

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PEREIRA DE FELIPE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DAS MICROALGAS *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada e *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller SOBRE COPÉPODES PLANCTÔNICOS DO GÊNERO *Acartia*

PONTAL DO PARANÁ

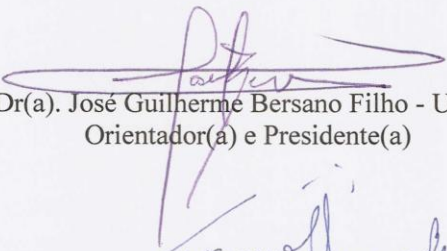
2013

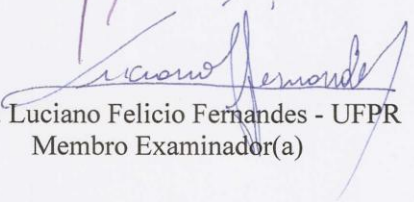
*“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DAS MICROALGAS
Heterosigma akashiwo (RAPHIDOPHYCEAE) e Prorocentrum
minimum (DINOPHYCEAE) SOBRE COPÉPODES PLANCTÔNICOS
DO GÊNERO Acartia”*

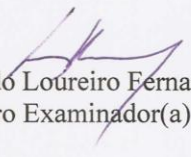
POR

Fernanda Pereira de Felipe

Dissertação nº 110 aprovada como requisito parcial do grau de Mestre(a)
no Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos da
Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos
professores:


Dr(a). José Guilherme Bersano Filho - UFPR
Orientador(a) e Presidente(a)


Dr(a). Luciano Felício Fernandes - UFPR
Membro Examinador(a)


Dr(a). Luiz Fernando Loureiro Fernandes - UFES
Membro Examinador(a)

Pontal do Paraná, 28/03/2013.



**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS
COSTEIROS E OCEÂNICOS**

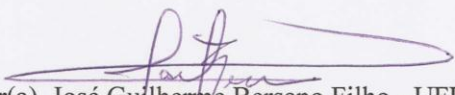
Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR
Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil
Tel. (41) 3511-8644 - Fax (41) 3511-8648 - www.cem.ufpr.br - E-mail: pgsisco@ufpr.br

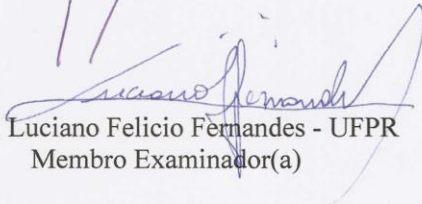
TERMO DE APROVAÇÃO

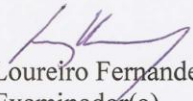
Fernanda Pereira de Felipe

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DAS MICROALGAS
Heterosigma akashiwo (RAPHIDOPHYCEAE) e Prorocentrum
minimum (DINOPHYCEAE) SOBRE COPÉPODES PLANCTÔNICOS
DO GÊNERO Acartia**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre(a) em Sistemas Costeiros e Oceânicos, da Universidade Federal do
Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Dr(a). José Guilherme Bersano Filho - UFPR
Orientador(a) e Presidente(a)


Dr(a). Luciano Felício Fernandes - UFPR
Membro Examinador(a)


Dr(a). Luiz Fernando Loureiro Fernandes - UFES
Membro Examinador(a)

Pontal do Paraná, 28/03/2013.

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

F315a Felipe, Fernanda Pereira de
Avaliação do potencial tóxico das microalgas *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada e *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller sobre copépodes planctônicos do gênero *Acartia* . / Fernanda Pereira de Felipe. – Pontal do Paraná, 2013.
65 f.; 29 cm.

Orientador: Dr. José Guilherme Bersano Filho.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Florações nocivas. 2. Zooplâncton. 3. Efeitos subletais. 4. Taxas de produção de ovos. 5. Taxas de ingestão. I.Título. II. José Guilherme Bersano Filho. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 589.3

*“Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade
das tartarugas
mais que a dos mísseis.
Tenho em mim
esse atraso de nascença.
Eu fui aparelhado
para gostar de passarinhos.
Tenho abundância
de ser feliz por isso.
Meu quintal
É maior do que o mundo.”*

Manoel de Barros

“There's real poetry in the real world.

Science is the poetry of reality.”

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao meu orientador Prof. José Guilherme Bersano Filho por todo o suporte e paciente transmissão de conhecimento por todos estes anos de pesquisa, além da infraestrutura concedida pelo Laboratório de Zooplâncton;
- Ao meu co-orientador Prof. Luiz Laureno Mafra Júnior, por toda calma, entusiasmo e disponibilidade em ajudar, mesmo nas horas mais difíceis. Sempre com muitas idéias e um sorriso no rosto;
- A CAPES pelo financiamento da minha pesquisa;
- Ao Centro de Estudos do Mar e PGSisCO pela infraestrutura disponibilizada para a realização do meu trabalho, e aos professores pelas ótimas aulas e amizade;
- A minha turma PGSisCO 2011 pela amizade, alegria compartilhada, pelo companheirismo e por fazer destes anos tão agradáveis;
- Finalmente à minha família, mãe e irmã, pelo amor incondicional, alegria e entusiasmo ao tentar entender o que de fato é este tal de fitoplâncton; por compreender a distância e sempre acalmar nas horas mais complicadas, com o amor mais puro do mundo;
- Ao meu pai (*in memoriam*) por me fazer enxergar a felicidade na simplicidade exuberante do canto dos pássaros e da natureza;
- Ao Phellipe, meu companheiro, por me fazer tão feliz, por estar sempre ao meu lado, me incentivar e me proporcionar momentos de tanta alegria;
- A natureza por ser tão inspiradora...

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.2. ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO I Avaliação de possíveis efeitos tóxicos da rafdofícea <i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) Hada sobre copépodes do gênero <i>Acartia</i>	19
RESUMO	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3. RESULTADOS.....	29
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO II Taxas de ingestão e produção de ovos de <i>Acartia tonsa</i> sob dietas contendo a diatomácea <i>Thalassiosira weissflogii</i> (Grunow) Fryxell & Hasle e/ou o dinoflagelado potencialmente nocivo <i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller	46
RESUMO	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3. RESULTADOS.....	55
4. DISCUSSÃO.....	57
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7. ANEXOS.....	64

RESUMO

Nas últimas décadas, o aumento na frequência, magnitude e distribuição geográfica de espécies de microalgas nocivas tem chamado a atenção para as particularidades fisiológicas, ecológicas e toxicológicas das espécies envolvidas. Apesar disso, pouco ainda se sabe sobre as interações entre microalgas nocivas e seus principais consumidores, o zooplâncton. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico de *Heterosigma akashiwo* e *Prorocentrum minimum* sobre copépodes do gênero *Acartia* provenientes do Complexo Estuarino de Paranaguá, PR, Brasil. Para tanto, foram realizados diferentes testes em laboratório a fim de verificar possíveis efeitos letais e subletais relacionados à produção de ovos e pelotas fecais, com duração de 24 e 72 horas. Os primeiros testes consistiram na alimentação de copépodes *Acartia tonsa* a diferentes concentrações celulares de *H. akashiwo* e em sua exposição ao extrato hidrossolúvel da microalga nas fases de crescimento exponencial e estacionária. Um último teste foi realizado para tentar encontrar a concentração capaz de matar metade do grupo experimental (CL₅₀) de copépodes *Acartia lilljeborgi*. A taxa de mortalidade máxima encontrada neste estudo foi de 31%, um valor relativamente baixo para caracterizar um efeito letal. A produção média de ovos e pelotas fecais (10 e 13 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹; 81 e 45 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹, para a fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente) na alimentação exclusiva com *H. akashiwo* demonstraram que os copépodes ingeriram esta microalga em menor quantidade e, conseqüentemente, produziram menos ovos (teste-t: p=0,003 e 0,02, respectivamente) do que a espécie controle *Thalassiosira weissflogii* (26 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹; 159 e 85 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹). As baixas taxas deste estudo foram atribuídas a uma possível baixa qualidade nutricional de *H. akashiwo*, reduções na alimentação dos copépodes quando alimentados por esta dieta, ou ainda à baixa digestibilidade das células pela presença de compostos químicos extracelulares presentes em sua parede celular. A exposição dos copépodes ao extrato hidrossolúvel em fase estacionária de crescimento causou uma inibição quase completa na produção de ovos e pelotas fecais (3 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 14 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹), com valores extremamente inferiores aos dos indivíduos que não sofreram exposição (29 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e até 208 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹). Provavelmente, a desintegração das membranas celulares ocasionou a liberação de ácidos graxos polinsaturados, no caso o ácido eicosapentaenóico (EPA), que teve sua toxicidade potencializada devido à presença do superóxido, produzido em abundância por *H. akashiwo*. Já os testes com o dinoflagelado *P. minimum* foram realizados a fim de encontrar as taxas de remoção (F), ingestão (I) e produção de ovos em dietas monoespecíficas ou em dietas mistas com a diatomácea *T. weissflogii*. As taxas de ingestão foram superiores na dieta exclusiva de *P. minimum* (3,2 x 10⁵ células.copépode⁻¹.dia⁻¹ ou 6,31 µg C.copépode⁻¹.dia⁻¹) o que pode estar refletindo um esforço maior de ingestão para manter níveis adequados de produção de ovos, já que com apenas 1,7 x 10⁵ células.copépode⁻¹.dia⁻¹ ou 2,21 µg C.copépode⁻¹.dia⁻¹ as taxas de produção de ovos em ambas as dietas foram semelhantes (31 e 32 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹, p=0,43). Além disso, o carbono presente em *P. minimum* possui baixa eficiência para produção de ovos (23%) quando comparado ao de *T. weissflogii* (64%), o que pode evidenciar que maiores quantidades da microalga devem ser ingeridas para garantir o potencial reprodutivo de *A. tonsa*.

Palavras-chave: Florações nocivas, zooplâncton, efeitos subletais, taxas de produção de ovos, taxas de ingestão.

ABSTRACT

The increase in frequency, magnitude, and geographic distribution of harmful microalgae species during the last decades has brought to attention their physiological, ecological, and toxicological particularities. Nevertheless, little is known on the interactions between harmful microalgae and their main consumers, the zooplankton. The goal of this study was to evaluate the toxicological potential of *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum* on *Acartia* copepods from the Paranaguá Estuarine Complex (PEC), Paraná, Brazil. In this regard, acute toxicity tests were performed for 24 and 72 hours in order to verify possible lethal and sublethal effects related to the production of eggs and fecal pellets. The first tests consisted in feeding *Acartia tonsa* with different cellular concentrations of *H. akashiwo* and in its exposure to the microalgae's hydrosoluble extract during the exponential and stationary growth phases. The last test was aimed at finding the lethal concentration for at least half of the individuals (CL_{50}) of *Acartia lilljeborgi*. The highest mortality rate found in this study was 31%, a relatively low value to characterize a lethal effect. Mean egg and fecal pellet production (10 and 13 eggs.female⁻¹.day⁻¹; 81 and 45 pellets.copepod⁻¹.day⁻¹ for exponential and stationary growth phases, respectively) during experiment with exclusive feeding on *H. akashiwo* demonstrated that copepods ingested the microalgae in small quantities, thus produced less eggs (t-test: $p = 0.003$ and $p = 0.02$, respectively) than the control species, *Thalassiosira weissflogii* (26 eggs.female⁻¹.day⁻¹; 159 and 85 pellets.copepod⁻¹.day⁻¹). The low rates obtained in this study could be due to a low nutritional quality of *H. akashiwo*, to a decrease in feeding of copepods when fed this diet, or to a low digestibility of cells due to the presence of chemical extracellular compounds in the cell wall. The exposure of copepods to the hydrosoluble extract during the stationary phase caused an almost complete inhibition of egg and fecal pellet production (3 eggs.female⁻¹.day⁻¹; 14 pellets.copepod⁻¹.day⁻¹), with values extremely lower than those from individuals which were not exposed (29 eggs.female⁻¹.day⁻¹; up to 208 pellets.copepod⁻¹.day⁻¹). Probably, the disintegration of the cellular membranes probably occasioned the release of polyunsaturated fatty acids, in this case the eicosapentaenoic acid (EPA), which had its toxicity potentiated due to the presence of the superoxide, produced abundantly by *H. akashiwo*. Tests with the dinoflagellate *P. minimum* aimed at finding the clearance rates (F), ingestion (I), and egg production in monospecific or mixed diets with the diatom *T. weissflogii*. Ingestion rates were higher in the *P. minimum* diet (3.2×10^5 cells.copepod⁻¹.day⁻¹ or $6.31 \mu\text{g C.copepod}^{-1}\text{.day}^{-1}$), which could reflect a higher ingestion effort to keep adequate levels of egg production, given that egg production rate for both diets was similar (31 and 32 eggs.female⁻¹.day⁻¹, $p = 0.43$) with 1.7×10^5 cells.copepod⁻¹.day⁻¹ or $2.21 \mu\text{g C.copepod}^{-1}\text{.day}^{-1}$. Besides that, the carbon within *P. minimum* confers low efficiency for egg production (23%) when compared to that within *T. weissflogii* (64%), which evidences that greater quantities of the microalgae must be ingested to ensure the reproductive potential of *A. tonsa*.

Key words: Harmful blooms, zooplankton, sublethal effects, egg production rates, ingestion rates.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos componentes do fitoplâncton desempenham um importante papel ecológico, pois realizam a transferência de energia e matéria orgânica aos demais níveis tróficos através da produção primária. Estima-se que pelo menos 90% da produção primária marinha global seja resultado da atividade do fitoplâncton (BEHRENFELD *et al.*, 2001; GREGG *et al.*, 2003). Contudo, sob determinadas circunstâncias, podem ser prejudiciais ao meio ambiente durante eventos conhecidos como “blooms” ou florações de algas nocivas (VAN DOLAH, 2000).

As florações fitoplanctônicas são fenômenos naturais impulsionados por uma combinação de fatores ambientais que propiciam um elevado crescimento de determinadas microalgas em um curto período de tempo, resultando em densidades de células excepcionalmente elevadas na água. A turbulência da água e a disponibilidade de nutrientes atuam como fatores favoráveis ao surgimento destas grandes densidades celulares, assim como temperatura da água, salinidade e luminosidade adequadas (MARGALEF, 1978; BATES; GARRISON; HORNER, 1998). Contudo, algumas espécies, mesmo em baixas concentrações, são suficientemente prejudiciais a ponto de caracterizar um evento de floração nociva (VAN DOLAH, 2000). Dentre estas, estão a rafdofíceia *Chatonella marina* (HALLEGRAEFF *et al.*, 1998) e os dinoflagelados *Pfiesteria piscicida* Steidinger *et Burkholder* (BURKHOLDER; GLASGOW JUNIOR, 1997) e *Dinophysis* spp. (SMAYDA, 1997), que mesmo em concentrações inferiores a mil células por litro de água já podem ser prejudiciais.

Os danos causados pelas florações de microalgas nocivas em ambientes marinhos são muitos, como a depleção do oxigênio da água em resposta à decomposição de matéria orgânica em excesso na fase final das florações; a mortalidade de organismos aquáticos devido à liberação de substâncias prejudiciais na água ou através de danos físicos ocasionados pela elevada concentração celular; a produção de ficotoxinas que podem intoxicar animais e seres humanos após a ingestão de frutos do mar contaminados; além de impactos econômicos, principalmente sobre as atividades da pesca, aquicultura e turismo (HALLEGRAEFF, 2003).

A frequência de florações de algas nocivas tem aumentado significativamente nas últimas décadas nos ambientes marinhos (SMAYDA, 1989; HALLEGRAEFF, 2003). Algumas das possíveis explicações para este aumento podem ser a eutrofização dos

ambientes costeiros; as mudanças climáticas de larga escala; ineficiência do controle biológico; o transporte de algas nocivas para novas áreas, seja de forma natural pelas correntes oceânicas, ou através de atividades humanas, como a aqüicultura e a água de lastro de navios; ou os maiores investimentos nas investigações científicas que fazem com que este fenômeno seja hoje melhor monitorado.

O número de espécies de microalgas com potencial tóxico varia na literatura, podendo geralmente estar subestimado, conforme sugerem os crescentes monitoramentos e descobertas subsequentes (ANDERSON & GARRISON, 1997; MAFRA *et al.*, 2006). Calcula-se que existam aproximadamente 300 espécies capazes de formar florações nocivas e, dentre estas, cerca de 40 produzam toxinas que podem eventualmente afetar a saúde humana (HALLEGRAEFF, 2003). De acordo com um banco de dados mundial, as algas marinhas nocivas são responsáveis por mais de 60.000 incidentes de intoxicação humana por ano, com um índice de mortalidade de 1,5% (VAN DOLAH, 2000).

Além de seus efeitos sobre a saúde humana, as ficotoxinas são responsáveis pela mortalidade de peixes, moluscos bivalves, mamíferos marinhos, aves e outros organismos componentes da cadeia alimentar marinha. Os impactos agudos causados pelas ficotoxinas são geralmente observados quando em eventos de floração, porém sabe-se que há efeitos crônicos no ambiente a baixas concentrações, embora estes não sejam bem documentados (VAN DOLAH, 2000).

Ainda menos compreendidas são as interações entre o fitoplâncton tóxico e seus consumidores primários, o zooplâncton (TURNER *et al.*, 1998; LINCOLN *et al.*, 2001). Variações na pressão de herbivoria exercida pelos organismos zooplânctônicos sobre o fitoplâncton podem ser indicadoras da presença de toxinas ou outros compostos que inibem o seu consumo na água (UYE, 1986; SHAW *et al.*, 1997). Isto porque algumas toxinas, quando produzidas em grandes concentrações durante as florações, são capazes de minimizar ou deter a herbivoria de consumidores potenciais, como os copépodes (LINCOLN *et al.*, 2001).

Os copépodes são considerados os metazoários mais abundantes do planeta (MAUCLINE, 1998; SCHMINKE, 2007), compreendendo de 55 a 95% da densidade e até 80% da biomassa total do mesozoplâncton marinho (LONGHURST, 1985). Devido a isso, têm grande importância na cadeia trófica, pois realizam a ligação entre o fitoplâncton e os consumidores situados em níveis tróficos superiores, além de desempenharem um

papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos, influenciando a regeneração de nutrientes e matéria orgânica no ambiente (HUYS & BOXSHALL, 1991; MITRA *et al.*, 2007).

O crustáceo *Acartia tonsa* Dana é um copépode planctônico pertencente à Ordem Calanoida, muitas vezes dominante nas comunidades zooplânctônicas, sendo assim, de extrema importância nas cadeias tróficas costeiras. Distribui-se amplamente pelo Atlântico Ocidental, Indo-Pacífico, Europa, Mar Báltico e Mar Negro através do Mar Mediterrâneo (MAUCLINE, 1998). Está, também, entre as espécies mais importantes que compõem o zooplâncton em estuários tropicais e subtropicais do Atlântico e de regiões temperadas (BJÖRNBERG, 1981; CERVETTO *et al.*, 1995). No Sul do Brasil, esta espécie pode ser bastante frequente, alcançando elevados valores de abundância tanto na costa como em estuários (MONTÚ, 1980; KAMINSKI & MONTÚ, 2005).

Os efeitos das toxinas de microalgas sobre os copépodes e outros organismos do zooplâncton variam para cada espécie (UYE & TAKAMATSU, 1990; TURNER *et al.*, 1998; TURNER *et al.*, 2001). Muitos trabalhos indicam que, em copépodes, as toxinas podem reduzir as taxas de ingestão, o crescimento populacional, a produção e a eclosão de ovos, além de sua sobrevivência (UYE & TAKAMATSU, 1990; TURRIFF *et al.*, 1995; LINCOLN *et al.*, 2001; MIRALTO *et al.*, 2003). Além das toxinas, esta redução pode se dar pela ação de outros compostos inibidores de predação (“grazing deterrents”) secretados por estes organismos ou ainda pela insuficiência nutricional de determinadas espécies (SHAW *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2001). A ingestão de diatomáceas tóxicas (assim como de outras espécies do fitoplâncton) pode interferir na reprodução, reduzindo o número de recrutas para as próximas gerações, causando grande impacto no ecossistema. Isso pode ser causado pela ação das toxinas diretamente na produção de ovos, ou por meio da geração de ovos não viáveis (UYE, 1986; BUSKEY & STOCKWELL, 1993; LINCOLN *et al.*, 2001).

A produção de ovos é um indicador das taxas de natalidade e recrutamento da população de copépodes. Além de determinar o potencial reprodutivo das espécies (HIRST & MCKINNON, 2001), está diretamente relacionada à qualidade nutricional a qual os organismos estão submetidos (BUTLER & DAM, 1994; CEBALLOS & IANORA, 2003). Neste contexto, a avaliação da produção de pelotas fecais atua como uma ferramenta complementar no entendimento do processo de alimentação de copépodes, pois têm uma relação direta com as taxas de ingestão (MAUCLINE, 1998). Desta forma, indica se determinado alimento é melhor metabolizado que outro (SANTER & VAN DEN BOSCH,

1994; IANORA *et al.*, 1995), o que influenciará nas taxas de produção de ovos (SHIN *et al.*, 2003).

No Brasil, os estudos que consideram os efeitos de microalgas tóxicas sobre o zooplâncton são limitados a testes de toxicidade com fases larvais de moluscos e crustáceos marinhos (e.g. MAFRA, 2005). Não há registros, entretanto, de estudos com copépodes. No litoral do Paraná, várias espécies de microalgas potencialmente tóxicas têm sido registradas, tanto no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) (PROENÇA & FERNANDES, 2004; MAFRA *et al.*, 2006), quanto na plataforma costeira (BRANDINI & FERNANDES, 1996; FERNANDES & BRANDINI, 2004) e na Baía de Guaratuba (L. L. MAFRA JR., *com. pess.*), mas atualmente não se pode afirmar se as mesmas podem ser nocivas ou não aos consumidores primários, principalmente aos copépodes.

Para o CEP, Mafra *et al.* (2006) apontaram as seguintes espécies de microalgas como as de maior potencial nocivo na região: *Pseudo-nitzschia* spp., *Dinophysis acuminata*, *Gymnodinium catenatum*, *Prorocentrum minimum*, *Phaeocystis* spp., *Chattonella* spp., *Heterosigma akashiwo*, *Trichodesmium erythraeum* e *Coscinodiscus wailesii*. As três primeiras, em conjunto com *Alexandrium* spp., também presente na região (L. L. MAFRA JR., *com. pess.*), são as que produzem as mais potentes ficotoxinas e que apresentam potencial para intoxicar seres humanos por meio do consumo de frutos do mar contaminados. Já para as demais espécies, o efeito nocivo atua principalmente sobre os organismos marinhos, variando desde a produção de substâncias tóxicas ainda não isoladas até alteração de cadeias tróficas e geração de matéria orgânica excessiva durante florações (MAFRA *et al.*, 2006). Dentre elas, o dinoflagelado *P. minimum* e a rafidofíceia *H. akashiwo* são abundantes e/ou frequentes, e se constituem em potenciais ameaças aos consumidores primários (Mafra *et al.*, 2006).

Neste sentido, as principais questões que orientam este trabalho são justamente relativas às possíveis formas como estas duas últimas espécies de microalgas poderiam afetar os copépodes, especialmente *Acartia tonsa*, uma espécie chave na cadeia trófica do CEP, litoral do PR. Seria *A. tonsa* capaz de selecionar e evitar a ingestão das microalgas consideradas nocivas? No caso de serem ingeridas, as microalgas avaliadas seriam capazes de provocar efeitos letais e/ou subletais aos copépodes? Para responder a estas perguntas, o presente estudo testará a hipótese de que, caso essas microalgas não provoquem a morte imediata dos copépodes quando ingeridas, poderão reduzir as taxas de alimentação e reprodução dos mesmos, o que será avaliado através da

produção de pelotas fecais e de ovos, além da estimativa do sucesso de eclosão dos ovos produzidos.

1.2. ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação será apresentada sob a forma de dois capítulos, que buscam responder, de forma conjunta, a todas as questões expostas acima. No CAPÍTULO 1 foram avaliadas as taxas de mortalidade, produção de pelotas fecais, produção de ovos e sucesso de eclosão de copépodes *A. tonsa* expostos a: (i) diferentes densidades celulares da rafidofíceia *H. akashiwo*, bem como a (ii) diferentes concentrações da fração hidrossolúvel do seu extrato celular. Tanto as células quanto os seus conteúdos internos (extratos) foram avaliados em diferentes fases do crescimento populacional da microalga, simulando situações de desenvolvimento e término de uma floração monoespecífica de *H. akashiwo*. O CAPÍTULO 2 aborda a capacidade de seleção alimentar do copépode *A. tonsa* quando exposto a dietas simples ou mistas, compostas pela diatomácea não nociva *Thalassiosira weissflogii* e/ou pelo dinoflagelado potencialmente tóxico *P. minimum*. Para atender a este objetivo, foram calculadas as taxas de ingestão, além das taxas de produção e sucesso de eclosão dos ovos de *A. tonsa* sob diferentes proporções de cada microalga.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.M., GARRISON, D.J. The ecology and oceanography of harmful algal blooms. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1009-1035, 1997.

BATES, S.S., GARRISON, D.L., HORNER, R.A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. *In*: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 267-292, 1998.

BEHRENFELD, M.J., RANDERSON, J.T., MCCLAIN, C.R., FELDMAN, G.C., LOS, S.O., TUCKER, C.J., FALOWSKI, P.G., FIELD, C.B., FROUIN, R., ESAIAIS, W.E., KOLBER, D.D., POLLACK, H. Biospheric Primary Production during an ENSO transition. **Science**, v. 291, p. 2594–2597, 2001.

BJÖRNBERG, T.K.S. Copepoda. *In*: Boltovskoy, D. **"Atlas del Atlántico Sudoccidental" métodos de trabajo com el zooplankton marino**. (Eds.), Pub. Esp. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, p. 587-679, 1981.

BRANDINI, F. P.; FERNANDES, L. F. Microalgae of the continental shelf off Paraná state, southeastern Brazil: a review of studies. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 44(1), p. 69–80, 1996.

BRIDGERS, A., MCCONNELL, E., NAAR, J., WEIDNER, A., TOMAS, L., TOMAS, C. Comparison of regional clones of the genera *Chattonella* and *Fibrocapsa* for growth characteristics and potential toxin production. *In*: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), **Harmful algae 2002**. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, p. 405-407, 2004.

BURKHOLDER, J.M., GLASGOW JR., H.B. Trophic controls on stage transformations of a toxic ambush-predator dinoflagellate. **Journal of Eukariotic Microbiology**, 44, 200-205, 1997.

BUSKEY, E.J., STOCKWELL, D.A. Effects of a persistent 'brown tide' on zooplankton populations in the Laguna Madre of south Texas. *In*: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), **Toxic phytoplankton blooms in the sea**. Elsevier, Amsterdam, p. 659–666, 1993.

BUTLER, M., DAM, H.G. Production rates and characteristics of fecal pellets of the copepod *Acartia tonsa* under simulated phytoplankton bloom conditions: implications for vertical fluxes. **Marine Ecology Progress Series**, v. 114, p. 81–91, 1994.

CEBALLOS, S., IANORA, A.. Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 294, p. 189-202, 2003.

CERVETTO, G., PAGANO, M., GAUDY, R. Feeding behaviour and migrations in a natural population of the copepod *Acartia tonsa*. **Hydrobiology**, v. 300/301, p. 237-248, 1995.

FERNANDES, L.F., BRANDINI, F. Diatom associations in shelf waters off Paraná state, Southern Brazil: annual variation in relation to environmental factors. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52(1), p. 19–34, 2004.

GREGG, W.W., CONKRIGHT, M.E., GINOUX, P., O'REILLY, J.E., CASEY, N.W. Ocean primary production and climate: global decadal changes. **Geophysical Research Letters**, v. 30, 2003.

HALLEGRAEFF, G.M., MUNDAY, B.L., BADEN, D.G., WHITNEY, P.L.. *Chattonella marina* raphidophyte bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in South Australia. *In*: Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernandez, and T. Wyatt. (Eds.), **Harmful Algae**, p. 93–96, Paris: Xunta de Galicia, IOC, 1998.

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. Second Edition. Paris, UNESCO, p. 25-50, 2003.

HIRST, A.G., MCKINOON, A.C. Does egg production represent adult female copepod growth? A call to account for body weight changes. **Marine Ecology Progress Series**, v. 223, p. 179-199, 2001.

HUYS, R.; BOXSHALL, G. A. **Copepod evolution**. London: Ray Society, 468 p., 1991.

IANORA, A., POULET, S.A., MIRALTO, A. A comparative study of the inhibitory effect of diatoms on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. **Marine Biology**, v. 121, p. 533-539, 1995.

KAMINSKI, S.M.; MONTÚ, M.A. Produção de ovos dos copépodes costeiros *Acartia tonsa*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata* da Praia do Cassino, Rio Grande, RS. **Atlântica**, v. 27, p. 103–111, 2005.

LINCOLN, J.A., TURNER, J.T., BATES, S.S., LÉGER, C., GAUTHIER, D.A. Feeding, egg production, and egg hatching success of the copepods *Acartia tonsa* and *Temora longicornis* on diets of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the non-toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. **Hydrobiologia**, v. 453/454, p. 107-120, 2001.

LONGHURST, A. R. The structure and evolution of plankton communities. **Progress in Oceanography**, v. 15, p. 1–35, 1985.

MAFRA, L.L. **Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá: subsídios para o monitoramento**. 156p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Botânica, UFPR, Paraná, 2005.

MAFRA, L.L., FERNANDES, L.F., PROENÇA, L.A.O. Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107-121, 2006.

MARGALEF, R. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. **Oceanologica Acta**, Paris, v. 1, p. 493-509, 1978.

MAUCHLINE, J. The Biology of Calanoid Copepods. *In*: Blaxter, Southward and Tyler, (Eds.), **Advances in Marine Biology**, 710 p., 1998.

MIRALTO, A., GUGLIELMO, L., ZAGAMI, G., BUTTINO, I., GRANATA, A., IANORA, A. Inhibition of population growth in the copepods *Acartia clausi* and *Calanus helgolandicus* during diatom blooms. **Marine Ecology Progress Series**, v. 254, p. 253-268, 2003.

MITRA, A., FLYNN, K.J, FASHAM, M.J.R. Accounting correctly for grazing dynamics in nutrient–phytoplankton–zooplankton models. **Limnology and Oceanography**, v. 52, p. 649–661, 2007.

MONTÚ, M. Zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos I. Estrutura e variações temporais e especiais da comunidade. **Atlântica**, v. 4, p. 53-72, 1980.

PROENÇA, L.A.O., FERNANDES, L.F. Introdução de microalgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores. *In*: Silva, J.S.V., Souza, R.C.C.L. (Eds.), **Água de lastro e bioinvasão**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 224, 2004.

SANTER, B., VAN DEN BOSCH, F. Herbivorous Nutrition of *Cyclops vicinus* - the Effect of a Pure Algal Diet on Feeding, Development, Reproduction and Life-Cycle. **Journal of Plankton Research**, v. 16, p. 171-195, 1994.

SCHMINKE, H.K. Entomology for the copepodologist. **Journal of Plankton Research**, v. 29, p. 149-162, 2007.

SHAW, B.A., ANDERSEN, R.J., HARRISON, P.J. Feeding deterrent and toxicity effects of apofucoxanthinoids and phycotoxins on a marine copepod (*Tigriopus californicus*). **Marine Biology**, v. 128, p. 273–280, 1997.

SHIN, K., JANG, M.C., JANG, P.K., JU, S.J., LEE, T.K., CHANG, M. Influence of food quality on egg production and viability of the marine planktonic copepod *Acartia omorii*. **Progress in Oceanography**, v. 57, p. 265-277, 2003.

SMAYDA, T.J. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: A linkage. *In*: Coper, E.M., Bricelj, V.M., Carpenter, E.J. (Eds.), **Novel Phytoplankton Blooms, Coastal and Estuarine Studies**, Number 35. Springer-Verlag, New York, p. 449–484, 1989.

SMAYDA, T.J. What is a bloom? A commentary. **Limnology and Oceanography**, v. 42, p. 1132-1136, 1997.

TURNER, J.T., TESTER, P.A., HANSEN, P.J. Interactions between toxic marine phytoplankton and metazoan and protistan grazers. *In*: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Springer-Verlag, Berlin, p. 453–474, 1998.

TURNER, J. T.; IANORA, A.; MIRALTO, A.; LAABIR, M.; ESPOSITO, F. Decoupling of copepod grazing rates, fecundity and egg-hatching success on mixed and alternating diatom and dinoflagellate diets. **Marine Ecology Progress Series**, v. 220, p. 187-199, 2001.

TURRIFF, N., RUNGE, J.A., CEMBELLA, A.D. Toxin accumulation and feeding behaviour of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* exposed to the red tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. **Marine Biology**, v. 123, p. 55–64, 1995.

UYE, S. Impact of copepod grazing on the red-tide flagellate *Chattonella antiqua*. **Marine Biology**, v. 92, p. 35–43, 1986.

UYE, S., TAKAMATSU, K. Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. **Marine Ecology Progress Series**, v. 59, p. 97-107, 1990.

VAN DOLAH, F.M. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. **Environmental Health Perspective**, v.108(1), p. 133-141, 2000.

CAPÍTULO I

Assessment of possible toxic effects of the Raphidophyceae *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada on copepods of the genus *Acartia*

Avaliação de possíveis efeitos tóxicos da rafidofíceia *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada sobre copépodes do gênero *Acartia*

Revista pretendida: Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (JEMBE), ISSN (0022-0981), Fator de impacto = 1.875, Qualis CAPES = Estrato B1.

Fernanda P. de Felipe¹, Luiz L. Mafra Jr. ¹, José G. Bersano Filho¹

¹ Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 61, 83255-976, Pontal do Paraná, PR, Brasil.

Keywords: *Acartia tonsa*, hydrosoluble extract, monospecific diet.

Palavras-chave: *Acartia tonsa*, extrato hidrossolúvel, dieta mono específica.

RESUMO

Heterosigma akashiwo é uma rafdofícea marinha reportada mundialmente como formadora de florações nocivas geralmente associadas a elevada mortalidade de peixes. Fatores que propiciam a dominância desta espécie, assim como o meio de ação de sua toxina ainda não foram definidos. Este estudo investigou os possíveis efeitos letais e subletais dessa microalga na produção de ovos e pelotas fecais de copépodes planctônicos do Complexo Estuarino de Paranaguá-PR, Brasil. Copépodes do gênero *Acartia* foram alimentados com diferentes concentrações e foram expostos ao extrato hidrossolúvel de *H. akashiwo* nas fases exponencial e estacionária de crescimento em testes de toxicidade aguda com duração de 24 e 72 horas. A alimentação dos copépodes com dieta monoespecífica de *H. akashiwo* não ocasionou efeitos letais, já que a mortalidade máxima foi de apenas 18% e 27%, porém efeitos subletais causaram reduções na produção de ovos e pelotas fecais em ambas as fases de crescimento. Quando comparadas à dieta controle *Thalassiosira weissflogii* (26 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹; 159 e 85 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹), as taxas foram significativamente menores (p= 0,003 e 0,02, teste-t), com 10 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 81 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ na fase exponencial e 13 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 45 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ na fase estacionária de crescimento. Possivelmente, as baixas taxas ocorreram devido a reduções na alimentação dos copépodes que podem ter evitado se alimentar da microalga pela presença de toxina ou compostos inibidores intracelulares, a uma possível baixa qualidade nutricional de *H. akashiwo*, ou mesmo à baixa digestibilidade das células devido à presença de compostos alelopáticos bioativos, uma secreção ou esfoliação de complexos polissacarídeo-proteínicos através da glicocálix em sua parede celular. A exposição aguda ao extrato hidrossolúvel de *H. akashiwo* obtido na fase estacionária de crescimento através de sonicação se mostrou tóxica mesmo em baixas concentrações, ocasionando mortalidade de até 31% dos indivíduos testados, além de ocasionar taxas nulas ou muito baixas de produção de ovos e pelotas fecais (3 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 14 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) quando comparadas à dos organismos que não sofreram exposição (29 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e até 208 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹). É possível que a ruptura da parede celular tenha liberado substâncias tóxicas intracelulares que podem ter tido sua toxicidade potencializada devido à presença de superóxido, produzido em abundância por *H. akashiwo* e outras espécies de rafdofíceas.

Palavras-chave: *Acartia tonsa*, extrato hidrossolúvel, dieta monoespecífica.

ABSTRACT

Heterosigma akashiwo is a marine raphidophyceae reported worldwide as forming harmful blooms generally associated with high fish mortalities. The factors which favor its dominance, as the action pathways of its toxin have yet to be defined. This study investigated the possible lethal and sublethal effects of this microalgae on egg and fecal pellet production by planktonic copepods from the Estuarine Complex of Paranaguá – PR, Brazil. *Acartia* copepods were fed with different microalgae concentrations and were exposed to its hydrosoluble extract during the exponential and stationary growth phases in acute toxicity tests during 24 and 72 hours. The diet which was exclusively composed of *H. akashiwo* did not generate lethal effects, given that mortality was 18 and 27%, however, sublethal effects caused reduction on egg and fecal pellet production during both growth phases. When compared to the control diet with *Thalassiosira weissflogii* (26 eggs.female⁻¹.day⁻¹; 159 and 85 fecal pellets.copepod⁻¹.day⁻¹), rates were significantly smaller (t-test: p = 0.003 and p = 0.02), with 10 eggs.female⁻¹.day⁻¹ and 81 fecal pellets.copepod⁻¹.day⁻¹ during the exponential growth phase and 13 eggs.female⁻¹.day⁻¹ and 45 fecal pellets.copepod⁻¹.day⁻¹ during the stationary phase. The low rates were probably due to a reduction in copepod feeding to avoid the microalgae by the presence of toxin or intracellular's inhibitor compounds, or to the low nutritional quality of *H. akashiwo*, or even to the low digestibility of the cells due to the presence of bioactive allelopathic compounds (a secretion or exfoliation of polysaccharide-protein complexes through the glycocalyx in its cellular wall). The acute exposure to the hydrosoluble extract of *H. akashiwo* obtained during the stationary growth phase through sonication showed to be toxic even in low concentrations, leading to a mortality of up to 31% on tested individuals, besides generating null or very low egg and fecal pellet production rates (3 eggs.female⁻¹.day⁻¹ and 14 fecal pellets.copepod⁻¹.day⁻¹) when compared to those of unexposed individuals (29 eggs.female⁻¹.day⁻¹ and up to 208 fecal pellets.copepod⁻¹.day⁻¹). It is possible that the rupture of the cellular wall released intracellular toxic substances which may have had their toxicity potentiated by the presence of the superoxide, which is produced abundantly by *H. akashiwo* and other raphidophyceae species.

Key words: *Acartia tonsa*, hydrosoluble extract, monospecific diet.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de florações de algas nocivas vem aumentando significativamente nas últimas décadas (Smayda, 1990; Anderson, 1995; Hallegraeff, 2003), resultando em grandes impactos ambientais e econômicos. Estima-se que um número de 5000 espécies componham o fitoplâncton marinho (Sournia *et al.*, 1991) e destas, aproximadamente 300 são capazes de produzir florações nocivas (Hallegraeff, 2003).

A classe Raphidophyceae é composta por cinco gêneros marinhos, *Chattonella*, *Fibrocapsa*, *Haramonas*, *Heterosigma* e *Olisthodiscus* e ainda, três gêneros dulciaquícolas, *Gonyostomum*, *Merotricha* e *Vacuolaria*. Algumas espécies marinhas (*Chattonella globosa* Hara et Chihara, *C. marina* Hara & Chihara, *C. marina* var. *antiqua* (Hada) Demura & Kawachi, *C. subsalsa* Biecheler, *Fibrocapsa japonica* Toriumi & Takano e *Heterosigma akashiwo* Hada ex Hara & Chihara) têm sido reportadas mundialmente como formadora de florações nocivas, sendo a maioria dos casos associada à mortalidade de peixes (Imai *et al.*, 1998; Tiffany *et al.*, 2001; Hiroishi *et al.*, 2005; Kempton *et al.*, 2008). A espécie *Heterosigma akashiwo*, por exemplo, foi responsável por inúmeras florações em fazendas de salmonídeos nas regiões noroeste e sudoeste do Oceano Pacífico e na porção oeste do Canadá que causaram grandes prejuízos econômicos, na ordem de milhões de dólares por evento (Khan *et al.*, 1997; Twiner e Trick, 2000; Tiffany *et al.*, 2001).

Muitas espécies de rafdofíceas são comuns em sistemas costeiros brasileiros (Persich *et al.*, 1998; Proença e Tamanaha, 2000; Bergesch e Odebrecht, 2001; Mafra *et al.*, 2006). No entanto, em apenas um dos casos, associado a uma floração de *H. akashiwo*, foi registrada mortalidade de peixes, em evento ocorrido na Baía de Guaraqueçaba, Complexo Estuarino de Paranaguá, no verão de 2001 (Proença e Fernandes, 2004). Outras florações de rafdofíceas foram registradas na costa do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, porém estas não causaram morte de organismos aquáticos (Odebrecht *et al.*, 2002; Proença, 2005).

A ação nociva de algumas espécies da classe rafdofíceas, como *H. akashiwo* e *Chattonella antiqua* para peixes já foi comprovada (Hallegraeff e Hara, 1995), no entanto, não se sabe ao certo como se dá o mecanismo de ação de suas ficotoxinas. Acredita-se que ocorra um dano físico provocado pela excreção de uma mucilagem capaz de obstruir as brânquias dos peixes, além da produção de ácidos graxos poliinsaturados que possuem substâncias hemolíticas. Também foi detectada a produção de brevetoxina e análogos, poliéteres com ação neurotóxica, em cepas de *Fibrocapsa japonica*, *Chattonella antiqua*, *Chattonella marina* isoladas do Japão, Nova Zelândia e Estados Unidos (Hard *et al.*, 2000; Khan e Onoue, 2000; Haque e Onoue, 2001; Bourdelais *et al.*, 2002; Bridgers *et al.*, 2004).

É de fundamental importância compreender como se dão as interações entre as algas nocivas e seus consumidores primários, os organismos zooplânctônicos. Sabe-se que algumas espécies de microalgas são capazes de reduzir ou eliminar a atividade alimentar de seus consumidores (= controle biológico), principalmente do zooplâncton, quer pelo efeito das ficotoxinas ou por proporcionar uma fonte de alimento não palatável à herbivoria (Buskey *et al.*, 1996; Turner e Tester, 1997), ou até mesmo por não serem completamente digeridas (Bersano *et al.*, 2002). Os copépodes, principais constituintes do zooplâncton, podem apresentar diferentes estratégias para lidar com tais mecanismos apresentados pelo fitoplâncton tóxico. Enquanto algumas espécies estão aptas a evitar a ingestão das células por seleção alimentar (Tomas e Deason, 1981; Huntley *et al.*, 1983; Uye e Takamatsu, 1990), outras são tolerantes/resistentes e podem consumir diretamente as microalgas, controlando assim as florações (Uye, 1986; Colin e Dam, 2002; Kozlowsky-Suzuki *et al.*, 2003) e algumas são fisiologicamente incapacitadas de forragear as espécies tóxicas e podem sofrer inanição (Sykes e Huntley, 1987; Lincoln, *et al.*, 2001). Quando copépodes que não possuem tais estratégias são expostos a concentrações elevadas de microalgas tóxicas, ou quando suas estratégias para evitar os efeitos nocivos não são completamente eficientes, eles se tornam susceptíveis aos efeitos deletérios das florações, que podem incluir a redução das taxas de ingestão, produção e eclosão de ovos, além de afetar suas taxas de sobrevivência (Uye e Takamatsu, 1990; Turriff *et al.*, 1995; Lincoln *et al.*, 2001; Miralto *et al.*, 2003).

Este estudo foi realizado a fim de avaliar possíveis efeitos da microalga potencialmente tóxica *Heterosigma akashiwo* sobre copépodes planctônicos das espécies *Acartia tonsa* Dana e *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht, muito comuns em estuários tropicais e subtropicais do Atlântico e de regiões temperadas (Björnberg, 1981; Cervetto *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1998).

Para alcançar este objetivo, a ocorrência de efeito agudo (i.e., letalidade) foi testada com uma dieta exclusiva de *Heterosigma akashiwo* em duas espécies do gênero *Acartia* (i). Efeitos letais e subletais foram mensurados através das taxas de produção e sucesso de eclosão de ovos e pelotas fecais (ii). O mesmo foi avaliado para copépodes expostos à fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo* (iii). Diferentes concentrações foram utilizadas com o objetivo de determinar as concentrações críticas para a espécie *A. tonsa* (iv). Por fim, a viabilidade de eclosão dos ovos foi observada para todos os tratamentos (iv).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e cultivo dos organismos

Os cultivos de *Heterosigma akashiwo* utilizados neste estudo foram iniciados a partir de um inóculo cedido por Mariângela Menezes, do Laboratório de Ficologia do Museu Nacional/UFRJ (LABIFICO), que havia sido inicialmente isolado por Luis A. O. Proença (Instituto Federal de Santa Catarina, Campus Itajaí) de amostra coletada entre as cidades de Laguna e São Francisco do Sul, Santa Catarina. Tais coletas ocorreram no âmbito de um programa estadual de monitoramento de algas nocivas mantido atualmente em parceria com a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). O método utilizado para tanto seguiu os procedimentos gerais descritos por Schmidt (2007), que consiste no isolamento por meio de manipulação através de um capilar de vidro e sucessivas lavagens. Atualmente, esta cepa de *H. akashiwo* vem sendo mantida em cultivo monoclonal no Laboratório de Microalgas (LaMic) do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR).

Os cultivos de *H. akashiwo* (10-18 µm de comprimento e 8-17 µm de largura) e das espécies não nocivas utilizadas como dieta de manutenção dos copépodes ou como “controle” durante os experimentos, *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle (10-16 µm de comprimento e 9-16 µm de largura) e *Isochrysis galbana* Parke (4-6 µm de comprimento e 3-5 µm de largura) foram mantidos em água do mar filtrada em membrana Millipore com porosidade de 0,6 µm, enriquecida com meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), com adição de silicato para a diatomácea *T. weissflogii*, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 1^\circ \text{C}$), salinidade (25), intensidade luminosa ($100\text{-}140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h).

Os copépodes utilizados nos experimentos foram coletados com rede de plâncton de 1,5 m de comprimento, 0,5 m de diâmetro e malha de 300 µm na desembocadura do Rio Guaraguaçu, em salinidade de 15 ± 2 , no estuário da Baía de Paranaguá. Após a coleta, foram imediatamente transportados para laboratório e, a partir deste momento, foram mantidos em baldes de 35 L com aeração suave, preenchido com água do mar filtrada em malha de porosidade de 1 µm, salinidade 15 ± 1 e alimentados em excesso com *Thalassiosira weissflogii* (20×10^3 células.mL⁻¹) e *Isochrysis galbana* (10×10^4 células.mL⁻¹). Os cultivos de *A. tonsa* foram mantidos no laboratório por mais de um ano, com adição periódica de novos indivíduos a partir da eclosão de ovos mantidos em geladeira, segundo recomendado por Bersano (2003).

2.2 Testes de toxicidade

2.2.1 Efeito letal e subletal das células de *Heterosigma akashiwo* sobre o copépode *Acartia tonsa*

Para que os experimentos pudessem contemplar as fases de crescimento exponencial e estacionária de *H. akashiwo*, a curva de crescimento da espécie foi obtida através de contagens

realizadas sob microscópio Olympus BX41, com uma câmera tipo Sedgewick-Rafter®. Diariamente, 1 mL de cada frasco era retirado do cultivo e fixado em solução de lugol neutro. Os valores das concentrações celulares foram calculados através da média e desvio padrão da contagem de três réplicas, e foram expressos em células por mililitro (células.mL⁻¹).

Assumindo que a saturação alimentar para *A. tonsa* ocorra a uma densidade de 20×10^3 células de *T. weissflogii*.mL⁻¹ (Kjørboe *et al.*, 1985), as densidades celulares experimentais de *Heterosigma akashiwo* foram convertidas em biovolume através da medida das dimensões de 30 células e o uso de formas geométricas aproximadas (Hillebrand *et al.*, 1999), podendo assim ser comparadas.

Para determinar a concentração de efeito observado (CEO) de cada regime de alimentação, caso este ocorresse, quatro diferentes densidades algais de *H. akashiwo* foram testadas (5%, 20%, 40% e 100%). No caso do experimento em fase de crescimento exponencial, a densidade celular no 15º dia de cultivo ($1,1 \times 10^5$ células.mL⁻¹) foi considerada o nível de exposição máxima (100%). Já em fase de crescimento estacionária, no 22º dia de cultivo, a densidade celular de $1,3 \times 10^5$ células.mL⁻¹ foi encontrada, sendo utilizada como o nível de exposição máxima. As demais concentrações (5, 20 e 40%) foram obtidas por diluição em água do mar filtrada a salinidade 20 em membrana Millipore com porosidade de 0,6 µm (Tabela I). Além destes, houve um tratamento de inanição e um controle com a diatomácea *T. weissflogii*. Cada tratamento foi conduzido em 4 réplicas.

Tabela I. Densidades celulares de *Heterosigma akashiwo* nas diferentes concentrações experimentais utilizadas em fase de crescimento exponencial e estacionária.

<i>Heterosigma akashiwo</i> (x10 ³ células.mL ⁻¹)		
Tratamentos	Fase exponencial	Fase estacionária
5%	5,5	6,6
20%	22	26,5
40%	40	50
100%	110	132,5

Antes de iniciar os experimentos, copépodes adultos foram selecionados com o auxílio de pipetas de Pasteur e transferidos a béqueres de 300 mL (8 fêmeas/4 machos por bequer), onde foram mantidos em inanição durante 10 h para que ovos e pelotas fecais provenientes da alimentação de manutenção fossem descartados. A incubação ocorreu durante 24 h sob as condições experimentais (regime alimentar variável, salinidade 20, temperatura $20 \pm 1^\circ$ C e fotoperíodo natural de 11:13 h C:E), a fim de se contabilizar vivos e mortos e obter a produção de ovos (ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e de pelotas fecais (nº.copépole⁻¹.dia⁻¹) resultantes da alimentação

ofertada em cada tratamento experimental (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 1999). Com o objetivo de evitar a sedimentação das microalgas, os frascos foram cuidadosamente agitados a cada 4 horas. Após as 24 h de incubação, o conteúdo de cada recipiente foi filtrado em uma malha de 20 µm para que ovos, pelotas fecais e copépodes ficassem retidos. A taxa de sobrevivência foi avaliada, e nos casos de morte, descontou-se o número de organismos mortos dos cálculos de produção de ovos e pelotas fecais. O material foi fixado em solução de formaldeído a 4% para posterior contagem de ovos e pelotas fecais sob lupa Olympus SZ 51.

Antes da fixação com formaldeído, um número entre 20-25 ovos foi retirado de cada dieta microalgal ao final do experimento, a fim de se quantificar o sucesso de eclosão dos ovos (%). Estes foram mantidos em placas de Petri nas mesmas condições laboratoriais por mais 24 h e o número de náuplios que eclodiu foi dividido pelo número de ovos e multiplicado por 100.

2.2.2 Efeito letal e subletal da fração hidrossolúvel do extrato de *Heterosigma akashiwo* sobre o copépode *Acartia tonsa*

A fração hidrossolúvel do extrato foi obtida através de sonicação com um ultrassom de ponteira Ultrasonic Processor modelo CPX 130 da Cole Parmer. O rompimento das células ocorreu devido à emissão de ondas sonoras de alta frequência. A amplitude do sonicador foi fixada em 60%, e a taxa de pulso foi de 3 segundos. A ruptura total das células foi verificada através de microscópio óptico Olympus BX41. Para que apenas a fração hidrossolúvel (i.e. substâncias dissolvidas no meio de cultivo e liberadas das células por ruptura) do extrato fosse utilizada, o mesmo foi filtrado em microfiltro de fibra de vidro GF-3 com porosidade de 0,6 µm.

Quatro diferentes concentrações da fração hidrossolúvel do extrato foram testadas (5%, 20%, 40% e 100%), obtidas através de contagem celular realizada em câmara tipo Sedgewick-Rafter[®] antes da ruptura das células para extração da fração hidrossolúvel. O experimento na fase de crescimento exponencial de *H. akashiwo* foi realizado no 8º dia de cultivo a uma densidade celular de $4,9 \times 10^4$ células.mL⁻¹. Para contemplar a fase estacionária, outro experimento foi realizado no 20º dia de cultivo, em concentração celular de $1,8 \times 10^5$ células.mL⁻¹. Ambas as concentrações foram consideradas como os níveis de exposição máxima (100%). As demais concentrações (5, 20 e 40%) foram obtidas por diluição em água do mar filtrada em membrana Millipore com porosidade de 0,6 µm em salinidade 20 (Tabela II).

Tabela II. Densidades celulares das diferentes concentrações da fração hidrossolúvel do extrato de *Heterosigma akashiwo* utilizadas nas primeiras 24 h do experimento em ambas as fases de crescimento, e a concentração de *Thalassiosira weissflogii* a qual todos os tratamentos foram submetidos nas 24 h finais. Os tratamentos de inanição e *T. weissflogii* não foram expostos ao extrato de *H. akashiwo*.

Tratamentos	0 – 24 h		24 – 48 h
	<i>H. akashiwo</i> ($\times 10^3$ células.mL ⁻¹)		<i>T. weissflogii</i> ($\times 10^3$ células.mL ⁻¹)
	Fase exponencial	Fase estacionária	Fase exponencial
5%	2,5	9	20
20%	10	36	20
40%	20	72	20
100%	50	180	20
Inanição	0		20
<i>T. weissflogii</i>	0 (+ 20 <i>T. weissflogii</i>)		20

A primeira etapa do experimento consistiu em se avaliar a taxa de sobrevivência de *A. tonsa* exposta a diferentes densidades celulares de *H. akashiwo* e, a partir de então, calcular a densidade capaz de matar metade do grupo experimental (CL₅₀). Para isso, 13 copépodes (10 fêmeas e 3 machos) foram expostos às diferentes concentrações da fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo* durante 24 h, sem oferta de alimento. Além destes, houve um tratamento de inanição e o controle com a diatomácea *T. weissflogii* (20×10^3 células.mL⁻¹), todos conduzidos em béqueres de polipropileno de 300 mL e com 4 réplicas cada.

Após a exposição aguda, o conteúdo de cada recipiente foi filtrado em uma malha de 200 µm, para que o número de indivíduos vivos fosse contabilizado e os mortos retirados com uma pipeta de Pasteur.

A segunda etapa foi realizada a fim de verificar possíveis efeitos subletais da exposição à fração hidrossolúvel do extrato. Os copépodes que permaneceram vivos foram retirados do extrato e transferidos para frascos experimentais contendo uma dieta exclusiva de *Thalassiosira weissflogii* (20×10^3 células.mL⁻¹) por um período de mais 24 h sob as mesmas condições (salinidade 20, temperatura $20 \pm 1^\circ$ C e fotoperíodo natural de 11:13 h C:E). O mesmo foi realizado para o tratamento de inanição e o controle, que permaneceu com a dieta de *T. weissflogii*. Após a incubação, o conteúdo de cada recipiente foi retido em uma malha de 20 µm, teve o número de indivíduos vivos e mortos novamente contabilizado, e nos casos de morte, o organismo foi descontado dos cálculos. O material foi fixado em solução de formaldeído a 4% para posterior contagem de ovos e pelotas fecais sob lupa Olympus SZ 51. Antes da fixação, um número entre 20-25 ovos foi separado de cada tratamento e transferido para placas de Petri, onde foram mantidos por mais 24 h para se quantificar o sucesso de eclosão (%). Para tanto, o número de náuplios que eclodiu foi dividido pelo número de ovos e multiplicado por 100.

2.2.3 Efeito letal das células de *Heterosigma akashiwo* sobre o copépode *Acartia lilljeborgi*

Este teste adicional de exposição aguda com o copépode *Acartia lilljeborgi* foi realizado a fim de se tentar determinar a concentração de *H. akashiwo* necessária para produzir efeito de letalidade em 50% (CL₅₀) dos indivíduos pertencentes ao grupo experimental, durante uma exposição relativamente longa (72 h). Indivíduos adultos de *A. tonsa* não estavam disponíveis no cultivo mantido no Laboratório de Zooplâncton e não foram encontrados no ambiente no momento deste experimento. Por outro lado, *A. lilljeborgi* foi coletada em grandes densidades no CEP e, portanto foi utilizada. Esta espécie é uma das seis do gênero *Acartia* que ocorrem ao longo de toda a costa do Brasil (Björnberg, 1981). É amplamente distribuída em muitas águas estuarinas tropicais e subtropicais do Brasil, desde o estuário do rio Tocantins, no Pará, ao norte (Cipólli e Carvalho, 1973) até a Baía de Paranaguá, no Paraná, ao sul (Montú e Cordeiro, 1988). Segundo o estudo de Lopes *et al.* (1998), *Acartia lilljeborgi* e os ciclopóides do gênero *Oithona* destacaram-se em abundância em praticamente toda a Baía de Paranaguá.

Com o objetivo de realizar o experimento na fase de crescimento estacionária de crescimento, para testar densidades celulares semelhantes às que ocorrem em florações de *H. akashiwo*, o cultivo da raífidócea foi mantido até o 33º dia, a uma densidade celular de $1,1 \times 10^5$ células.mL⁻¹. Seis diferentes densidades celulares foram testadas: 0,5, 2, 4, 7, 31,9 e 110×10^3 células.mL⁻¹, obtidas por diluição em água do mar com salinidade 20, filtrada em membrana Millipore com porosidade de 0,6 µm. A concentração de $31,9 \times 10^3$ células.mL⁻¹ é equivalente em biovolume às 20×10^3 células.mL⁻¹ de *T. weissflogii*, que, de acordo com Hillebrand *et al.* (1999), representa uma densidade celular suficiente para atingir o ponto de saturação alimentar (Kjørboe *et al.*, 1985).

A incubação ocorreu durante 72 h sob as condições experimentais (salinidade 20, temperatura $20 \pm 1^\circ$ C e fotoperíodo natural de 12:12 h C:E) e cada tratamento contou com 4 réplicas contendo 10 fêmeas adultas de *A. lilljeborgi* cada, além de um tratamento de inanição e um controle com a diatomácea *Thalassiosira weissflogii*. A cada 24 h, foram realizadas contagens celulares e eventuais reposições de células para que a densidade celular inicial fosse mantida até o final do experimento. Também foi contabilizado o número de indivíduos vivos e mortos, sendo que os mortos foram retirados com uma pipeta de Pasteur.

2.3 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVAs) unifatoriais foram conduzidas para testar as diferenças entre a produção de ovos e pelotas fecais dos copépodes que foram expostos às diferentes

concentrações celulares de *H. akashiwo* e o tratamento de inanição. Testes-t foram utilizados para verificar se diferenças na produção de ovos e pelotas fecais ocorriam entre o controle com a espécie *Thalassiosira weissflogii* e o tratamento com biomassa equivalente (medida em biovolume) da microalga potencialmente tóxica (40%). No caso do experimento de exposição à fração hidrossolúvel do extrato, no qual a produção de ovos e pelotas fecais foi tomada após as 24 h com a dieta de *T. weissflogii*, a qual todos os tratamentos foram submetidos da mesma forma, uma ANOVA pôde ser realizada comparando todos eles.

Além disso, uma ANOVA bifatorial foi realizada (intervalo de confiança de 95%) para testar as diferenças da produção de ovos e de pelotas fecais em relação às diferentes concentrações de *H. akashiwo* e as fases de crescimento da microalga. Esta comparação pôde ser feita apenas para o experimento que testou o efeito subletal das células de *H. akashiwo* sobre *A. tonsa*, já que as densidades algais dos cultivos em ambas as fases de crescimento eram próximas, o que não ocorreu no experimento que testou o efeito do extrato hidrossolúvel. Para atender aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, os dados foram transformados por log, raiz quadrada e pelo método potência ótima de Box-Cox, quando necessário. Para o experimento de exposição aguda com duração de 72 h, a ANOVA foi utilizada a fim de encontrar diferenças na mortalidade dos indivíduos ocasionadas pelas diferentes concentrações da dieta. Quando encontrada diferença significativa, o teste post-hoc de Tukey foi conduzido para identificar entre quais concentrações havia valores significativamente diferentes.

Todas as análises estatísticas foram geradas utilizando a linguagem de programação R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito letal e subletal das células de *Heterosigma akashiwo* sobre *Acartia tonsa*

A alimentação de *A. tonsa* com os cultivos de *H. akashiwo* nas fases de crescimento exponencial e estacionária provocaram mortalidade máxima de apenas 18% dos indivíduos, mesmo em densidades celulares de até 1,1 e 1,3 x 10⁵ células.mL⁻¹ (concentrações de 100%), respectivamente.

Durante a fase de crescimento exponencial de *H. akashiwo*, no tratamento de 40%, a produção de ovos foi de 10 ± 2 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹, enquanto no tratamento controle (biovolume equivalente de *T. weissflogii*) esta alcançou um valor médio significativamente diferente (p = 0,003) de 26 ± 5 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹. Da mesma forma, a produção de pelotas fecais foi de 81 ± 10 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ com a dieta de *H. akashiwo* e de 159 ± 25 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ com *T. weissflogii*, valores que novamente diferiram estatisticamente (p = 0,005) (Figura 1).

Para copépodes alimentados com *H. akashiwo* na fase estacionária (tratamento de 40%), a produção de ovos (13 ± 3 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) também foi significativamente inferior ($p = 0,02$) àquela do controle (26 ± 7 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹). Além disso, a produção média de pelotas fecais no tratamento com concentração de 40% de *H. akashiwo* (45 ± 3 pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹) foi menor e significativamente diferente ($p = 0,01$) da encontrada no controle (85 ± 20 pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹) (Figura 1).

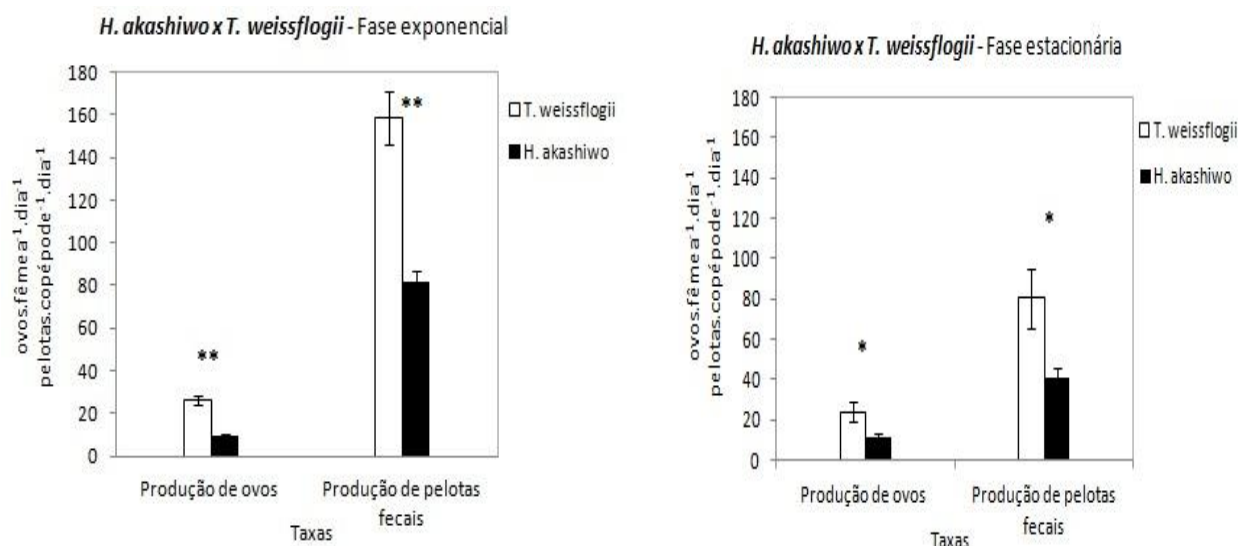


Figura 1. Produção de ovos (ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e pelotas fecais (pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹) para as dietas de *Heterosigma akashiwo* e *Thalassiosira weissflogii* (controle) durante a fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente. Os asteriscos significam pvalor < 0,5 (*) e $p < 0,01$ (**). As barras representam o erro padrão das quatro réplicas testadas para cada tratamento.

As diferentes concentrações de *H. akashiwo* apresentaram valores significativamente distintos entre alguns tratamentos ($p < 0,001$), tanto para a produção de ovos quanto para a produção de pelotas fecais durante a fase de crescimento exponencial. O número de pelotas fecais no tratamento de 5% foi mais baixo (41 ± 10 pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹) do que os valores obtidos nas demais concentrações de *H. akashiwo*, e as taxas de produção de ovos (14 ± 3 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e pelotas fecais (95 ± 8 pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹) de *A. tonsa* foram mais elevadas no tratamento de 100%. Além disso, o tratamento de inanição produziu, em média, 2 ± 1 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 29 ± 8 pelotas.copépede⁻¹.dia⁻¹, valores significativamente mais baixos do que todos os demais. Presumiu-se que em inanição ou com alimento de baixa qualidade nutricional, a produção dos ovos e pelotas fecais seria mais baixa (Buskey e Stearns, 1991; Calbet e Alcaraz, 1996; Carlotti e Hirche, 1997), porém optou-se pela realização do controle a fim de confirmar o pressuposto.

Com relação ao experimento desenvolvido na fase estacionária, as diferentes concentrações de *H. akashiwo* apresentaram diferenças significativas tanto para produção de

ovos ($p = 0,009$) como para produção de pelotas fecais ($p = 0,001$). Entretanto, estas diferenças se deram unicamente devido aos valores significativamente inferiores medidos no tratamento de inanição (Figura 2).

O sucesso de eclosão dos ovos foi superior a 80% em ambas as fases de crescimento da microalga.

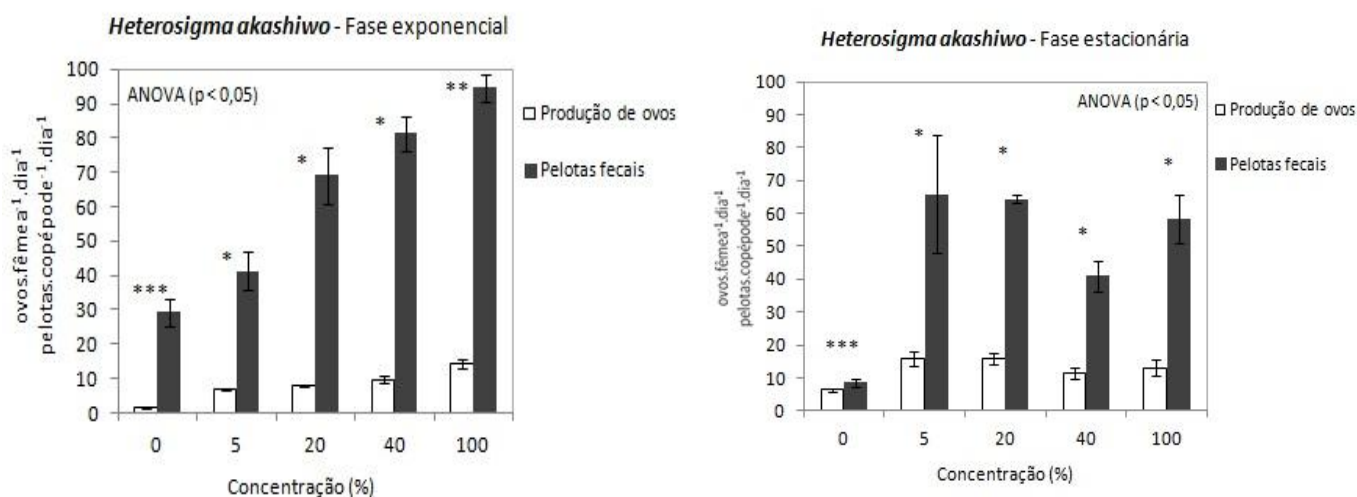


Figura 2. Produção de ovos (ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e pelotas fecais (pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) para as diferentes concentrações de *Heterosigma akashiwo* e inanição (0%) nas fases de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente. Os asteriscos representam grupos semelhantes através do teste de Tukey. As barras representam o erro padrão das quatro réplicas testadas para cada tratamento.

A comparação realizada entre as duas fases de crescimento, quanto à produção de ovos ($p < 0,01$) e pelotas fecais ($p < 0,001$) mostrou resultados com diferenças significativas. A produção de ovos diferiu entre os tratamentos de 5% ($5,5$ a $6,6 \times 10^3$ células.mL⁻¹) e 20% (22 a 26×10^3 células.mL⁻¹) entre uma fase e outra, já que os valores obtidos com a alimentação do cultivo em fase exponencial foram muito baixos (7 ± 1 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ e 8 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹, respectivamente). Quanto às pelotas fecais, os tratamentos de 40% (40 a 50×10^3 células.mL⁻¹) produziram 81 ± 10 e 45 ± 3 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ na fase exponencial e estacionária, respectivamente, e os tratamentos de 100% (110 a $132,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹), 95 ± 8 e 58 ± 14 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹. Estes valores apresentaram diferenças significativas entre fases de crescimento.

3.2. Efeito letal e subletal da fração hidrossolúvel do extrato de *Heterosigma akashiwo* para *Acartia tonsa*

A exposição de *A. tonsa* à fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo* nas fases de crescimento exponencial e estacionária (50 e 180×10^3 células.mL⁻¹ = concentrações de 100%) provocaram mortalidade máxima de 18% e 31 % dos indivíduos, respectivamente.

Quanto aos efeitos subletais, os copépodes que foram expostos às 24 h iniciais da fração hidrossolúvel em sua fase de crescimento exponencial, apresentaram valores significativamente distintos ($p < 0,01$) para a produção de ovos e de pelotas fecais entre alguns de seus tratamentos. A produção de ovos foi maior nos tratamentos de 20% (32 ± 8 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹), 40% (29 ± 6 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e no tratamento que permaneceu as 48 h experimentais com o controle, *T. weissflogii* (29 ± 1 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹). Os valores mais baixos foram encontrados nos tratamentos de 100% (19 ± 2 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e no tratamento que permaneceu as 24 h iniciais em inanição (18 ± 4 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹). A produção de pelotas fecais também apresentou diferenças extremamente significativas ($p < 0,001$) com valores mais elevados nas menores concentrações celulares, nos tratamentos de 5% (214 ± 11 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹), 20% (156 ± 49 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) e no tratamento que permaneceu as 48 h somente com *T. weissflogii* (189 ± 18 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) (Figura 3).

A exposição dos copépodes durante 24 h ao extrato na fase de crescimento estacionária da microalga causou uma redução extremamente significativa na produção de pelotas fecais e ovos nas 24 h seguintes, quando todos os tratamentos receberam a mesma concentração de *T. weissflogii*. Tanto a produção de ovos quanto a de pelotas fecais apresentou diferenças ($p < 0,001$) entre todas as concentrações de exposição e os tratamentos sem exposição ao extrato. A produção de ovos nos tratamentos expostos ao extrato foi em geral muito baixa, com o maior valor alcançado no tratamento de 40% (72×10^3 células.mL⁻¹), com somente 3 ± 1 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹. Os copépodes que não entraram em contato com a fração hidrossolúvel do extrato produziram 29 ± 13 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ em ambos os tratamentos, tanto os que passaram as 24 h iniciais em inanição quanto os que permaneceram as 48 h experimentais na dieta de *T. weissflogii*. A produção de pelotas seguiu a mesma tendência, com valores mais elevados nos tratamentos de inanição (126 ± 10 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) e 48 h de *T. weissflogii* (208 ± 61 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) e o menor valor obtido no tratamento de 100% (180×10^3 células.mL⁻¹), com somente 8 ± 4 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹ (Figura 3).

O sucesso de eclosão foi baixo (62%) para os organismos que permaneceram em inanição e sem contato com o extrato nas primeiras 24 h, em ambos os experimentos (fase exponencial e estacionária). Nos outros tratamentos, o sucesso de eclosão foi sempre superior a 80%.

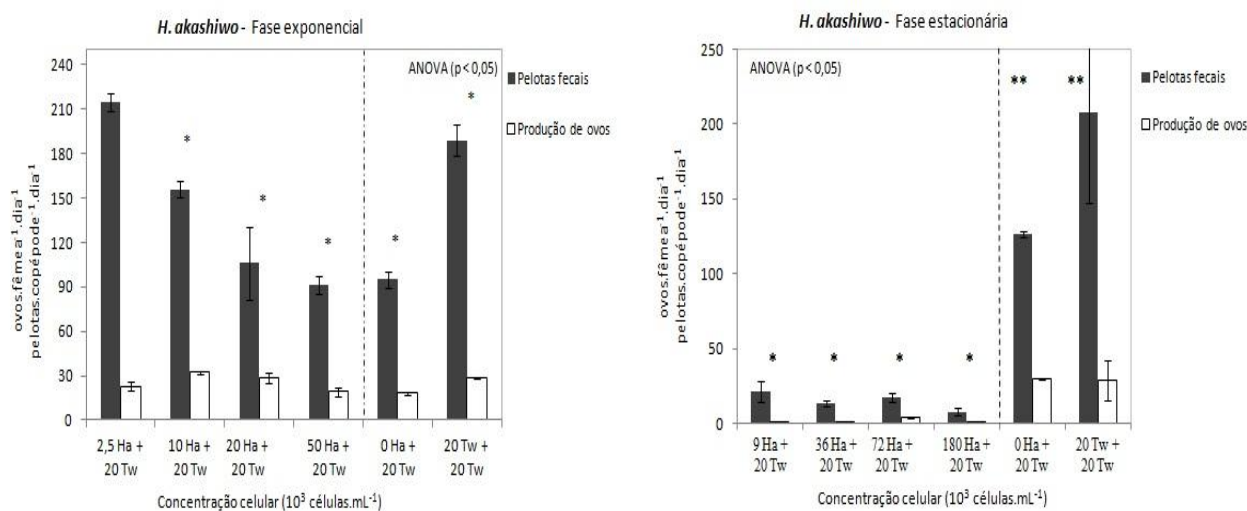


Figura 3. Produção de ovos (ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹) e pelotas fecais (pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹) após exposição às diferentes concentrações da fração hidrossolúvel do extrato de *Heterosigma akashiwo* (Ha) nas primeiras 24 h experimentais nas fases de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente, e posterior alimentação com dieta monoespecífica de *Thalassiosira weissflogii* (Tw) nas 24 h finais. Os tratamentos de inanição e *T. weissflogii* não foram expostos ao extrato de *H. akashiwo*. Os asteriscos representam grupos semelhantes através do teste de Tukey. As barras representam o erro padrão das quatro réplicas testadas para cada tratamento.

3.3. Efeito letal das células de *Heterosigma akashiwo* sobre o copépode *Acartia lilljeborgi*

A exposição de *Acartia lilljeborgi* às diferentes concentrações de *H. akashiwo* durante 72 h causou mortalidade máxima de apenas 27% dos indivíduos no tratamento de 100%. Este valor não diferiu significativamente dos demais ($p = 0,91$). O teste t realizado entre o tratamento de $31,9 \times 10^3$ células.mL⁻¹ de *H. akashiwo* e o controle com biovolume equivalente de *T. weissflogii* também não apontou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,13$), apesar de a mortalidade ter sido bem maior no tratamento com *H. akashiwo* ($23\% \pm 15$) do que no controle ($3\% \pm 2$) (Figura 4).

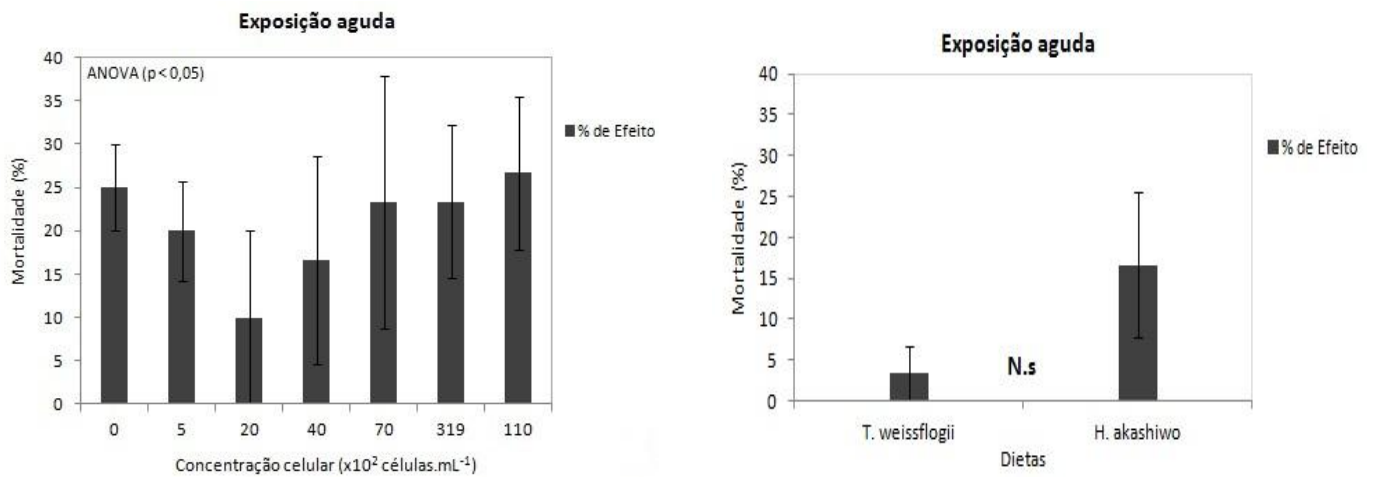


Figura 4. Taxas de mortalidade de *A. lilljeborgi* após 72 h de alimentação com dieta monoalgal de *H. akashiwo* em diferentes concentrações e em comparação com o controle *T. weissflogii*, respectivamente. N. s. significa que a diferença encontrada entre as dietas não foi significativa ($p > 0,05$). As barras representam o erro padrão das três réplicas testadas para cada tratamento.

4. DISCUSSÃO

Vários mecanismos de toxicidade têm sido propostos para rafdofíceas, incluindo a produção de compostos semelhantes à brevetoxina (Khan *et al.*, 1997, Bourdelais *et al.*, 2002), muco ou a presença de compostos alelopáticos bioativos na superfície celular (Honjo, 1993), a produção de radicais óxidos, superóxidos e peróxido de hidrogênio (Marshall *et al.*, 2005; Twiner e Trick, 2000) além de substâncias hemolíticas (Jüttner, 2001; Branco, 2012).

4.1. Efeito letal e subletal das células de *Heterosigma akashiwo* sobre *Acartia tonsa* e *Acartia lilljeborgi*

Os resultados deste estudo indicaram que os copépodes *A. tonsa* e *A. lilljeborgi*, aparentemente não sofreram efeitos tóxicos quando alimentados com a rafdofícea *H. akashiwo* posto que apresentaram mortalidade máxima de apenas 18% e 27% quando submetidos às várias densidades celulares desta microalga durante 24 h e 72 h, respectivamente. Vale dizer que tais densidades foram comparáveis ou superiores àquelas registradas durante florações da rafdofícea em ambientes naturais. Efeitos letais relacionados à mesma microalga também não foram encontrados em outros estudos de laboratório com copépodes, que reportaram apenas efeitos subletais relacionados a baixas taxas de ingestão, produção e eclosão de ovos (Tomas e Deason, 1981; Uye e Takamatsu, 1990; Colin e Dam, 2002).

Clough e Strom (2005) sugerem que uma dieta monoalgal de *H. akashiwo* parece nutricionalmente insuficiente para o crescimento de algumas espécies de ciliados, somente uma

dieta mista com *Rhodomonas sp.* garantiu altas abundâncias de indivíduos. Em outro estudo, o copépode *Schmackeria inopinus* apresentou taxas de ingestão e produção de ovos reduzidas quando alimentado com uma dieta de *H. akashiwo* em relação a *Isochrysis galbana* (Yu *et al.*, 2010). O mesmo ocorreu com *A. omorii* em comparação a dietas com outras quinze espécies de flagelados (Uye e Takamatsu, 1990). Para *A. tonsa* e *Acartia hudsonica*, Tomas e Deason (1981) também encontraram taxas de ingestão inferiores (4x), além de baixas taxas de crescimento quando alimentadas com uma dieta de *Olisthodiscus luteus* (considerado sinônimo de *H. akashiwo* para o autor) em relação à clorofíceia *Dunaliella tertiotecta*.

No presente estudo, indivíduos de *A. tonsa* alimentados com uma dieta monoespecífica de *H. akashiwo* apresentaram taxas de produção de ovos e pelotas fecais estatisticamente inferiores em relação aos copépodes alimentados com a diatomácea *T. weissflogii*, usada como controle. Apesar das baixas taxas de produção de pelotas fecais e ovos, estas foram sempre superiores às encontradas quando os copépodes foram mantidos em inanição, demonstrando que eles realmente se alimentaram de *H. akashiwo* e produziram ovos viáveis (sucesso de eclosão superior a 80%). As baixas taxas alimentares e de produção de ovos encontradas, portanto poderiam ser atribuídas a uma baixa qualidade nutricional de *H. akashiwo*, ou talvez a baixa digestibilidade das células, ou ainda ambas as coisas. Vários outros estudos têm encontrado resultados semelhantes quando copépodes são expostos a esta dieta, o que não necessariamente está relacionado à presença de toxina (Tomas e Deason, 1981; Viso e Marty, 1993; Uye e Takamatsu, 1990; Yu *et al.*, 2010).

Para algumas espécies de microalgas, a produção de compostos tóxicos ou inibidores é considerada um mecanismo químico de defesa contra herbívoros (Uye e Takamatsu, 1990). Os mesmos autores atribuíram a rejeição alimentar de *Acartia omorii* sobre *Gymnodinium nagasakiense*, *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* e *Heterosigma akashiwo* ao efeito de compostos químicos inibidores presentes dentro da célula. Além disso, outros estudos sugeriram uma possível seleção alimentar realizada por copépodes, que seriam capazes de evitar a ingestão de *H. akashiwo* em dietas mistas e monoespecíficas (Tomas e Deason, 1981; Uye e Takamatsu, 1990; Clough e Strom, 2005; Colin e Dam, 2002). Esta seleção se daria pela presença de quimiorreceptores nos apêndices bucais dos copépodes (Ong, 1969; Friedman e Strickler, 1975), que podem detectar determinados compostos químicos secretados pelas células, selecionando quais são as partículas alimentares adequadas e quais as indesejadas, reduzindo desta forma a ingestão sobre as últimas (Poulet *et al.*, 1986). Neste contexto, Yu *et al.* (2010) observaram que o calanóide *S. inopinus* apresentou baixas taxas de ingestão em dieta exclusiva de *H. akashiwo*, porém em dietas mistas, as taxas foram incrementadas conforme a concentração de *Isochrysis galbana* era aumentada. No presente estudo ficou comprovado que *A. tonsa* ingeriu *H. akashiwo*, porém em quantidades bem menores quando comparadas com o controle, fato que talvez possa

estar relacionado com o comportamento alimentar de *A. tonsa*, que uma vez percebendo através de seus quimiorreceptores a presença de células algais portadoras de toxinas, teria evitado a ingestão de grandes quantidades de células, a fim de manter concentrações toleráveis de toxinas em seu trato digestório.

Por outro lado, a possibilidade de que *H. akashiwo* seja nutricionalmente inadequada deve também ser abordada, na tentativa de se explicar as reduções observadas na produção de ovos de *A. tonsa*. De fato, Clough e Strom (2005) sugerem que as baixas taxas de crescimentos encontradas em uma dieta monoespecífica de *H. akashiwo* sejam causadas por sua baixa qualidade nutricional já que com uma dieta mista com *Rhodomonas* sp. altas abundâncias foram alcançadas. Tomas e Deason (1981) também encontraram taxas de ingestão e crescimento inferiores para *A. tonsa* e *A. hudsonica*, em dieta exclusiva de *Olithodiscus luteus* em relação à clorofíceia *Dunaliella tertiolecta*, o que poderia sugerir a baixa qualidade nutricional da rafdofíceia. Contudo, os resultados observados no presente estudo não confirmam esta hipótese, uma vez que o que foi realmente observado foi uma redução significativa na produção de pelotas fecais, fato que mostra na verdade que os copépodes ingeriram menor quantidade de alimento, quando comparada ao controle, o que conseqüentemente refletiu na baixa produção de ovos.

Percebe-se pelos fatos expostos que as respostas podem ser ainda mais complexas pois a redução alimentar pode decorrer da ação isolada ou combinada de fatores.

Há também outra possibilidade bastante plausível que explicaria a baixa ingestão de *H. akashiwo* e conseqüentemente uma relativa baixa toxicidade para o copépode. Alguns estudos atribuem a possível baixa digestibilidade das células de *H. akashiwo* à presença de compostos alelopáticos bioativos, neste caso, a secreção ou esfoliação de complexos polissacarídeo-proteínicos através da glicocálix presente na parede celular (Honjo, 1993). O estudo realizado por Bersano *et al.* (2002) mostrou que a pelagófita formadora de florações conhecidas como "Texas Brown Tide", *Aureoumbra lagunensis*, secreta substâncias poliméricas extracelulares (EPS) compostas por polissacarídeos. Além de reduções nas taxas alimentares de ciliados, constatou-se em *A. tonsa* que estas células são capazes de resistirem parcialmente à digestão e permanecerem vivas e sem danos nas pelotas fecais dos copépodes.

De forma semelhante, alguns autores relataram a adesão de células de *H. akashiwo* ao corpo do copépode *S. inopinus* (Yu *et al.*, 2010) e *Artemia salina* (Wang *et al.*, 2006; L. L. Mafra, dados não publicados) após 4 dias de exposição, o que ocasionou diminuição na velocidade de natação dos organismos, e indiretamente prejudicou as taxas de ingestão, reprodução e sobrevivência de ambos. Compostos extracelulares também foram encontrados na rafdofíceia *O. luteus*, o que causou reduções nas taxas alimentares do copépode *Centropages hamatus* (Van Alstyne, 1986). A produção e excreção destes componentes orgânicos é capaz de alterar a atividade metabólica em células de mamíferos (Twiner *et al.*, 2004). Em um estudo anterior,

Buskey e Hyatt (1995) haviam observado que ocorriam reduções nas taxas de crescimento e na produção de ovos de *A. tonsa* durante a floração de *A. lagunensis*, o que pode ser explicado pela baixa digestibilidade proposta por Bersano *et al.* (2002) para aquela microalga. Até o momento, entretanto, poucos estudos têm focado na função das estruturas da glicocálice de *H. akashiwo*, por isso a necessidade de continuar as investigações sobre as possíveis relações entre estas características e sua ação nociva.

4.2. Efeito letal e subletal da fração hidrossolúvel do extrato de *Heterosigma akashiwo* para *Acartia tonsa*

No que diz respeito a exposição de *A. tonsa* ao extrato hidrossolúvel do cultivo de *H. akashiwo* em fase estacionária de crescimento (i.e. conteúdo intra-celular + compostos extracelulares liberados no meio), os resultados não indicaram toxicidade aguda já que a mortalidade máxima foi de apenas 31 % dos indivíduos de *A. tonsa*. Porém, a exposição por 24 h dos copépodes a todas concentrações testadas deste mesmo extrato resultou em efeitos negativos subletais, tais como a inibição quase por completa das taxas de produção de ovos e de pelotas fecais, quando os organismos foram subsequentemente expostos a uma dieta monoespecífica, não tóxica de *T. weissflogii*. Em contrapartida, mesmo em concentrações equivalentes a até 50×10^3 células.mL⁻¹, a exposição de *A. tonsa* por 24 h ao extrato obtido com células de *H. akashiwo* em fase de crescimento exponencial do cultivo não causou danos aos copépodes, que apresentaram taxas de sobrevivência elevadas e alcançaram altas taxas de produção de ovos e de pelotas fecais após adição de *T. weissflogii* durante as 24 h seguintes. Apesar das altas taxas, foi observada uma redução na produção de ovos e pelotas conforme a concentração celular de *H. akashiwo* era aumentada. A exposição ao extrato hidrossolúvel do cultivo de *H. akashiwo* em fase exponencial de crescimento, portanto, não causou nenhum dano fisiológico à *A. tonsa*, que após a exposição por 24 h alcançou taxas de produção de ovos e pelotas fecais similares e até superiores às do controle com *T. weissflogii*. Tamanaha (2001) também não encontrou efeitos tóxicos relacionados à letalidade ou alterações no desenvolvimento de larvas de ouriços quando expostas a concentrações equivalentes a até 8×10^3 células.mL⁻¹ do extrato de *H. akashiwo* na mesma fase de crescimento. Do mesmo modo, a exposição ao extrato de *Heterosigma carterae* também não afetou o desenvolvimento embrio-larval da ostra *Crassostrea gigas* (Connell *et al.*, 1997).

O oposto foi observado durante exposição à fase estacionária da fração hidrossolúvel do extrato, com concentração máxima equivalente a 180×10^3 células.mL⁻¹. A produção de ovos nos tratamentos em que houve exposição e posterior alimentação com *T. weissflogii* foi extremamente reduzida, mesmo nas menores concentrações testadas, equivalentes a 9×10^3 células.mL⁻¹,

quando comparadas aos tratamentos em que não houve exposição. A produção de pelotas fecais também apresentou valores muito baixos em relação aos não expostos. Tais resultados sugerem que o extrato em fase de crescimento estacionária seja mais tóxico para *A. tonsa*, já que a exposição causou danos persistentes aos organismos, que mesmo após serem retirados do extrato e alimentados com *T. weissflogii* produziram poucos ovos e pelotas fecais, além de terem apresentado a maior mortalidade encontrada no estudo. Em ambiente natural, a fração hidrossolúvel do extrato poderia entrar em contato com os organismos marinhos devido à ação bacteriana agindo na decomposição das células em fase de crescimento senescente, em período pós-floração, momento que aparentemente é o mais prejudicial.

A exposição ao material intracelular de espécies potencialmente tóxicas tem sido reportada como prejudicial a muitos organismos. Em bioensaios, a exposição ao extrato de *H. akashiwo* afetou o desenvolvimento larval de *Perna perna*, porém não apresentou toxicidade para o ouriço-do-mar *L. variegatus* ou ação hemolítica em camundongos (Tamanaha, 2001). Os mesmos organismos testados, quando expostos ao extrato aquoso do dinoflagelado *Alexandrium fraterculus*, apresentaram danos em sua morfologia além da ocorrência de morte de camundongos em apenas 8 h de exposição (Proença *et al.*, 2002). Mafra (2005) isolou uma cepa de *H. akashiwo* proveniente da floração ocorrida no CEP em novembro de 2004 e comprovou sua letalidade em juvenis do misidáceo *Mysidopsis juniae* e atraso no desenvolvimento larval do molusco *Perna perna*.

O extrato obtido da mesma cepa utilizada neste trabalho apresentou atividade hemolítica em sangue de coelho quando em concentrações de $7,4 \times 10^5$ células.mL⁻¹ (Branco, 2012). A mesma autora, porém, não detectou brevetoxinas e seus derivados a partir do extrato obtido de uma floração de *H. akashiwo* na Lagoa Rodrigo de Freitas ocorrida em 19 de março de 2007 ao contrário dos estudos de Haque e Onoue (2002) e Khan *et al.* (1997). Células rompidas de diferentes cepas de *H. akashiwo* provenientes do Canadá, Estados Unidos e Espanha produziram uma potente atividade hemolítica em eritrócitos de coelho, de maneira denso-dependente quando em condições controladas (temperatura a 18°C e luminosidade a 100 μ mol fótons m⁻² s⁻¹) (Ling e Trick, 2010). Por outro lado, as mesmas cepas apresentaram baixa ou nenhuma atividade hemolítica quando suas células “intactas” foram expostas (Ling e Trick, 2010). O mesmo ocorreu com a rafidofíceia *C. marina*, onde agentes hemolíticos foram encontrados apenas nos extratos (Kuroda *et al.*, 2005). Isto sugere que os agentes hemolíticos são liberados após a ruptura celular, provavelmente relacionados aos componentes da membrana. Apesar do efeito observado em outros organismos, a ação hemolítica isolada em copépodes não pode ser comprovada.

Além disso, Marshall *et al.* (2003) demonstraram com *C. marina* que espécies reativas de oxigênio (ERO) podem atuar como potencializadoras dos agentes hemolíticos. *H. akashiwo*, assim como *C. marina* e *F. japonica* produzem níveis elevados de superóxido (Marshall *et al.*, 2005) e

EPA (entre 17 e 27% dos ácidos graxos) (Marshall *et al.*, 2002) considerado extremamente tóxico para organismos marinhos, incluindo o fitoplâncton (Arzul *et al.*, 1995) e o zooplâncton (Jüttner, 2001). Tal sinergia pode ter ocorrido no presente estudo, inibindo a alimentação e produção de ovos de *A. tonsa* após exposição à fração hidrossolúvel do extrato em altas concentrações.

Cepas de *H. akashiwo* isoladas em distintas regiões do mundo (e.g. América do Norte, Ásia, Europa, Oceania) apresentaram resultados de toxicidade positivos para bioensaios com peixes, larvas de moluscos, ostras, crustáceos, ciliados e camundongos (Ono *et al.*, 2000; Keppler *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2005; Ling e Trick, 2010; Powers *et al.*, 2011). Porém, a toxicidade de *H. akashiwo* tem sido associada a diversos fatores ambientais, como temperatura, salinidade, luz e disponibilidade de nutrientes e não apenas às densidades celulares encontradas nas florações (Ling e Trick, 2010; Fredrickson *et al.*, 2011). Além disso, as populações de *H. akashiwo* apresentam elevada variabilidade genética e fenotípica, e a existência dos diferentes ecótipos pode ser relacionada ao local de isolamento, a população de origem, ou o momento da floração. Dentro de uma mesma região geográfica, ecótipos fortemente contrastantes, com diferentes estratégias competitivas coexistem em uma única população de *H. akashiwo* (Fredrickson *et al.*, 2011). Sendo assim, para se determinar o potencial efeito nocivo de uma floração de *Heterosigma akashiwo*, o cultivo e testes de toxicidade em laboratório tornam-se ferramentas fundamentais.

As condições de cultivo também podem alterar a toxicidade de *H. akashiwo* (Mafra, 2005). Em testes realizados por Ono *et al.* (2000), maiores toxicidades foram obtidas a 25°C e salinidades entre 20 e 25 (Proença e Fernandes, 2004). A cepa utilizada neste estudo foi cultivada nessa faixa de salinidade e temperatura a 20°C, seguindo as condições disponíveis no Laboratório de Microalgas do Centro de Estudos do Mar. As condições laboratoriais de salinidade, temperatura e luminosidade utilizadas nos presentes cultivos e durante os bioensaios podem ter contribuído para a possível ação tóxica de *H. akashiwo*, já que nem sempre os diferentes ecótipos apresentam efeitos negativos aos organismos em testes realizados em laboratório, como já citado anteriormente.

A dieta exclusiva de *H. akashiwo* rendeu baixas taxas de produção de ovos e pelotas fecais para *A. tonsa* quando comparadas à alga controle, *T. weissflogii*, que alcançou taxas de produção de ovos de até 29 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹. Apesar de não terem sido realizados testes mais específicos, as baixas taxas foram atribuídas a uma possível baixa qualidade nutricional de *H. akashiwo*, a reduções na alimentação dos copépodes, ou mesmo à baixa digestibilidade das células pela presença de compostos químicos em sua parede celular. A exposição aguda às frações hidrossolúveis do extrato se apresentou tóxica mesmo em baixas concentrações em fase de crescimento estacionário. Mesmo após a retirada dos indivíduos e posterior alimentação com *T. weissflogii*, taxas nulas ou muito baixas foram obtidas de produção de ovos e pelotas. Portanto, esta ação observada pode causar redução no potencial reprodutivo da espécie no

ambiente natural. Provavelmente, a desintegração das membranas celulares provocou a liberação de ácidos graxos poliinsaturados, no caso o ácido eicosapentaenóico (EPA), que teve sua toxicidade potencializada devido à presença do superóxido, que é produzido em abundância por *H. akashiwo* e outras espécies de rafdofíceas.

Os resultados encontrados se mostram preocupantes, já que as duas espécies de *Acartia* aqui estudadas, estão entre as principais componentes do zooplâncton no CEP (Lopes *et al.*, 1998) possuindo grande importância trófica. No caso de ocorrência de florações de *H. akashiwo* o prejuízo para o ecossistema poderá ser grande, devido a reduções no potencial reprodutivo das espécies, o que se mostrou possível através deste estudo. A finalidade da realização dos experimentos com o extrato de *H. akashiwo* foi simular o efeito da ação bacteriana agindo na degradação celular que ocorre na fase senescente de crescimento, no período pós-floração em ambiente natural, o que se mostrou extremamente prejudicial aos copépodes. Cabe dizer que florações registradas no CEP em ocasiões anteriores apresentaram densidades de $2,6 \times 10^3$ células.mL⁻¹ em março de 2001 (Proença e Fernandes, 2004) e $5,2 \times 10^3$ células.mL⁻¹ em novembro de 2004 (Mafra, 2005). Mesmo em densidades inferiores às utilizadas neste estudo, a primeira ocasionou altas mortalidades de peixes e a segunda apresentou toxicidade em bioensaios realizados em juvenis do misídeo *Mysidopsis juniae* e mexilhões *Perna perna*. Na primeira ocasião, a pesca e o consumo de mexilhões da região foram proibidos por 25 dias, gerando um gasto estimado em cerca de US\$ 180.000,00 (Proença e Fernandes, 2004). Baseado nisso, faz-se necessário um plano de monitoramento de algas nocivas no Complexo Estuarino de Paranaguá, já que a região se mostra susceptível aos efeitos deletérios causados por eventos desta natureza.

5. CONCLUSÕES

1. Não foram verificados efeitos letais em *A. tonsa* e *A. lilljeborgi* quando submetidos a uma dieta monoespecífica com a rafdofíceia em várias densidades celulares durante 24 h e 72 h, já que as mortalidades máximas encontradas foram de apenas 18% e 27%;
2. Efeitos subletais relacionados à baixa produção de ovos e pelotas fecais ocorreram quando *A. tonsa* foi alimentada com diferentes concentrações de uma dieta monoespecífica de *H. akashiwo* em relação à *T. weissflogii*;
3. Indivíduos do copépode *A. tonsa* apresentaram taxa de mortalidade de 31% quando expostos a fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo*, que foi a mortalidade mais alta encontrada neste estudo;

4. A exposição de *A. tonsa* à fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo* em fase de crescimento exponencial durante 24 h não causou danos fisiológicos nos indivíduos, que alimentados posteriormente com *T. weissflogii*, alcançaram taxas de produção de ovos e pelotas fecais dentro da normalidade;

5. Efeitos subletais em copépodes expostos à fração hidrossolúvel de *H. akashiwo* na fase de crescimento estacionária foram evidentes nas diferentes concentrações utilizadas, pois houve uma inibição drástica na produção de ovos e de pelotas fecais mesmo após alimentação com *T. weissflogii*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D. M., 1995. ECOHAB: The Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms: A National Agenda. Woods Hole Oceanographic Institute, Woods Hole, MA, 66 p.
- Arzul, G., Gentien, P., Bodennec, G., Toularastel, F., Youenou, A., Crassous, M.P., 1995. Comparison of toxic effects of *Gymnodinium cf. nagasakiense* polyunsaturated fatty acids, in: Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, pp. 395–400.
- Bergesch, M., Odebrecht, C., 2001. Characteristics and importance of plankton flagellates in marine coastal and oceanic ecosystems, in: Faria, B.M., Farjalla, V.F., Esteves, F.A. (Eds.), Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, IX: 173-196.
- Bersano, J.G.F., Buskey, E.J., Villareal, T.A., 2002. Viability of the Texas brown tide alga, *Aureoumbra lagunensis*, in fecal pellets of the copepod *Acartia tonsa*. Plankton Biol. Ecol., 49, 88-92.
- Bersano, J.G.F., 2003. Intensive cultivation of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: a potential source of live food for aquaculture, in: Annual Meeting of the World Aquaculture Society, 1., Salvador. 2003. Book of abstracts. Salvador, BA., pp. 95 (Resumo).
- Björnberg, T.S.K., 1981. Copepoda, in: Boltovskoy, D. (Eds.). Atlas del zooplancton del atlantico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Publ. Esp. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, 587-680.
- Bourdelais, A.J., Tomas, C.R., Naar, J., Kubanek, J., Baden, D.G., 2002. New Fish-Killing Alga in Coastal Delaware Produces Neurotoxins. Environ. Health Perspect., 110 (5), 465-470.
- Branco, S., 2012. Morfotaxonomia e Toxicidade de Espécies de Raphidophyceae (Ochrophyta) do Rio de Janeiro e Santa Catarina. Dissertação de mestrado, Mestrado em Ciências Biológicas (Botânica), Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). 60 p.
- Bridgers, A., McConnell, E., Naar, J., Weidner, A., Tomas, L., Tomas, C., 2004. Comparison of regional clones of the genera *Chattonella* and *Fibrocapsa* for growth characteristics and potential toxin production, in: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A., (Eds.), Harmful algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 405-407.
- Buskey, E.J., Stearns, D.E., 1991. The effects of starvation on bioluminescence potential and egg release of the copepod *Metridia longa*. J. Plank. Res., 13, 885-893.
- Buskey, E. J., Hyatt, C.J., 1995. Effects of the Texas (USA) "brown tide" alga on planktonic grazers. Mar. Ecol. Prog. Ser., 126, 285-292.

- Buskey, E. J., Patterson, S., Stewart, J., Collumb C., 1996. Current status and historical trends of brown tide and red tide phytoplankton blooms in the Corpus Christi Bay National Estuary Program Study Area. Corpus Christi Bay National Estuary Program Publ. no.CCBNEP-1, 90 p.
- Calbet, A., Alcaraz, M., 1996. Effects of constant and fluctuating food supply on egg production rates of *Acartia grani* (Copepoda: Calanoida). Mar. Ecol. Prog. Ser., 140, 33-39.
- Carlotti, F., Hirche, H.J., 1997. Growth and egg production of female *Calanus finmarchicus*: An individual-based physiological model and experimental validation. Mar. Ecol. Prog. Ser., 149, 91-104.
- Cervetto, G., Pagano, M., Gaudy, R., 1995. Feeding behavior and migrations in a natural population of the copepod *Acartia tonsa*. Hydrob., 301, 237–248.
- Cipólli, M.N., Carvalho, M.A.J., 1973. Levantamento de Calanoida e Cyclopoida (Copepoda, Crustacea) das águas da regila do Guama, Capim e Tocantins, com nota sobre a fauna acompanhante. Papdis Avulsos Zoologia, S. Paulo, 27, 95-110.
- Clough, J., Strom, S., 2005. Effects of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) on protist grazers: laboratory experiments with ciliates and heterotrophic dinoflagellates. Aquat. Microb. Ecol., 39, 121–134.
- Colin, S.P., Dam, H.G., 2002. Latitudinal differentiation in the effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* spp. on the feeding and reproduction of populations of the copepod *Acartia hudsonica*. Harmful Algae, 1, 113–125.
- Connell, L., Welling, K.A., Cattolico, R.A., 1997. Algal organic metabolites affect survival of pacific oysters, *Crassostrea gigas*, larvae. J. Shel. Res., 16(2), 439-501.
- Fredrickson, K.A., Strom, S.L., Ryan C., 2011. Interstrain variability in physiology and genetics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) from the West Coast of North America. J. Phycol., 47, 25–35.
- Friedman, M. M., Strickler, J. R., 1975. Chemoreceptors and feeding in calanoid copepods (Arthropoda: Crustacea). Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 72, 4185-4188.
- Fu, M., Koulmanb, A., Van Rijsselc, M., Lutzend, A., de Boerc, M.K., Tylc, M.R., Liebezeit, G., 2004. Chemical characterisation of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). Toxicon, 43, 355–363.
- Gómez-Gutiérrez, J., Peterson, W.T., 1999. Egg production rates of eight calanoid copepod species during summer 1997 off Newport, Oregon, USA. J. Plank. Res., 21, pp. 637-657.
- Hallegraeff, G.M., Hara, Y., 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes, in: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on harmful marine microalgae, Paris: Unesco, pp. 365-371.
- Hallegraeff, G.M., 2003. 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. Second Edition. Paris, UNESCO, pp. 25-50.
- Haque, S.M., Onoue, Y., 2002. Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Bot. Mar., 45, 356–363.
- Hard, J.J., Connell, L., Hershberger, W.K., Harrell, L.W., 2000. Genetic variation in mortality of chinook salmon during a bloom of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. J. Fish Biol., 56, 1387-1397.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Polingher, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol., 35, 403–424.
- Hiroishi, S., Okada, H., Imai, I., Yoshida, T., 2005. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. Harmful Algae, 4, 783-788.
- Honjo, T., 1993. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*, in: Smayda, T.J., Shimizu, Y., (Eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam, Elsevier, pp. p 33–41.
- Huntley, M. E., Barthel, K. G., Star, J. L., 1983. Particle rejection by *Calanus pacificus*: discrimination between similarly sized particles. Mar. Biol., 74, 151–160.
- Imai, I., Yamaguchi, M., Watanabe, M., 1998. Ecophysiology, life cycle, and bloom dynamics of *Chattonella* in the Seto Inland Sea, Japan, in: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff,

- G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, Nato-Asi series 41, Berlin: Springer, pp. 93-112.
- Jüttner, F., 2001. Liberation of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defence reaction in epilithic diatom biofilms. *J. Phycol.*, 37, 744–755.
- Kempton, J., Keppler, C. J., Lewitus, A., Shuler, A., Wilde, S., 2008. A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters. *Harmful Algae*, 7, 235-240.
- Keppler, C.J., Hoguet, J., Smith, K., Ringwood, A.H., Lewitus, A.J., 2005. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae*, 4, 275–285.
- Khan, S., Arakawa, O., Onoue, Y., 1997. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquac. Res.*, 28, 9-14.
- Khan, S., Onoue, Y., 2000. Variation of neurotoxin production in axenic and non-axenic cultures of *Chattonella antiqua*, in: Sabino, M., Rodrigues-Amaya, D., Corrêa, B. (Eds.), *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, 10°. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP.
- Kjørboe, T., Mohlenberg, F., Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26, 85–97.
- Kozłowski-Suzuki, B., Karjalainen, M., Lehtiniemi, M., Engström-Öst, J., Koski, M., Carlsson, P., 2003. 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.*, 249, 237–249.
- Kuroda, A., Nakashima, T., Yamaguchi, K., Oda, T., 2005. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comp. Bioch. Physiol.*, 141, 297–305.
- Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10, 113–390.
- Lincoln, J.A., Turner, J.T., Bates, S.S., Léger, C., Gauthier, D.A., 2001. Feeding, egg production, and egg hatching success of the copepods *Acartia tonsa* and *Temora longicornis* on diets of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* and the non-toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. *Hydrobiologia*, 453/454, 107-120.
- Ling, C., Trick, C.G., 2010. Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, 9, 522–529.
- Lopes, R. M., do Vale, R., Brandini, F. P., 1998. 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.*, 46 (2), 195-211.
- Mafra, L.L., 2005. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá: subsídios para o monitoramento. 156p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Botânica, UFPR, Paraná.
- Mafra, L.L., Fernandes, L.F., Proença, L.A.O., 2006. Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring. *Braz. J. Oceanogr.*, 54, 107-121.
- Marshall, J.A., Hovenden, M., Hallegraeff, G.M., 2002. Photosynthesis does influence reactive oxygen species production in the red tide alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *J. Plank. Res.*, 142, 1231-1236.
- Marshall, J.A., Nichols, P.D., Hamilton, B., Lewis, R.J., Hallegraeff, G.M., 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, 2, 273-281.
- Marshall, J.A., Salas, M., Oda, T., Hallegraeff, G., 2005. Superoxide production by marine microalgae. *Mar. Biol.*, 147, 533-540.
- Miralto, A., Guglielmo, L., Zagami, G., Buttino, I., Granata, A., Ianora, A., 2003. Inhibition of population growth in the copepods *Acartia clausi* and *Calanus helgolandicus* during diatom blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 254, 253-268.

- Montú, M.A., Cordeiro, T.A., 1988. Zooplâncton del complejo estuarial de la Bahía de Paranaguá 1. Composición, dinámica de las especies, ritmos reproductivos y acción de los factores ambientales sobre la comunidad. *Nerítica*, 3, 61-83.
- Odebrecht, C., Azevedo, S.M.F.O., Garcia, V.M.T., Huszar, V.L.M., Magalhaes, V.F., Menezes, M., Proença, L.A.O., Rörig, L.R., Tenenbaum, D.R., Villac M.C., Yunes J.S., 2002. Floraciones de Microalgas Nocivas en Brasil: Estado del Arte y Proyectos en Curso, in: Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B. (org.) *Floraciones Algaes Nocivas en El Cono Sur Americano*. 1 ed. Madrid: Instituto Espanhol de Oceanografia, pp. 307.
- Okaichi, T., 1989. Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan., in: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), *Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. New York: Elsevier Science Publishing, pp. 137-142.
- Ong, J.E., 1969. The fine structure of the mandibular sensory receptors in the brackish water calanoid copepod *Gladioferens pectinatus* (Brady). *Z Zellforsch*, 97, 178-195.
- Ono, K., Khan, S., Onoue, Y., 2000. Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquac. Res.*, 31: 427-433.
- Persich, G.R., Garcia, V.M.T., Odebrecht, C., 1998. Microalgas potencialmente nocivas na costa do Rio Grande do Sul, in: *Anais da XI Semana Nacional de Oceanografia*. Rio Grande, RS, pp. 261-263.
- Poulet, S. A., Samaln, J.F., Moal, J., 1986. Chemoreception and food requirements among copepods, in: Schreiver, G., Schminke, H. K., Shih, C T (Eds.), *Proceedings 2nd International Conference on Copepoda*. Syllogeus No. 58, National Museum of Canada, Ottawa, pp. 426-442.
- Powers, L., Creed, I. F., Trick, C. G., 2012. Sinking of *Heterosigma akashiwo* results in increased toxicity of this harmful algal bloom species. *Harmful Algae*, 13, 95-104.
- Proença, L.A.O., Tamanaha, M.S., 2000. Presença de fitoflagelados “nus” potencialmente nocivos em uma enseada do litoral norte de Santa Catarina, in: *Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia*, Itajaí, SC, pp. 553-555.
- Proença, L. A. O., Tamanaha, M. S., Resgalla Jr., C., 2002. Toxicity of the aqueous extract of *Alexandrium fraterculus* Balech, in: *Abstracts of the International Conference on Harmful Algae*. St. Petesburg, EUA, pp. 235.
- Proença, L.A.O., Fernandes, L.F., 2004. Introdução de microalgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores, in: Silva, J.S.V., Souza, R.C.C.L (Eds.), *Água de lastro e bioinvasão*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, pp. 224.
- Proença, L.A.O., 2005. Algal Blooms in Coastal Zones: Examples of Harmful Impacts from the Brazilian Coast. *J. Coast. Res.*, 39, 76-78.
- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Schmidt, C.J.B., 2007. Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas, in: Arredondo, V.B.O., Domenico, V. (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, pp. 1-16.
- Smayda, T., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, in: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 29-40.
- Sournia, A., Chretiennot-Dinet, M.J., Ricard, M., 1991. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *J. Plank. Res.*, 13, 1093-1099.
- Sykes, P. F., Huntley, M. E., 1987. Acute physiological reactions of *Calanus pacificus* to selected dinoflagellates: direct observations. *Mar. Biol.*, 94, 19-24.
- Tamanaha, M.S., 2001. Avaliação da toxicidade do extrato hidrossolúvel de *Heterosigma akashiwo* (rafidócea) Hada 1968. Itajaí, 57 p. Monografia (Graduação em Oceanografia) - Universidade do Vale do Itajaí.

- Tiffany, M.A., Barlow, S.B., Matey, V.E., Hurlbert, S.H., 2001. *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia*, 446, 187-194.
- Tomas, C.R., Deason, E.E., 1981. The influence of grazing by two *Acartia* species on *Olisthodiscus luteus* Carter. *P.S.Z.N.I. Mar. Ecol.*, 2, 215–223.
- Turner, J.T., Tester, P.A., 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limn. Oceanog.*, 42, 1203–1214.
- Turriff, N., Runge, J.A., Cembella, A.D., 1995. Toxin accumulation and feeding behaviour of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* exposed to the red tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. *Mar. Biol.*, 123, 55–64.
- Twiner, M. J., Trick, C.G., 2000. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *J. Plankton Res.*, 22(10), 1961-1975.
- Twiner, M.J., Dixon, S.J., Trick, C.G., 2004. Extracellular organics from specific cultures of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) irreversibly alter respiratory activity in mammalian cells. *Harmful Algae*, 3, 173-182.
- Uye, S., 1986. Impact of copepod grazing on the red-tide flagellate *Chattonella antiqua*. *Mar. Biol.*, 92, 35–43.
- Uye, S., Takamatsu, K., 1990. Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59, 97-107.
- Van Alstyne, K. L., 1986. Effects of phytoplankton taste and smell on feeding behavior of the copepod *Centropages hamatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 34, 187-190.
- Viso, A.C., Marty, J.C., 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*, 34, 1521–1533.
- Wang, L., Yan, T., Zhou, M., 2006. Impacts of HAB species *Heterosigma akashiwo* on early development of the scallop *Argopecten irradians* Lamarck. *Aquaculture*, 200, 374–383.
- Yu, J., Yang, G., Tian, J., 2010. The effects of the harmful alga *Heterosigma akashiwo* on cultures of *Schmackeria inopinus* (Copepoda, Calanoida). *J. Sea Res.*, 64 (3), 287–294.

CAPÍTULO II

Ingestion and egg production rates of *Acartia tonsa* Dana on diets containing the diatom *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle and/or the potentially harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller

Taxas de ingestão e produção de ovos de *Acartia tonsa* sob dietas contendo a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle e/ou o dinoflagelado potencialmente nocivo *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller

Revista pretendida: Aquaculture, ISSN (0044-8486), Fator de impacto = 2.041, Qualis CAPES = Estrato A2.

Fernanda P. de Felipe¹, Luiz L. Mafra Jr.¹, José G. Bersano Filho¹

¹ Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 61, 83255-976, Pontal do Paraná, PR, Brasil.

Keywords: Copepods, mixed diets, carbon, egg production, nutrition.

Palavras-chave: Copépodes, Dietas mistas, carbono, produção de ovos, nutrição.

RESUMO

Este estudo buscou testar a possibilidade de o dinoflagelado *Prorocentrum minimum* ser tóxico, nutricionalmente pobre, ou ainda se poderia constituir um item alimentar adequado para o copépode *Acartia tonsa*. Os experimentos foram conduzidos com indivíduos adultos de *A. tonsa* e do dinoflagelado *P. minimum* coletados da área de estudo, o Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), Paraná, Brasil. Os copépodes foram alimentados com dietas monoespecíficas do dinoflagelado e da diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, além de dietas mistas de ambos, para que posteriormente fossem estimadas as taxas de remoção (F), ingestão (I) e produção de ovos. Os resultados mostraram que *P. minimum* não se mostrou tóxico, já que suas células foram ingeridas em grandes quantidades, com um valor de $3,2 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹ ou 6,31 µg C.copépode⁻¹.dia⁻¹ o que equivale a 158% do peso de *A. tonsa* ingerido em carbono num ciclo diário. Os valores nas dietas mistas também foram elevados, sendo a taxa de ingestão mais baixa encontrada na dieta monoespecífica de *T. weissflogii* ($1,7 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹ ou 2,21 µg C.copépode⁻¹.dia⁻¹), 53% do seu peso em carbono.dia⁻¹. As taxas de produção de ovos foram relativamente altas em todas as dietas com valores entre 31 e 39 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹, sem diferença estatística entre elas. Porém, considerando as altas taxas de ingestão na dieta monoespecífica de *P. minimum*, apenas 23% do carbono total ingerido foi alocado para a produção de ovos. Na dieta monoespecífica com a diatomácea, do carbono total ingerido, 64% foi convertido em produção de ovos, o que lhe garantiu taxas de produção similares às que foram encontradas na dieta exclusiva de *P. minimum*. O sucesso de eclosão dos ovos foi sempre superior a 80% em todas as dietas. Possivelmente, os altos valores encontrados nas taxas de ingestão em dieta monoespecífica de *P. minimum* podem estar relacionados a um maior esforço de ingestão por parte de *A. tonsa* para assegurar o seu funcionamento metabólico além de manter níveis de produção de ovos adequados. Portanto, a microalga foi prontamente aceita e ingerida pelos copépodes, porém os resultados sugerem que maiores quantidades da mesma são necessárias para manter níveis de produção semelhantes aos encontrados na dieta de *T. weissflogii* e garantir um bom potencial reprodutivo da espécie.

Palavras-chave: Copépodes, Dietas mistas, carbono, produção de ovos, nutrição.

ABSTRACT

The present study aimed at testing whether the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* can be toxic, nutritionally poor, or if it could constitute an adequate nutritional item for the copepod *Acartia tonsa*. The experiments were conducted with adult *A. tonsa* and *P. minimum* sampled from the Estuarine Complex of Paranaguá – PR, Brazil. The copepods were fed with monospecific (constituted by *P. minimum* and by the diatom *Thalassiosira weissflogii*) and mixed (constituted by both the dinoflagellate and diatom) diets in order to investigate and compare clearance rates (F), ingestion (I), and egg production. The results showed that *P. minimum* was not toxic, given its cells were ingested in large quantities, with a value of 3.2×10^5 cells.copepod⁻¹.day⁻¹ or 6.31 µg C.copepod⁻¹.day⁻¹ (= a daily cycle ingestion of 158% of the *A. tonsa* weight in carbon). The values for the mixed diets were also high. The lowest ingestion rate was found for the *T. weissflogii* diet, 1.7×10^5 cells.copepod⁻¹.day⁻¹ or 2.21 µg C.copepod⁻¹.day⁻¹, which equals 53% of the *A. tonsa* weight in carbon.day⁻¹. Egg production rates were relatively high in all diets (no statistical differences between them), with values between 31 and 39 eggs.female⁻¹.day⁻¹. However, considering the high ingestion rates obtained by the monospecific *P. minimum* diet, only 23% of the total carbon ingested was allocated to egg production. The diatom monospecific diet showed a 64% of total carbon ingested being used for egg production, which gave it production rates similar to those found for the *P. minimum* diet. The egg hatching success was always above 80% for all diets. The high ingestion rates found for the *P. minimum* diet were probably related to a higher ingestion effort by *A. tonsa* to ensure its metabolic functioning, besides keeping adequate egg production levels. Thus, the microalgae was promptly accepted and ingested by the copepods, however results suggest that higher microalgae quantities are necessary to maintain production levels similar to those exhibited by the *T. weissflogii* diet and to guarantee a good reproductive potential for the species.

Key words: Copepods, mixed diets, carbon, egg production, nutrition.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o aumento na frequência, magnitude e na distribuição geográfica de espécies de microalgas nocivas (Hallegraeff, 1993; Smayda, 1997; Anderson *et al.*, 2002) tem chamado a atenção para as particularidades fisiológicas, ecológicas e toxicológicas das várias espécies envolvidas.

A ação do fitoplâncton nocivo sobre os organismos aquáticos é geralmente relacionada à sua toxicidade (Colin e Dam, 2002) sendo que em copépodes os efeitos prejudiciais podem incluir inibição alimentar e incapacitação fisiológica, além de redução nas taxas de produção e sucesso de eclosão dos ovos (Turner e Tester, 1997; Dan e Colin, 2005). No entanto, efeitos negativos na produção de ovos, por exemplo, não são suficientes para caracterizar determinada espécie como sendo tóxica ou mesmo prejudicial. Tal redução pode ocorrer devido à insuficiência nutricional da microalga em questão (Jónasdóttir, 1994; Jónasdóttir e Kjørboe, 1996; Jónasdóttir *et al.*, 1998), o que poderia se tornar um problema somente no caso de uma floração monoespecífica da mesma.

Dentre as várias microalgas potencialmente tóxicas, os dinoflagelados estão entre os mais importantes (Burkholder e Glasgow Junior, 1997; Van Dolah, 2000; Zingone e Enevoldsen, 2000). O dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller é uma espécie formadora de florações que possui distribuição global (Smayda, 1990), com vários registros para águas costeiras e estuários do sul do Brasil (Seeliger *et al.*, 1998; Mafra, 2005; Mafra *et al.*, 2006; Islabão e Odebrecht, 2011). A ecologia e dinâmica das florações são documentadas nos Estados Unidos, nordeste do Atlântico, no Mar Mediterrâneo e na costa da Austrália (Cannon, 1990; Grzebyk e Berland, 1996; Yallop, 2001; Fan *et al.*, 2003). No Complexo Estuarino de Paranaguá, Brasil, a espécie ocorre em toda sua extensão, com picos de até $1,7 \times 10^5$ células.L⁻¹, principalmente nos setores mais internos da Baía (Mafra *et al.*, 2006). A facilidade de cultivo e a ampla disponibilidade de clones para uso experimental, levaram a uma extensa literatura sobre esta espécie (Heil *et al.*, 2005).

Um obstáculo nos estudos de dieta alimentar se deve à toxicidade de *P. minimum*, que parece variar entre diferentes linhagens. Por exemplo, em Portugal os sintomas de envenenamento em mexilhões e humanos foram consistentes com envenenamento paralisante por consumo de marisco (PSP) (Silva, 1980). Em uma cepa proveniente do Mediterrâneo, foi isolada uma toxina com atividade neurotóxica (Grzebyk *et al.*, 1997). Já em uma cepa isolada de Long Island, EUA, não foram observados efeitos tóxicos para três espécies de ciliados (Rosetta e McManus, 2003). Embora *P. minimum* possa atingir grandes densidades no CEP, nada se sabe até o momento sobre os efeitos deste dinoflagelado sobre seus potenciais consumidores na área em questão.

Muitos estudos a respeito dos efeitos nocivos do fitoplâncton sobre os organismos zooplancônicos, principalmente copépodes têm focado apenas nas taxas alimentares que, em geral, sofrem uma redução quando submetidos a dietas de determinadas espécies de dinoflagelados, rafidofíceas e cianobactérias, por exemplo (Ives, 1987; Uye e Takamatsu, 1990; Teegarden, 1999). Outros têm se concentrado nos efeitos sobre as taxas de produção e sucesso de eclosão dos ovos de copépodes, sem mensurar as taxas de ingestão (Ivanora e Poulet, 1993; Laabir *et al.*, 1995; Uye, 1996; Ban *et al.*, 1997). Isso gera uma dificuldade na avaliação dos efeitos ecológicos destas algas em sistemas naturais (Colim e Dam, 2002).

Muitas espécies de copépodes planctônicos apresentam a capacidade de conseguirem discriminar entre partículas nutritivas e não nutritivas (Donaghay e Small, 1979; Huntley *et al.*, 1986) o que pode ser considerada uma grande vantagem, já que a qualidade do alimento ingerido afeta diretamente as taxas de produção de ovos, como foi observado para *Acartia tonsa* Dana (Donaghay, 1985; Dam e Colin, 2005). Sabe-se que a produção de ovos está intimamente relacionada à taxa de ingestão dos copépodes, refletindo tanto em termos quantitativos como qualitativos o tipo de alimento que foi ingerido (Kleppel *et al.*, 1998). A alimentação do zooplâncton geralmente é expressa pelas taxas de remoção (F) e ingestão (I). A taxa de remoção (F) é definida como o volume de água que teve a totalidade do alimento consumido/removido por indivíduo por unidade de tempo, enquanto a taxa de ingestão (I) é a quantia de alimento (número de partículas ou biomassa) ingerida por indivíduo por unidade de tempo (Bamstedt *et al.*, 2000).

Sendo assim, é importante aliar as taxas de remoção e ingestão de copépodes à sua produção de ovos a fim de avaliar se determinado alimento se mostra tóxico ou apresenta uma qualidade nutricional adequada ou não para sua dieta (Jónnasdóttir, *et al.*, 1998). Ainda, partindo do pressuposto que a toxicidade ou não de *P. minimum* pode variar regionalmente ou entre linhagens, faz-se necessário caracterizar as células isoladas de uma floração ocorrida no CEP, já que o dinoflagelado é recorrente e abundante na região.

Este trabalho buscou verificar se o copépepe planctônico *Acartia tonsa*, espécie frequentemente encontrada no CEP, alimenta-se de forma eficiente do dinoflagelado *P. minimum*, bem como determinar qual a influência do mesmo em sua produção de ovos. Para tanto, buscou quantificar as taxas de ingestão (I), de remoção (F) e a produção de ovos de *A. tonsa*, quando submetida a dietas mono específicas e mistas, compostas por diferentes proporções de *P. minimum* e da diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle, a fim de observar a ocorrência ou não de efeitos nocivos, letais ou subletais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de Estudo

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), PR (25°30'S, 48°30'W) ocupa uma superfície líquida de 612 Km² e é composto por quatro baías principais, Laranjeiras, Guaraqueçaba, Antonina e Paranaguá. De acordo com a classificação de Koeppen, o clima é pluvial temperado (Cfa), caracterizado por chuvas constantes o ano todo, clima úmido, com maiores índices de pluviosidade durante o verão (Maak, 1981). A salinidade varia entre 20 a 34 no inverno e 12 a 29 no verão, sendo que valores mais baixos ocorrem nos setores mais internos e em períodos de maior pluviosidade. A descarga média anual de água doce na Baía de Paranaguá é de 150 m³.s⁻¹. A temperatura da água varia entre 18 e 25°C no inverno, e 23 e 30°C no verão (Lana *et al.*, 2001).

A hidrodinâmica local é regida pelo regime de marés, que segundo Knoppers (1987), é caracterizado por um padrão semi-diurno, com amplitude média anual de 2,23 metros (Lana *et al.*, 2001). Os ventos são predominantemente do quadrante sul (Rezende, 1995). Dois sistemas de trem de ondas predominam na costa, de E/NE e SSE/SE, sendo que os períodos de ondas variam entre 4 e 12 segundos e a altura significativa varia entre 0,4 e 1,3 metros (Portobrás, 1983; Martins, 2004).

2.2. Metodologia

2.2.1. Coleta e cultivo dos organismos

A espécie potencialmente tóxica avaliada, o dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (12-18 µm de comprimento e 9-14 µm de largura) foi isolada no Laboratório de Microalgas (LaMic) da região de estudo e atualmente é mantida em cultivo monoclonal. A outra espécie utilizada neste estudo, a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* (10-16 µm de comprimento e 9-16 µm de largura) foi obtida do Laboratório de Microalgas da FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande) e também mantida em cultivo no LaMic até o momento da realização dos experimentos. Os cultivos foram mantidos em água do mar filtrada em membrana Millipore com porosidade de 0,6 µm, enriquecida com meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), com adição de silicato no caso da diatomácea, sob condições controladas de temperatura (20 ± 1° C), salinidade (25), intensidade luminosa (100-140 µE.m⁻².s⁻¹) e fotoperíodo (12:12 h C:E).

Os copépodes utilizados nos experimentos foram coletados com rede de plâncton de 1,5 m de comprimento, 0,5 m de diâmetro e malha de 300 µm em salinidade 15 ± 2, próximo à desembocadura do Rio Guaraguaçu, no estuário da Baía de Paranaguá. Após a coleta, foram imediatamente transportados para o Laboratório de Zooplâncton, onde foram mantidos em baldes de 35 L com aeração suave, preenchido com água do mar filtrada, salinidade 15 ± 1 e alimentados

diariamente com *Thalassiosira weissflogii* (20×10^3 células.mL⁻¹) e *Isochrysis galbana* Parke (10×10^4 células.mL⁻¹) em excesso até o momento da realização dos experimentos. A utilização de *I. galbana* nos cultivos se faz essencial já que possui menor tamanho (4-6 µm de comprimento e 3-5 µm de largura), adequado para a alimentação de náuplios e copepoditos.

2.2.2. Experimento de alimentação de *A. tonsa* com dietas monoespecíficas ou mistas

Para avaliar a pressão de herbivoria de *Acartia tonsa* sobre cada microalga, o experimento foi delineado a fim de se detectar (i) possíveis reduções nas taxas de ingestão e produção de ovos em uma dieta exclusiva de *Prorocentrum minimum*, e (ii) uma possível seleção alimentar quando expostos a uma dieta mista entre *P. minimum* e *Thalassiosira weissflogii* (Jónasdóttir *et al.*, 1998; Colin e Dam, 2002).

Para tal, foram testados cinco tratamentos constituídos por (a) 100% *Prorocentrum minimum*; (b) 100% *Thalassiosira weissflogii*; (c) 50% *P. minimum* + 50% *T. weissflogii*; (d) 75% *P. minimum* + 25% *T. weissflogii*; e (e) 25% *P. minimum* + 75% *T. weissflogii* seguindo a metodologia proposta por Jónasdóttir *et al.* (1998).

As concentrações algais foram calculadas a partir da biomassa que proporciona a saturação alimentar de *A. tonsa*, ou seja, 500 µg C.L⁻¹ (Kjørboe *et al.*, 1985). O equivalente em biovolume de *T. weissflogii* ocorre em densidade celular de 20×10^3 células.mL⁻¹. A partir da medida das dimensões de 30 células, e com o uso de formas geométricas aproximadas (Hillebrand *et al.*, 1999), o biovolume equivalente de *Prorocentrum minimum* foi calculado, correspondendo a uma densidade celular de 37×10^3 células.mL⁻¹. Estas densidades foram consideradas os tratamentos de 100%. A partir destes, os demais foram calculados nas proporções de 75%, 50% e 25% para cada microalga (Tabela I). O experimento foi realizado no 10º dia do cultivo de *P. minimum*, que estava a uma densidade celular de $1,38 \times 10^5$ células.mL⁻¹.

Tabela III. Concentrações celulares de *Prorocentrum minimum* e *Thalassiosira weissflogii* utilizadas nas diferentes dietas experimentais.

Dietas	<i>Prorocentrum minimum</i> (células.mL ⁻¹)	<i>Thalassiosira weissflogii</i> (células.mL ⁻¹)
100%	37.175	20.000
50% + 50%	18.587	10.000
75% Pro + 25% Th	27.881	5.000
25% Pro + 75% Th	9.293	15.000

Copépodes sexualmente maduros e ativos foram selecionados através de uma pipeta de Pasteur e mantidos em inanição durante 10 h para que ovos e pelotas fecais provenientes da alimentação prévia fossem descartados. Após o período em inanição, onze adultos de *A. tonsa* (8

fêmeas/3 machos) foram adicionados a béqueres de polipropileno com volume de 300 ml (frascos experimentais). Foram realizadas quatro réplicas para cada tratamento, além de dois controles, sem a presença de copépodes. A incubação ocorreu durante 24 h sob as condições experimentais (regime alimentar, salinidade 20, temperatura $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo natural de 12:12 h C:E).

Com o objetivo de evitar a sedimentação das microalgas, os frascos foram cuidadosamente agitados manualmente a cada 4 horas. Após as 24 h de incubação, o conteúdo de cada recipiente foi retido em uma malha de 20 μm , teve o número de indivíduos vivos e mortos contabilizado, e nos casos de morte, descontou-se o número de organismos mortos dos cálculos. O material foi posteriormente fixado em solução de formaldeído a 4% para posterior contagem de ovos sob lupa Olympus SZ 51. O sucesso de eclosão (%) dos ovos para cada dieta microalgal foi quantificado a partir de 20-25 ovos, que foram separados de cada tratamento e transferidos para placas de Petri antes da fixação com formaldeído. Estes foram mantidos em laboratório nas mesmas condições por mais 24 h. O número de náuplios que eclodiu foi então dividido pelo número de ovos e multiplicado por 100.

Para a contagem das microalgas, amostras de 30 mL foram retiradas de cada tratamento experimental e fixadas com lugol acético. Estas foram realizadas sob microscópio Olympus BX41, com uma câmera tipo Sedgewick-Rafter[®].

As taxas de ingestão (I) foram calculadas em termos de células ingeridas $\text{copépole}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e as taxas de remoção (F) em $\text{mL copépole}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ resultantes da alimentação ofertada em cada tratamento experimental, seguindo as equações de Frost (1972), conforme apresentado a seguir.

Inicialmente, o coeficiente de crescimento da presa (ou alimento) “k” foi calculado por:

$$(1) \quad C_2 = C_1 \cdot e^{k(t_2 - t_1)}$$

onde: “ C_2 ” e “ C_1 ” são as concentrações das presas nos tratamentos de controle no início (t_1) e final (t_2) do experimento; Em seguida, obteve-se o coeficiente de pastagem “g” pela equação:

$$(2) \quad C^*_2 = C_1 \cdot e^{(k - g) \cdot (t_2 - t_1)}$$

onde: “ C^*_2 ” é a concentração de presas no tratamento experimental ao final do experimento;

A concentração média de presas “< C >” foi então calculada por:

$$(3) \quad < C > = C_1 \cdot (e^{(k - g) \cdot (t_2 - t_1)} - 1) / (t_2 - t_1)(k - g)$$

A partir daí, pôde-se calcular a taxa de remoção “F” (*clearance*) pela fórmula:

$$(4) \quad F = V \cdot g / N$$

onde: “V” é o volume do frasco de incubação e “N” é o número de copépodes no frasco de incubação;

A Taxa de ingestão “I” foi finalmente calculada por:

$$(5) \quad I = F \cdot < C >$$

As densidades celulares obtidas através das taxas de ingestão (I) foram convertidas para biovolume, a partir do tamanho médio das células e fórmulas para o cálculo do volume conforme formas geométricas aproximadas para cada espécie (Hillebrand *et al.*, 1999). A partir do biovolume encontrado, foi estimada a biomassa em carbono ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) (Smayda, 1978), utilizando fatores de conversão específicos para cada grupo taxonômico segundo a literatura especializada (Tabela II).

Tabela II. Fatores utilizados para conversão do biovolume V (μm^3) de pequenas diatomáceas ($>3000 \mu\text{m}^3$; e.g. *Thalassiosira weissflogii*) e dinoflagelados (e.g. *Prorocentrum minimum*) em biomassa de carbono (pg).

Organismo	Fórmula	Referência
Diatomáceas	$\text{pg C} = 0,288 \times V^{0,811}$	Putt e Stoecker (1989)
Dinoflagelados	$\text{pg C} = 0,76 \times V^{0,819}$	Putt e Stoecker (1989)

A taxa de carbono diária (DR), a fim de verificar quanto *A. tonsa* se alimentou de seu próprio peso em carbono, foi calculada através da fórmula:

$$(6) \quad DR = I \cdot 24 / (B \cdot t) \cdot 100 (\%)$$

onde: “B” é o peso do organismo em carbono e “t” é o tempo do experimento. O cálculo foi realizado considerando o peso típico de uma fêmea de *A. tonsa* como sendo de $4 \mu\text{g C}$ (Besiktepe e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005).

Além disso, foi calculada a taxa de eficiência do carbono ingerido para produção de ovos. Para tanto, o teor de carbono presente em um ovo foi assumido como sendo 45 ng (Kjørboe *et al.*, 1985). O valor do carbono presente em um ovo foi então multiplicado pelo número de ovos produzidos e dividido pela biomassa de carbono total ingerida.

2.2.3. Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVAs) unifatoriais foram utilizadas para testar as diferenças nas taxas de ingestão, em células e em carbono, e a produção de ovos de *A. tonsa* entre os diferentes tratamentos com as espécies *P. minimum* e *T. weissflogii*. Quando encontrada diferença significativa na ANOVA, o teste post-hoc de Tukey foi conduzido para identificar entre quais

concentrações havia valores significativamente diferentes. Uma análise de regressão linear foi utilizada para verificar a relação de associação entre a quantidade de carbono ingerido e a taxa de eficiência deste carbono para produção de ovos.

Todas as análises estatísticas foram geradas utilizando a linguagem de programação R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2009).

3. RESULTADOS

Com relação às taxas de remoção (F) os maiores valores foram registrados para a dieta de 25% *P. minimum* + 75% *T. weissflogii* (24,11 mL.copépode⁻¹.dia⁻¹), seguido de 13,48 mL.copépode⁻¹.dia⁻¹ na dieta de 75% *P. minimum* + 25% *T. weissflogii*. O valor mais elevado diferiu estatisticamente de todos os demais ($p < 0,01$). O menor ocorreu na dieta exclusiva de *T. weissflogii*, sendo 7,18 mL.copépode⁻¹.dia⁻¹.

Os maiores valores de ingestão foram registrados na dieta de 25% de *P. minimum* + 75% de *T. weissflogii* ($3,55 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹) e na dieta monoespecífica de *P. minimum* ($3,2 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹). Estes valores apresentaram diferença estatística extremamente significativa em relação aos obtidos nos demais tratamentos ($p < 0,01$). As mais baixas taxas de ingestão foram obtidas nas dietas de 75% de *P. minimum* + 25% de *T. weissflogii* ($1,8 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹) e na dieta monoespecífica de *T. weissflogii* ($1,86 \times 10^5$ células.copépode⁻¹.dia⁻¹).

Com os valores de ingestão convertidos em carbono, a taxa de ingestão para a dieta monoespecífica de *T. weissflogii* (2,21 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) continuou significativamente inferior ($p < 0,01$) às demais, exceto da dieta composta por 50% *P. minimum* + 50% *T. weissflogii* (3,16 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Dentro desta dieta, a taxa de ingestão para *P. minimum* (2,72 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi novamente superior ($p < 0,01$) àquela de *T. weissflogii*, que correspondeu a apenas 0,44 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Os valores mais elevados foram novamente relacionados à dieta exclusiva de *P. minimum* (6,31 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), representando uma taxa diária de 158% de seu próprio peso em carbono. O valor mais próximo foi alcançado pela dieta composta por 25% *P. minimum* + 75% *T. weissflogii* (5,32 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), com relação de 67% de seu próprio peso em carbono. Na dieta de 25% *P. minimum* + 75% *T. weissflogii*, apesar da oferta de *T. weissflogii* ter sido superior à de *P. minimum*, os valores de ingestão em carbono (2,89 e 2,42 $\mu\text{g C.copépode}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, respectivamente) não diferiram significativamente entre si ($p = 0,60$) (Figura 1).

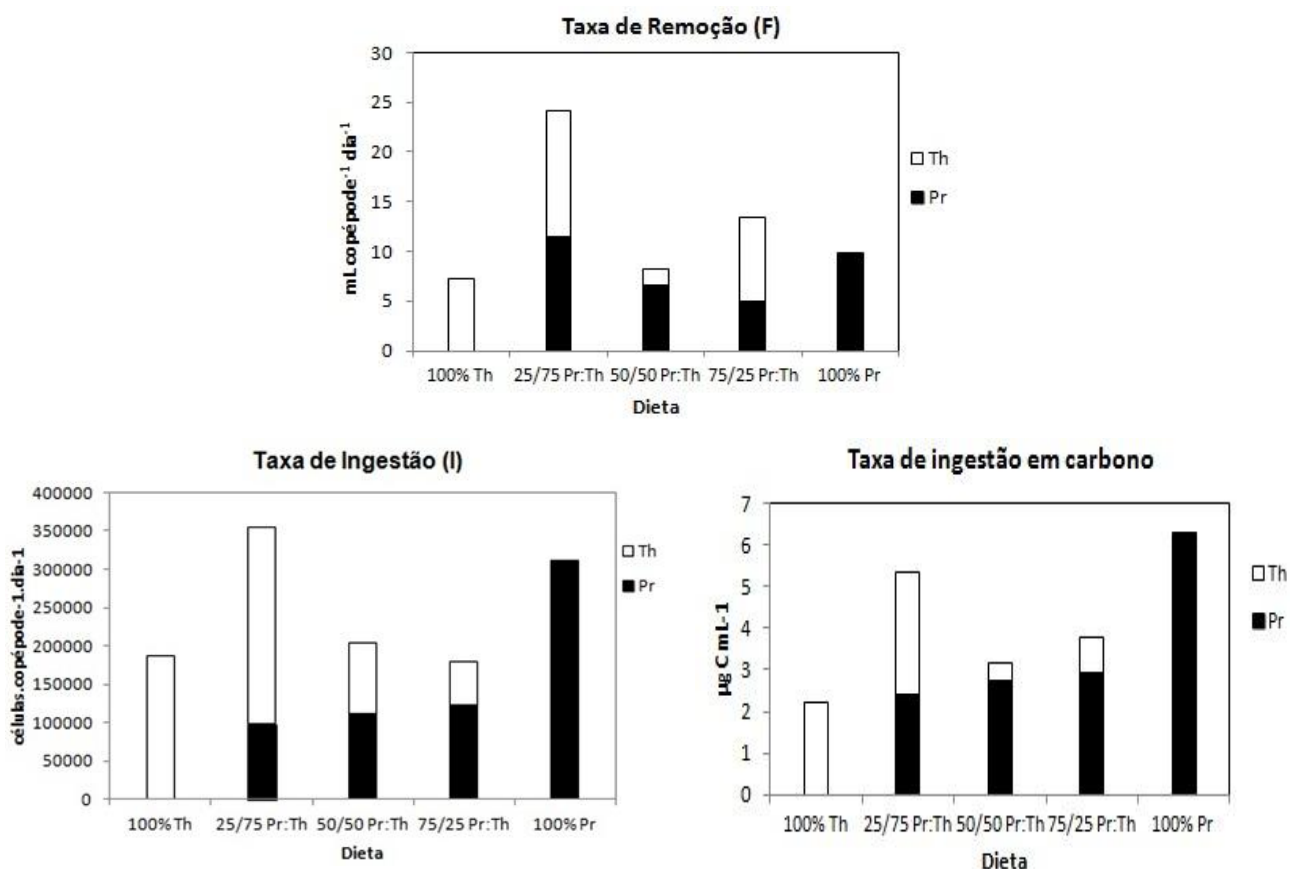


Figura 1. Taxas de remoção (F), Taxas de ingestão em células (I) e em carbono para as diferentes dietas experimentais compostas por dietas mono específicas de *T. weissflogii* (Th), *P. minimum* (Pr) e dietas mistas de ambas as espécies em diferentes proporções.

Com relação à produção de ovos, a produtividade foi relativamente elevada para todos os tratamentos, com valores que variaram entre 31 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ na dieta mono específica de *T. weissflogii* e 39 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ na dieta de 50% *P. minimum* + 50% *T. weissflogii*, sendo que todos os valores foram semelhantes estatisticamente ($p = 0,43$). A viabilidade dos ovos também foi alta, sempre superior a 80% (Figura 2a).

Houve uma relação linear negativa bastante significativa ($r^2 = 0,92$, $p < 0,001$) entre a quantidade de carbono ingerido e a eficiência do carbono para a produção de ovos. Os maiores valores de ingestão de carbono foram inversamente proporcionais à eficiência em produção de ovos, e a diferença da eficiência entre dietas apresentou diferenças significativas ($p < 0,001$). Na dieta mono específica de *T. weissflogii*, para a qual foram ingeridos apenas 2,21 µg C.copépode⁻¹.dia⁻¹, a eficiência em produção de ovos foi de 64% da quantidade ingerida, enquanto que na dieta de 50% *P. minimum* + 50% *T. weissflogii*, foi observado que 57% da ingestão de 3,16 µg C

copéode⁻¹.dia⁻¹ foi investido em produção de ovos. O menor percentual de eficiência em produção de ovos ocorreu na dieta exclusiva de *P. minimum* (23%), para a qual se registrou a maior taxa de ingestão em carbono, 6,31 µg C copéode⁻¹.dia⁻¹ (Figura 2b).

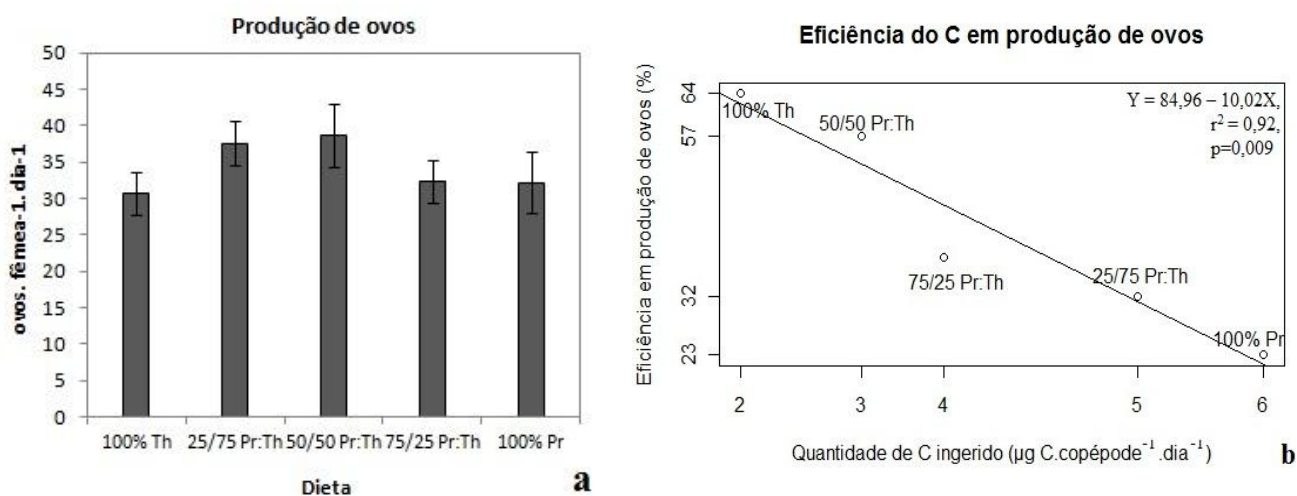


Figura 2. Produção de ovos (a) e correlação entre a quantidade de carbono ingerido e eficiência do carbono em produção de ovos (b) para as diferentes dietas experimentais compostas por dietas monoespecíficas de *T. weissflogii* (Th), *P. minimum* (Pr) e dietas mistas de ambas as espécies em diferentes proporções. As barras representam o erro padrão das quatro réplicas testadas para cada tratamento.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que *P. minimum* não foi tóxico para indivíduos adultos de *A. tonsa*, que aparentemente não realizaram ingestão seletiva nas dietas mistas com *T. weissflogii* e não tiveram nenhuma dificuldade na ingestão de *P. minimum*, fato que refletiu nas elevadas taxas de produção de ovos viáveis. Corroborando os resultados do presente trabalho, estudos prévios (Jónnasdóttir *et al.*, 1998 e Colin e Dam, 2002), observaram que quando uma microalga tóxica é ingerida por copépodes submetidos a uma dieta mista, o efeito nocivo da mesma não é neutralizado pelo efeito positivo causado pela ingestão da alga não tóxica, e as taxas de ingestão e produção tendem a ser nulas ou muito baixas.

A taxa de remoção (F) está relacionada ao tamanho do alimento oferecido, além da capacidade de retenção e o tamanho dos copépodes (Berggreen *et al.*, 1988, Støttrup e Jensen, 1990). Este trabalho utilizou as mesmas espécies, com as mesmas dimensões das testadas por Besiktepe e Dam (2002), que asseguraram as taxas de remoção máximas para *A. tonsa*. Berggreen *et al.* (1988) e Støttrup e Jensen (1990) testaram partículas com dimensões que variavam entre 2 e 250 µm, para as diferentes fases de crescimento de *A. tonsa* e encontraram que as taxas de remoção ótimas para adultos estariam na faixa de alimento compreendida entre

14 e 70 μm . Portanto o tamanho das partículas utilizadas neste estudo é idêntico ao limite inferior ideal para a alimentação de adultos de *A. tonsa*, que é capaz de assegurar taxas de remoção ótimas.

As taxas de ingestão, tanto em células como em carbono na dieta monoespecífica de *P. minimum* foram superiores às demais. O valor em carbono de 6,31 $\mu\text{g C}$, representou 158% do peso de *A. tonsa* ingerido em um ciclo diário. Este valor foi similar ao do estudo de Dam e Colin (2005) no qual foi observado uma ingestão aproximada de 8 $\mu\text{g C}$, relativos a 200% do próprio peso de *A. tonsa*. As taxas de ingestão máximas, expressas em porcentagem do peso corporal de carbono consumidos diariamente, observadas neste estudo estão dentro da faixa observada para o gênero *Acartia*, que podem atingir taxas equivalentes a 100% ou mais de seu corpo em carbono quando em concentrações elevadas de alimento (Durbin e Durbin, 1992). Porém, em algumas situações, os valores podem ser extremamente superiores, como no caso do estudo de Paffenhöffer (1988) que relatou valores de até 360% do peso do corpo por dia para *A. tonsa* e Deason (1980) que reportou valores de 660% do corpo em carbono para *A. hudsonica*.

O valor elevado nas taxas de ingestão encontrado neste estudo para *P. minimum* pode estar refletindo um esforço maior de ingestão por parte de *A. tonsa*, a fim de manter níveis adequados de produção de ovos. Embora as dietas das duas microalgas tenham sido oferecidas em proporções equivalentes de biovolume, a quantidade de carbono oferecida na dieta de *P. minimum* ficou em torno de 1100 $\mu\text{g C.L}^{-1}$ e para *T. weissflogii* foi de 365 $\mu\text{g C.L}^{-1}$, já que as células de diatomáceas possuem pouca contribuição de carbono no vacúolo intracelular (Smayda, 1978). Porém, esta concentração já é considerada suficientemente elevada para assegurar uma ampla produção de ovos em *A. tonsa* (Dam e Colin, 2005), apesar de ser inferior às concentrações de saturação tipicamente utilizadas para fêmeas de *A. tonsa* propostas por Kiørboe (1985). Levando em consideração que as taxas de ingestão de copépodes aumentam conforme a oferta de alimento até que o ponto de saturação seja atingido, o valor superior de carbono na dieta de *P. minimum* não teria sido o responsável pelas elevadas taxas de ingestão, já que as quantidades estão bem acima da saturação alimentar que ocorre em 500 $\mu\text{g C.L}^{-1}$ (Kiørboe *et al.*, 1985; Jónnasdóttir, 1994; Besiktepe e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005). Portanto, as elevadas taxas de ingestão obtidas não significam necessariamente que *P. minimum* seja mais completo nutricionalmente e mais palatável que *T. weissflogii*, mas sim que para assegurar uma produção de ovos satisfatória e manutenção de seu metabolismo, os copépodes necessitaram ingerir maiores quantidades da microalga.

Considerando a produção de ovos, os valores obtidos foram considerados relativamente elevados para todas as dietas, variando entre 31 e 39 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹. O valor mais baixo foi encontrado na dieta monoespecífica de *T. weissflogii* e o maior, na dieta em proporções iguais das duas microalgas. Possivelmente, a composição nutricional de superior qualidade de *T. weissflogii*

tenha sido incrementada por *P. minimum*. Jónnasdóttir (1994) encontrou razão C:N e quantidade de ácidos graxos totais similares na composição da diatomácea e do dinoflagelado, além das mesmas taxas de produção de ovos para ambos. Ainda segundo o autor, os principais grupos de ácidos graxos, ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e ácidos graxos saturados (AGS) diferem ligeiramente. Apesar das semelhanças nutricionais citadas, vale salientar que menores taxas de ingestão de *T. weissflogii* foram suficientes para assegurar taxas similares de produção de ovos, o que garante sua superioridade nutricional já conhecida.

A produção de ovos na dieta monoespecífica de *P. minimum* foi de 32 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹, considerada alta e compatível à produção de ovos em dietas com microalgas de composição nutricional consideradas ideais para *A. tonsa*, como no caso deste estudo, com *T. weissflogii*, e no estudo de Colin e Dam (2002) com a clorófita *Tetraselmis sp.* Estes resultados são similares aos valores do estudo de Dam e Colin (2005), com valores entre 20 e 40 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹. Este último classificou *P. minimum* como uma fonte alimentar incompleta já que segundo Mauchline (1998) a produção ideal para *A. tonsa* pode exceder 100 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ em condições normais. Porém, neste estudo e em outros testes realizados em laboratório (dados não mostrados) para *A. tonsa* coletadas da região da área de estudo, a produção de ovos não ultrapassou 40 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹.

A baixa qualidade nutricional atribuída a *P. minimum* por alguns autores (Besiktepe e Dam, 2002; Dam e Colin, 2005; Turner *et al.*, 2001) também se deve à baixa eficiência do carbono da microalga para produção de ovos. Neste estudo, apenas 23% do carbono ingerido foi alocado para o crescimento na forma de produção de ovos. Em geral, a média de eficiência de crescimento de copépodes (assumida como a eficiência da produção de ovos em adultos) é superior a 30% (Kiørboe *et al.*, 1985; Dam *et al.*, 1994; Straile, 1997). Assume-se assim, que grandes quantidades da microalga devem ser ingeridas para que *A. tonsa* obtenha uma produção de ovos semelhante à de dietas mistas ou da dieta monoespecífica de *T. weissflogii*, para assegurar o potencial reprodutivo da espécie. Quantidades inferiores de ingestão de células e carbono da diatomácea asseguraram quantidades similares de produção de ovos, já que a eficiência de carbono para produção de ovos desta foi de 64%.

Referente ao sucesso de eclosão de ovos, a dieta monoespecífica de *P. minimum* não provocou nenhum efeito em *A. tonsa* que alcançou valores superiores a 80%, semelhantes aos de *T. weissflogii* e considerados satisfatórios.

É importante salientar a importância da alimentação na produção de ovos (Jónnasdóttir *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003; Dam e Lopes, 2003), pois grande parte do alimento assimilado é utilizado para a reprodução, uma vez que os copépodes não crescem em tamanho após a última muda (Kiørboe *et al.*, 1985). Sendo assim, se expostos a alimentos com baixo valor nutricional,

maiores quantidades terão que ser ingeridas pelos copépodes, que refletirão em uma maior produção de ovos.

Analisando o que foi observado em laboratório para ambientes naturais, a baixa eficiência do carbono de *P. minimum* para o crescimento, neste caso mensurado através da produção de ovos de *A. tonsa*, não configura um problema no Complexo Estuarino de Paranaguá, que conta com altas densidades do dinoflagelado em todas as épocas do ano (Mafra, 2005). Na região mais interna da Baía de Paranaguá e na Baía de Antonina, foram registrados picos máximos de, aproximadamente $1,7 \times 10^5$ células.L⁻¹. Portanto, as altas densidades não causariam danos aos copépodes, já que *P. minimum* não se mostrou tóxico para *A. tonsa*, e ainda teria disponível uma elevada oferta alimentar do dinoflagelado para assegurar o potencial reprodutivo da espécie.

5. CONCLUSÕES

1. O dinoflagelado *P. minimum* não apresentou efeitos tóxicos letais ou subletais para adultos do copépode *A. tonsa* que se alimentaram em abundância do mesmo e, aparentemente, não apresentaram dificuldade ou alguma seleção que evitasse o dinoflagelado;
2. As taxas de remoção e ingestão foram semelhantes às encontradas em outros estudos, que classificam as faixas de tamanhos de ambas as dietas como sendo ótimas para a alimentação de adultos de *A. tonsa*;
3. A produção de ovos foi relativamente elevada, não diferindo estatisticamente em nenhuma das dietas experimentais, apesar da baixa eficiência do carbono de *P. minimum* (23%) para a produção de ovos, que foi inferior à de *T. weissflogii* (64%);
4. O sucesso de eclosão dos ovos foi elevado em todas as dietas, com valores sempre superiores a 80%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25, 704–26.
- Bamstedt, U., Gifford, D.J., Irigoien, X., Atkinson, A., Roman, M., 2000. Feeding, in: Harris, R.P., Wiebe, P.H., Lenz, J., Skjoldal, H.R., Huntley, M. (Eds.), *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press Inc. (London) Ltd., pp. 297-380.
- Ban, S., Burns, C., Castel, J., Chaudron, Y., Christou, R., Escribano, R., Umani, S.F., Gasparini, S., Ruiz, F.G., Hoffmeyer, M., Ianora, A., Kang, H.K., Laabir, M., Lacoste, A., Miralto, A., Ning, X., Poulet, S., Rodriguez, V., Funge, J., Shi, J., Starr, M., Uye, S., Wang, Y., 1997. The paradox of diatom-copepod interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157, 287–293.

- Berggreen, U., Hansen, B., Kiørboe, T., 1988. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.*, 99, 341–352.
- Besiktepe, S., Dam, H.G., 2002. Coupling of ingestion and defecation in the copepod *Acartia tonsa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 229, 151–164.
- Burkholder, J.M., Glasgow Jr., H.B., 1997. Trophic controls on stage transformations of a toxic ambush-predator dinoflagellate. *Journal of Eukariotic Microbiology*, 44, 200-205.
- Cannon, J.A., 1990. Development and dispersal of red tides in the Port River, South Australia, in: International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund. Toxic Marine Phytoplankton, vol. 4. Proceeding. Lund: International Society for the Study of Harmful Algae, pp. 110-115.
- Colin, S.P., Dam, H.G., 2002. Latitudinal differentiation in the effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* spp. on the feeding and reproduction of populations of the copepod *Acartia hudsonica*. *Harmful Algae*, 1, 113–125.
- Dam, H.G., Peterson, W.T., Bellantoni, D.C., 1994. Seasonal feeding and fecundity of the calanoid copepod *Acartia tonsa* in Long Island Sound: is omnivory important to egg production? *Hydrobiology*, 292/293, 191–199.
- Dam, H.G., Lopes, R.M., 2003. Omnivory in the calanoid copepod *Temora longicornis*: feeding, egg production and egg, hatching rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 293, 119 – 137.
- Dam, H.G., Colin, S.P., 2005. *Prorocentrum minimum* (clone Exuv) is nutritionally insufficient, but not toxic to the copepod *Acartia tonsa*. *Harmful Algae*, 4, 575–584.
- Deason, E.E., 1980. Grazing of *Acartia hudsonica* (*A. clausi*) on *Skeletonema costatum* in Narragansett Bay (USA): influence of food concentration and temperature. *Mar. Biol.*, 60, 101–113.
- Donaghay, P.L., Small, L.F., 1979. Food selection capabilities of the estuarine copepod *Acartia clausii*. *Mar. Biol.*, 52, 137-146.
- Donaghay, P.L., 1985. An experimental test of the relative significance of food quality and past feeding history to limitation of egg production of the estuarine copepod *Acartia tonsa*. *Arch. Hydrobiol.*, 21, 235-245.
- Durbin, E. G., Durbin, A. G., Campbell, R. G., 1992. Body Size and Egg-Production in the Marine Copepod *Acartia- Hudsonica* During a Winter Spring Diatom Bloom in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 342-360.
- Fan, C., Glibert, P.M., Burkholder, J.A., 2003. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae*, 2, 282–299.
- Frost, B.W., 1977. Feeding behaviour of *Calanus pacificus* in mixtures of food particles. *Limnol. Oceanogr.*, 22, 472-491.
- Grzebyk, D., Berland, B., 1996. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, 18, 1837-1849.
- Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B., Pouchus, Y.F., 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Plankton Res.* 19, 1111–1124.
- Guillard, R.L.R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. I.; Chanley, M. H. (Eds.) Culture of marine invertebrates. New York: Plenum, p. 29-59.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79–99.
- Heil, C.A., Glibert, P.M., Fan, C., 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller – a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae*, 4, 449–470.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Polingher, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, 35, 403–424.
- Huntley, M., Sykes, P., Rohan, S., Marin, V., 1986. Chemically-mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanisms, occurrence and significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28, 105-120.
- Ianora, A., Poulet, S.A., 1993. Egg viability in the copepod *Temora stylifera*. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 1615–1626.

- Islabão, C.A., Odebrecht, C., 2011. Dinoflagelados (Peridiniales, Prorocentrales) do microplâncton na plataforma continental e talude do extremo sul do Brasil (inverno 2005, verão 2007). *Biota neotrop.*, 11 (3), 153-166.
- Ives, J.D., 1987. Possible mechanisms underlying copepod grazing responses to levels of toxicity in red tide dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112, 131-145.
- Jónnasdóttir, S.H., 1994. Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. *Mar. Biol.*, 121, 67-81.
- Jónnasdóttir, S.H., Kiørboe, T., 1996. Copepod recruitment and food composition: do diatoms affect hatching success? *Mar. Biol.*, 125, 743-750.
- Jónnasdóttir, S.H., Kiørboe, T., Tang, K.W., St. John, M., Visser, A.W., Saiz, E., Dam, H.G., 1998. The role of diatoms in copepod production: good, harmless or toxic? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 172, 305-308.
- Jónnasdóttir, S.H., Gudfinnsson, H.G., Gislason, A., Astthorsson, O.S., 2002. Diet composition and quality for *Calanus finmarchicus* egg production and hatching success off south-west Iceland. *Mar. Biol.*, 140, 1195-1206.
- Kiørboe, T., Møhlenberg, F., Hamburger, K., 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26, 85-97.
- Kleppel, G.S., Pieper, R.E., Trager, G.S., 1988. Variability in gut content of individual *Acartia tonsa* from waters off southern California. *Mar. Biol.*, 97, 185-190.
- Knoppers, B.A., Brandini, F.P., Thamm, C.A., 1987. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. II Some physical and chemical characteristics. *Neritica*, Curitiba, 2, n. 1, 1-36.
- Laabir, M., Poulet, S.A., Ianora, A., Miralto, A., Cueff, A., 1995. Reproductive response of *Calanus helgolandicus*. II. In situ inhibition of embryonic development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129, 97-105.
- Lana, P. C., Marone, E., LOPES, R.M., MACHADO, E.C., 2001. The subtropical estuarine complex of Paranaguá Bay, Brazil. In: Selliger, U.; Kjerfve (Eds.). *Ecological Studies*, v. 144 - Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 131-145.
- Maak, R., 1981. Geografia física do estado do Paraná. Rio de Janeiro, J. Olimpio Ed. Secr. Cultura e do Esporte do estado do Paraná, 450 p.
- Mafra, L.L., 2005. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá: subsídios para o monitoramento. 156p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Botânica, UFPR, Paraná.
- Mafra, L.L., Fernandes, L.F., Proenca, L.A.O., 2006. Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring. *Braz. J. Oceanogr.*, 54, 107-121.
- Martins, G.J., Marone, E., Angulo, R.J., Noernberg, M.A., Quadros, C.J.L., 2004. Dinâmica da zona rasa de shoaling e o transporte de sedimentos na desembocadura sul do Complexo Estuarino de Paranaguá – PR. *Boletim Paranaense de Geociências*, v. 54, p. 51 – 64.
- Mauchline, J., 1998. The Biology of Calanoid Copepods. In *Advances in Marine Biology*, Blaxter, Southward and Tyler (Ed.). 710 p.
- Paffenhöfer, G.A., 1988. Feeding rates and behavior of zooplankton. *Bull. Mar. Sci.*, 43, 430-445.
- Portobras – Empresa de Portos do Brasil S.A., 1983. Campanha de medições de ondas em Paranaguá-PR, período: 21.08.82 a 21.01.83. Rio de Janeiro. INPH-DIDELE, 23 p.
- Putt, M., Stoecker, D.K., 1989. An experimentally determined carbon: volume ratio for marine 'oligotrichous' ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanog.*, 34, 1097-1103.
- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Rezende, K.R.V., 1995. Dinâmica Temporal do Fitoplâncton de Zona de Arrebentação da Praia de Pontal do Sul (Paranaguá-PR). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- Rosetta, C.H., McManus, G.B., 2003. Feeding by ciliates on two harmful algal bloom species *Prymnesium parvum* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 2, 109-126.

- Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P., 1998. Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. *Ecoscience*, Rio Grande, 341 p.
- Silva, E.S., 1980. As grandes populações de dinoflagelados tóxicos na lagoa de Obidos, vol. IV. Arquivos do Instituto Nacional de Saúde, Lisboa (Portugal), pp. 253–262.
- Shin, K., Jang, M.C., Jang, P.K., Ju, S.J., Lee, T.K., Chang, M., 2003. Influence of food quality on egg production and viability of the marine planktonic copepod *Acartia omorii*. *Progress in Oceanography*, 57, 265–277.
- Smayda, T. J., 1978. From phytoplankton to biomass. In Sournia, A. *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, pp. 273–279.
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, in: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 29–40.
- Smayda, T. J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42, 1137–1153.
- Støttrup J. G., Jensen, J., 1990. Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 141, 87–105.
- Straile, D., 1997. Gross-growth efficiencies of protozoan and metazoan zooplankton and their dependence on food concentration, predator-prey weight ratio, and taxonomic group. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1375–1385.
- Teegarden, G.J., Cembella, A.D., Capuano, A.L., Barron, S.H., Durbin, E.G., 2003. Phycotoxin accumulation in zooplankton feeding on *Alexandrium fundyense*—vector or sink? *J. Plankton Res.* 25, 29–443.
- Turner, J.T., Tester, P.A., 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limn. Oceanogr.*, 42, 1203–1214.
- Turner, J.T., Ianora, A., Miralto, A., Laabir, M., Esposito, F., 2001. Decoupling of copepod grazing rates, fecundity and egg-hatching success on mixed and alternating diatom and dinoflagellate diets. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 220, 187–199.
- Uye, S., 1986. Impact of copepod grazing on the red-tide flagellate *Chattonella antiqua*. *Mar. Biol.*, 92, 35–43.
- Uye, S., Takamatsu, K., 1990. Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59, 97–107.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspective*, 108(1), 133–141.
- Yallop, M.L., 2001. Distribution patterns and biomass estimates of diatoms and autotrophic dinoflagellates in the NE Atlantic during June and July, 1996. *Deep-Sea Research*, 48, 825–844.
- Zingone, A., Enevoldsen, H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management*, 43, 725–748.

7. ANEXOS

CAPÍTULO I

Tabela IV. Resultados da ANOVA (Análise de Variância) testada para as diferenças na produção de ovos e pelotas fecais entre os diferentes tratamentos de *H. akashiwo* nas fases de crescimento exponencial (A) e estacionária (B).

Fonte de variação	Produção de ovos			Produção de pelotas fecais		
	gl	MQ	F	gl	MQ	F
(A) Tratamento	4	84,193	35,47***	4	2994,58	23,87***
(A) Resíduos	15	2,373		15	125,45	
(B) Tratamento	4	62,837	4,92***	4	0,419	27,06***
(B) Resíduos	15	12,752		15	0,015	

Tabela V. Resultados da ANOVA-Bifatorial (Análise de Variância) testada para as diferenças na produção de ovos e pelotas fecais entre tratamentos dentro das diferentes fases de crescimento exponencial e estacionária de *H. akashiwo*.

Fonte de variação	Produção de ovos			Produção de pelotas fecais		
	gl	MQ	F	gl	MQ	F
Tratamento	4	112,088	14,82***	4	3898,0	17,66***
Fase de crescimento	1	200,167	26,46***	1	2421,1	10,97**
Tratamento x Fase de crescimento	4	34,942	4,62**	4	1400,7	6,34***
Resíduos	30	7,563		30	220,7	

Tabela VI. Resultados da ANOVA (Análise de Variância) testada para as diferenças na produção de ovos e pelotas fecais entre os tratamentos quando expostos à fração hidrossolúvel do extrato de *H. akashiwo* nas fases de crescimento exponencial (A) e estacionária (B).

Fonte de variação	Produção de ovos			Produção de pelotas fecais		
	gl	MQ	F	gl	MQ	F
(A) Tratamento	5	0,174	6,43**	5	16,66	18,15***
(A) Resíduos	15	0,027		15	0,917	
(B) Tratamento	5	1,559	17,19***	5	5,357	36,60***
(B) Resíduos	15	0,090		15	0,146	

Tabela V. Resultados da ANOVA (Análise de Variância) testada para a mortalidade de *Acartia lilljeborgi* nas diferentes dietas de *Heterosigma akashiwo* durante exposição de 72 h.

Fonte de variação	Mortalidade		
	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>
Mortalidade	6	93,389	0,319
Resíduos	13	301,282	

CAPÍTULO II

Tabela I. Resultados da ANOVA (Análise de Variância) testada para a taxa de ingestão em células.copépode⁻¹.dia⁻¹ e em carbono (µg C mL⁻¹) para as diferentes dietas testadas de *P. minimum* e *T. weissflogii*.

Fonte de variação	Ingestão em células			Ingestão em carbono		
	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>
(A) Tratamento	4	3,279***	13,334***	4	10,630	26,515***
Resíduos	14	2,459***		14	0,400	

Tabela II. Resultados da ANOVA (Análise de Variância) testada para produção de ovos (ovos.fêmea⁻¹. dia⁻¹) e o investimento do Carbono ingerido em produção de ovos para as diferentes dietas testadas de *P. minimum* e *T. weissflogii*.

Fonte de variação	Produção de ovos			Investimento em C para produção de ovos		
	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>	<i>gl</i>	MQ	<i>F</i>
(A) Tratamento	4	46,478	1,003	4	1134,6	7,79**
Resíduos	14	46,307		14	145,6	