1987. General group characteristics; special features of interest; short history of dinoflagellate study. In: Taylor, F.J.R. (ed.). **The Biology of Dinoflagellates**, Blackwell, Oxford, UK. p. 1-23.

TILLMANN, U., HANSEN, P. J. 2009. Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: evidence from mixed growth experiments. **Aquatic Microbial Ecology**, 57: 101–112.

WISECAVER, J. H., HACKETT, J D. 2011. Dinoflagellate Genome Evolution. **Annual Review of Microbiology**, 65: 369-387.

YU, J., YANG, G., TIAN, J. The effects of the harmful alga *Heterosigma akashiwo* on cultures of *Schmackeria inopinus* (Copepoda, Calanoida). 2010. **Journal of sea research**, 64: 287:294.

7 – ANEXO

Cepas de dinoflagelados estabelecidas no Laboratório Integrados de Processos Oceanográficos – LIPO (Ubatuba, São Paulo). Numeração atribuída à cepa isolada, número da multiplaca de isolamento e local de isolamento, identificação taxonômica preliminar da espécie de dinoflagelado isolada, data do isolamento e local de coleta da amostra analisada. M1: Morfotipo 1. M2: Morfotipo 2. SP: São Paulo. SC: Santa Catarina. UBA: Ubatuba.

Nº	Multiplas de isolamento	Espécies	Data de isolamento	Local de coleta
01	Placas 01-02/SP	Ordem Gonyaulacales F. J. R. Taylor 1980	03.10	Espécie isolada em Itajaí (SC) e reisolada no Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP (SP)
03	Placas 01-02/SP	Família Goniomataceae Lindemann 1928		
11	Placa 02/UBA	Ordem Gonyaulacales F. J. R. Taylor 1980	19 - 20.03.10	Praia do Lamberto (Ubatuba, SP)
12	Placa 04/UBA	Família Gonyaulacaceae Lindemann 1928	25.04.10	
13	Placa 02/UBA	Ordem Gymnodiniales Lemmermann 1910 Família Gymnodiniaceae Lankester 1885	19 - 20.03.10	
14	Placa 04/UBA		25.04.10	
15	Placa 04/UBA		25.04.10	
17	Placa 03/UBA	Ordem Gonyaulacales F. J. R. Taylor 1980 Família Ostreopsidaceae Kindemann 1928	10.04.10	
18	Placa 03/UBA		10.04.10	
19	Placa 03/UBA		10.04.10	
20	Placa 02/UBA	Ordem Prorocentrales Lemmermann 1910 Família Prorocentraceae Stein 1883	19 - 20.03.10	
21	Placa 04/UBA		25.04.10	
22	Placa 03/UBA		10.04.10	
16	Placa 05/UBA	Ordem Gonyaulacales F. J. R. Taylor 1980	22.05.10	Canal do Boqueirão (Ubatuba, São Paulo)
02	Placas 06-07/UBA	Ordem Gonyaulacales F. J. R. Taylor 1980 Família Goniomataceae Lindemann 1928	Alexandrium sp. A (M1)	
04	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. B (M1)	
05	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. C (M1)*	
06	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. D (M1)	
07	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. E (M2)	
08	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. F (M2)*	
09	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. G (M2)*	
10	Placas 06-07/UBA		Alexandrium sp. H (M2)	

⁸ A espécie foi reisolada após a verificação do crescimento de uma microalga de menor tamanho na fase de decaimento da cultura e vem sendo cultivada, no LIPO, em 2 séries de tubos de ensaio, em duplicata;

⁹ (*) As quatro espécies destacadas foram perdidas durante o último período de execução do mestrado. As cepas continuam sendo repicadas, para o caso de estarem encistadas, porém não foi verificado crescimento até o presente momento.