

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA KARINE WORMSBECHER NOLLI

ASPECTOS SANITÁRIOS DE OSTRAS CULTIVADAS NO COMPLEXO ESTUARINO  
DE PARANAGUÁ: *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*, *PERKINSUS* SP. E FICOTOXINAS

PONTAL DO PARANÁ

2018

PAULA KARINE WORMSBECHER NOLLI

ASPECTOS SANITÁRIOS DE OSTRAS CULTIVADAS NO COMPLEXO ESTUARINO  
DE PARANAGUÁ: *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*, *PERKINSUS* SP. E FICOTOXINAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, no Centro de Estudos do Mar, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laurenno Mafra Jr.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Luciene Correa Lima

PONTAL DO PARANÁ

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

CATALOGAÇÃO NA FONTE:  
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar  
Fernanda Pigozzi – CRB 9/1151

N796a Nolli, Paula Karine Wormsbecher  
Aspectos sanitários de ostras cultivadas no Complexo Estuarino de Paranaguá: *Vibrio parahaemolyticus*, *Perkinsus* sp. e ficotoxinas. / Paula Karine Wormsbecher Nolli. – Pontal do Paraná, 2018.  
83 f.: il.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior.

Coorientadora: Profa.Dra. Luciene Correa Lima.

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

1. Aquicultura. 2. Intoxicação. 3. Microbiologia. 4. Saúde pública. I. Título. II. Mafra Júnior, Luiz Laureno. III. Lima, Luciene Correa. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 639.3

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PAULA KARINE WORMSBECHER NOLLI** intitulada: **Aspectos sanitários de ostras cultivadas no Complexo Estuarino de Paranaguá: *Vibrio parahaemolyticus*, *Perkinsus* sp. e ficotoxinas**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Pontal do Paraná, 28 de Março de 2018.



LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



MATHIAS ALBERTO SCHRAMM  
Avaliador Externo (IFSC)



GISELA GERALDINE CASTILHO WESTPHAL  
Avaliador Externo (UFPR)

Pontal do Paraná, 28 de março de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado que auxiliou a realização desta pesquisa.

Agradeço a Deus pela oportunidade de evolução.

Aos meus pais, irmão e namorado pelo incentivo e carinho nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Luiz Laurenno Mafra Jr. e Luciene Correa Lima pela paciência, sugestões e apoio nesta trajetória.

Aos ostreicultores: Dona Eleonor e Antônio, da Ponta Oeste da Ilha do Mel e também a todos os ostreocultores de Medeiros, principalmente ao Sr. Orlando.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Aquícola e do Laboratório de Microalgas, principalmente a Ana Beatriz Villas Boas, Daniele Conceição, Thiago Alves, Carlos Tibiriçá, Kaianã Mauê, Lígia Luz, Thalita, Lirian e Débora pelo companheirismo e diversão durante as longas jornadas de trabalho.

Agradeço a querida amiga Bruna Fernanda Sobrinho pela parceria, diversão, incentivo e por cozinhar divinamente bem. Aos amigos da PGSISCO: Ligia Novak, Amanda Câmara, Angeline, Priscila, Mariana Aliceda, Bryan e Guilherme.

Agradeço a técnica Daniele Conceição e ao Professor Rodolfo Pettersen, do Laboratório de Genética e Melhoramento de Organismos Marinhos do CEM- UFPR, por possibilitar a realização das análises de PCR. Ao Rodrigo Maggioni e a Simone Sühnel, por contribuírem com os padrões de *Perkinsus* sp. Também, a técnica Fernanda Ishii e a profesora Hedda Kolm, do Laboratório de Microbiologia Ambiental Marinha, e ao Sr. Orestes de Oliveira Jr., do Laboratório de Microscopia do CEM - UFPR por ceder a estrutura do laboratório para que fossem realizadas algumas análises.

Agradeço a técnica Liciane Silva e a professora Adriana Perretti, do Laboratório de Indicadores Geoquímicos – CEM - UFPR, por possibilitar a realização das análises de nutrientes. Também, a técnica Maria Letícia Biavatti e a professora Katia Naomi Kuroshima, do Laboratório de Oceanografia Química da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, por também possibilitarem a realização das análises de nutrientes.

Agradeço ao Professor Luciano Fernandes, do Laboratório de Ficologia, do Centro Politécnico – UFPR, por ceder seu tempo para me ensinar e acompanhar a preparação das amostras e por realizar as análises de microscopia de transmissão. Também ao Thiago Pereira

Alves e Christian Rafael Kleemann, do LAQUA-IFSC, pela realização das análises de detecção do ácido domóico.

Agradeço as técnicas Mariane Ferranini e Daniela Nóbrega e a professora Camila Domit, do Laboratório de Ecologia Costeira – CEM-UFPR, por possibilitarem o preparo das lâminas para as análises histopatológicas. Também, a professora Gisela G. Castilho-Westphal, do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais - GIA - UFPR, por ceder seu tempo e me ensinar a interpretar as análises histopatológicas e também analisar parte das lâminas.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

## RESUMO

Ostras se alimentam de partículas em suspensão na água, podendo reter em seus tecidos micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias e parasitos, e também toxinas produzidas por microalgas, o que pode comprometer seu crescimento e também causar danos à saúde pública por meio de intoxicações alimentares. Este estudo avaliou aspectos sanitários de ostras *Crassostrea* sp. cultivadas na Ponta Oeste da Ilha do Mel (PO) e em Medeiros (MED), situadas no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), Paraná-Brasil. Entre junho/2016 e junho/2017, campanhas amostrais foram realizadas, sendo coletadas amostras integradas da coluna d'água e ostras de cada local. Foi aplicado um conjunto de técnicas laboratoriais, incluindo a fermentação em tubos múltiplos para determinação da ocorrência de bactérias *Vibrio parahaemolyticus*; cultivo em Meio Tioglicolato Fluido de Ray (RFTM), histopatologia e Reação por Polimerase em Cadeia (PCR) para avaliar a prevalência de parasitos *Perkinsus* sp.; contagem em microscópio invertido para quantificação das microalgas potencialmente tóxicas; e cromatografia líquida (LC-MS/MS e LC-UVD) para detecção das ficotoxinas nos tecidos das ostras e na fração particulada da água do mar. As variáveis biológicas foram relacionadas com fatores abióticos dominantes e entre si, para avaliar a existência de interações significativas no ambiente. A temperatura da água diferiu entre os locais, sendo maior em MED (21,5 a 27°C) do que na PO (21,25 a 26°C) e os valores de salinidade também diferiram entre MED (20 a 22) e PO (24 a 36). Este estudo faz o primeiro relato da presença de *Perkinsus marinus* e *P. cf. olseni* em ostras *Crassostrea* sp. provenientes do CEP. A intensidade da infecção foi predominantemente baixa entre os organismos, exceto no mês de junho/17, quando a infecção foi considerada intensa. A prevalência variou entre 30 a 75% por RFTM e 10 a 75% por PCR, sendo consistentemente maior em novembro/16 nas ostras provenientes da PO. Ao contrário da intensidade da infecção, a prevalência diferiu entre os locais. Além disso, foi possível detectar a presença de *V. parahaemolyticus* nas ostras de MED e PO, sendo as maiores densidades (>1.100 NMP.g<sup>-1</sup>) registradas em novembro/16 e abril/17. Na água, as densidades de *V. parahaemolyticus* foram superiores em abril/17 (>1.100 NMP.mL<sup>-1</sup>). No plâncton, diatomáceas foram mais abundantes do que dinoflagelados ao longo do período de estudo, sendo a abundância total de microalgas maior em abril/17. As microalgas potencialmente tóxicas ocorreram em ambos os locais, sendo que o dinoflagelado produtor de toxinas diarreicas, *Dinophysis* cf. *acuminata*, ocorreu em maiores abundâncias em junho/16 (617 cel.L<sup>-1</sup> em MED e 121.265 cel.L<sup>-1</sup> na PO) e as diatomáceas penadas potencialmente produtoras de toxinas amnésicas, *Pseudo-nitzschia calliantha* (252.989 ± 163.600 cel.L<sup>-1</sup>) e *Pseudo-nitzschia pungens* (6.779 ± 11.732 cel.L<sup>-1</sup>), em abril/17. Foram detectadas baixas concentrações da toxina diarreica ácido ocadaico no plâncton em junho/17, tanto em MED (0,24–4,10 µg.L<sup>-1</sup>) como na PO (1,57–1,83 µg.L<sup>-1</sup>), e altas concentrações nas glândulas digestivas dos bivalves, em junho/16 na PO (639 ± 287 µg.L<sup>-1</sup>), coincidindo com a maior abundância da alga produtora na água. A toxina amnésica ácido domoico não foi detectada nem no plâncton nem nas ostras. As possíveis interações encontradas neste trabalho, sugerem que *V. parahaemolyticus* esteve diretamente relacionada com a abundância total de células de microalgas no plâncton e inversamente relacionada com a prevalência de *Perkinsus* sp. Adicionalmente, a abundância de *Dinophysis* cf. *acuminata* esteve diretamente relacionada à prevalência de *Perkinsus* sp. Em conjunto, as densidades relativamente elevadas de *V. parahaemolyticus*, *D. cf. acuminata*, *Pseudo-nitzschia* spp. e *Perkinsus* spp. encontradas neste estudo despertam preocupação quanto aos possíveis danos à saúde humana e à manutenção da sustentabilidade da atividade de ostreicultura na Baía de Paranaguá, sobretudo se tais parâmetros não forem constantemente monitorados.

**Palavras-chave:** aquicultura, monitoramento microbiológico, intoxicação, saúde pública

## ABSTRACT

Oysters feed on suspended particles in the water and can retain in their tissues pathogenic microorganisms, including bacteria and parasites, as well as toxins produced by microalgae, which can compromise their growth also damage on public health. This study evaluated the sanitary aspects of *Crassostrea* sp. In Ponta Oeste (PO) and Medeiros (MED), located in the Estuarine Complex of Paranaguá (CEP), Paraná-Brazil. Between June/2016 and June/2017, sampling campaigns were performed, and samples were collected from the water column and oysters from each site. A set of laboratory techniques was applied, including fermentation in multiple tubes to determine the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*; culture in Ray Fluid Thioglycollate Medium (RFTM), histopathology and Polymerase Chain Reaction (PCR) to evaluate the prevalence of *Perkinsus* sp.; count in inverted microscope for quantification of potentially toxic microalgae; and liquid chromatography (LC-MS/MS and LC-UVD) for the detection of phycotoxins in oyster tissues and the particulate fraction of seawater. Biological variables were related to dominant abiotic factors and to each other to evaluate the existence of significant interactions in the environment. Water temperature was higher in MED (21,5 a 27°C) than in PO (21,25 a 26°C). The salinity values also differed between MED (20 to 22) and PO (24 to 36). This study makes the first report of the presence of *Perkinsus marinus* and *P. cf. olsenii* in oysters *Crassostrea* sp. from the CEP. The intensity of the infection was predominantly low, except in the month of June/17, when the infection was considered intense. The prevalence ranged from 30 to 75% by RFTM and 10 to 75% by PCR, is consistently higher in November/16 in oysters from PO. Contrary to the intensity of infection, prevalence differed between sites. In addition, it was possible to detect the presence of *V. parahaemolyticus* in MED and PO oysters, with the highest densities ( $> 1.100 \text{ NMP.g}^{-1}$ ) recorded in November/16 and April/17. In water, the densities of *V. parahaemolyticus* were higher in April/17 ( $> 1.100 \text{ NMP.mL}^{-1}$ ). In the plankton, diatoms were more abundant than dinoflagellates throughout the study period, with total microalgae abundance higher in April/17. Potentially toxic microalgae occurred in both sites: the dinoflagellate *Dinophysis* cf. *acuminata* ( $617 \text{ cel.L}^{-1}$  in MED and  $121,265 \text{ cel.L}^{-1}$  in the PO) and the diatoms *Pseudo-nitzschia calliantha* ( $252,989 \pm 163,600 \text{ cel.L}^{-1}$ ) and *Pseudo-nitzschia pungens* ( $6,779 \pm 11,732 \text{ cel.L}^{-1}$ ) in April/17. Low concentrations of ocaidaic acid in plankton were detected in June/17 in MED ( $0.24\text{-}4.10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and PO ( $1.57\text{-}1.83 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), and high concentrations in the digestive glands of the bivalves, in June/16 in the PO ( $639 \pm 287 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). However, the domoic acid was not detected in either plankton or oysters. The possible interactions found in this work suggest that *V. parahaemolyticus* was directly related to the total abundance of microalgae cells in plankton and inversely related to the prevalence of *Perkinsus* sp. Additionally, the abundance of *Dinophysis* cf. *acuminata* was directly related to the prevalence of *Perkinsus* sp. Together, the relatively high densities of *V. parahaemolyticus*, *D. cf. acuminata*, *Pseudo-nitzschia* spp. and *Perkinsus* spp. found in this study raise concern about possible damages to human health and the maintenance of the sustainability of oyster farming activity in the Bay of Paranaguá, especially if such parameters are not constantly monitored.

**Key words:** aquaculture, microbiological monitoring, intoxication, public health

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ COM DESTAQUE PARA AS DUAS COMUNIDADES OSTREICULTORAS ESTUDADAS (PONTA OESTE, NA ILHA DO MEL E MEDEIROS), ONDE FORAM COLETADOS AMOSTRAS DE ÁGUA EM DOIS LOCAIS DISTINTOS (SINALIZADOS PELOS DOIS TRIÂNGULOS EM VERMELHO). .....21
- FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* .....24
- FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DE DETECÇÃO DE *PERKINSUS SP.* .....25
- FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE *PERKINSUS SP.* .....25
- FIGURA 5 - TECIDO BRANQUIAL DE OSTRAS *CRASSOSTREA SP.* COLETADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL, INFECTADO POR *PERKINSUS SP.* APÓS INCUBAÇÃO EM RFTM, MOSTRANDO CÉLULAS DO PARASITO CORADAS COM LUGOL. PRESENÇA DE NUMEROSOS HIPNÓSPOROS DE *PERKINSUS SP.* CARACTERÍSTICOS DE UMA INFECÇÃO INTENSA (AUMENTO DE 400X EM MICROSCÓPIO ÓPTICO). .....37
- FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE OSTRAS INFECTADAS POR *PERKINSUS SP.*, MARCADOR DO PESO MOLECULAR (M), CONTROLE COM DNA DE *PERKINSUS SP.* (C) E AS AMOSTRAS DE OSTRAS (A) POSITIVAS E NEGATIVAS (A2). .....37
- FIGURA 7 - ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES *PERKINSUS MARINUS* E *PERKINSUS CF. OLSENI* DAS AMOSTRAS SANAQ 1 A 6 COLETADAS EM MEDEIROS (CEP) E AMOSTRAS DO BANCO DE DADOS DO NCBI.40
- FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA DA ESPÉCIE *Dinophysis cf. acuminata* COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL. ....46
- FIGURA 9 - *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA* FOTOGRAFADA COM AUXÍLIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL. .... 50

FIGURA 10 - *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS* FOTOGRAFADA COM AUXÍLIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL. ....50

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ABUNDÂNCIA (Cel.L <sup>-1</sup> ) DE DIATOMÁCEAS E DINOFLAGELADOS PRESENTES EM MEDEIROS (PAINEL SUPERIOR) E PONTA OESTE (PAINEL INFERIOR) DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO, EM RELAÇÃO AOS VALORES MÉDIOS DE SALINIDADE E TEMPERATURA DA ÁGUA. .....	44
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E POST-HOC (TUKEY/HSD) PARA A PROFUNDIDADE, TRANSPARÊNCIA, TEMPERATURA, SALINIDADE, NITRITO E CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA - <i>A</i> DA ÁGUA NAS DUAS ÁREAS ESTUDADAS LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ) DESTACADAS EM NEGRITO.....	31
TABELA 2 – DENSIDADE DE <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE OSTRAS E ÁGUAS AMOSTRADAS NAS COMUNIDADES DE MEDEIROS E PONTA OESTE DA ILHA DO MEL, LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR, BRASIL.....	32
TABELA 3 – PREVALÊNCIA DE <i>PERKINSUS</i> SP. E INTENSIDADE DE INFECÇÃO EM OSTRAS <i>CRASSOSTREA</i> SP. PROVENIENTES DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ- PR, BASEADOS NOS ENSAIOS EM RFTM E CONFIRMADAS POR PCR. ....	37
TABELA 4 - NÚMERO DE OSTRAS QUE APRESENTARAM INFECÇÃO POR <i>PERKINSUS</i> SP. DETERMINADA ATRAVÉS DOS ENSAIOS EM RFTM E CONFIRMADAS OU NÃO POR PCR (+ OU -), COM A RESPECTIVA EFICIÊNCIA ENTRE AS REFERIDAS TÉCNICAS, DE ACORDO COM INTENSIDADE DE INFECÇÃO (ESCALA DE MACKIN ENTRE 0 A 4) ....	38
TABELA 5 - TÁXONS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE FITOPLÂNCTON NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL, DE OUTUBRO DE 2016 A JUNHO DE 2017 .....	43
TABELA 6 – ESTRATIFICAÇÃO DA ESTRUTURA VERTICAL DA COLUNA D'ÁGUA: RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA (ANOVA) E POST-HOC (TUKEY) PARA OS DADOS DE SALINIDADE E TEMPERATURA OBTIDOS COM CTD A CADA 0,5 M NAS DUAS REGIÕES ESTUDADAS LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR, BRASIL. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ) DESTACADAS EM ITÁLICO .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	- Ácido Domóico
AO	- Ácido Ocadaico
ASP	- do inglês, <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
CEP	- Complexo Estuarino de Paranaguá
CTD	- do inglês, <i>Conductivity, Temperature e Depth</i>
DSP	- do inglês, <i>Diarrheic Shellfish Poisoning</i>
DTA	- Doenças Transmitidas por Alimentos
DTX	- Dinofisistoxinas
HiC	- Ágar HiCrome
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alto Rendimento
IN	- Instrução Normativa
LC-MS/MS	- Cromatografia Líquida acoplado ao Espectrômetro de Massas
LOD	- do inglês, <i>Limit of Detection</i>
MED	- Medeiros
NCBI	- Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
NMP	- Número Mais Provável
OIE	- Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PO	- Ponta Oeste da Ilha do Mel
PNCMB	- Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
PSP	- do inglês, <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
RENAQUA	- Rede Nacional de Laboratórios Responsáveis pelas Análises Oficiais e Diagnósticos
RFTM	- Meio de Tioglicolato de Ray
SAC+	- Sacarose Positiva
SIM	- Sulfeto, Indol e Motilidade
SAC-	- Sacarose Negativa
STX	- Saxitoxinas
TCBS	- Ágar Tiosulfato Citrato de Bile e Sacarose
TDH	- Hemolisina Direta Termoestável
THR	- Hemolisina Relacionada a TDH
TSA	- do inglês, <i>Tryptic Soy Agar</i>

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UPGMA - do inglês, *Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Justificativa.....	18
1.2	Objetivos .....	19
1.2.1	Objetivo Geral .....	19
1.2.2	Objetivos Específicos .....	19
1.3	Hipóteses .....	20
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1	Área de estudo .....	21
2.2	Amostragem.....	21
2.3	Procedimentos analíticos .....	23
2.3.1	Isolamento e quantificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	23
2.3.2	Detecção de <i>Perkinsus</i> sp. nas ostras .....	24
2.3.3	Identificação e quantificação de microalgas potencialmente tóxicas.....	26
2.3.4	Quantificação de ficotoxinas nas ostras .....	27
2.3.5	Determinação da concentração de nutrientes e clorofila- <i>a</i> .....	28
2.3.6	Análise estatística .....	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
3.1	Parâmetros físico-químicos da água.....	30
3.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	32
3.3	<i>Perkinsus</i> sp.....	36
3.4	Microalgas e ficotoxinas .....	42
3.4.1	Variação espacial e temporal na abundância do fitoplâncton .....	42
3.4.2	Variação espacial e temporal de microalgas potencialmente tóxicas e ficotoxinas ...	45
3.5	Possíveis interações entre os micro-organismos estudados .....	54
4	CONCLUSÕES.....	55
5	REFERÊNCIAS .....	57
6	ANEXOS.....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é uma importante fonte de recursos naturais devido a sua elevada produtividade biológica, possibilitando a realização da atividade aquícola, entre outras formas de uso dos recursos (Dumbauld, Ruesink et al. 2009). Dentre as diversas modalidades de aquicultura, o cultivo de moluscos (malacocultura) se destaca em nível mundial por demandar baixo investimento relativo e render grande produção de biomassa por área cultivada (FAO 2015). No Brasil, o estado de Santa Catarina é responsável por mais de 90% da produção nacional, cultivando mexilhões e ostras da espécie exótica *Crassostrea gigas* (EPAGRI 2018), enquanto que no Paraná, a produção e comercialização de ostras nativas, *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar* (=brasiliiana), acontecem em escala artesanal nas comunidades que habitam as margens e ilhas do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) e na Baía de Guaratuba. A atividade pesqueira apresenta sinais de redução no litoral paranaense, logo, a maricultura pode ser importante para o futuro das comunidades fixadas nos diferentes locais dos estuários paranaenses (Westphal 2012) que vêm buscando na aquicultura alternativas para continuar gerando alimento e renda. Sendo através da sua extração em bancos naturais ou do cultivo a partir de sementes obtidas em laboratório, a maricultura representa uma fonte de renda importante para muitas comunidades pesqueiras ao longo de outros trechos da costa brasileira (Farias 2008).

O cultivo de ostras (ostreicultura) no CEP ocorre na forma de *long-lines* e devido a forma de alimentação das ostras (por filtração), alimentam-se de partículas em suspensão na coluna d'água (Souza, Zanette et al. 2015). Além do fitoplâncton, seu principal componente alimentar e de onde pode incorporar toxinas produzidas por algumas espécies de microalgas nocivas, também podem reter, em seus tecidos, micro-organismos patogênicos, incluindo bactérias e parasitos. Desse modo, ostras contaminadas tanto podem adoecer e morrer, prejudicando a sustentabilidade do cultivo de ostras (ostreicultura) e também resultando em perdas significativas ao setor aquícola (Lafferty, Harvell et al. 2015); quanto podem veicular toxinas produzidas por bactérias patogênicas (Silveira, Milan et al. 2016) ou microalgas tóxicas (Grattan, Holobaugh et al. 2016). O consumo de organismos aquáticos originários de águas contaminadas pode levar ao desenvolvimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) tanto pela ação de um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido, como por toxinas por ele produzidas (Brasil 2001). Sendo assim, o monitoramento sanitário da água e das próprias ostras produzidas é importante, pois garante a segurança alimentar e a manutenção dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, sobretudo, porque o consumo deste produto ocorre majoritariamente *in natura*. Além disso, o eficiente monitoramento dos aspectos sanitários viabiliza o desenvolvimento sustentável da malacocultura.

Dentre os micro-organismos patogênicos que merecem ser monitorados no âmbito da malacocultura, destacam-se bactérias do gênero *Vibrio*, por possuírem capacidade de se desenvolver tanto no ambiente marinho quanto no pescado de origem marinha (FAO 2011, Silveira, Milan et al. 2016). Espécies de *Vibrio* representam ameaça, especialmente nas primeiras fases do cultivo de bivalves, com mortalidades de larvas de até 100%, redução da produtividade e consideráveis perdas econômicas (Romalde, Dieguez et al. 2014). Por sua vez, moluscos infectados por vibrios podem significar um risco substancial aos humanos, particularmente se forem ingeridos crus ou parcialmente cozidos (Drake, DePaola et al. 2007, Serratore P., Ciulli S. et al. 2014). Entre as espécies de *Vibrio* consideradas mais relevantes, tanto pela ação direta sobre os bivalves produzidos (Beaz-Hidalgo, Balboa et al. 2010), quanto do ponto de vista epidemiológico para humanos (Passalacqua, Zavatta et al. 2016), destaca-se *Vibrio parahaemolyticus* por causar severas gastroenterites. Além de ser considerado a principal causa de DTAs no Japão, infecções por *V. parahaemolyticus* tem aumentado na Ásia, América do Norte e América do Sul, por exemplo (Hara-Kudo and Kumagai 2014).

A espécie *V. parahaemolyticus* apresenta elevada taxa de crescimento em relação a outras espécies de *Vibrio* (Oliver, Pruzzo et al. 2013) e possui capacidade de produzir toxinas, que é altamente correlacionada com gastroenterites pelo consumo de bivalves *in natura* (Meng, Alter et al. 2015). Sua ação patogênica está relacionada principalmente ao fenômeno Kanagawa e depende da produção da hemolisina direta termoestável (TDH) e hemolisina relacionada à TDH (THR) (Raghunath 2014), onde ocorre a destruição dos glóbulos vermelhos (Zhang and Orth 2013). Além destes, novos estudos revelaram o sistema de secreção tipo III, relacionado a sobrevivência da bactéria no meio ambiente, através da lise celular que causa a liberação de nutrientes em situações onde os recursos são limitados (Silveira, Milan et al. 2016). Apesar de possuir diferentes fatores de virulência, nem todas as cepas de *V. parahaemolyticus* são patogênicas e a proporção destas cepas é variável em função de condições geográficas e sazonais (Pereira, Possas et al. 2007, Letchumanan, Chan et al. 2014, Raszl, Froelich et al. 2016). A distribuição destes micro-organismos em ecossistemas estuarinos depende de fatores bióticos (predação pelo zooplâncton e abundância de seu hospedeiro) e abióticos da coluna d'água (temperatura, salinidade, pH, pressão, turbidez e concentração de nutrientes na água) (Thompson, Marcelino et al. 2005, Ristori, Iaria et al. 2007). Em regiões temperadas os vibrios estão presentes na água do mar durante todo o ano, porém, em maior concentração nos meses mais quentes (Raszl, Froelich et al. 2016), com gradual redução em meses mais frios (Motes, DePaola et al. 1998, Drake, DePaola et al. 2007). Podem ocorrer em temperaturas próximas a 15°C e ser frequentemente encontrados no sedimento e aderidos a outros organismos marinhos (Drake, DePaola et al. 2007, Letchumanan, Chan et al. 2014). Além disso, diversas espécies de *Vibrio* estão associadas a organismos presentes no fitoplâncton e zooplâncton, que

contribuem para que estas bactérias desempenhem seu papel ecológico na ciclagem de nutrientes, mas que, por outro lado, possibilitam a difusão deste patógeno no ambiente e, conseqüentemente, colaboram para entrada de patógenos nos tecidos das ostras (Newman 2015, Kramer, Ward et al. 2016). Em se tratando de ostreicultura, é importante que as análises para se avaliar a presença de *Vibrio* sp. não se limitem à água, mas que contemplem também as ostras para garantir a inocuidade microbiológica do produto ofertado (Machado 2002, Farias 2008).

Diversos outros patógenos ocorrem na coluna d'água e o gênero *Perkinsus*, mesmo que não cause danos à saúde humana, reúne organismos importantes para a aquicultura mundial por serem responsáveis pela enfermidade perkinsiose e interferir no desenvolvimento dos bivalves, provocando redução no crescimento e valor de mercado. Dentre todas as espécies patogênicas aos bivalves - *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. mediterraneus*, *P. beihaiensis*, *P. honshuensis*, *P. andrewsi* e *P. chesapeakei* - apenas as duas primeiras espécies são de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), por causarem danos significativos à maricultura (OIE 2018), causando mortalidades massivas em muitas espécies de bivalves de águas tropicais e subtropicais em todo o mundo (Villalba, Reece et al. 2004). A prevalência desses parasitos está fortemente correlacionada a altas temperaturas e salinidade (Villalba, Reece et al. 2004, Cho and Park 2010). De acordo com Bower, McGladdery et al. (1994) e OIE (2017), ostras infectadas por *P. marinus* podem apresentar glândula digestiva com “aspecto pálido”, abertura involuntária da concha (*gapping*), retração do manto, crescimento retardado, abscessos e lesões, podendo ocorrer até 95% de mortalidade. Quando infectadas por *P. olseni*, os animais podem apresentar ruptura do tecido conjuntivo, cistos macroscópicos nas brânquias, abscesso e pústulas, emagrecimento, *gapping*, comprometimento do sistema imune, destruição do epitélio do tubo digestivo e mortalidade (OIE 2017). Enquanto que, os efeitos subletais podem causar danos ecológicos e econômicos, por afetar negativamente o crescimento dos bivalves ou ainda afetar a deficiência nas reservas de energia para a gametogênese (Casas, Villalba et al. 2002). Resultando em menor recrutamento e menor quantidade de juvenis. Esta infecção causa estresse ao hospedeiro e acarreta menor eficiência das suas células de defesa, de modo que se torna mais difícil para o organismo afetado superar outra condição estressante (Villalba, Reece et al. 2004). Entretanto, tais sinais nem sempre são detectáveis ou exclusivos dessa enfermidade (OIE 2018).

Diversas espécies de microalgas compõem o fitoplâncton, sendo predominantemente autotróficas e responsáveis por grande parte da produção primária dos oceanos. Por meio de relações tróficas, a matéria orgânica e energia são transferidas aos demais grupos de organismos presentes no ambiente marinho (Smayda 1997, Zingone and Enevoldsen 2000), incluindo moluscos bivalves suspensívoros como as ostras. As microalgas presentes nas regiões costeiras são alimento primordial

para diversos organismos herbívoros e/ou suspensívoros e, desta forma, essenciais à malacocultura (Hallegraeff, Anderson et al. 2003). No entanto, durante o processo de filtração pelo meio do qual obtêm as partículas alimentares, os bivalves podem também ingerir microalgas produtoras de toxinas presentes em áreas de cultivo e acumular estes compostos em seus tecidos.

O crescimento excessivo em número de células de microalgas em um curto espaço de tempo é denominado floração (Anderson, Andersen et al. 2001). As florações de microalgas são fenômenos naturais e se tornaram bastante frequentes nos últimos anos, devido principalmente aos mecanismos de dispersão natural de células através das correntes, às mudanças climáticas e à eutrofização (Hallegraeff, Anderson et al. 2003, Lassus, Chomérat et al. 2016). Em uma situação de floração de microalgas tóxicas, pode ocorrer desde a intoxicação de humanos via consumo de pescado contaminado, até a morte de animais marinhos, como também a alteração na coloração da água e a contaminação das praias com matéria orgânica em excesso (Hallegraeff, Anderson et al. 2003, Lassus, Chomérat et al. 2016). Por isso, muitos países têm investido no monitoramento de áreas aquícolas, para controle e prevenção da contaminação do pescado destinado ao consumo humano (Trainer and Hardy 2015).

Diferentes espécies de microalgas marinhas produzem ficotoxinas, que são classificadas de acordo com suas estruturas químicas e sintomas que acarretam. Tais compostos tóxicos são termoestáveis e representam risco para a saúde humana por meio do desenvolvimento de síndromes (intoxicações alimentares) diversas, dentre as quais: a) envenenamento amnésico por moluscos, do inglês *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), causada principalmente pela diatomácea *Pseudo-nitzschia* sp. produtora de ácido domóico (AD), que provoca sintomas gastrointestinais (cólicas abdominais e vômito) e neurológicos (desorientação e perda de memória recente); b) envenenamento paralisante por moluscos, do inglês *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), causado especialmente pelos dinoflagelados do gênero *Alexandrium* e *Gymnodinium catenatum*, produtores de saxitoxinas (STX) e moléculas congêneres, que provocam distúrbios gástricos, formigamento ou paralisia nas extremidades do corpo e, em casos mais graves, paralisia cardiorrespiratória; c) e o envenenamento diarreico por moluscos, do inglês *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), causado principalmente pelo dinoflagelado planctônico *Dinophysis* spp. e algumas espécies bênticas de *Prorocentrum* sp., produtores de ácido ocadaico (AO) e seus derivados, dinofisistoxinas (DTX 1 e DTX 2). Em humanos, estas toxinas provocam náusea, vômito e diarreia, constituindo a principal causa de intoxicação alimentar por ficotoxinas no mundo todo (Hallegraeff, Anderson et al. 2003, FAO 2004, Brasil 2012, Lassus, Chomérat et al. 2016). Além disso, embora sejam bastante resistentes às toxinas produzidas por microalgas, bivalves expostos a grande densidade de microalgas tóxicas, têm suas

funções fisiológicas prejudicadas, o que aumenta sua susceptibilidade a várias infecções, como a causada pelo gênero *Perkinsus* (Hégaret, Da Silva et al. 2007, Lassudrie, Soudant et al. 2014).

Ao longo da costa brasileira, diversos pesquisadores isolaram *V. parahaemolyticus* em amostras de águas e de ostras (Barreto, de Sousa et al. 2008, Rojas, Matté et al. 2011, Rodrigues and Carvalho- Filho 2012, Ramos, Miotto et al. 2014). No Paraná, estudos sobre o gênero *Vibrio* foram conduzidos no CEP, porém sem a identificação da espécie *V. parahaemolyticus* (Chalkoscki 2014, Santos 2015, Alves 2016). Da mesma forma, não há estudos sobre a presença de *Perkinsus* sp. em ostras nativas no Paraná, porém alguns trabalhos determinaram a presença de *P. olseni*, *P. marinus*, e *P. beihaiensis* em ostras nativas em diversos estados brasileiros, tais como: no nordeste (Dantas-Neto, Sabry et al. 2015), Bahia (Luz and Boehs 2016), Ceará (Sabry, Gesteira et al. 2013), Paraíba (da Silva, Vianna et al. 2013), Sergipe (da Silva, Scardua et al. 2014) e Santa Catarina (Cunha 2016). Algumas espécies de microalgas potencialmente tóxicas, já foram identificadas em águas brasileiras, como o dinoflagelado causador de PSP, *Gymnodinium catenatum* no Espírito Santo (Oliveira 2005), em Santa Catarina (Proença, Tamahana et al. 2001, Schramm, Tamahana et al. 2006) e no Paraná (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006) e *Alexandrium minutum* no Rio de Janeiro (Menezes, Branco et al. 2007), e também *Alexandrium* spp. relacionado a presença de toxina paralisante em moluscos bivalves em Santa Catarina (CIDASC 2017). Além disso, várias espécies de *Pseudo-nitzschia*, diatomáceas causadoras de ASP, já foram identificadas no Rio de Janeiro (Mariné, Silva et al. 2010), em São Paulo (Moser, Ciotti et al. 2012), em Santa Catarina (Fernandes, Cavalcante et al. 2013) e no Paraná (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Tibiriçá, Fernandes et al. 2015). Da mesma forma, os dinoflagelados *Dinophysis* sp. - principais causadores de florações e de proibições da comercialização e consumo de bivalves na costa brasileira - já foram relatados no Rio de Janeiro (Mariné, Silva et al. 2010), em Santa Catarina (Proença, Schramm et al. 2007) e no Paraná (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Tibiriçá, Fernandes et al. 2015). Nestes últimos dois estados, a detecção de toxinas diarreicas em moluscos tem se tornado frequente nos últimos anos (Mafra Jr., Tavares et al. 2014, Mafra Jr, Lopes et al. 2015, ADAPAR 2016, CIDASC 2016).

A presença de micro-organismos patogênicos e ficotoxinas em ambientes marinhos pode gerar impactos negativos ao ambiente, aos recursos naturais, a atividade aquícola e a saúde dos consumidores de frutos do mar. Os bivalves não apresentam características macroscópicas evidentes quando estão contaminados por bactérias, alguns parasitas e microalgas, então o monitoramento sanitário das áreas onde ocorrem os cultivos se faz necessário para a manutenção da fauna marinha como também da segurança alimentar dos consumidores. Para tanto, este trabalho teve por objetivo investigar a variação espaço-temporal na densidade e prevalência de micro-organismos patogênicos (*Vibrio parahaemolyticus* e *Perkinsus* sp.) e a concentração de ficotoxinas em ostras, bem como a

abundância das espécies de microalgas potencialmente tóxicas na água em duas áreas de ostreicultura no Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP): a Ponta Oeste da Ilha do Mel (PO) e Medeiros (MED). Os dados de densidade, prevalência e abundância destas variáveis biológicas foram relacionados entre si para se avaliar a existência de interações entre os organismos patogênicos, bem como com fatores abióticos dominantes em cada local, durante os meses de outubro e novembro de 2016, e abril e junho de 2017.

### 1.1 Justificativa

O Brasil tem grande potencial para a expansão da maricultura, pois além do crescente interesse e demanda pela produção de frutos do mar, possui baías e enseadas abrigadas e clima favorável ao desenvolvimento de espécies de bivalves de interesse comercial. De acordo com a FAO (2014), FAO (2015) a produção total de peixes, crustáceos e moluscos no Brasil em 2015, foi de 574.530 toneladas, apresentando crescimento de 16% quando comparado ao ano de 2012, mesmo ano em que a produção comercial de bivalves no Paraná foi de 340 toneladas (Matsushita 2014). Apesar de apresentar números discretos, a ostreicultura é a principal modalidade aquícola em desenvolvimento no litoral paranaense e por isso, requer intrinsecamente que seja implementado um monitoramento sanitário oficial.

Neste contexto, a Instrução Normativa Interministerial (IN) n. 7, publicada em 8 de outubro de 2012, possibilitou o início da atividade de monitoramento e controle higiênico sanitário da produção de bivalves no Brasil, por meio do Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário dos Moluscos Bivalves (PNCMB) (Brasil 2012). Este programa estabelece procedimentos de coleta e análises de micro-organismos patogênicos (*Escherichia coli*) e ficotoxinas, além de estipular os limites máximos dos resultados das análises para estabelecer se a extração e o consumo devem ser proibidos ou não (Brasil 2013). No entanto, este programa de monitoramento não aborda todos os agentes patogênicos relevantes para a segurança alimentar dos consumidores de bivalves, a exemplo da ausência do monitoramento de *V. parahaemolyticus*. Porém, os limites deste patógeno são definidos pela Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Além destas, a Resolução n. 357 de 17 de março de 2005 estabelece os parâmetros químicos e microbiológicos (apenas coliformes termotolerantes) tolerados nos corpos de água onde estão instalados os cultivos de moluscos bivalves destinados ao consumo humano (BRASIL, 2005). É importante ressaltar que os patógenos estudados no presente trabalho, além de causarem danos à saúde pública (FAO 2011, Lassus, Chomérat et al. 2016), provocam impactos à ostreicultura mundial por intermédio da mortalidade massiva de

moluscos (Villalba, Reece et al. 2004, Beaz-Hidalgo, Balboa et al. 2010, OIE 2018), resultando em prejuízos consideráveis à cadeia produtiva (Reguera, Riobo et al. 2014).

O estado do Paraná ainda não implantou oficialmente tal monitoramento e, desta forma, expõe a fauna marinha e seus consumidores a riscos decorrentes da contaminação por diversos micro-organismos. Deste modo, a implementação do monitoramento da qualidade sanitária dos cultivos auxiliaria os profissionais da pesca, da aquicultura e de saúde pública a minimizarem os efeitos decorrentes da presença destes micro-organismos em níveis acima dos recomendados/tolerados. Além disso, o conhecimento sobre tais parâmetros microbiológicos, bem como seu monitoramento contínuo, pode promover a sustentabilidade da atividade de ostreicultura e garantir a qualidade sanitária do alimento produzido, consequentemente, alavancando o comércio local e regional de bivalves.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença e comparar a abundância de *Vibrio parahaemolyticus*, de *Perkinsus* sp., de microalgas potencialmente tóxicas e de ficotoxinas em ostras cultivadas e na água de entorno das áreas de cultivo em duas comunidades produtoras, Ponta Oeste da Ilha do Mel e Medeiros, localizadas no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Isolar e comparar densidades de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cultivadas e na água de cultivo, na Ponta Oeste da Ilha do Mel e em Medeiros, verificando possíveis correlações das densidades desta bactéria com as características ambientais dominantes, principalmente temperatura e salinidade.
- b) Investigar a presença e comparar a prevalência de *Perkinsus* sp. em ostras cultivadas na Ponta Oeste da Ilha do Mel e em Medeiros, e correlacioná-las com as características ambientais dominantes, principalmente temperatura e salinidade.
- c) Quantificar as concentrações de ficotoxinas nas ostras cultivadas e a abundância de microalgas potencialmente tóxicas na água de entorno dos cultivos nas comunidades da Ponta Oeste da Ilha do Mel e de Medeiros, e correlacioná-las com as variações da temperatura, salinidade, concentração de nutrientes e variáveis meteorológicas relevantes.

- d) Avaliar as possíveis interações entre densidades de *V. parahaemolyticus*, prevalência de *Perkinsus* sp. e abundância total do fitoplâncton e de microalgas tóxicas na água e nas ostras.

### 1.3 Hipóteses

Hipótese 1: Considerando que os parâmetros físico-químicos da água, principalmente temperatura e salinidade, interferem na presença e densidade de *Vibrio parahaemolyticus* em ambientes estuarinos, então a variação desses parâmetros ao longo do tempo influenciará a ocorrência desta bactéria nas ostras cultivadas em duas áreas distintas do CEP.

Hipótese 2: Se a prevalência de *Perkinsus* sp. nas ostras é influenciada principalmente pela temperatura e salinidade, então a variação desses fatores abióticos ao longo do tempo afetará a prevalência deste parasito nas ostras cultivadas nos locais estudados durante o período amostral.

Hipótese 3: Se os parâmetros físico-químicos afetam a distribuição horizontal e vertical das microalgas produtoras de toxinas em ambientes estuarinos, então as variações destes parâmetros ao longo do tempo irão influenciar na abundância destas microalgas na água e consequentemente, na concentração de toxinas acumulada nas ostras cultivadas nos dois locais investigados.

Hipótese 4: Se (i) a distribuição de *Vibrio* sp. é influenciada pela presença de diversas espécies de micro-organismos na coluna d'água, aos quais se agregam, (ii) se *Vibrio* sp. e *Perkinsus* sp. colonizam porções semelhantes do trato digestório das ostras e se (iii) a prevalência de *Perkinsus* sp. é atrelada à abundância de microalgas tóxicas na coluna d'água, então interações entre espécies de *Vibrio*, de *Perkinsus* e de microalgas podem ser esperadas, de modo que a presença/abundância de um dos organismos patogênicos/tóxicos estudados, ou a sua ação conjunta, pode afetar o sistema de defesa do hospedeiro, resultando em maior morbidade dos bivalves.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O Complexo Estuarino de Paranaguá (FIGURA 1) está localizado na porção centro-norte do litoral do Estado do Paraná, na região sul do Brasil. É composto por quatro baías principais: Laranjeiras, Guaraqueçaba, Antonina e Paranaguá. A hidrodinâmica local é dominada pelo regime de marés e pela descarga fluvial (Lana, Marone et al. 2001). No CEP, os cultivos de ostras estão distribuídos em várias baías, estando dois principais produtores instalados em Medeiros (MED; setor intermediário) e na Ponta Oeste da Ilha do Mel (PO; localizada no setor mais externo do estuário).

FIGURA 1 - COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ COM DESTAQUE PARA AS DUAS COMUNIDADES OSTRICULTORAS ESTUDADAS (PONTA OESTE, NA ILHA DO MEL E MEDEIROS), ONDE FORAM COLETADOS AMOSTRAS DE ÁGUA EM DOIS LOCAIS DISTINTOS (SINALIZADOS PELOS DOIS TRIÂNGULOS EM VERMELHO).



FONTE: O AUTOR (2018)

### 2.2 Amostragem

Foram coletadas, no total, 272 ostras nas campanhas amostrais realizadas durante o presente estudo (junho, setembro, outubro e novembro de 2016, abril e junho de 2017), em dois pontos

amostrais na PO e outros dois em MED. Em cada coleta, foram coletadas ostras diretamente dos *long-lines* em cada área estudada, sendo seis ostras destinadas à análise de *V. parahaemolyticus*, vinte para análise de *Perkinsus* sp. e outras doze para a análise de ficotoxinas. Os indivíduos coletados foram armazenados em sacos plásticos e acondicionados em caixas isotérmicas durante aproximadamente 3 h até o início das análises.

Adicionalmente, durante a maré de enchente, foram coletadas amostras da coluna d'água, utilizando uma mangueira graduada (10 m de comprimento e 30 mm de diâmetro), flexível e transparente, que foi esticada da superfície ao fundo com ajuda de um lastro, em dois pontos distintos em cada área de cultivo para maior representatividade da coluna d'água (e partículas) em contato com as ostras. A mangueira foi lavada com a água do mar local antes de cada coleta a fim de evitar contaminação com material de pontos distintos. As amostras de água foram armazenadas em frascos de 1 L para a análise das concentrações de nutrientes, de clorofila-*a*, além da abundância de microalgas e concentração de ficotoxinas presentes no plâncton. Também foi realizado o arrasto oblíquo com rede de fitoplâncton (malha de 20 µm) em dois pontos distintos em cada área de cultivo, acondicionando o material filtrado em frascos de 250 mL para a posterior identificação de espécies de microalgas presentes no plâncton. Os arrastos foram realizados durante um período de tempo relativamente curto (3 min) para se obter uma amostra representativa da assembleia fitoplanctônica, mas evitar um excesso de material sedimentar e detritico em suspensão (Calazans, Muelbert et al. 2011). Para a análise de *V. parahaemolyticus* na água, foram coletados 100 mL de água do mar em um frasco autoclavado. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, durante aproximadamente 3 h, e transportadas aos laboratórios de Sanidade Aquícola e de Microalgas do Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR) para processamento.

Os parâmetros físico-químicos da água do entorno dos cultivos foram medidos *in situ* com o auxílio de um aparelho CTD (Conductivity, Temperature and Depth, Alec ASTD687+IF, Japão). Foram registrados os valores de salinidade, temperatura, turbidez e profundidade ao longo de um perfil vertical em cada ponto de coleta, sendo tomadas medidas a cada 10 cm (da superfície até o fundo) a fim de avaliar a estratificação da coluna d'água. Também foram obtidos dados adicionais de salinidade com auxílio de um refratômetro ótico portátil (RHB 32) e dados de temperatura (°C) com o auxílio de um termômetro a partir das alíquotas de água coletadas com a mangueira em dois pontos amostrais de cada local. Por fim, a transparência da coluna d'água foi estimada por meio da profundidade (m) do disco de Secchi.

Dados de pluviosidade, oriundos da estação meteorológica automática da Ilha do Mel foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia, que mantém os dados disponíveis em seu sítio

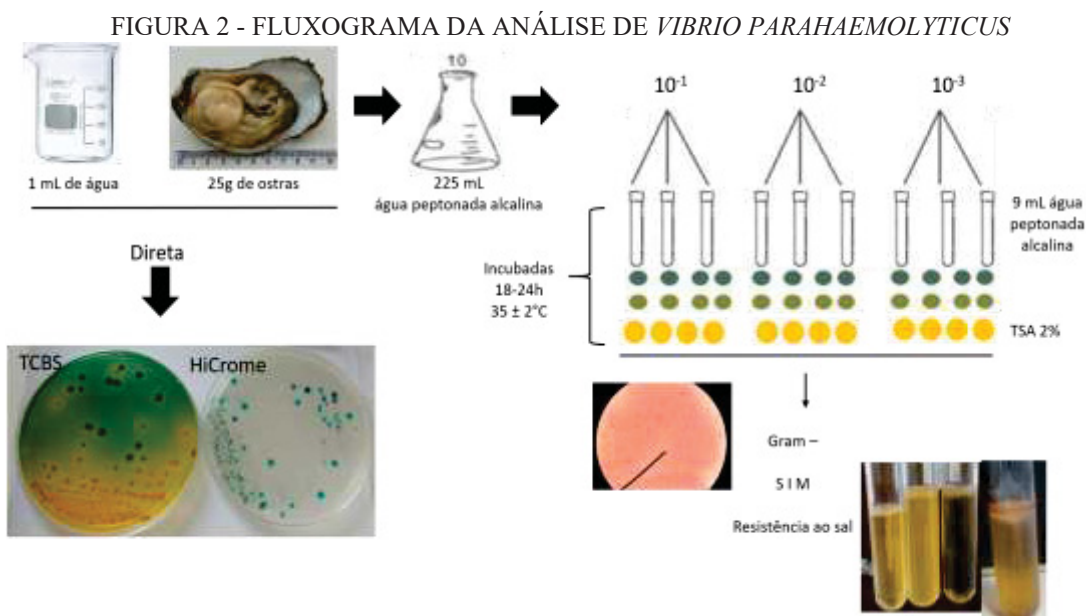
eletrônico (INMET 2017). Os valores de precipitação acumulada foram somados para os cinco dias que antecederam a coleta e expressos em milímetros.

### 2.3 Procedimentos analíticos

#### 2.3.1 Isolamento e quantificação de *Vibrio parahaemolyticus*

Em laboratório, as ostras foram limpas externamente com escova e água corrente, abertas, e o material interno (líquido intervalvar e partes moles) coletado segundo metodologia proposta por (Silva, Junqueira et al. 2010). A quantificação de *V. parahaemolyticus* foi feita segundo o Manual de Análises Bacteriológicas (FDA 2010) para a técnica de fermentação em tubos múltiplos, em diluição seriada com repetição de 3 tubos. Foi utilizada água peptonada alcalina (Bacto™ Peptone – BD) para realizar o enriquecimento e incubação a 35°C por 18 a 24 h. Tubos com crescimento positivo foram estriados em ágar Tiosulfato-Citrato sais de Bile e Sacarose (TCBS, Sigma-Aldrich) e também, em ágar cromogênico “HiC” (Hi Chrome Vibrio, Sigma-Aldrich), e as placas incubadas por 18 a 24h a 35°C. Após contagem total de Unidade Formadora de Colônias (UFC), de ambos os meios, foram selecionadas quatro colônias com o aspecto desejado (verde azulado), denominadas de subamostras, e transferidas para o meio TSA (Tryptic Soy Agar - NEOGEN) enriquecido com 2% de NaCl e incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. Em seguida, as colônias oriundas do TCBS foram submetidas aos testes de coloração de Gram, Oxidase, Catalase, Sulfeto, Indol, motilidade (SIM, Himedia) e resistência a concentrações de 5 e 8% de cloreto de sódio (NaCl, Neon Comercial) para a possível confirmação da espécie *V. parahaemolyticus* (FIGURA 2). As colônias crescidas a partir de inoculação direta em meio HiC foram repicadas em placas contendo meio TCBS como contraprova e posteriormente repicadas novamente em placas contendo o meio HiC para confirmação do crescimento de colônias de aspecto desejável (azul turquesa) para avaliar a compatibilidade entre os meios distintos.

A amostra usada como padrão de referência de *V. parahaemolyticus* para validação dos meios e dos testes foi a “amostra Cascavel”, cedida pelo Labomar, Universidade Federal do Ceará, CE.



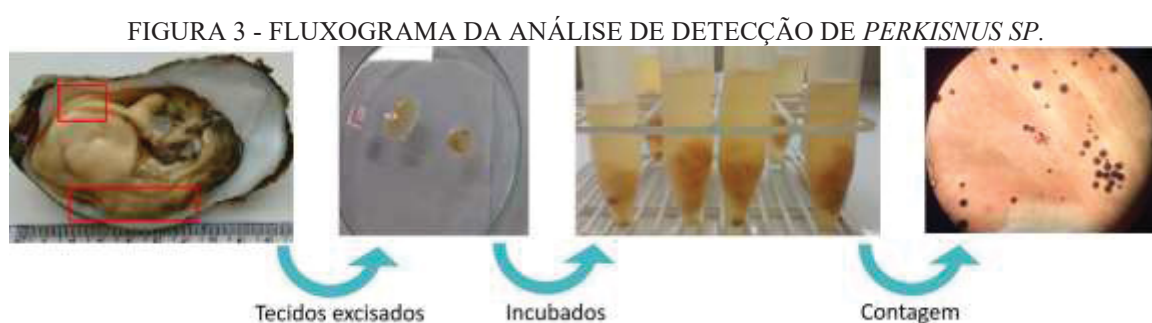
FONTE: O AUTOR (2018)

### 2.3.2 Detecção de *Perkinsus* sp. nas ostras

A investigação da ocorrência de perkinsiose na população de ostras em cada local amostrado foi feita através da identificação do protozoário *Perkinsus* sp. em tecidos moles dos bivalves e das análises de prevalência e intensidade de infecção. A prevalência foi definida como o número total de organismos infectados, dividido pelo total de ostras coletadas em cada local amostrado (Bush, Lafferty et al. 1997). Enquanto a intensidade de infecção por *Perkinsus* sp. foi determinada pela contagem dos hipnósporos e sua classificação pela escala Mackin (Ray 1954), onde: 0 = sem infecção (i.e. ausência de hipnósporos aparentes em toda a lâmina); 1 = infecção muito leve (até 10 hipnósporos observados em toda a lâmina); 2 = infecção leve (de 11 a 100 hipnósporos observados em toda a lâmina); 3 = infecção moderada (até 40 hipnósporos observados em cada um dos 10 campos do microscópio ( $400\times$ ) distribuídos sobre a lâmina) e 4 = infecção intensa mais de 40 hipnósporos observados em cada um dos 10 campos do microscópio ( $400\times$ ) distribuídos sobre a lâmina) (Sabry 2010).

Depois de lavadas em água corrente e de ter suas conchas medidas (Galtsoff 1964) e abertas, as ostras foram avaliadas macroscopicamente para a verificação de possíveis alterações sugestivas de patologias nas partes moles, tais como retração do manto, ruptura de tecidos, lesões e coloração anormal. A seguir, as ostras tiveram parte das brânquias e reto excisados e acondicionados em tubos Falcon contendo 5 mL de meio RFTM, 50  $\mu\text{L}$  de solução antibiótica e 50  $\mu\text{L}$  de antifúngica,

permanecendo incubados no escuro por 7 dias, em temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ). As amostras de tecidos foram posteriormente cortadas, coradas com lugol e analisadas em microscópio para a contagem de hipnósporos. Para a análise histopatológica, foi realizado um corte transversal das partes moles da ostra, contendo glândula digestiva, gônadas e manto, seguido de fixação em solução de Davidson por 48h, desidratação em uma sequência de álcool  $70^\circ$  e emblocagem em parafina histológica. Depois de fixados, os blocos foram cortados em lâminas de  $5 \mu\text{m}$  e corados com hematoxilina de Harris e eosina para posterior análise dos cortes em microscópio óptico (FIGURA 3).



FONTE: O AUTOR (2018)

Para a análise molecular, parte do tecido branquial das amostras positivas em RFTM foi acondicionada em microtubos contendo em álcool absoluto e armazenada em congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ). Foi realizada a extração do DNA genômico, utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio (Green and Sambrook 2001). Para as análises de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados os primers Perk ITS-85 e Perk ITS-750, que amplificaram um produto de 703 pares de base (pb) (FIGURA 4). Todas as metodologias descritas seguiram os protocolos estabelecidos pela (OIE 2018).

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DA ANÁLISE DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE *PERKINSUS SP.*



FONTE: O AUTOR (2018)

Para a determinação de espécie, seis amostras positivas em RFTM e PCR, escolhidas aleatoriamente, foram sequenciadas. As sequências obtidas foram alinhadas no software MEGA (Tamura, Stecher et al. 2013), juntamente com amostras idôneas do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) e então aplicado o método de inferência UPGMA (grupos de pares não ponderados usando médias aritméticas) e *máxima verossimilhança* para a construção da árvore filogenética.

### 2.3.3 Identificação e quantificação de microalgas potencialmente tóxicas

Para a identificação das espécies de microalgas potencialmente tóxicas, 200 mL da amostra de rede foram armazenados em frascos plásticos e fixados em solução de formaldeído a uma concentração final de 4%. A identificação dos grupos taxonômicos foi realizada mediante observação de características morfométricas das células, em microscópio óptico Olympus® (BX-41), em comparação a bibliografias referentes à taxonomia de microalgas marinhas, com ênfase nas espécies potencialmente tóxicas (e.g (Procopiak 2004, Omura, Iwataki et al. 2012). Adicionalmente, a identificação das espécies nocivas de diatomáceas penadas encontradas neste estudo (*Pseudonitzschia* sp.) foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET; JEOL® modelo JM1200 EXII) no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, seguindo recomendações de (Hasle and Fryxell 1970).

Do conteúdo total de água amostrada nos locais de cultivo com mangueira, uma alíquota de 250 mL foi armazenada em frasco de vidro âmbar e fixada com Lugol a 1%, destinado à quantificação das espécies de microalgas pela técnica de sedimentação de Utermöhl (1958), com auxílio de microscópio óptico Olympus® (BX-41), utilizando cubas de sedimentação de 25 mL. A enumeração de células seguiu a metodologia proposta por Edler and Elbrächter (2010), utilizando transectos ou toda a câmara para se estimar a abundância total de células no volume de amostra sedimentado. Os números de células por transecto ou células por câmara, foram então convertidos em células por litro através da multiplicação por fatores de conversão, levando-se em consideração a relação entre a área total da câmara e a área contada (câmara ou transecto) e ainda o volume de amostra sedimentada, em litros.

As contagens para estimativa da abundância total do fitoplâncton foram realizadas sob um aumento de 200×, sendo percorrida a câmara inteira para a enumeração de células com tamanho superior a 10 µm, e contando um mínimo de 300 unidades no total (limite de detecção, LOD: 40 cel.L<sup>-1</sup>).

### 2.3.4 Quantificação de ficotoxinas nas ostras

Para a determinação analítica da presença e concentração de ficotoxinas, as ostras foram lavadas externamente em água corrente e depois abertas cuidadosamente com o objetivo de se preservar a integridade de seus tecidos. Ao todo, foram coletadas 84 ostras para este fim, sendo metade destinada à quantificação de ficotoxinas no tecido inteiro e a outra metade destinada à quantificação nas glândulas digestivas.

Os tecidos moles de cada ostra foram pesados e acondicionados individualmente em tubos de centrífuga de 50 mL e então foi adicionado um volume de metanol grau HPLC 99,8 % (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) em uma proporção final de 1:9 (v:v). A solução foi homogeneizada com o auxílio de um processador ultrassônico (Cole-Parmer, CPX 130, Venon Hills, IL, USA) durante 2 min, com pulsos de 3 s e intervalos de 1 s, a 80% de amplitude e uma potência de 130 W. O homogeneizado foi então centrifugado por 5 min a 2.000 rpm. Finalmente, 1 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa (PTFE, 0,22  $\mu$ m porosidade) e armazenado em vials de 2 mL a -20 °C até o momento da análise.

A detecção das toxinas diarreicas ocorreu em sistema de cromatografia líquida (Agilent Technologies® 1260, Palo Alto, CA, USA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (AB Sciex® qTRAP 3200, Framingham, MA, USA), equipado com uma fonte de ionização turbo ion spray, de acordo com o método oficial harmonizado da União Européia para toxinas lipofílicas (European, Union et al. 2015). A separação dos compostos foi realizada em coluna cromatográfica (Agilent Poroshell®, C18, 50 $\times$ 2,1 mm e partículas de 2,7  $\mu$ m de diâmetro), mantida sob uma temperatura de 20°C. Para a análise, um volume de 5 a 15  $\mu$ L de cada amostra foi injetado e eluído pela fase móvel, que consistiu em água deionizada (solução A) e acetonitrila 95% (solução B). O gradiente de eluição (0,3 mL.min<sup>-1</sup>) aplicado foi de 80:20% (A:B) até 100% da solução B durante 8 minutos e depois mantido a 100% da solução B durante 3,5 minutos, antes de retornar a condição inicial até o final da análise, que durou 13 minutos, no total.

A detecção de toxinas amnésicas ocorreu em sistema de Cromatografia Líquida de Alto Rendimento acoplado a um detector ultravioleta (LC-UVD, Chromaster, Hitachi®), de acordo com o método oficial harmonizado da União Européia para determinação de ácido domóico (European, Union et al. 2008). A separação dos compostos foi realizada em coluna cromatográfica (Lichrochart, Merck, RP-18, 250 $\times$ 4,6 mm e partículas empacotadas de 5,0  $\mu$ m diâmetro), mantida a 40 °C. Para a análise, as condições do sistema isocrático ocorreram com um volume de injeção de 20  $\mu$ L de cada amostra e eluído pela fase móvel, que consistiu em água ultrapura, acetonitrila grau HPLC e ácido trifluorocrático grau HPLC (9:0,9:0,1 v/v) com gradiente de eluição de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

A identificação das toxinas foi realizada de acordo com o tempo de retenção e dos espectros de massa (para toxinas diarreicas) ou espectro de absorvância-UV (para toxinas amnésicas) obtidos nas amostras, comparando aos mesmos parâmetros obtidos para os padrões de referência (IMB-NRC, Canadá). Os seguintes fragmentos iônicos foram monitorados em modo de ionização negativo:  $m/z$  803,5  $\rightarrow$  255,0 e  $m/z$  803,5  $\rightarrow$  113,0 para o ácido ocadaico (OA),  $m/z$  817,5  $\rightarrow$  255,0 e  $m/z$  817,5  $\rightarrow$  113,0 para a dinofisistoxina-1 (DTX-1),  $m/z$  803,5  $\rightarrow$  255,0 e  $m/z$  803,5  $\rightarrow$  113,0 para DTX-2, e  $m/z$  1041,6  $\rightarrow$  255,0 para DTX-3. Outras toxinas lipofílicas não-diarreicas foram monitoradas em conjunto, tais como pectenotoxinas (PTX-1, PTX-2 e PTX-6), yessotoxinas (YTX) e seus análogos (45-OH-YTX e Homo-YTX) (EU-RL-MB, 2015). Para o AD, a detecção ocorreu em comprimento de onda de 242 nm (EU-RL-MB, 2008).

As concentrações de toxinas foram determinadas a partir de curvas de calibração construídas por meio de diluições sucessivas do padrão analítico em metanol, sendo 3,5, 14,0, 55,9 e 223,4 ng.mL<sup>-1</sup> para o AO, e 0,2, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 24,85 µg.mL<sup>-1</sup> para o AD. O limite de detecção (LOD) foi calculado através da fórmula:  $LOD = (3*DP)/b$ , onde “DP” é o desvio padrão de múltiplas leituras da menor concentração do padrão analítico ( $n = 6$  para AO e  $n = 5$  para AD), e “b” é a inclinação da curva de calibração.

### 2.3.5 Determinação da concentração de nutrientes e clorofila-*a*

Alíquotas adicionais de água do mar coletadas em cada local foram acondicionadas em frascos plásticos com capacidade de 250 mL, guardadas em caixa térmicas e filtradas logo após a chegada ao laboratório. Filtraram-se 200 mL de cada amostra por meio de um filtro de microfibras de vidro de 47 mm de diâmetro e porosidade 1,2 µm (Whatman® grau GF/C, GE Healthcare), em sistema de filtração a vácuo. Os filtros foram reservados para a análise de clorofila-*a*, sendo mantidos ao abrigo de luz e congelados imediatamente logo após a filtragem. Já o líquido filtrado foi mantido congelado em freezer até o processamento, para a determinação da concentração de nutrientes dissolvidos.

A concentração de clorofila-*a* foi determinada por fluorimetria (Arar e Collins, 1997) e a concentração de fosfato e silicato foi determinada pelo método colorimétrico de Hansen e Koroleff (1999) e analisados no Laboratório de Indicadores Geoquímicos, no Centro de Estudos do Mar - Universidade Federal do Paraná. Por fim, as concentrações de nitrito e amônio foram determinadas através do método colorimétrico de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA et al. 2012) e analisados no Laboratório de Oceanografia Química

localizado no Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

### 2.3.6 Análise estatística

Os dados referentes às variáveis abióticas (temperatura, salinidade, concentração dos nutrientes e transparência da coluna d'água) e bióticas (densidade de *V. parahaemolyticus*, prevalência de *Perkinsus* sp., abundância total do fitoplâncton e abundância das espécies potencialmente tóxicas) de cada local estudado foram inicialmente tabulados em Windows Microsoft<sup>®</sup> Excel (versão 2013). A densidade de *V. parahaemolyticus* e prevalência de *Perkinsus* sp. foram comparadas entre os dois locais estudados através do teste-t de Student, e a existência de correlação entre as variáveis bióticas e abióticas foi avaliada através da análise de correlação de Pearson, todas conduzidas no software R (versão 3.5.0).

Análises de variância bifatoriais (two-way ANOVA) foram conduzidas no software Statistica 8.0<sup>®</sup> (Stat-Soft, Inc., USA), a fim de avaliar se as diferenças observadas entre a abundância total do fitoplâncton, abundância das espécies de microalgas mais frequentes e abundância das espécies potencialmente tóxicas nos diferentes locais e datas foram estatisticamente significantes, bem como para avaliar se houve interação entre os efeitos dos locais e datas sobre as variáveis abióticas. Análises de variância simples (one-way ANOVA) foram realizadas no software Statistica a fim de se comparar os valores médios de temperatura e salinidade obtidos a cada 0,5 m ao longo do perfil vertical, determinando se houve ou não estratificação da coluna d'água em cada amostragem. O teste de Bartlett foi aplicado para avaliar a homogeneidade das variâncias e o teste post-hoc de Tukey/HSD (Honestly Significantly Differences) foi realizado para distinguir as diferenças identificadas na ANOVA entre os valores médios obtidos para as diferentes datas, sempre que necessário.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Parâmetros físico-químicos da água

O CEP é controlado fortemente pelo regime de marés e influenciado pela pluviosidade e drenagem continental, de forma que, influenciam a distribuição espacial e temporal da salinidade, temperatura, concentração de nutrientes, material particulado em suspensão e conseqüentemente, a penetração de luz na coluna d'água. Sendo assim, os valores de precipitação atmosférica acumulada em 5 dias foram similares entre os períodos amostrais, variando entre 19 mm, no mês de outubro de 2016, 17,6 mm em abril/17 e 14,4 mm em junho/17. Não foi possível avaliar a precipitação atmosférica do mês de novembro, pois a estação meteorológica da Ilha do Mel estava em manutenção. Durante o período estudado, os parâmetros físico-químicos avaliados estiverem dentro dos padrões esperados para esta região, de modo que, a profundidade variou em ambos os locais, dependendo da maré e do ponto exato amostrado, com valores ligeiramente menores no setor intermediário (1,2 a 5,8 m em MED) do que no setor externo da baía (2,0 a 6,0 m na PO), e valores significativamente maiores em abril/17 em ambos os locais. A transparência da água oscilou entre as datas, variando entre 1,2 e 1,8 m em MED e entre 0,8 e 3,0 m na PO, com menores valores em outubro/16 em ambos os locais. A temperatura da água foi ligeiramente mais elevada em MED (21 a 27 °C) do que na PO (21 a 26°C), sendo mais elevada em abril/17 em ambos os locais. Já a salinidade diferiu significativamente entre os locais estudados durante o todo período, com menores valores no setor intermediário (20 a 22 em MED) do que no setor externo do estuário (24 a 36 na PO).

As concentrações de amônio ( $0,052$  a  $0,054 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em MED e  $0,052$  a  $0,053 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na PO), fosfato ( $0,031$  a  $0,035 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em MED e  $0,031$  a  $0,034 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na PO) e silicato ( $11,646$  a  $74,143 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em MED e  $11,409$  a  $25,403$  na PO) não diferiram significativamente entre os locais ao longo do período estudado ( $p=0,78$ ,  $p=0,49$  e  $p=0,17$ , respectivamente). Por outro lado, as concentrações de nitrito ( $0,024$  a  $0,069 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em MED e  $0,024$  a  $0,111 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na PO) foram significativamente maiores em junho/17 em ambos os lugares estudados, enquanto que os valores de clorofila-*a* ( $3,01$  a  $17,52 \mu\text{g.L}^{-1}$  em MED e  $2,09$  a  $10,69 \mu\text{g.L}^{-1}$  na PO) foram mais elevados na PO em jun/17 (TABELA 1).

A coluna d'água se encontrou estratificada, com valores significativamente menores de salinidade na camada mais superficial em relação ao estrato mais profundo, no mês de novembro/16 na PO e no mês de junho/17 em MED. Da mesma forma, os valores de temperatura em junho/17 foram significativamente superiores no estrato mais profundo em MED (TABELA 6).

TABELA 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E POST-HOC (TUKEY/HSD) PARA A PROFUNDIDADE, TRANSPARÊNCIA, TEMPERATURA, SALINIDADE, NITRITO E CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA - *A* DA ÁGUA NAS DUAS ÁREAS ESTUDADAS LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ) DESTACADAS EM NEGRITO.

Salinidade						
	SS	GL	MS	F	P	Tukey/HSD
Data	77,227	3	25,742	60,07	<b>0,000023</b>	
Local	200,000	1	200,000	466,67	<b>&lt; 0,000001</b>	Med < Po
Data*Local	55,045	3	18,348	42,81	<b>0,000072</b>	Med: Out = Nov = Abr = Jun Po: (Nov < Out) = Abr < Jun
Erro	3,000	7	0,429			

Temperatura						
	SS	GL	MS	F	P	Tukey/HSD
Data	60,659	3	20,220	87,10	<b>0,000007</b>	Med e Po: Out = Jun < Nov < Abr
Local	1,681	1	1,681	7,24	<b>0,031059</b>	Med > Po
Data*Local	1,250	3	0,417	1,79	0,235713	
Erro	1,625	7	0,232			

Profundidade						
	SS	GL	MS	F	p	Tukey/HSD
Data	14,447	3	4,816	4,141	0,055443	
Local	6,722	1	6,722	5,781	<b>0,047165</b>	Med < Po
Data*Local	3,207	3	1,069	0,919	0,479345	
Erro	8,140	7	1,163			

Transparência						
	SS	GL	MS	F	p	Tukey/HSD
Data	3,832	3	1,277	5,863	<b>0,025277</b>	Med e Po: Out < Nov = Abr = Jun
Local	0,001	1	0,001	0,003	0,961136	
Data*Local	0,819	3	0,273	1,253	0,361122	
Erro	1,525	7	0,218			

Clorofila- <i>a</i>						
	SS	GL	MS	F	p	Tukey/HSD
Data	3,390	3	1,130	0,094	0,961067	
Local	153,009	1	153,009	12,700	<b>0,009174</b>	Med > Po
Data*Local	13,462	3	4,487	0,372	0,775706	
Erro	84,338	7	12,048			

Nitrito						
	SS	GL	MS	F	p	Tukey/HSD
Data	0,007	3	0,002	50,445	<b>0,000042</b>	

Local	0,000	1	0,000	8,936	<b>0,020244</b>	Med < Po
Data*Local	0,0012	3	0,001	11,703	<b>0,004069</b>	Med: Out = Nov = Abr < Jun Po: Out = Nov = Abr < Jun
Erro	0,000	7	0,000			

Legenda: SS= soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MS = quadrados médios; F = valor de F; p = valor de p

### 3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

A bactéria *V. parahaemolyticus* ocorre naturalmente no ambiente marinho e é frequentemente isolada em amostras de água, sedimento, algas e em frutos do mar, principalmente em moluscos bivalves em razão do hábito alimentar suspensívoro (FAO 2011, Letchumanan, Chan et al. 2014, Meng, Alter et al. 2015). Desta forma, bivalves constituem a principal via de intoxicação de seres humanos por estes micro-organismos patogênicos (Thompson, Marcelino et al. 2005, Ceccarelli and Colwell 2014, Romalde, Dieguez et al. 2014, Raszl, Froelich et al. 2016). *V. parahaemolyticus* foi detectado na água e nas ostras provenientes de MED e PO ao longo do período estudado (TABELA 2). De modo que, a densidade de *V. parahaemolyticus* não diferiu entre as localidades investigadas no CEP. Porém, em novembro/16 e em junho/17, a água de MED apresentou maior NMP.mL<sup>-1</sup> de *V. parahaemolyticus* do que a água de PO (aproximadamente 12 e 4 vezes maior, respectivamente). No mês de novembro/16 e junho/17, o oposto foi verificado em relação às ostras; isto é, no primeiro, PO teve densidade >1.100 NMP.g<sup>-1</sup> contra 290 NMP.g<sup>-1</sup> de *V. parahaemolyticus* em MED, e no último mês, PO teve densidade 240 NMP.g<sup>-1</sup> contra nenhum *V. parahaemolyticus* em MED.

TABELA 2 – DENSIDADE DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE OSTRAS E ÁGUAS AMOSTRADAS NAS COMUNIDADES DE MEDEIROS E PONTA OESTE DA ILHA DO MEL, LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR, BRASIL.

Data	Local	Água NMP.ml <sup>-1</sup>	Ostra NMP.ml <sup>-1</sup>	OSTRA CP		Colônias reprovadas em teste bioquímico		Colônias reprovadas no teste NaCl 8%		Colônias confirmados como <i>V.p.</i>		Compa-tibilidade HiC x TCBS	
				UFC.g <sup>-1</sup> Agar HiC	UFC g <sup>-1</sup> Agar TCBS	n	%	n	%	n	%	n	%
nov/16	Med	290	290	13	8	2	100	2	100	0	0	2/2	100
	PO	23	>1.100	36	4	AC	-	AC	-	AC	-	AC	-
abr/17	Med	>1.100	>1.100	1	74	4	100	1	25	0	0	0/4	0
	PO	>1.100	>1.100	3	18	AC	-	AC	-	AC	-	AC	-
jun/17	Med	1.100	0	22	2	1	50	0	-	1	50	2/2	100
	PO	240	240	31	32	1	50	0	0	1	50	2/2	100

Legenda: NMP= Número Mais Provável, UFC= Unidade Formadora de Colônias, HiC= Agar HiChrome; TCBS = Tiosulfato-Citrato saís de Bile e Sacarose, *V.p.* = *Vibrio parahaemolyticus*; n= número de amostras; AC= ausência de crescimento CP = colônias presuntivas.

As elevadas densidades de *V. parahaemolyticus* ( $>1.100 \text{ NMP.g}^{-1}$ ) encontradas em ostras do CEP, principalmente em abril/17, representam um risco de intoxicação aos consumidores de moluscos bivalves, agravado pelo hábito da população de consumir ostras *in natura* ou pouco cozidas. Contudo, embora o isolamento de *V. parahaemolyticus* em ostras não seja raro, sobretudo em meses mais quentes (Matté, Matté et al. 1994, DePaola, Nordstrom et al. 2003, Sobrinho P, Destro et al. 2010), nem toda cepa de *V. parahaemolyticus* é virulenta; sua ação patogênica é dependente da produção de hemolisina direta termoestável (TDH), evidenciada principalmente pelo fenômeno Kanagawa positivo (Drake, DePaola et al. 2007, Leal, da Silva et al. 2008, Sobrinho P, Destro et al. 2010). No Brasil, estudos realizados em ostras mostraram baixa incidência de formas patogênicas de *V. parahaemolyticus* (Matté, Matté et al. 1994, Ristori, Iaria et al. 2007, Sobrinho P, Destro et al. 2010). Do ponto de vista epidemiológico, entretanto, gastroenterites causadas por *V. parahaemolyticus* parecem ser subestimadas, já que manifestações gastroentéricas podem decorrer de razões diversas e seus sintomas tipicamente não são severos o suficiente para demandar uma atenção médica especial. Ainda assim, *V. parahaemolyticus* é a principal causa de gastroenterites de origem alimentar em países da Ásia, Oceania, Europa e Estados Unidos (Drake, DePaola et al. 2007, Letchumanan, Chan et al. 2014).

Neste estudo, não houve diferença significativa entre a densidade de *V. parahaemolyticus* na água e nas ostras. Apesar disso, para a atividade de maricultura, torna-se imprescindível o monitoramento da qualidade sanitária da água em que os organismos estão sendo cultivados para se assegurar um produto de qualidade (Kaufman, Bej et al. 2003), uma vez que os bivalves bioacumulam em seus tecidos as partículas em suspensão na água, resultando em quantidades variáveis de micro-organismos acumulados conforme a qualidade da água em que os bivalves são cultivados (Feldhusen 2000, Romalde, Dieguez et al. 2014).

Ferreira (2013) conduziu as primeiras investigações sobre *Vibrio* sp. em águas no litoral do Paraná, registrando a presença de vibriões em todos os 5 pontos de amostragem no balneário Pontal do Sul, porém a maior incidência foi de espécies sacaroses positivas em meio TCBS. No CEP, a pesquisa desenvolvida por Chalcoski (2014), avaliou a presença de *Vibrios* sp. em ostras e nas águas de entorno da ostreicultura da Ponta Oeste e as contagens de *Vibrio* foram aumentando conforme o aumento da temperatura ambiental. Por fim, Alves (2016), avaliou a presença de *V. parahaemolyticus* em ostras cultivadas na Ponta Oeste e em Medeiros através do método de contagem direta e relatou que ostras de ambas as comunidades estavam contaminadas por este patógeno, mesmo resultado encontrado neste estudo.

Apesar de se basear em um número pequeno de amostras, os valores de temperatura ( $P = 0,82$ ) e transparência da água ( $P = 0,76$ ), apresentaram correlação positiva com as densidades  $\text{NMP.g}^{-1}$

<sup>1</sup> de *V. parahaemolyticus* nas amostras de ostras, enquanto a salinidade ( $P = -0,16$ ) também apresentou correlação inversamente proporcional. Para as amostras de água, por sua vez, temperatura ( $P = 0,49$ ) apresentou correlação positiva, enquanto a salinidade ( $P = 0,68$ ) apresentou correlação fraca com a densidade de *V. parahaemolyticus*. Sendo assim, a densidade de *V. parahaemolyticus* também pode estar relacionada às variações sazonais (Raszl, Froelich et al. 2016), como visto no presente estudo. As maiores densidades de *V. parahaemolyticus* nas ostras do CEP foram encontradas em abril/17 e as menores em junho/17, quando foram registrados os maiores e menores valores de temperatura na água do mar durante o período investigado, respectivamente. O aumento na densidade de *V. parahaemolyticus* está atrelado a valores de temperatura acima de 20°C, ao mesmo tempo em que sua densidade diminui em temperaturas abaixo deste valor (Drake, DePaola et al. 2007). Por exemplo, a 15°C, a densidade destes micro-organismos pode ser maior no sedimento e em organismos marinhos do que na coluna d'água (Paranjpye, Nilsson et al. 2015), sugerindo assim, que este patógeno migre de ambiente, dependendo da temperatura da água. A ausência de *V. parahaemolyticus* em águas mais quentes (onde usualmente se encontram), pode ser devido à sua dispersão devido à competição com a alta carga de bactérias tipo *Vibrio* (“*Vibrio-like*”). Estas bactérias correspondem principalmente a dos gêneros *Vibrio* e *Shewanella*. Este último degrada aminoácidos sulfurosos e produzem sulfetos voláteis incluindo H<sub>2</sub>S, que é provavelmente responsável pelas abundantes colônias de cor negra observadas em placas de TCBS (Fuenzalida, Armijo et al. 2007).

Tanto a temperatura quanto a salinidade podem afetar substancialmente a abundância e distribuição de *Vibrio* sp. (Raszl, Froelich et al. 2016), no entanto, neste estudo, a salinidade se mostrou um fator secundário para o desenvolvimento de *V. parahaemolyticus*, mesmo padrão observado por Ramos, Miotto et al. (2014) e (Sobrinho P, Destro et al. 2010). Uma relação mais fraca entre salinidade e a abundância de *V. parahaemolyticus* pode ser explicada também pela amplitude dos valores de salinidade medidos no presente estudo, já que uma correlação fortemente positiva ocorre sob maior variação dos valores de salinidade, mas uma fraca ou nenhuma correlação se faz presente quando a amplitude de valores é menor (Paranjpye, Nilsson et al. 2015). Neste estudo, mesmo que os valores de salinidade no CEP tenham oscilado bastante (20 - 36), estes se mantiveram na faixa de maior frequência da ocorrência desta bactéria.

Embora o ágar TCBS seja recomendado oficialmente, os métodos que compõem o Manual de Bacteriologia (Crocì, Suffredini et al. 2007, FDA/WHO 2011) não refletem a mais recente tecnologia para a detecção de *V. parahaemolyticus* em bivalves naturalmente contaminados. O uso de meio cromogênico em substituição ao meio TCBS apresenta algumas vantagens, como a eficiência na identificação específica de espécies de *Vibrio*, bem como a supressão da necessidade de testes

bioquímicos para se confirmar a identificação de *V. parahaemolyticus* (Hara-Kudo, Nishina et al. 2001, Blanco-Abad, Ansede-Bermejo et al. 2009, Bisha, Simonson et al. 2012). No presente estudo, foi confirmado maior densidade de UFC.g<sup>-1</sup> de *V. parahaemolyticus* em HiC nos meses de novembro/16 e junho/17, já que varias colônias presuntivas em TCBS foram eliminadas em testes bioquímicos e no teste de resistência a NaCl a 8%. Colônias previamente crescidas em HiC se mantiveram em número e características fenotípicas, apresentando compatibilidade quando repicado em TCBS (TABELA 2). Sendo assim, o ágar HiCrome teve uma boa compatibilidade em relação ao ágar TCBS, representando uma boa alternativa à rotina de análises por reduzir o tempo de trabalho e o número de testes bioquímicos necessários para a detecção de *V. parahaemolyticus*. De acordo com Blanco-Abad, Ansede-Bermejo et al. (2009), o meio cromogênico é 27,7% mais sensível e eficiente para o isolamento de *V. parahaemolyticus* do que o método tradicional. Di Pinto, Terio et al. (2011) também relataram maior eficiência, com até 95% a mais de sensibilidade para a identificação de *V. parahaemolyticus* nas placas contendo o meio cromogênico, enquanto que Duan and Su (2005) concluíram que, apesar de o ágar cromogênico ter mais acurácia em relação ao TCBS, ele não teve resultados satisfatórios em virtude de ter sido encontrado resultados falsos positivos quando confirmados por PCR.

O consumidor brasileiro tem o hábito de consumir bivalves *in natura* e, desta forma, está amparado com ferramentas que possibilitem prever possíveis infecções alimentares por *V. parahaemolyticus*, através da Resolução n. 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Brasileira de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil 2001), que define os critérios e padrões microbiológicos para pescado e produtos a base de pescado expostos à venda, “moluscos bivalves ingeridos na forma *in natura*”, listando o limite máximo para *V. parahaemolyticus* como 10<sup>3</sup> UFC/g, como também os limites para *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* e Coliformes a 45°C. Como também, a FDA/US (Food and Drug Administration / United States), através do Shellfish Sanitation Program 2009, estabelece limites de atenção para a contaminação por *V. parahaemolyticus*, sendo este nível de contaminação igual a 1000 UFC.g<sup>-1</sup>, e quando superior, é considerado de qualidade inaceitável. Neste estudo, o maior valor encontrado foi de 74 UFC.g<sup>-1</sup> e segundo o limite regulatório nacional e internacional, é considerada aceitável.

Além disso, a FDA/US recomenda o monitoramento de *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*, principalmente para ostras consumidas cruas. Adicionalmente, aconselha a refrigeração das ostras a 7,2 °C como forma de manter sua qualidade microbiológica durante a comercialização (FDA/WHO 2011). Da mesma forma, a legislação japonesa voltada à segurança alimentar, sobretudo no caso do pescado, foi e continua sendo fundamental para a redução e controle de DTA's no Japão (Hara-Kudo and Kumagai 2014). Sob essa perspectiva, Leal, da Silva et al. (2008) e Ramos, Miotto

et al. (2014) apontam que a detecção de *V. parahaemolyticus* deveria ser incluída no sistema brasileiro de elucidação etiológica de diarreias, considerando o potencial de envolvimento do referido micro-organismo em surtos e mesmo em casos isolados de gastroenterites em humanos. Alguns métodos podem ser recomendados para a prevenção de vibrioses, seja a depuração pós-colheita dos moluscos, a irradiação com raios gama, o cozimento, a conserva, dentre outras formas de processamento. Moluscos processados por aquecimento não devem conter *V. parahaemolyticus* viáveis, desde que não haja falta de higiene na manipulação ou contaminação do produto pós-processamento (Kaysner e DePaola, 2004).

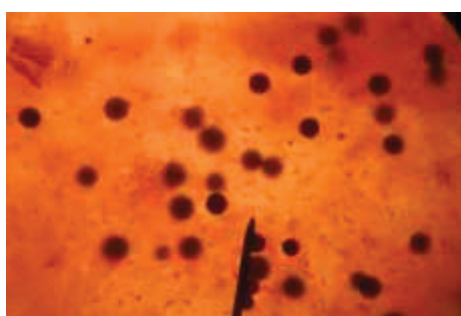
### 3.3 *Perkinsus* sp.

As ostras analisadas provenientes da PO mediram, em média,  $8,9 \pm 1,1$  cm de altura e  $5,9 \pm 0,75$  cm de comprimento, e as de MED  $8,8 \pm 1,1$  cm por e  $5,9 \pm 0,87$  cm, não havendo diferença significativa nas suas dimensões entre os locais. Não foram observados sinais de emagrecimento, tão pouco lesões macroscópicas nos tecidos moles.

A presença de *Perkinsus* sp. foi detectada em ostras provenientes de ambas as localidades investigadas. Das 140 ostras analisadas, pouco mais da metade (71 indivíduos) estava infectada pelo parasito. A prevalência se manteve moderada ao longo do tempo, enquanto a intensidade de infecção foi predominantemente baixa (TABELA 3). Das 71 ostras que testaram positivas para *Perkinsus* sp. em meio RFTM (FIGURA 5), 56 foram confirmadas por PCR, (79% de eficiência; TABELA 4), as quais apresentaram amplificação dos fragmentos genômicos do tamanho esperado (703 pb) (FIGURA 6). A prevalência e intensidade de infecção, embora tenha variado de baixa a intensa, ao longo do estudo, não diferiu significativamente entre as localidades. A prevalência de *Perkinsus* sp. encontrada neste estudo pode ter sido uma função das condições biológicas de cada organismo como também das condições ambientais de cada área estudada. Além destes, o tempo em que a ostra esta em contato com o parasito localizado na “área infectada” por *Perkinsus* sp. Moluscos bivalves exibem respostas diferentes à infecção; de acordo com le Peyre and Faisal (1995) algumas espécies de ostras proporcionam um ambiente menos favorável para o desenvolvimento do parasito, provavelmente devido aos baixos níveis de proteínas plasmáticas, gerando limitação nutricional para o agente patogênico e à elevada atividade celular, que pode degradar o parasito de forma mais eficaz. Tanto MED (27%) quanto PO (54%) apresentaram valores médios de prevalência em PCR maiores que a prevalência de 5,78% encontrada no estuário do Rio Pacoti, Fortaleza, Ceará (Sabry, Rosa et al. 2009), de 5,6% mensurada no estuário da Ponta do Mangue, Rio Grande do Norte (Silva, Figueiredo

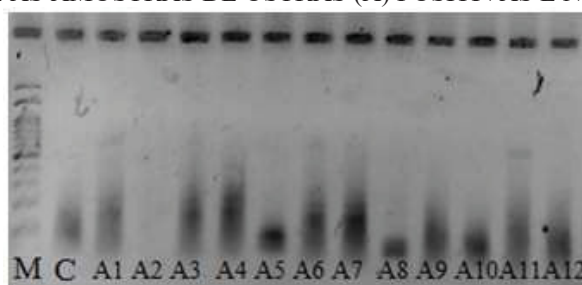
et al. 2017), e em estuários do Ceará (17,3%), Piauí (5,3%) e Maranhão (10,6%) (Dantas-Neto, Sabry et al. 2015), porém menores do que a prevalência média de 93,3% reportada no estuário do rio Mamanguipe, no estado da Paraíba (Vieira 2014), de 63% reportada nos estuários do Rio Marau e Graciosa, estado da Bahia (Brandao, Boehs et al. 2013) e do que os valores máximos (26,7 a 96,6%) encontrados em São Francisco do Sul, no estado vizinho de Santa Catarina (Cunha 2016).

FIGURA 5 - TECIDO BRANQUIAL DE OSTRAS *CRASSOSTREA* SP. COLETADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL, INFECTADO POR *PERKINSUS* SP. APÓS INCUBAÇÃO EM RFTM, MOSTRANDO CÉLULAS DO PARASITO CORADAS COM LUGOL. PRESENÇA DE NUMEROSOS HIPNÓSPOROS DE *PERKINSUS* SP. CARACTERÍSTICOS DE UMA INFECÇÃO INTENSA (AUMENTO DE 400X EM MICROSCÓPIO ÓPTICO).



FONTE: O AUTOR (2017)

FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE OSTRAS INFECTADAS POR *PERKINSUS* SP., MARCADOR DO PESO MOLECULAR (M), CONTROLE COM DNA DE *PERKINSUS* SP. (C) E AS AMOSTRAS DE OSTRAS (A) POSITIVAS E NEGATIVAS (A2).



FONTE: O AUTOR (2017)

TABELA 3 – PREVALÊNCIA DE *PERKINSUS* SP. E INTENSIDADE DE INFECÇÃO EM OSTRAS *CRASSOSTREA* SP. PROVENIENTES DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ- PR, BASEADOS NOS ENSAIOS EM RFTM E CONFIRMADAS POR PCR.

diagnóstico		RFTM			PCR	
Data	Local	n° de ostras infectadas	Prevalência (%)	Intensidade	n° de ostras infectadas	Prevalência (%)
jun/16	Med	5 de 12	41	-	3 de 12	25
jun/16	PO	5 de 8	62	-	5 de 8	62
set/16	Med	6 de 20	30	1	2 de 20	10
nov/16	PO	15 de 20	75	2	15 de 20	75
abr/17	Med	8 de 20	40	1	3 de 20	15
abr/17	PO	6 de 20	30	1	2 de 20	10

jun/17	Med	12 de 20	60	4	12 de 20	60
jun/17	PO	14 de 20	70	4	14 de 20	70

Intensidade baseada na escala de Mackin

TABELA 4 - NÚMERO DE OSTRAS QUE APRESENTARAM INFECÇÃO POR *PERKINSUS* SP. DETERMINADA ATRAVÉS DOS ENSAIOS EM RFTM E CONFIRMADAS OU NÃO POR PCR (+ OU -), COM A RESPECTIVA EFICIÊNCIA ENTRE AS REFERIDAS TÉCNICAS, DE ACORDO COM INTENSIDADE DE INFECÇÃO (ESCALA DE MACKIN ENTRE 0 A 4)

	Intensidade de infecção por <i>Perkinsus</i> sp.					Total
	0	1	2	3	4	
RFTM	69	51	11	5	4	140
PCR +	0	36	11	5	4	56
PCR -	0	15	0	0	0	15
Eficiência (%)	100	71	100	100	100	79

A presença de *Perkinsus* sp. nas ostras do CEP ao longo de todo o período estudado pode ser explicada pelo fato deste parasito ser infeccioso em todos os estágios do ciclo de vida (Villalba, Reece et al. 2004) e possuir mecanismo de transmissão horizontal direta, ou seja, é transferido diretamente entre indivíduos, sem necessidade de hospedeiros intermediários (Villalba, Gestal et al. 2011).

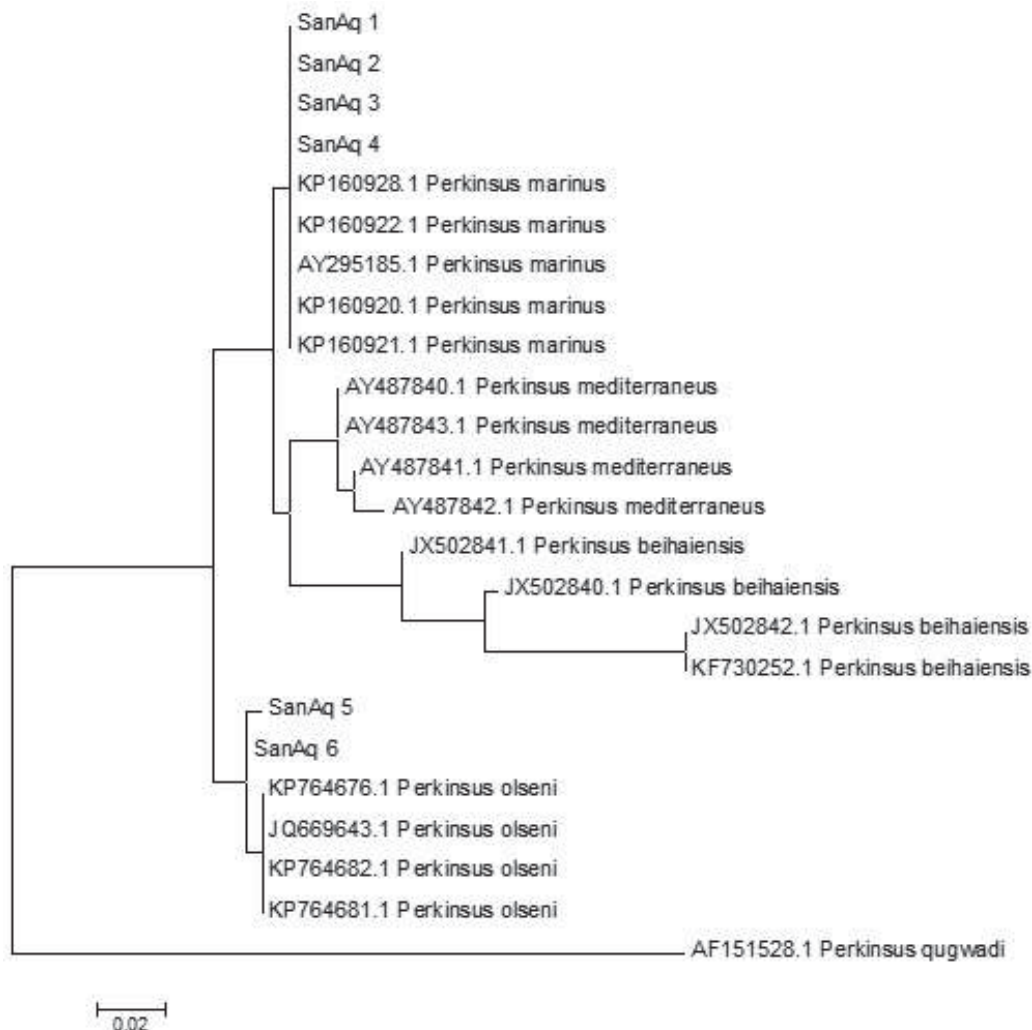
Neste estudo, *Perkinsus* sp. foram isolados durante todo o período investigado, mas foram forte e inversamente correlacionadas à temperatura ( $P = -0,94$ ) e não apresentaram correlação com a salinidade ( $P = 0,54$ ). Mesmo que, a prevalência e intensidade da infecção apresentaram maiores valores no período em que foram registrados os maiores valores de salinidade (36), outros estudos relatam que a salinidade pode favorecer a presença de *Perkinsus* sp. (Villalba, Reece et al. 2004, La Peyre, Casas et al. 2010, da Silva, Costa et al. 2016, Luz, Carvalho et al. 2017, Silva, Figueiredo et al. 2017). Entretanto, este período coincidiu também com as menores temperaturas, o que contraria relatos anteriores (Villalba, Reece et al. 2004, Cho and Park 2010, Villalba, Gestal et al. 2011). Em um estudo realizado em Chesapeake Bay (EUA), por exemplo, o aumento da infecção pelo parasito está relacionado ao aumento da temperatura da água acima de 20°C (Burreson and Ragone 1996, Bonilla 2016). É possível, portanto, que a menor temperatura (21 °C) registrada durante o período investigado no CEP (início da primavera a final do outono) ainda seja favorável ao desenvolvimento destes parasitos, assim como ocorre na região nordeste do Brasil durante todo o ano (da Silva, Scardua et al. 2014); (Queiroga, Vianna et al. 2015). Como visto no presente estudo, a influência da salinidade parece ser maior do que a da temperatura. Estudos conduzidos no nordeste brasileiro mostraram que, no inverno, quando a salinidade estava 24, houve uma queda abrupta na prevalência de *Perkinsus* sp. quando comparada ao verão, em que a salinidade estava 34 (da Silva, Scardua et al. 2014). No setor mais externo do CEP, a prevalência da infecção chegou a 70% quando a salinidade

alcançou 36, similar aos níveis alcançados no Rio Grande do Norte, a uma salinidade de 37 (da Silva, Costa et al. 2016) e na Bahia, a uma salinidade de 36 (Luz, Carvalho et al. 2017). No entanto, é necessário coletar com mais frequência os dados de temperatura e salinidade da água do mar para, então, determinar conclusivamente como a dinâmica destes parâmetros pode influenciar na infecção de ostras *Crassostrea* sp. por *Perkinsus* sp.

Das 71 ostras em que a infecção por *Perkinsus* sp. foi determinada pelo meio RFTM, em 15 indivíduos não se confirmou a presença do parasito por PCR, provavelmente porque a infecção estava em um nível leve ou porque ocorreu alguma falha na extração do DNA que impediu a amplificação dos fragmentos genômicos. Outros autores também encontraram divergência nos resultados entre RFTM e PCR (Reece, Dungan et al. 2008), (Sabry 2010), (Burreson 2008), apesar de (Reece, Dungan et al. 2008) terem afirmado que a prevalência estimada entre RFTM e análises moleculares são normalmente parecidas.

Neste estudo, as amostras que tiveram fragmentos DNA sequenciados, foram classificadas como *Perkinsus marinus* (n=4) e *P. olseni* (n=2). As sequências obtidas para *P. marinus* foram idênticas entre si e não apresentaram diferença significativa em relação àquelas depositadas no NCBI. Entretanto, para *P. olseni*, apesar das sequências não apresentarem diferença significativa em relação àquelas depositadas no NCBI, foram classificadas como *P. cf. olseni* (FIGURA 7) devido a sua distância do ramo de *P. olseni*. Sendo assim, este é o primeiro relato da presença de *Perkinsus marinus* e *Perkinsus cf. olseni* em ostras *Crassostrea* sp. provenientes do Complexo Estuarino de Paranaguá. Este achado gera uma preocupação à rentabilidade da aquicultura paranaense, pois organismos infectados por *Perkinsus* sp. apresentam crescimento lento e deficiência de reserva energética para ter sucesso na gametogênese, resultando em tamanho e valor inferior de mercado, podendo ocorrer maceração do músculo adutor, abertura involuntária das valvas, perda de peso, encolhimento do manto, comprometimento do sistema imunológico e por fim, a morte da ostra (Villalba, Reece et al. 2004, ICES 2011). *Perkinsus marinus* é uma das espécies mais nocivas para seu hospedeiro, sobretudo ostras, períodos de elevada prevalência e forte intensidade de infecção podem resultar em eventos sazonais de mortalidade massiva, como registrado para ostras *Crassostrea virginica* nos Estados Unidos (Ragone Calvo, Dungan et al. 2003). Ambas as espécies de parasitos encontradas neste estudo já foram reportadas em ostras no litoral do Brasil, principalmente na costa nordeste (Sabry 2010, da Silva, Scardua et al. 2014, Queiroga, Vianna et al. 2015), mas também no sul, no estado de Santa Catarina (Cunha 2016), representando uma ameaça à produção de ostras *Crassostrea* sp. nestas regiões.

FIGURA 7 - ANÁLISE DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA DAS SEQUÊNCIAS DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES *PERKINSUS MARINUS* E *PERKINSUS* CF. *OLSENI* DAS AMOSTRAS SANAQ 1 A 6 COLETADAS EM MEDEIROS (CEP) E AMOSTRAS DO BANCO DE DADOS DO NCBI.



FONTE: Daniele Conceição, Laboratório de genética e melhoramento de organismos aquáticos, CEM, UFPR (2018)

O aparecimento de parasitos e doenças que causam mortalidades em massa, podem persistir na região e inviabilizar o futuro da produção (Villalba, Reece et al. 2004), representando um importante fator que contribui para as mortalidades em massa (Bower, McGladdery et al. 1994). Além das bactérias patogênicas e microalgas tóxicas, o monitoramento de parasito, como *P. marinus* e *P. olseni*, seria importante no litoral brasileiro, pois os mesmos podem afetar diretamente as ostras, alterando sua eficiência dos processos metabólicos, reduzindo o crescimento e a reprodução, como também afetando sua resistência ao estresse e promovendo a morte do animal. A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) trabalha ao redor do mundo, inclusive no Brasil, para que normas de controle destas enfermidades sejam elaboradas e, assim, haja controle da ocorrência de doenças de notificação obrigatória em diversos grupos animais. Segundo a OIE (2018), as doenças de notificação obrigatória de moluscos são: infecção por *Abalone herpesvirus* e *Xenohaliotis californiensis* em

abalones, e infecção com *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*, *P. marinus* e *P. olseni* em ostras. No Brasil, *P. marinus* está na lista de doenças de notificação obrigatória de moluscos de acordo com a Portaria n. 19, de 4 de fevereiro de 2015, e a notificação consiste na comunicação da ocorrência dos casos de doenças às autoridades sanitárias, visando a adoção de medidas de controle que sejam pertinentes para manter a atividade aquícola sustentável (Brasil 2015). Segundo a OIE (2017), as enfermidades são responsáveis, ainda, por impactos no desenvolvimento sócio-econômico em muitos países por causa do transporte de moluscos contaminados para áreas livres de patógenos, causando redução das populações de moluscos bivalves.

Embora os cortes histológicos (n = 40) tenham sido realizados a partir de amostras que apresentaram maior intensidade de infecção, não foi possível identificar o parasito nestas análises. Cunha (2016) sugere que a análise em RFTM é mais simples e eficaz em diagnosticar a presença do parasito do que a análise histopatológica. Uma das razões é a pequena quantidade de tecido normalmente amostrado em ambas as técnicas (Almeida, Berthe et al. 1999). Ademais, o meio RFTM aumenta o tamanho dos trofozoítos e deixa a parede celular mais espessa, tornando, assim, a leitura das amostras em microscópio mais fácil (Ashton-Alcox, Kim et al. 2006). Em contraste, na análise histopatológica, o tecido é fixado e mantém o mesmo número e tamanho do parasito, o que exige um bom treinamento para identificação das estruturas de interesse. Segundo Sabry (2010), (Sabry, Gesteira et al. 2013) e Brandao, Boehs et al. (2013), as células do parasito apresentam um vacúolo que ocupa grande parte do citoplasma e o núcleo situado na parte periférica da célula.

O protozoário *Perkinsus* sp. coloniza e danifica preferencialmente o epitélio do trato digestório das ostras infectadas (Moss, Xiao et al. 2008, Sabry, Rosa et al. 2009, Queiroga, Vianna et al. 2015). O que pode estar associado a sua forma de captura das partículas de alimento que as ostras utilizam (Mackin 1951). Neste estudo, não foram identificadas lesões nos órgãos digestivos das ostras analisadas, mesmo naquelas que se apresentaram altamente infectadas em meio RFTM. No entanto, Queiroga, Vianna et al. (2015) encontraram alta prevalência (93,3%) de *Perkinsus* sp. no estuário do Rio Mamanguape, na Paraíba, através da histopatologia em ostras durante todo o período de estudo, sendo a alta prevalência devido ao efeito acumulativo da estação seca, quando as maiores temperaturas e salinidades da água foram registradas e coincidindo com a época em que as ostras apresentaram comprometimento do sistema imunológico. Similarmente, (Vieira 2014) encontraram alta prevalência (93,3%) deste parasito, sobretudo no manto e epitélio dos órgãos digestivos das ostras analisadas da Bahia. Através da mesma técnica, entretanto baixas prevalências (3,3% a 6,6%) de *Perkinsus* sp. foram encontradas em Santa Catarina, com maiores valores no verão (Cunha 2016). De modo similar, Dantas-Neto, Sabry et al. (2015) encontraram baixas prevalências (5,3 % a 17,3%) em três estuários nordestinos.

No entanto, a perkinsiose ainda não foi diretamente associada a eventos de mortalidade em massa no Brasil (Da Silva et al., 2013, 2014, 2016; Queiroga et al., 2015; Dantas-Neto et al., 2015), este estudo não avaliou se a prevalência e infecção do parasito no CEP causou mortalidade em ostra nas áreas estudadas, o que deverá ser feito num futuro próximo. Da mesma forma, estudos populacionais devem ser conduzidos para se avaliar possíveis impactos ecológicos associados à mortalidade que estes parasitos podem acarretar.

Apesar da falta de identificação de *Perkinsus* sp. pela histopatologia, foi possível observar outros parasitos, como *Bucephalus* sp. e *Nematopsis* sp., além de *brown cells*. *Bucephalus* sp., encontrado em apenas uma ostra analisada (2,5%), acomete as gônadas do hospedeiro, causando castração (Brandao, Boehs et al. 2013). Já foi encontrado em ostras *Crassostrea* sp. na Bahia (Nascimento et al., 1986; Luz, Carvalho et al. 2017), no Ceará (Sabry, Gesteira et al. 2013) e também em outras espécies de bivalves no nordeste brasileiro (Brandao, Boehs et al. 2013) e no sul (Sühnel, Johnson et al. 2016). *Nematopsis* sp., por sua vez, presente em todas as ostras analisadas (100 %), quando em grande quantidade nas brânquias dos bivalves, pode dificultar as trocas gasosas (Brandão, Boehs; et al. 2012), como também utiliza-os como hospedeiros intermediários para completar seu ciclo de vida no trato digestivo de crustáceos (Lauckner 1983). *Nematopsis* sp. é usualmente reportado em ostras *Crassostrea* sp. no nordeste (Azevedo, Padovan et al. 2005, Sabry, Gesteira et al. 2007, Queiroga, Vianna et al. 2015, Luz and Boehs 2016); e no sul do Brasil (Sühnel, Johnson et al. 2016), bem como em outras espécies comerciais de bivalves (Boehs, Magalhães et al. 2012). Aglomerados de *brown cells* estiveram presente em 50% das ostras analisadas e indicam uma possível resposta imunológica de defesa aos referidos parasitos.

### 3.4 Microalgas e ficotoxinas

#### 3.4.1 Variação espacial e temporal na abundância do fitoplâncton

Considerando as células de microalgas maiores que 10  $\mu\text{m}$ , foram identificados 29 táxons distintos em ambos os locais estudados, pertencentes aos dois principais grupos do microfitoplâncton costeiro: diatomáceas (cêntricas e penadas) e dinoflagelados (TABELA 5). Além disso, foi incluído nas contagens o ciliado fotossintetizante *Mesodinium rubrum*, por atuar como produtor primário e por se tratar da principal presa do dinoflagelado tóxico mixotrófico, *Dinophysis* cf. *acuminata*.

Não houve diferença significativa no número de táxons por amostragem entre os dois locais estudados, porem o setor externo apresentou valores ligeiramente maiores ( $15 \pm 3$  na PO) do que no

setor intermediário ( $12 \pm 4$  em MED). Dentre diatomáceas e dinoflagelados, este trabalho identificou a ocorrência de 30 táxons distintos, sendo os mais abundantes condizentes com aqueles reportados em trabalhos realizados anteriormente no CEP (Brandini 1985, Brandini and Moraes 1986, Brandini, Moraes et al. 1989, Thamm 1990, Anderle 2004, Fernandes and Brandini 2004, Luz 2016): *Ceratium furca*, *Chaetoceros* sp., *Cylindrotheca* spp, *Gymnodinium* sp., *Pleurosigma* sp., *Protoperidinium* sp., *Prorocentrum* sp., *Rhizosolenia* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassionema nitzschioides*.

TABELA 5 - TÁXONS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE FITOPLÂNCTON NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL, DE OUTUBRO DE 2016 A JUNHO DE 2017

Diatomáceas		Dinoflagelados	Outros
Cêntricas	Penadas		
<i>Actinoptychus</i> sp.	<i>Bacillaria</i> sp.	<i>Alexandrium fraterculos</i>	<i>Mesodinium rubrum</i>
<i>Chaetoceros</i> sp.	<i>Meuniera membranacea</i>	<i>Ceratium furca</i>	
<i>Coscinodiscus</i> sp. 1	<i>Pleurosigma</i> sp.	<i>Ceratium fusus</i>	
<i>Coscinodiscus</i> sp. 2	<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> *	<i>Dinophysis</i> cf. <i>acuminata</i> *	
<i>Cylindrotheca</i> sp.	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> *	<i>Gyrodinium</i> sp.	
<i>Ditylum</i> sp.	<i>Thalassionema</i> sp.1	<i>Noctiluca</i> sp.	
<i>Fragilaria</i> sp.	<i>Thalassionema</i> sp.2	<i>Prorocentrum micans</i>	
<i>Lauderia anulata</i>		<i>Prorocentrum scutellum</i>	
<i>Odontella</i> sp.		<i>Protoceratium</i> sp.	
<i>Rhizosolenia setigera</i>		<i>Pyrocystis</i> sp.	
<i>Skeletonema</i> sp.			

\*Espécies potencialmente tóxicas

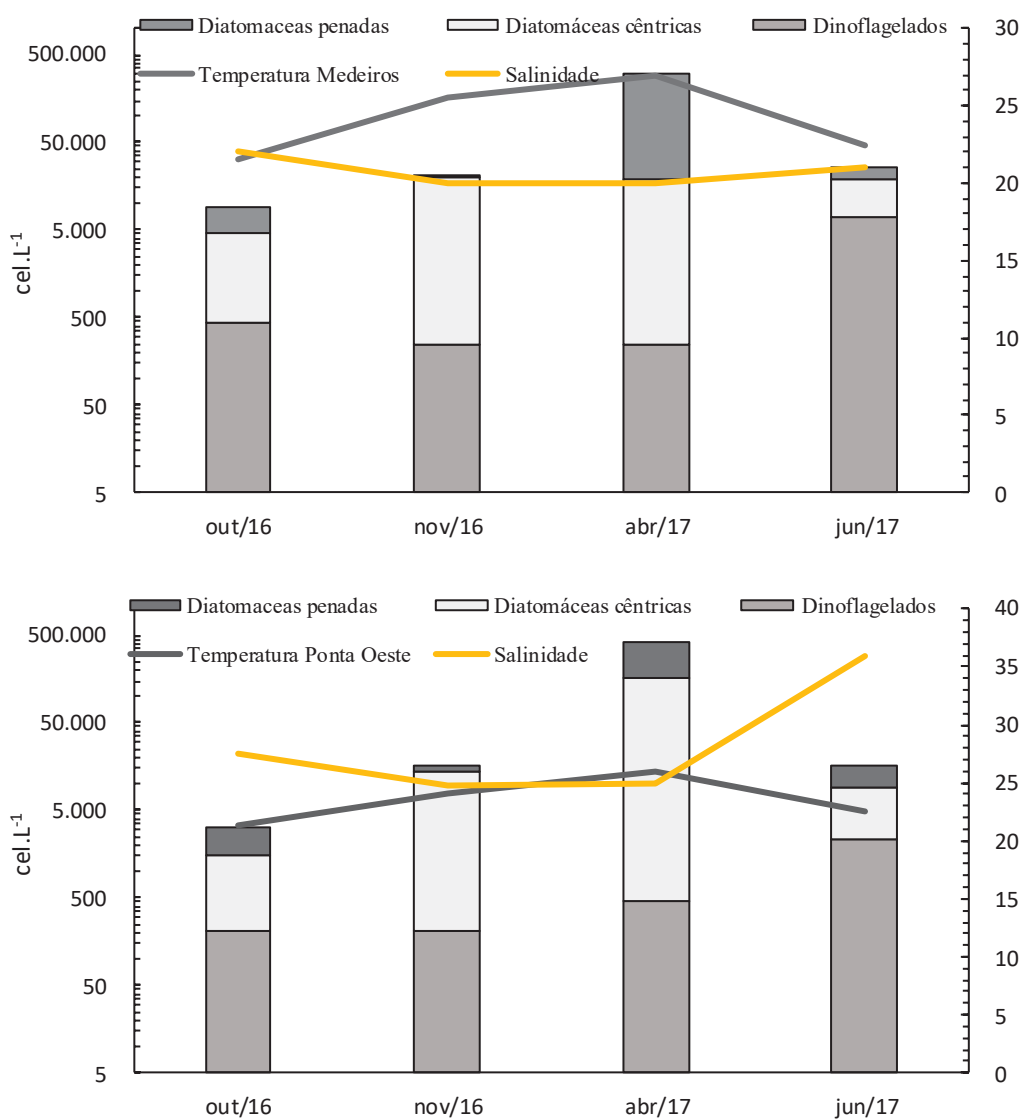
Houve uma variação sazonal significativa na abundância de diatomáceas e no número total de células do microfítocoplâncton, tanto em MED como na PO, com maiores valores registrados no mês de abr/17 (GRÁFICO 1).

As diatomáceas cêntricas, assim como em estudos pretéritos realizados no CEP (Anderle 2004, Luz 2016), foram dominantes no presente estudo, principalmente no final do verão e início do outono, quando a temperatura da água e a concentração de silicato foram maiores. O silicato, que é importante para a síntese de DNA e formação das frústulas das diatomáceas (Bates, Garrison et al. 1998), é encontrado em abundância no CEP, onde, de modo geral, a demanda por sílica é menor que a oferta (Brandini and Moraes 1986).

Nesse mesmo período, a coluna d'água apresentou características verticalmente homogêneas (TABELA 6), ou seja, a maior circulação de água dentro do estuário provavelmente tenha favorecido o maior desenvolvimento de diatomáceas através da promoção de turbulência que as impedem de afundar (Mos 2001). De modo inverso, a coluna d'água esteve mais estável verticalmente em junho de 2017, o que pode ter favorecido o maior desenvolvimento de dinoflagelados naquele período (Day 1989, Smayda 1997), quando sua elevada capacidade natatória os permite permanecer nas camadas

superficiais iluminadas e realizar movimentos de migração vertical em busca de nutrientes, conferindo uma vantagem competitiva em relação às diatomáceas (Margalef 1978, Smetacek 1988, Doblin, Thompson et al. 2006).

GRÁFICO 1 - ABUNDÂNCIA ( $\text{cel.L}^{-1}$ ) DE DIATOMÁCEAS E DINOFLAGELADOS PRESENTES EM MEDEIROS (PAINEL SUPERIOR) E PONTA OESTE (PAINEL INFERIOR) DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO, EM RELAÇÃO AOS VALORES MÉDIOS DE SALINIDADE E TEMPERATURA DA ÁGUA.



Legenda: Valores de  $\text{cel.L}^{-1}$  em escala logarítmica

FONTE: O AUTOR (2018)

TABELA 6 – ESTRATIFICAÇÃO DA ESTRUTURA VERTICAL DA COLUNA D'ÁGUA: RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA (ANOVA) E POST-HOC (TUKEY) PARA OS DADOS DE SALINIDADE E TEMPERATURA OBTIDOS COM CTD A CADA 0,5 M NAS DUAS REGIÕES ESTUDADAS LOCALIZADAS NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PR, BRASIL. DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0.05$ ) DESTACADAS EM ITÁLICO

Data	Local	Salinidade			Temperatura		
		F	p	Tukey/HSD	F	p	Tukey/HSD
out.16	Med	1,4	0,380		0	0,96	
	Po	0,2	0,948		0	0,89	
nov.16	Med	0,34	0,889		0,8	0,63	
	Po	546	0,008	0 < (0,5 = 1,0 = 1,5 = 2,0 = 2,5 = 3,0) < 3,5 < 4,0 < 4,5	1	0,60	
abr.17	Med	0,375	0,816		1	0,53	
	Po	2,47	0,107		2	0,22	
jun.17	Med	31,4	0,003	0 = 0,5 = 1,0 < 1,5	177	0,01	0 = 0,5 = 1,0 < 1,5
	Po	0	0,890		0	0,88	

### 3.4.2 Variação espacial e temporal de microalgas potencialmente tóxicas e ficotoxinas

As espécies de microalgas potencialmente tóxicas ocorreram em menores abundâncias no CEP, quando comparadas aos outros táxons durante o período estudado. Durante o presente estudo, foi possível detectar a presença das espécies de microalgas potencialmente tóxicas *Dinophysis* cf. *acuminata*, *Pseudo-nitzschia calliantha* e *P. pungens*, que podem se tornar nocivas ao ser humano por meio da contaminação de moluscos bivalves por ficotoxinas (Lassus, Chomérat et al. 2016). Além disso, foi possível relatar a ocorrência de espécies de *Chaetoceros* e *Coscinodiscus*, que ocasionalmente podem se tornar nocivas aos animais marinhos durante florações intensas, em função do formato das células que podem danificar as brânquias de peixes e/ou da produção excessiva de compostos mucilaginosos que podem prejudicar a taxa de filtração dos consumidores primários. Apesar de normalmente não causarem danos diretos aos bivalves, elevadas abundâncias destas microalgas e seus compostos mucilaginosos aumentam a probabilidade de infecções por patógenos (Sar, Ferrario et al. 2002).

#### 3.4.2.1 *Dinophysis* cf. *acuminata* e toxinas diarreicas

O envenenamento diarréico por consumo de moluscos (DSP) é uma das principais preocupações com relação à segurança alimentar em escala global. Durante surtos de DSP, o desenvolvimento socioeconômico de comunidades costeiras que dependem da malacocultura pode ser afetado (O'Boyle and Silke 2009, Reguera, Riobo et al. 2014). Neste estudo, *Dinophysis* cf. *acuminata* (FIGURA 8) foi a única espécie produtora de toxinas diarreicas encontrada no CEP,

ocorrendo em ambas as localidades sob baixas densidades celulares, em novembro/16 (116 cel.L<sup>-1</sup> na PO) e em junho/17 (193 cel.L<sup>-1</sup> em MED e 116 cel.L<sup>-1</sup> na PO), e atingindo abundâncias consideravelmente elevadas em junho/16 (617 cel.L<sup>-1</sup> em MED e 121.265 cel.L<sup>-1</sup> na PO). Apesar de não apresentar correlação com a maioria dos parâmetros físico-químicos analisados neste trabalho, sua ocorrência seguiu os padrões sazonais relatados para esta região de estudo, ou seja, ocorrência mais expressiva no inverno e na primavera (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Mafra Jr, Lopes et al. 2015).

Além de condições físico-químicas apropriadas, como concentrações mais elevadas de nutrientes nitrogenados no meio, luz adequada e, muitas vezes, a estratificação da coluna d'água, a ocorrência de espécies mixotróficas de *Dinophysis* e sua abundância no plâncton estão relacionadas também à disponibilidade de suas presas obrigatórias – ciliados *Mesodinium rubrum* (Reguera, Riobo et al. 2014, Hattenrath-Lehmann, Marcoval et al. 2015). A abundância celular de *Dinophysis* cf. *acuminata* apresentou uma variação temporal irregular no presente estudo, relacionada inversa e fracamente com a abundância de sua presa *M. rubrum* (P = -0,27) e não relacionada à maioria dos parâmetros físico-químicos analisados neste trabalho, podendo ser considerada bastante resistente e/ou com elevada capacidade adaptativa. Desta forma, células de *Dinophysis* cf. *acuminata* podem se desenvolver de forma lenta e permanecer em abundâncias menores por períodos prolongados sob baixa disponibilidade de alimento e/ou na ausência de estratificação marcada da coluna d'água, assim como observado no presente estudo. As maiores abundâncias em junho de 2016 estiveram relacionadas a uma floração massiva do dinoflagelado que atingiu o litoral sul-sudeste do Brasil, associada ao transporte de uma massa d'água com baixos valores de temperatura e salinidade, afetando principalmente a plataforma continental rasa e porções mais externas dos estuários e enseadas onde se pratica a malacocultura no Paraná e em Santa Catarina (Mafra et al. 2016, Alves et al. 2018).

FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA DA ESPÉCIE *Dinophysis* cf. *acuminata* COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL.



FONTE: O AUTOR (2018)

Esta espécie de dinoflagelado tóxico é abundante em diversas regiões do mundo, como por exemplo no Japão (Kamiyama and Suzuki 2009), Estados Unidos (Deeds, Wiles et al. 2010), Espanha (García-Altare, Casanova et al. 2016), Chile (Díaz, Molinet et al. 2011, Alves-de-Souza, Varela et al. 2014), Argentina (Sar, Sunesen et al. 2012, Villalobos, Santinelli et al. 2015) e Uruguai (Martínez, Méndez et al. 2017). No Brasil, já foi relatada em diversos estados, como no Rio de Janeiro (Soares, Zanette et al. 2016), Rio Grande do Sul (Haraguchi and Odebrecht 2010), Santa Catarina (Mafra Jr., Tavares et al. 2014, Mafra Jr, Lopes et al. 2015, Parizzi, Machado et al. 2016) e no Paraná (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Tibiriçá, Fernandes et al. 2015), acarretando danos à saúde pública, além de prejuízos à produção aquícola e pesqueira associados à proibição da comercialização de estoques contaminados e a subsequente diminuição na demanda pelo produto (Sar, Sunesen et al. 2010).

Células de *Dinophysis* sp. podem ficar concentradas em finas camadas na coluna d'água (Escalera, Pazos et al. 2012) e, por isso, recomenda-se que os programas de monitoramento utilizem uma mangueira para se obter amostras integrais da coluna d'água e assim, aumentar as chances de detectar a espécie, gerando um alerta para possíveis eventos de contaminação em humanos. Conforme verificado neste estudo, entretanto, esta estratégia amostral resulta em menores abundâncias à medida que eventuais agregações celulares são diluídas na amostra. Por esta razão, ainda que seja detectada em baixas abundâncias, *Dinophysis* sp. podem provocar a contaminação de moluscos bivalves com quantidades significativas de toxina, desde que os moluscos estejam suspensos em uma profundidade onde as células de *Dinophysis* sp. estejam concentradas. Tal situação pode ter ocorrido neste estudo, no momento em que se detectou a toxina nos tecidos das ostras, sem que tenha se detectado a ocorrência de células nas amostras de água, conforme descrito a seguir.

O Limite de Detecção (LOD) alcançado para a análise de AO neste estudo foi de 0,049 ng.mL<sup>-1</sup>. Desta forma, baixas concentrações de toxinas diarreicas (AO) puderam ser detectadas através de LC-MS/MS na fração particulada da água do mar (séston) em outubro/16, na PO (0,21–0,39 µg.L<sup>-1</sup>), e principalmente em junho/17, tanto na PO (1,57–1,83 µg.L<sup>-1</sup>) como em MED (0,24–4,10 µg.L<sup>-1</sup>). Já nos tecidos inteiros das ostras, foram detectadas concentrações moderadas de AO em MED (21,75 ± 37,89 µg.L<sup>-1</sup>) e altas concentrações na PO (639 ± 287 µg.L<sup>-1</sup>) em junho/16, condizentes com as maiores densidades celulares de *D. cf. acuminata* registradas nesta ocasião. Adicionalmente, em outubro/16 foram detectadas baixas concentrações da toxina (2,04 ± 1,37 µg.Kg<sup>-1</sup>) nas glândulas digestivas das ostras coletadas em Medeiros, onde foi registrado o valor máximo de 5,54 µg.Kg<sup>-1</sup> na glândula digestiva de um indivíduo. Nos demais períodos amostrais, os níveis

incorporados de AO estiveram abaixo do LOD da técnica analítica empregada, tanto para indivíduos inteiros quanto para as glândulas digestivas de ostras amostradas em ambas as regiões.

*Dinophysis acuminata* é capaz de produzir toxinas diarreicas, incluindo o ácido ocadaico (AO) e seus derivados, as dinofisistoxinas 1 e 2 (DTX-1 e DTX-2), que causam intoxicações alimentares em humanos. Estes compostos geralmente não afetam diretamente os bivalves, que conseguem eliminá-los rapidamente por meio de um eficiente processo de depuração (Hallegraeff, Anderson et al. 2003, Reguera, Riobo et al. 2014). Entretanto, podem se tornar um obstáculo para o crescimento da aquicultura brasileira, caso se registrem eventos de contaminação sucessivos acompanhados de breves interrupções na comercialização do produto. A quantidade de toxinas acumuladas nos organismos marinhos – e consequentemente transferidas a organismos em diferentes níveis tróficos – depende da abundância da microalga produtora de toxina no plâncton, além da capacidade de seleção de partículas e da taxa de assimilação do bivalve (Jiang et al., 2007). Neste estudo, foram detectadas concentrações moderadas a elevadas de AO, mas não DTX, nas glândulas digestivas de ostras *Crassostrea* sp.

A alta concentração de AO detectado em junho/16 esteve relacionado à alta abundância de *Dinophysis* cf *acuminata* encontrada na água neste mesmo período, caracterizando o início de um evento de floração desta microalga no litoral paranaense nos meses de junho e julho de 2016 (ADAPAR, 2016). Do mesmo modo, os baixos níveis acumulados em outras épocas estiveram associados à baixa densidade de organismos tóxicos a qual os moluscos foram expostos. Ainda assim, estes resultados demonstram que a toxina pode se acumular nos bivalves e ser transferida aos seus consumidores, mesmo quando abundâncias baixas ( $\sim 100\text{-}200\text{ cel.L}^{-1}$ ) ou não detectáveis ( $<40\text{ cel.L}^{-1}$ ) de *Dinophysis* sp. estão presentes na água (conforme estimado a partir de amostras integrais da coluna d'água, coletadas com mangueiras). Em situações de baixa abundância no ambiente, especialmente aquelas que favoreçam a retenção de elevadas quotas celulares de toxinas (Mafra Jr., Tavares et al. 2014) como, por exemplo, durante a limitação de crescimento por limitação de presas, nutrientes ou luz (Nielsen, Krock et al. 2012), a concentração de AO por célula se torna maior do que quando as populações de *Dinophysis* ocorrem em densidades mais elevadas ( $>250\text{ cel.L}^{-1}$ ) sob condições mais favoráveis (Lindahl, Lundve et al. 2007).

As concentrações de AO mensuradas no material particulado em suspensão ao longo do presente estudo ( $0,10$  e  $2,16\ \mu\text{g.L}^{-1}$ ) não foram tão baixas, sendo superiores, inclusive, às quantidades medidas uma situação de floração na Baía Alfacs, na Catalunia, Espanha ( $<0,11\ \mu\text{g.L}^{-1}$ ; (García-Altares, Casanova et al. 2016), comprovando que ostras *Crassostrea* sp. possuem baixa capacidade de retenção de toxinas diarreicas, conforme medido em laboratório anteriormente (Mafra Jr, Ribas et al. 2015). Desta forma, ostras não devem ser consideradas organismos sentinela para investigação de

florações de *Dinophysis* sp. (García-Altare, Casanova et al. 2016) devido à baixa eficiência de captura de partículas maiores, alta capacidade de seleção de partículas, baixa assimilação/retenção dos compostos tóxicos e rápida excreção, bem como sua posição nos estratos mais profundos da coluna d'água (Reizopoulou, Strogyloudi et al. 2008).

Em situações especiais, entretanto, *Dinophysis* sp. podem ser nocivas ao ser humano em abundâncias tão baixas quanto  $1.000 \text{ cel.L}^{-1}$  (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006), ou ainda menores, como as registradas em nosso estudo ( $100\text{-}200 \text{ cel.L}^{-1}$ ), sobretudo quando mexilhões são expostos (Yasumoto, Murata et al. 1985, Reguera, Velo-Suárez et al. 2012), já que estes organismos costumam acumular maiores concentrações de toxinas (Mafra Jr, Ribas et al. 2015). Por exemplo, em junho/16 algumas pessoas manifestaram os sintomas gastrointestinais típicos de contaminação por DSP e foram internadas após consumir mexilhões contaminados com altas concentrações de AO (Mafra Jr et al. 2016).

Os episódios de DSP têm sido registrados ao redor do mundo, principalmente em áreas de cultivo de bivalves, como Japão, Sul do Chile, noroeste da Europa (França, Espanha, Portugal), Austrália e Estados Unidos que periodicamente relatam a incidência de toxina diarreica em bivalves (Reguera, Riobo et al. 2014, Lassus, Chomérat et al. 2016). Além dos danos à saúde pública, eventos tóxicos causados por *Dinophysis acuminata* causam ainda grandes prejuízos econômicos à malacocultura através da suspensão da comercialização em países onde há grande produção de bivalves destinados ao consumo humano (García-Altare, Casanova et al. 2016), e também recentemente no Brasil, nos estados de Santa Catarina (CIDASC 2016) e Paraná (ADAPAR 2016).

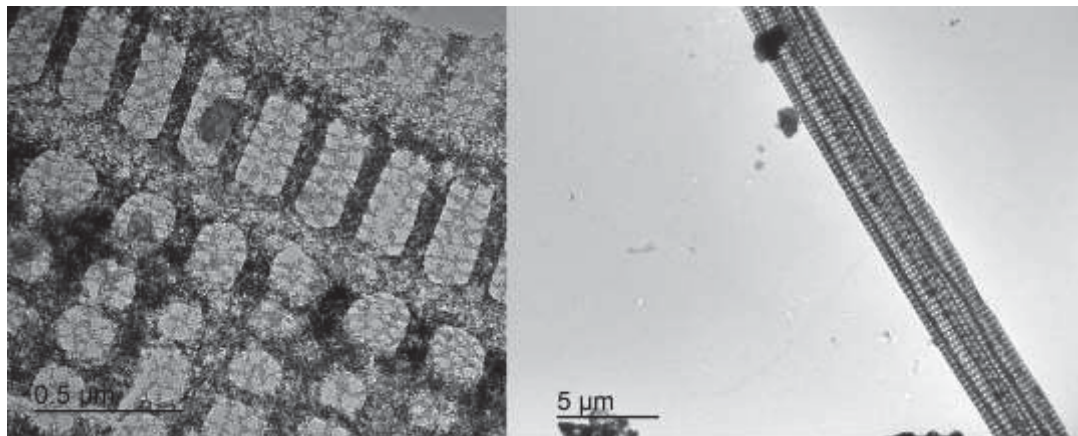
Apesar de grande parte das ostras analisadas no presente estudo não terem acumulado quantidades de toxinas diarreicas suficientes para intoxicar de forma aguda seres humanos, as toxinas diarreicas podem, ainda, levar à formação de tumores mediante exposição crônica a baixas concentrações (Fujiki and Suganuma 2009, Mariné, Silva et al. 2010), Sosa et al., 2013), representando um risco de saúde a consumidores frequentes de moluscos leve a moderadamente contaminados por estes compostos.

#### 3.4.2.2 *Pseudo-nitzschia* sp.

No mês de abril/17, as diatomáceas penadas *Pseudo-nitzschia calliantha* (FIGURA 9) e *Pseudo-nitzschia pungens* (FIGURA 10), foram predominantes tanto em MED como na PO. Para *P. calliantha* foi registrada uma abundância média de  $252.989 \pm 163.600 \text{ cel.L}^{-1}$  e para *P. pungens*,  $6.779 \pm 11.732 \text{ cel.L}^{-1}$  em ambas as comunidades estudadas. Não houve variação na

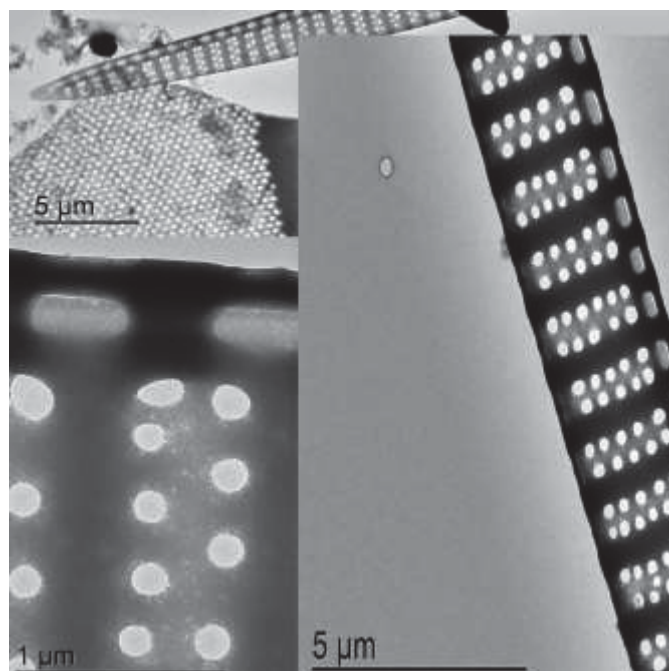
abundância das espécies potencialmente tóxicas entre os locais, porém, *P. calliantha* foi significativamente mais abundante em abril/17.

FIGURA 9 - *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA* FOTOGRAFADA COM AUXÍLIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL.



FONTE: LUCIANO F. FERNANDES, DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA, UFPR (2017)

FIGURA 10 - *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS* FOTOGRAFADA COM AUXÍLIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E COLETADA NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ, PARANÁ, BRASIL.



FONTE: LUCIANO F. FERNANDES, DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA, UFPR (2017)

No CEP, as máximas abundâncias de *P. calliantha* (467.739 cél.L<sup>-1</sup>) e *P. pungens* (24.362 cél.L<sup>-1</sup>) foram detectadas em abril de 2017 nas duas áreas estudadas, associadas à temperatura mais elevada da água e maiores concentrações de silicato e amônio. *Pseudo-nitzschia* sp. são encontradas em diferentes ambientes marinhos, como estuários, baías e plataforma continental (Thessen, Dortch et al. 2005), e se desenvolvem em amplas faixas de temperatura (2-30°C) e salinidade (18-40) (Mos 2001, Thessen, Dortch et al. 2005, Anderson, Sapiano et al. 2010). Em regiões temperadas e subtropicais, como no CEP, as espécies de *Pseudo-nitzschia* sp. são mais comuns na primavera e no final do verão/início do outono, meses que há pluviosidade moderada (Lana, Marone et al. 2001, Brandini, da Silva et al. 2007). Portanto, nestes períodos, ocorre uma maior instabilidade meteorológica com ventos mais fortes e, conseqüentemente, maior turbulência, o que proporciona a ressuspensão de nutrientes presentes no sedimento e também favorece a permanência de células de *Pseudo-nitzschia* sp. na camada fótica da água (Mos, 2001). Além disso, esses períodos de instabilidade provocam uma maior drenagem continental, aumentando assim o aporte de nutrientes novos na coluna d'água, o que proporciona o desenvolvimento destas espécies de diatomáceas produtoras de toxinas amnésicas, de forma que elas chegam a se tornar dominantes na comunidade fitoplanctônica da região estudada e áreas adjacentes em alguns momentos (Anderle 2004, Fernandes and Brandini 2004, Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Tibiriçá, Fernandes et al. 2015).

Neste estudo, a abundância de *P. calliantha* atingiu valores superiores ao considerado como um nível de alerta por Mafra Jr, Fernandes et al. (2006), ou seja, quando a contagem ultrapassa 100.000 cél.L<sup>-1</sup>, e com dominância superior a 50% da contagem total das espécies consideradas. No entanto, mesmo com a grande abundância de células, as análises por cromatografia líquida não detectaram ácido domóico (AD) nos tecidos das ostras nem no material particulado em suspensão, em razão da detecção de AD seguir o método oficial voltado para o monitoramento de ficotoxinas em áreas aquícolas e, portanto, possui limite de detecção limitado (LOD = 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>), incapaz de registrar níveis baixos ou traços de AD eventualmente ocorridos neste estudo. Similarmente, (Stehr, Connell et al. 2002) relataram baixas concentrações de AO no plâncton e não nos tecidos dos bivalves em períodos que *P. pungens* dominou a assembleia fitoplanctônica na costa dos EUA e outros estudos realizados no sul do Brasil não detectaram concentrações expressivas de AD no plâncton, mesmo mediante grandes abundâncias de *Pseudo-nitzschia* sp. na água (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Alves, Schramm et al. 2010, Proença, Fonseca et al. 2011). Excepcionalmente, em Santa Catarina, uma floração dominada por *P. calliantha* (10<sup>6</sup> cel.L<sup>-1</sup>) no verão de 2000 foi relacionada a elevados níveis de AD no plâncton (Tavares, Proença et al. 2009) e um evento dominado por *P. calliantha* e *P. pseudodelicatissima* no verão de 2009 (2×10<sup>7</sup> cel.L<sup>-1</sup>) levou ao

acúmulo de AD (máx. 98,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) acima do nível regulatório (20  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em moluscos bivalves na Baía sul de Florianópolis, SC (Fernandes, Cavalcante et al. 2013).

Além de *P. calliantha* e *P. pungens*, outras espécies de *Pseudo-nitzschia* já foram reportadas no CEP, como *Pseudo-nitzschia multiseriata*, *P. australis*, e *P. pseudodelicatissima* (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Fernandes and Brandini 2010, Wadt, Mafra et al. 2017), sendo as três consideradas capazes de produzir grandes quantidades de AD (Wadt, Mafra et al. 2017). Mesmo sendo eliminado rapidamente por depuração e não causando danos aparentes aos moluscos bivalves, o AD, quando em maiores concentrações, pode ser neurotóxico a outros animais marinhos, como também em humanos que consumam organismos contaminados, causando prejuízos diversos (Mos 2001, Hallegraeff, Anderson et al. 2003). Por exemplo, uma grande floração de *Pseudo-nitzschia* sp. ocorreu durante a primavera na costa oeste dos EUA em 2015, causou prejuízos em torno de 170 milhões de dólares, afetando não somente a indústria pesqueira, aquícola e o turismo, como também causando a morte de muitos mamíferos marinhos (McCabe, Hickey et al. 2016).

Para compreender o potencial de produção de AD das diferentes espécies de *Pseudo-nitzschia*, diversos estudos foram realizados a partir de cultivos estabelecidos com cepas provenientes de diversos locais do mundo e as duas espécies encontradas neste estudo já demonstraram capacidade de produzir toxina em condição de cultivo, ainda que em baixas concentrações. Assim, *P. calliantha* foi capaz de produzir pequenas concentrações de AD, variando de 0,02  $\text{pg.cel}^{-1}$  (Lundholm, Skov et al. 1997), 0,01  $\text{pg.cel}^{-1}$  (Martin, Haya et al. 1990, Álvarez, Uribe et al. 2009) a quantidades tão baixas quanto 0,054  $\text{fg.cel}^{-1}$  (Wadt, Mafra et al. 2017). Este último estudo foi, inclusive, o primeiro relato de produção de AD a partir de uma cepa de *P. calliantha* coletada no Atlântico Sul. A outra espécie – *P. pungens* – geralmente revela-se não tóxica, como cepas originárias do CEP (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Wadt, Mafra et al. 2017), mas quantidades variáveis de AD foram produzidas por algumas poucas cepas de diferentes regiões: Nova Zelândia (0,47  $\text{pg.cel}^{-1}$ ; (Rhodes 1998)), EUA (1.8  $\text{fg.cel}^{-1}$ ; (Baugh, Bush et al. 2006)) e Canadá (1-20  $\text{pg.cel}^{-1}$ ; (Bates, Bird et al. 1989)). O conteúdo intracelular de AD em diferentes espécies de *Pseudo-nitzschia* varia conforme fatores genéticos, composição bacteriana associada, fase de crescimento, concentração de nutrientes presentes no meio, ocorrência de turbulência, intensidade de luz e fotoperíodo (Bates, Garrison et al. 1998, Mos 2001, Wadt, Mafra et al. 2017). Ademais, a turbulência estimula a formação de longas cadeias celulares e, com isso, a ostra intensifica o processo de rejeição destas partículas e aumenta a produção de pseudofezes, consequentemente reduzindo a taxa de assimilação e retenção de toxina em seus tecidos (Mafra Jr, Bricelj et al. 2009, Wadt, Mafra et al. 2017).

Desta forma, ainda que muitas espécies possivelmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia* spp. ocorram no litoral sul do Brasil (Mafra Jr, Fernandes et al. 2006, Fernandes and Brandini 2010,

Tibiriçá, Fernandes et al. 2015), estas espécies possuem baixo teor de toxinas, comprovando a baixa incidência de surtos de contaminação por AD nesta região até o momento. Contudo, considerando a possibilidade de condições climáticas excepcionais e a introdução de novas populações/espécies, somente o monitoramento periódico garantirá a segurança alimentar dos consumidores de bivalves no estado do Paraná.

### 3.4.2.3 Monitoramento de microalgas potencialmente tóxicas e legislação no Brasil

A presença de microalgas tóxicas em áreas de cultivo gera uma preocupação adicional com referência à segurança alimentar dos consumidores de bivalves. No Brasil, o monitoramento oficial de ficotoxinas juntamente com o monitoramento microbiológico iniciou em 2005, através do já extinto Comitê Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (CNCMB) (Proenca and Schramm 2013). Atualmente o monitoramento de toda a produção da maricultura destinada ao consumo humano é de responsabilidade do Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), instituído pela Instrução Normativa Interministerial nº 7, de 8 de maio de 2012 (Brasil 2012). Além desta, a Instrução Normativa nº 3, de 13 de abril de 2012 (Brasil 2012), institui o RENAQUA, rede oficial de laboratórios responsáveis pelas análises oficiais e diagnósticos, e define os principais tipos de intoxicação por consumo de bivalves e as espécies de microalgas produtoras de toxinas. A definição dos limites máximos aceitáveis de ficotoxinas produzidas por microalgas para interdição, ou não, das áreas onde há cultivos consta na Portaria nº 175 de 15 de maio de 2013 (Brasil 2013). Esta portaria institui os limites regulatórios para o AO e o AD em até 0,16 e 20 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, saxitoxinas em até 0,8 mg.Kg<sup>-1</sup>, yessotoxinas em até 1,0 mg.Kg<sup>-1</sup> e azaspirácidos em até 0,16 mg.Kg<sup>-1</sup>. As metodologias analíticas oficiais são definidas através da Portaria nº 204, de 28 de junho de 2012 (Brasil 2012), e para o monitoramento oficial, devem ser realizadas coletas com periodicidade mínima de 15 em 15 dias em cada área onde há extração ou cultivo de bivalves a fim de fiscalizar os níveis dos parâmetros estabelecidos na legislação pertinente. Quando há o aumento significativo da densidade das microalgas produtoras de toxinas, deve-se aumentar a frequência de coleta de água e moluscos para no mínimo, semanalmente. Caso sejam detectadas toxinas na carne dos bivalves em concentrações maiores que ao do limite regulatório, fica suspensa a extração e venda de bivalves destinados ao consumo humano até que as concentrações de toxinas estejam baixas.

### 3.5 Possíveis interações entre os micro-organismos estudados

O aumento da concentração de nutrientes favorece a produção primária e, conseqüentemente, o desenvolvimento de patógenos que podem gerar danos à aquicultura e também à saúde pública através do consumo de frutos do mar contaminados (De Rijcke, Van Acker et al. 2016). As correlações encontradas neste trabalho entre a abundância de *V. parahaemolyticus* e de *Pseudo-nitzschia* spp. ( $P=0,82$ ), sugerem que o fitoplâncton pode favorecer o crescimento microbiológico e a dispersão de patógenos no meio por fornecer substrato e microambientes e promover o desenvolvimento de *V. parahaemolyticus* na coluna d'água (Kaneko and Colwell 1977, Rehnstam-Holm, Godhe et al. 2010, Martinez-Urtaza, Blanco-Abad et al. 2012, Takemura, Chien et al. 2014). Além disso, proporcionam maior concentração deste patógeno nos tecidos moles das ostras pois além de utilizar o fitoplâncton como substrato, também é o principal componente alimentar destes moluscos bivalves (Ward 1996). Paralelamente, tanto o aumento na densidade de *Vibrio* sp. quanto a incidência e magnitude das florações de algas nocivas podem estar relacionados a alterações climáticas de maior escala (De Rijcke, Van Acker et al. 2016).

A ocorrência simultânea de microorganismos patogênicos e microalgas tóxicas pode afetar o desenvolvimento das ostras, principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento (Romalde, Dieguez et al. 2014). Como resultado, a exposição dos bivalves a florações de microalgas tóxicas podem afetar a susceptibilidade dos bivalves aos agentes patogênicos (De Rijcke, Van Acker et al. 2016), como sugerido neste estudo pela forte correlação de *D. cf. acuminata* com a prevalência de *Perkinsus* sp. ( $P=0,87$ ). Outro exemplo é associação de *P. marinus* à cianobacteria *Synechocystis* sp., que quando fagocitada pelo parasito, fornece nutrientes e favorece seu desenvolvimento, tornando as ostras mais suscetíveis a infecções pelo parasito em um outro estudo (Queiroga, Marques-Santos et al. 2017). Ainda, de acordo com Lassudrie, Wikfors et al. (2015), um dinoflagelado produtor de toxinas paralisantes, *Alexandrium fundyense*, estimulou a infecção por *P. marinus* em ostras *Crassostrea virginica*, além de que ostras infectadas por *Bucephalus* sp. apresentaram maior risco de infecção por *P. marinus* quando expostas a *A. fundyense*, devido a uma supressão dos mecanismos de defesa do bivalve. Além disso, ostras infectadas por *Bucephalus* sp. e expostas a grandes densidades de microalgas tóxicas, podem se tornar mais suscetíveis à predação por causa do comprometimento das fibras musculares, que impossibilita o correto fechamento e abertura das valvas. Contudo, apesar de não ser significativamente afetado de forma aguda pela exposição à *Alexandrium ostenfeldii*, *Perkinsus olseni* mostrou uma ocorrência decrescente em relação à abundância deste dinoflagelado tóxico, sugerindo um efeito deletério da microalga ao parasito

(Lassudrie, Soudant et al. 2014), da mesma forma que quando exposto ao dinoflagelado *Karenia selliformis* (da Silva, Hegaret et al. 2008).

Neste estudo, a densidade de *V. parahaemolyticus* foi inversamente relacionada à presença de *Perkinsus* sp. ( $P = -0,34$ ). Sendo assim, a densidade de várias espécies de *Vibrio* é capaz de intervir na presença de *P. marinus* em bivalves, já que o parasito produz substâncias que o permitem se desenvolver nos hemócitos das ostras (Smolowitz 2013), e ao mesmo tempo favorecem o crescimento de bactérias (incluindo *Vibrio* sp.) por suprimir a atividade bactericida que as ostras apresentam (Tall, Peyre et al. 1999).

Possíveis interações no ambiente natural entre *V. parahaemolyticus*, *Perkinsus* sp., *Dinophysis* sp. e *Pseudo-nitzschia* sp., como relatadas neste estudo, são raramente investigadas, existindo apenas estudos que avaliam os efeitos sinérgicos da exposição simultânea de bivalves a diferentes micro-organismos de uma forma geral. Tais estudos revelam que o metabolismo/fisiologia do bivalve é afetado pelos danos sinérgicos causados pela exposição a diferentes micro-organismos, acarretando maiores taxas de mortalidade dos bivalves infectados por comprometimento direto de seu sistema imunológico (Bricelj, Ford et al. 2011). Assim, mesmo micro-organismos que não são de notificação obrigatória deveriam ser considerados em programas de sanidade de moluscos bivalves, pelo potencial impacto que apresentam ao seu desenvolvimento, o que pode comprometer a cadeia produtiva aquícola.

#### 4 CONCLUSÕES

Em ambas as áreas estudadas, registrou-se a presença de *V. parahaemolyticus*. As grandes densidades deste patógeno apresentaram relação positiva com a temperatura. Entretanto, apesar dos limites estarem abaixo da legislação pertinente, a alta densidade deste patógeno, tanto na água como nas ostras analisadas, geram preocupação quanto a manutenção da atividade de cultivo e também aos possíveis danos à saúde humana.

Da mesma forma, foram conduzidas três diferentes metodologias para a detecção do protozoário parasito *Perkinsus* sp., e apesar de não ter sido possível identifica-lo em histopatologia, as análises em meio RFTM e por PCR demonstraram ser bastante compatíveis, por apresentarem resultados semelhantes de prevalência. Sendo assim, *Perkinsus* sp. apresentou valores significativos de prevalência em ambas as áreas estudadas do CEP e sua ocorrência esteve relacionada com a temperatura e salinidade da água. Desta forma, este é o primeiro relato da presença de *P. marinus* e *P. olseni* em ostras *Crassostrea* sp. no litoral do Paraná, portanto, sua ocorrência gera preocupação quanto a saúde dos bivalves e ao êxito da ostreicultura paranaense.

Embora o dinoflagelado *Dinophysis* cf. *acuminata* tenha ocorrido em baixas abundâncias na maior parte do tempo, a maior abundância em junho/16 evidenciou o início de uma floração deste dinoflagelado tóxico, onde foi possível detectar concentrações consideráveis da toxina diarreica ácido ocadaico (AO) no tecido de ostras coletadas neste período. Por outro lado, *Pseudo-nitzschia calliantha* dominou o fitoplâncton no mês de abril de 2017, mas não foi possível se detectar níveis relevantes da toxina amnésica ácido domoico (AD) nos tecidos das ostras, nem no material particulado em suspensão. Porém, deve-se considerar que esta espécie, em conjunto com *Pseudo-nitzschia pungens*, esteve presente no CEP em abundâncias maiores que o nível de alerta estabelecido por programas de monitoramento ao redor do mundo. Portanto, a presença de cultivos destinados ao consumo humano na região do CEP causa preocupação à manutenção da saúde dos consumidores de bivalves com relação à presença persistente e por vezes abundantes de espécies de microalgas produtoras de toxinas.

As correlações entre micro-organismos patogênicos e microalgas potencialmente tóxicas encontradas neste estudo sugerem que o fitoplâncton pode favorecer o crescimento microbiológico e a dispersão de patógenos no meio e também proporcionar maior concentração deste patógeno nos tecidos moles das ostras, já que o fitoplâncton é o seu principal componente alimentar. E conseqüentemente, a exposição dos bivalves a florações de microalgas tóxicas podem afetar a susceptibilidade dos bivalves aos agentes patogênicos, como por exemplo, o parasito do genero *Perkinsus*.

Desta forma, a frequente detecção de *Vibrio parahaemolyticus*, *Perkinsus* spp. e microalgas potencialmente tóxicas enfatiza a importância da aplicação da vigilância sanitária dos bivalves produzidos. Logo, é sugerida a implementação de um programa de monitoramento contemplando estes micro-organismos, visando a sanidade do produto ofertado, minimizando possíveis intoxicações alimentares e mantendo a sustentabilidade do cultivo.

## 5 REFERÊNCIAS

ADAPAR. (2016). "Liberação da retirada de ostras e mexilhões no litoral do Paraná." jan/2018, from <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=309&tit=a-hrefhttpwww.adapar.pr.gov.brmodulesnoticiasarticle.phpstoryid309NOTA-TECNICA-02-Liberada-a-Retirada-de-Ostras-e-Mexilhoes-no-Litoral-do-Paranaa>.

ADAPAR (2016). Proibida venda e consumo de ostras e mariscos produzidos no Paraná. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Curitiba, PR.

Almeida, M., F. Berthe, A. Thebault and M. T. Dinis (1999). "Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*." Aquaculture **177**(1-4): 325-332.

Álvarez, G., E. Uribe, S. Quijano-Scheggia, A. López-Rivera, C. Mariño and J. Blanco (2009). "Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile." Harmful Algae **8**(6): 938-945.

Alves-de-Souza, C., D. Varela, C. Contreras, P. de La Iglesia, P. Fernández, B. Hipp, C. Hernández, P. Riobó, B. Reguera, J. M. Franco, J. Diogène, C. García and N. Lagos (2014). "Seasonal variability of *Dinophysis* spp. and *Protoceratium reticulatum* associated to lipophilic shellfish toxins in a strongly stratified Chilean fjord." Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography **101**: 152-162.

Alves, A. B. V. B. (2016). Isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras cultivadas no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná. Monografia, Universidade Federal do Paraná.

Alves, T. P., M. A. Schramm, M. S. Tamanaha and L. A. d. O. Proença (2010). "Implementação e avaliação do monitoramento de algas nocivas e de ficotoxinas em um cultivo de moluscos em Florianópolis-SC." Atlântica (Rio Grande) **32**(1): 71-78.

Alves, T. P., M. A. Schramm, L. A. O. Proença, T. O. Pinto and L. L. Mafra, Jr. (2018). "Interannual variability in *Dinophysis* spp. abundance and toxin accumulation in farmed mussels (*Perna perna*) in a subtropical estuary." Environmental Monitoring Assess **190**(6): 329.

Anderle, P. N. (2004). Fitoplâncton na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Variação anual e recorrência interanual de espécies abundantes. Monografia, UFPR.

Anderson, C. R., M. R. P. Sapiano, M. B. K. Prasad, W. Long, P. J. Tango, C. W. Brown and R. Murtugudde (2010). "Predicting potentially toxigenic *Pseudo-nitzschia* blooms in the Chesapeake Bay." Journal of Marine Systems **83**(3-4): 127-140.

Anderson, D. M., P. Andersen, V. M. Bricelj, J. J. Cullen and J. J. Rensel (2001). Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. APEC #201-MR-01.1. S. Asia Pacific Economic Program, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical. Paris, Unesco. **Series n. 59**.

APHA, AWWA and WEF (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. American, Public, Health and Association. Washington. **Ed. n. 22:** 1360 pp.

Ashton-Alcox, K., Y. Kim and E. Powell (2006). *Perkinsus marinus* assay. Histological techniques for marine bivalve mollusks: NOAA Technical Memorandum H. S. R. Laboratory **27:** 153-164.

Azevedo, C., I. Padovan, L. Corral and P. Padovan (2005). "Ultrastructural description of an unidentified apicomplexan oocyst containing bacteria-like hyperparasites in the gill of *Crassostrea rhizophorae*." Dis. Aquat. Org., **65:** 153-157.

Barreto, N. E., O. V. de Sousa and R. H. S. dos Fernandes Vieira (2008). "Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão." Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal **2(2):** 18-31.

Bates, S., C. J. Bird, A. d. Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L. A. Hanic, G. R. Johnson, A. McCulloch, P. Odense and R. Pocklington (1989). "Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **46(7):** 1203-1215.

Bates, S. S., D. L. Garrison and R. A. Horner (1998). Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. Physiological ecology of harmful algal blooms. D. M. Anderson, A. D. Cembella and G. M. Hallegraeff. Heidelberg. **vol. 41:** p. 267-292.

Baugh, K. A., J. M. Bush, B. D. Bill, K. A. Lefebvre and V. L. Trainer (2006). "Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies." African Journal of Marine Science **28(2):** 403-407.

Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J. L. Romalde and M. J. Figueras (2010). "Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs." Environ Microbiol Rep **2(1):** 34-43.

Bisha, B., J. Simonson, M. Janes, K. Bauman and L. D. Goodridge (2012). "A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*." International Journal of Food Science & Technology **47(5):** 885-899.

Blanco-Abad, V., J. Ansele-Bermejo, A. Rodriguez-Castro and J. Martinez-Urtaza (2009). "Evaluation of different procedures for the optimized detection of *Vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples." Int J Food Microbiol **129(3):** 229-236.

Boehs, G., A. R. M. Magalhães, R. C. Sabry and L. O. Ceuta (2012). "Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira." Silva-Souza AT, Lizama MLA, Takemoto R, organizadores. Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos. Maringá: ABRAPOA: 165-194.

Bonilla, C. M. E. (2016). Examining the protozoan *Perkinsus* sp. in Mexican Pacific oyster aquaculture. Advocate Gaaliance.

Bower, S. M., S. E. McGladdery and I. M. Price (1994). "Synopsis of Infectious Disease and Parasites of Commercially Exploid Shellfish." Annual Review of Fish Diseases **4:** 1-199.

Brandao, R. P., G. Boehs, R. C. Sabry, L. O. Ceuta, S. Luz Mdos, F. R. Queiroga and P. M. da Silva (2013). "*Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil." Journal Invertebrate Pathology **112**(2): 138-141.

Brandão;, R. P., G. Boehs; and P. M. d. Silva (2012). "Health assessment of the oyster *Crassostrea rhizophorae* on the southern coast of Bahia, northeastern Brazil." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Brandini, F. P. (1985). "Seasonal succession of the phytoplankton in the bay of Paranagua (Parana state - Brazil)." Revista Brasileira de Biologia **45**: 687-694.

Brandini, F. P., A. S. da Silva, E. T. da Silva and H. Kolm (2007). "Sources of Nutrients and Seasonal Dynamics of Chlorophyll in the Inner Shelf off Paraná State, South Brazil Bight." Journal of Coastal Research **235**: 1131-1140.

Brandini, F. P. and C. L. B. Moraes (1986). "Composição e distribuição do fitoplâncton em áreas costeiras e oceânicas da região Sueste do Brasil. ." Nerítica **1**(3): 9-19.

Brandini, F. P., C. L. B. Moraes and C. A. C. Thamm (1989). "Shelf-break upwelling, subsurface maxima of chlorophyll and nitrite, and vertical distribution of a subtropical nano-microplankton community off southeastern Brazil." Memórias do III Encontro Brasileiro de Plâncton 47-55.

Brasil (2001). Resolução n. 12 de 02 de janeiro de 2001. . Aprova o regulamento tecnico e principios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. M. d. S. A. N. d. V. Sanitária. Brasília, Diario Oficial da Republica Federativa do Brasil.

Brasil (2012). Instrução normativa interministerial n. 7, de 8 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). P. e. A. Ministério da Pesca e Aquicultura; Ministério da Agricultura. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Brasil (2012). Instrução Normativa n. 3, de 13 de abril de 2012. Instituir a Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA. M. d. p. e. Aquicultura. Brasília, Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil.

Brasil (2012). Portaria n. 204, de 28 de junho de 2012. Estabelecer os procedimentos para coleta de amostras para realização de análises de micro-organismos contaminantes e de toxinas em moluscos bivalves e de análises para o monitoramento de espécies de microalgas potencialmente produtoras de toxinas. M. d. P. e. Aquicultura. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Brasil (2013). Portaria n. 175, de 15 de maio de 2013. Os critérios a serem utilizados para a definição de retirada de moluscos bivalves e liberação de área com retirada suspensa de acordo com os resultados das análises de biotoxinas e microbiológicas. M. d. P. e. Aquicultura. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Brasil (2015). Portaria n. 19, de 4 d fevereiro de 2015. Define a lista de doenças de notificação obrigatória de animais aquáticos ao Serviço Veterinário Oficial (SVO). M. d. P. e. Aquicultura. Brasília, Diário Oficial da União.

Bricelj, V., S. E. Ford, C. Lambert, A. Barbou and C. Paillard (2011). "Effects of toxic *Alexandrium tamarense* on behavior, hemocyte responses and development of brown ring disease in *Manila clams*." Marine Ecology Progress Series **430**: 35-48.

Burreson, E. M. (2008). "Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections." Diseases of Aquatic Organisms **80**(1): 81-83.

Burreson, E. M. and C. Ragone (1996). "Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985." Journal of Shellfish Research **15**(1): 17-34.

Bush, A. O., K. D. Lafferty, J. M. Lotz and A. W. Shostak (1997). "Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited." The Journal of Parasitology **83**(4): 575.

Calazans, D., J. H. Muelbert and E. Muxagata (2011). Organismos Planctônicos. Estudos Oceanográficos: Do Instrumental ao Prático, Editora Textos Pelotas, RS: 200-274.

Casas, S. M., A. Villalba and K. S. Reece (2002). "Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity." Diseases of Aquatic Organisms **50**(1): 51-65.

Ceccarelli, D. and R. R. Colwell (2014). "Vibrio ecology, pathogenesis, and evolution." Front Microbiol **5**: 256.

Chalcoski, G. M. S. (2014). Bactérias do gênero vibrio em ostras cultivadas na ponta oeste, Ilha do Mel, Paranaguá-PR. Monografia apresentada no Curso de Graduação em Tecnologia em Aquicultura, Universidade Federal do Paraná.

Chalkoski, G. M. S. (2014). Pesquisa de bactérias do gênero Vibrio em água do cultivo de ostras na Ponta Oeste, Ilha do Mel, Paranaguá, PR. Monografia, Universidade Federal do Paraná.

Cho, K.-S. and K.-I. Park (2010). "Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters." Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea: 269-281.

CIDASC. (2016). "Nota técnica 02/2016. Manutenção da proibição da retirada, comercialização e consumo de moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras)." jan/2018, from file:///C:/Users/Paula/Desktop/\_PAPERS%2001.03.17/PROJETO/novos%20papers/01.03.18/novos%20papers/microalgas/nota%20tecnica%20CIDASC\_03.06.2016%20grande%20floração%20de%20dinophysis%20em%20SC.pdf

CIDASC (2016). Nota Técnica – 001/2016. Proibição da retirada, comercialização e consumo de moluscos bivalves (ostras, vieiras, mexilhões e berbigões) devido à detecção de Toxina Diarreica – DSP. Florianópolis, SC.

CIDASC. (2017). "Nota técnica n. 004/2017: Manutenção da proibição da retirada, comercialização e consumo de moluscos bivalves (ostras, vieiras, mexilhões e berbigões) apenas para áreas com resultado positivo para a toxina PSP." jan/2018, from file:///C:/Users/Paula/Desktop/\_PAPERS%2001.03.17/PROJETO/novos%20papers/01.03.18/novos%20papers/microalgas/CIDASC\_NOTA-TÉCNICA-004\_2017\_PSP%20alexandrium%20em%20SC.pdf.

Croci, L., E. Suffredini, L. Cozzi, L. Toti, D. Ottaviani, C. Pruzzo, P. Serratore, R. Fischetti, E. Goffredo and G. Loffredo (2007). "Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*." Journal of applied microbiology **102**(1): 229-237.

Cunha, A. C. L. B. d. (2016). Diagnóstico de *Perkinsus* em ostras no litoral catarinense. Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Aquicultura Universidade Federal de Santa Catarina.  
da Silva, P. M., C. P. Costa, J. P. de Araujo, F. R. Queiroga and A. A. Wainberg (2016). "Epizootiology of *Perkinsus* sp. in *Crassostrea gasar* oysters in polyculture with shrimps in northeastern Brazil." Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria **25**(1): 37-45.

da Silva, P. M., H. Hegaret, C. Lambert, G. H. Wikfors, N. Le Goic, S. E. Shumway and P. Soudant (2008). "Immunological responses of the *Manila clam* (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions." Toxicon **51**(4): 563-573.

da Silva, P. M., M. P. Scardua, R. T. Vianna, R. C. Mendonca, C. B. Vieira, C. F. Dungan, G. P. Scott and K. S. Reece (2014). "Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio Sao Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil." Journal of Invertebrate Pathology **119**: 62-71.

da Silva, P. M., M. P. Scardua, R. T. Vianna, R. C. Mendonça, C. B. Vieira, C. F. Dungan, G. P. Scott and K. S. Reece (2014). "Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil." Journal of invertebrate pathology **119**: 62-71.

da Silva, P. M., R. T. Vianna, C. Guertler, L. P. Ferreira, L. N. Santana, S. Fernández-Boo, A. Ramilo, A. Cao and A. Villalba (2013). "First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil)." Journal of invertebrate pathology **113**(1): 96-103.

Dantas-Neto, M. P., R. C. Sabry, L. P. Ferreira, L. S. Romão and R. Maggioni (2015). "*Perkinsus* sp. infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil." Brazilian Journal of Biology **75**(4): 1030-1034.

Day, J. W. (1989). Estuarine ecology, John Wiley & Sons.

De Rijcke, M., E. Van Acker, N. Nevejan, K. A. C. De Schamphelaere and C. R. Janssen (2016). "Toxic dinoflagellates and *Vibrio* spp. act independently in bivalve larvae." Fish & Shellfish Immunology **57**: 236-242.

Deeds, J. R., K. Wiles, G. B. t. Heideman, K. D. White and A. Abraham (2010). "First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters." Toxicon **55**(6): 1138-1146.

DePaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells and D. W. Cook (2003). "Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters." Applied and Environmental Microbiology **69**(3): 1521-1526.

Di Pinto, A., V. Terio, L. Novello and G. Tantillo (2011). "Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*." Food Control **22**(1): 124-127.

Díaz, P., C. Molinet, M. A. Cáceres and A. Valle-Levinson (2011). "Seasonal and intratidal distribution of *Dinophysis* spp. in a Chilean fjord." Harmful Algae **10**(2): 155-164.

Doblin, M. A., P. A. Thompson, A. T. Revill, E. C. Butler, S. I. Blackburn and G. M. Hallegraef (2006). "Vertical migration of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* under different concentrations of nutrients and humic substances in culture." Harmful Algae **5**(6): 665-677.

Drake, S. L., A. DePaola and L. A. Jaykus (2007). "An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **6**(4): 120-144.

Duan, J. and Y. C. Su (2005). "Comparison of a Chromogenic Medium with Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar for Detecting *Vibrio parahaemolyticus*." Journal of food science **70**(2).

Dumbauld, B. R., J. L. Ruesink and S. S. Rumrill (2009). "The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries." Aquaculture **290**(3-4): 196-223.

Edler, L. and M. Elbrächter (2010). The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. . Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis., Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco **vol. 55**: p. 13-20.

EPAGRI. (2018). "Santa Catarina é o principal produtor de mexilhões e ostras do Brasil e o segundo da América do Sul." Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca jan/18, from [http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=657](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=657).

Escalera, L., Y. Pazos, M. D. Doval and B. Reguera (2012). "A comparison of integrated and discrete depth sampling for monitoring toxic species of *Dinophysis*." Marine Pollution Bulletin **64**(1): 106-113.

European, Union, Reference, L. for, Marine, Biotoxins and (EU-RL-MB) (2015). Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS. version 5. S. A. y. N. A. Agencia Española de Consumo. Vigo, Spain.

European, Union, Reference, Laboratory, for, Marine, Biotoxins and (EU-RL-MB) (2008). Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. version 1. Agencia, Española, d. Seguridad, Alimentaria and N. (AESAN). Vigo, Spain.

FAO (2004). Marine biotoxins. Food and Nutrition papes. F. a. A. O. o. t. U. Nations. Rome.

FAO (2011). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. FAO/WHO. Rome, Italy.

FAO (2014). Fishery and Aquaculture Statistic. FAO Yearbook. F. Food and Agriculture Organization of the United Nation.

FAO. (2015). "The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations." jan/2018, from <http://www.fao.org/aquaculture/en/>

Farias, H. (2008). Qualidade higienico sanitaria na cadeia produtiva de ostras, Crassostrea sp. cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil. Dissertação apresentada no curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

FDA (2010). Bacteriological Analytical Manual: Most Probable Number from Serial Dilutions. F. a. D. Administration.

FDA/WHO (2011). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and technical report., . Microbiological Risk Assessment Series n.16. F. a. A. O. o. t. U. Nations. Rome.

Feldhusen, F. (2000). "The role of seafood in bacterial foodborne diseases." Microbes and Infection **2**(13): 1651-1660.

Fernandes, L. F. and F. P. Brandini (2004). "Diatom associations in shelf waters off Parana State, Southern Brazil: annual variation in relation to environmental factors." Brazilian Journal of Oceanography **52**(1): 19-34.

Fernandes, L. F. and F. P. Brandini (2010). "The potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the Paraná and Santa Catarina states, Southern Brazil." Iheringia Serie Botanica **65**(1): 47-62.

Fernandes, L. F., K. P. Cavalcante, L. A. D. O. Proença and M. A. Schramm (2013). "Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *P. calliantha*, and associated domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast." Diatom research **28**(4): 381-393.

Ferreira, T. M. (2013). Quantificação de bactérias do gênero *Vibrio* em Pontal do Sul, litoral do Paraná- PR. Monografia, Universidade Federal do Paraná.

Fuenzalida, L., L. Armijo, B. Zabala, C. Hernandez, M. L. Rioseco, C. Riquelme and R. T. Espejo (2007). "*Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile." International Journal of Food Microbiology **117**(3): 270-275.

Fujiki, H. and M. Suganuma (2009). Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. Marine toxins as research tools, Springer: 221-254.

Galtsoff, P. S. (1964). "The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin)." US Fish Wildlf. Serv. Fish. Bull. **64**: 1-480.

García-Altres, M., A. Casanova, M. Fernández-Tejedor, J. Diogène and P. de la Iglesia (2016). "Bloom of *Dinophysis* spp. dominated by *D. sacculus* and its related diarrhetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Alfacs Bay (Catalonia, NW Mediterranean Sea): Identification of DSP toxins in phytoplankton, shellfish and passive samplers." Regional Studies in Marine Science **6**: 19-28.

Grattan, L. M., S. Holobaugh and J. G. Morris (2016). "Harmful algal blooms and public health." Harmful Algae **57**: 2-8.

Green, M. R. and J. Sambrook (2001). Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor.

Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson and A. D. Cembella (2003). Harmful algal blooms: a global overview. Paris, France, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson and A. D. Cembella (2003). Manual on Harmful Marine Microalgae. Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.

Hara-Kudo, Y. and S. Kumagai (2014). "Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infection and verification by analyses of seafood contamination and infection." Epidemiol Infect **142**(11): 2237-2247.

Hara-Kudo, Y., T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, J. Hasegawa and S. Kumagai (2001). "Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood." Appl Environ Microbiol **67**(12): 5819-5823.

Haraguchi, L. and C. Odebrecht (2010). "Dinophysiales (Dinophyceae) in the farthest Southern region of Brazil (Winter 2005, Summer 2007)." Biota Neotropica **10**(3): 101-114.

Hasle, G. R. and G. A. Fryxell (1970). "Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy." Transactions of the American Microscopical Society: 469-474.

Hattenrath-Lehmann, T. K., M. A. Marcoval, H. Middlesdorf, J. A. Goleski, Z. Wang, B. Haynes, S. L. Morton and C. J. Gobler (2015). "Nitrogenous nutrients promote the growth and toxicity of *Dinophysis acuminata* during estuarine bloom events." PLoS One **10**(4): e0124148.

Hégaret, H., P. M. Da Silva, G. H. Wikfors, C. Lambert, T. De Bettignies, S. E. Shumway and P. Soudant (2007). "Hemocyte responses of *Manila clams*, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures." Aquatic toxicology **84**(4): 469-479.

ICES (2011). Dermo disease of oysters caused by *Perkinsus marinus*. Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. I. C. f. t. E. o. t. Sea. Denmaek: 30.

INMET. (2017). "Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa." nov/2017, from <http://www.inmet.gov.br/portal/>.

Kamiyama, T. and T. Suzuki (2009). "Production of dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-2 by a culture of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae)." Harmful Algae **8**(2): 312-317.

Kaneko, T. and R. R. Colwell (1977). "The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay." Microbial Ecology **4**(2): 135-155.

Kaufman, G., A. Bej, J. Bowers and A. DePaola (2003). "Oyster-to-oyster variability in levels of *Vibrio parahaemolyticus*." Journal of food protection **66**(1): 125-129.

Kramer, A. M., J. E. Ward, F. C. Dobbs, M. L. Pierce and J. M. Drake (2016). "The contribution of marine aggregate-associated bacteria to the accumulation of pathogenic bacteria in oysters: an agent-based model." Ecology and evolution **6**(20): 7397-7408.

La Peyre, M. K., S. M. Casas, W. Gayle and J. F. La Peyre (2010). "The combined influence of sub-optimal temperature and salinity on the in vitro viability of *Perkinsus marinus*, a protistan parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*." Journal of Invertebrate Pathology **105**(2): 176-181.

Lafferty, K. D., C. D. Harvell, J. M. Conrad, C. S. Friedman, M. L. Kent, A. M. Kuris, E. N. Powell, D. Rondeau and S. M. Saksida (2015). "Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics." Ann Rev Mar Sci **7**: 471-496.

Lana, P. C., E. Marone, R. M. Lopes and E. C. Machado (2001). "The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil." **144**: 131-145.

Lassudrie, M., P. Soudant, G. Richard, N. Henry, W. Medhioub, P. M. Da Silva, A. Donval, M. Bunel, N. Le Goïc and C. Lambert (2014). "Physiological responses of *Manila clams Venerupis* (= *Ruditapes*) philippinarum with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure." Aquatic toxicology **154**: 27-38.

Lassudrie, M., G. H. Wikfors, I. Sunila, J. H. Alix, M. S. Dixon, D. Combot, P. Soudant, C. Fabioux and H. Hegaret (2015). "Physiological and pathological changes in the eastern oyster *Crassostrea virginica* infested with the trematode *Bucephalus* sp. and exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*." Journal of Invertebrate Pathology **126**: 51-63.

Lassus, P., N. Chomérat, P. Hess and E. Nézan (2016). Toxic and harmful microalgae of the World Ocean—Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. Copenhagen, Denmark, Intl. Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA)/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), .

Lauckner, G. (1983). Diseases of Mollusca: Bivalvia. Diseases of marine animals. B. A. Helgoland. Hamburgo: 478-691.

le Peyre, J. and M. Faisal (1995). "*Perkinsus marinus* produces extracellular proteolytic factor (s) in vitro." Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.

Leal, N. C., S. C. da Silva, V. O. Cavalcanti, A. C. Figueiroa, V. V. Nunes, I. S. Miralles and E. Hofer (2008). "*Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil." Journal of Applied Microbiology **105**(3): 691-697.

Letchumanan, V., K.-G. Chan and L.-H. Lee (2014). "*Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques." Frontiers in microbiology **5**: 705.

Lindahl, O., B. Lundve and M. Johansen (2007). "Toxicity of *Dinophysis* spp. in relation to population density and environmental conditions on the Swedish west coast." Harmful Algae **6**(2): 218-231.

Lundholm, N., J. Skov, R. Pocklington and Ø. Moestrup (1997). "Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters." Phycologia **36**(5): 381-388.

Luz, L. F. G. (2016). Caracterização espacial das propriedades bio-ópticas da Baía de Paranaguá, durante um episódio no verão de 2016. Monografia apresentada no curso de graduação de oceanografia, Universidade Federal do Paraná.

Luz, M. d. S. A. and G. Boehs (2016). "*Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil." Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science: 191-198.

Luz, M. S. A., F. S. Carvalho, H. C. Oliveira and G. Boehs (2017). "*Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil." Brazilian Journal of Biology: 0.

Machado, M. (2002). Maricultura como base produtiva geradora de emprego e renda: Estudo de caso para o Distrito de Ribeirão da Ilha no Município de Florianópolis - SC- Brasil. Tese de Doutorado apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina.

Mackin, J. (1951). "Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier." Bulletin of Marine Science **1**(1): 72-87.

Mafra Jr, L. L., V. M. Bricelj and J. E. Ward (2009). "Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. II. Selective rejection." Aquatic Biology **6**: 213-226.

Mafra Jr, L. L., L. F. Fernandes and L. A. O. Proença (2006). "Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring." Brazilian Journal of Oceanography **54**(2-3): 107-121.

Mafra Jr, L. L., D. Lopes, V. C. Bonilauri, H. Uchida and T. Suzuki (2015). "Persistent Contamination of Octopuses and Mussels with Lipophilic Shellfish Toxins during Spring *Dinophysis* Blooms in a Subtropical Estuary." Marine Drugs **13**(6): 3920-3935.

Mafra Jr, L. L., T. Ribas, T. P. Alves, L. A. O. Proença, M. A. Schramm, H. Uchida and T. Suzuki (2015). "Differential okadaic acid accumulation and detoxification by oysters and mussels during natural and simulated *Dinophysis* blooms." Fisheries Science **81**(4): 749-762.

Mafra Jr., L. L., C. P. d. S. Tavares and M. A. Schramm (2014). "Diarrhetic toxins in field-sampled and cultivated *Dinophysis* spp. cells from southern Brazil." Journal of applied phycology **26**(4): 1727-1739.

Mafra Jr., L. L., P. K. W. Nolli, L. F. Luz, J. G. Leal, B. F. Sobrinho, B. P. Escobar, L. Juraczky, A. R. M. Gonzalez, L. E. Mota, T. V. Batista, J. G. B. Filho, L. C. Lima and M. A. Noernberg (2016). "Okadaic acid contamination during an exceptionally massive *Dinophysis* cf. *acuminata* bloom in southern Brazil." Poster on 17th International Conference on Harmful Algae - ICHA.

Margalef, R. (1978). "Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment." Oceanologica acta **1**(4): 493-509.

Mariné, G. F., P. P. O. Silva, G. M. de Oliveira and V. de Magalhães Ferreira (2010). "Detecção de ácido okadaico em cultivo de mexilhões *Perna perna*, Angra dos Reis, RJ." Ciência Rural **40**(1): 193-196.

Martin, J. L., K. Haya, L. E. Burrige and D. J. Wildish (1990). "*Nitzschia pseudodelicatissima*: a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada." Marine Ecology Progress Series **67**(2): 177-182.

Martinez-Urtaza, J., V. Blanco-Abad, A. Rodriguez-Castro, J. Ansedo-Bermejo, A. Miranda and M. X. Rodriguez-Alvarez (2012). "Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas." The ISME Journal **6**(5): 994-1006.

Martínez, A., S. Méndez, A. Fabre and L. Ortega (2017). "Intensificación de floraciones de dinoflagelados marinos en Uruguay." Innotec **13**.

Matsushita, M. S. (2014). Trabalhos da Extensão Rural com uso de Geoprocessamento. I. Emater.

Matté, G. R., M. Matté, M. Sato, P. Sanchez, I. Rivera and M. Martins (1994). "Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil." Journal of Applied Microbiology **77**(3): 281-287.

McCabe, R. M., B. M. Hickey, R. M. Kudela, K. A. Lefebvre, N. G. Adams, B. D. Bill, F. Gulland, R. E. Thomson, W. P. Cochlan and V. L. Trainer (2016). "An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions." Geophysical research letters **43**(19).

Menezes, M., S. Branco, L. Proença and M. Schramm (2007). "Brazil. Bloom of *Alexandrium minutum* Halim on Rio de Janeiro coast: occurrence and toxicity." Harmful algae news(34): 7-9.

Meng, L., T. Alter, T. Aho and S. Huehn (2015). "Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state." FEMS microbiology ecology **91**(5): fiv035.

Mos, L. (2001). "Domoic acid: a fascinating marine toxin." Environmental toxicology and Pharmacology **9**(3): 79-85.

Moser, G., A. Ciotti, M. F. C. Giannini, R. Tonini and J. Harari (2012). "Changes in phytoplankton composition in response to tides, wind-induced mixing conditions, and freshwater outflows in an urbanised estuarine complex." Brazilian Journal of Biology **72**(1): 97-111.

Moss, J. A., J. Xiao, C. F. Dungan and K. S. Reece (2008). "Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China." Jornal of Eukaryotic Microbiology **55**(2): 117-130.

Motes, M., A. DePaola, D. Cook, J. Veazey, J. Hunsucker, W. Garthright, R. Blodgett and S. Chirtel (1998). "Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*)." Applied and environmental microbiology **64**(4): 1459-1465.

Newman, S. G. (2015). "What can shrimp farmers do about EMS (AHPNS/AHPND)?"

Nielsen, L. T., B. Krock and P. J. Hansen (2012). "Effects of light and food availability on toxin production, growth and photosynthesis in *Dinophysis acuminata*." Marine Ecology Progress Series **471**: 37-50.

O'Boyle, S. and J. Silke (2009). "A review of phytoplankton ecology in estuarine and coastal waters around Ireland." Journal of Plankton Research **32**(1): 99-118.

OIE (2017). Infection with *Perkinsus marinus*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. W. O. f. A. Health.

OIE (2017). Infection with *Perkinsus Olseni*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. W. O. f. A. Health.

OIE. (2018). "Listed diseases, infections and infestations." from <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>.

OIE. (2018). "Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals." jan/2018, from <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>.

Oliveira, C. A. M. (2005). Variações espaciais e temporais da biomassa fitoplanctônica em uma área de malacocultura no município de Anchieta-ES. Monografia apresentada ao curso de graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Espírito Santo.

Oliver, J. D., C. Pruzzo, L. Vezzulli and J. B. Kaper (2013). *Vibrio* species. food microbiology, American Society of Microbiology: 401-439.

Omura, T., M. Iwataki, V. M. Borja, H. Takayama and Y. Fukuyo. (2012). Marine phytoplankton of the western pacific. Toquio, Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd.

Paranjpye, R. N., W. B. Nilsson, M. Liermann, E. D. Hilborn, B. J. George, Q. Li, B. D. Bill, V. L. Trainer, M. S. Strom and P. A. Sandifer (2015). "Environmental influences on the seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific Northwest of the USA." FEMS Microbiology Ecology **91**(12).

Parizzi, R. A., E. D. C. Machado, C. P. D. S. Tavares, L. F. Fernandes, M. G. D. Camargo and L. L. Mafra Jr (2016). "Primary productivity and phytoplankton dynamics in a subtropical estuary: a multiple timescale approach." Scientia Marina **80**(3): 291-303.

Passalacqua, P. L., E. Zavatta, G. Bignami, A. Serraino and P. Serratore (2016). "Occurrence of *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio Cholerae* and *Vibrio Vulnificus* in the Clam *Ruditapes Philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy." Italian Journal of Food Safety **5**(1): 5709.

Pereira, C. S., C. d. A. Possas, C. M. Viana and D. d. P. Rodrigues (2007). "Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna-perna*) comercializados em Nitorói, Rio de Janeiro." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **40**(1): 56-59.

Procopiak, L. K. (2004). Diatomáceas (Bacillariophyta) em águas de lastro de navios do Porto de Paranaguá, e na Baía de Paranaguá, PR, com ênfase em espécies exóticas e nocivas. 224 f. Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Proença, L. A. and M. A. Schramm (2013). Limites seguros para ficotoxinas em moluscos bivalves conhecendo a doença para elaborar estratégias de controle. Panorama da Aquicultura.

Proença, L. A. O., R. S. Fonseca and T. O. Pinto (2011). Microalgas em área de cultivo do litoral de Santa Catarina. São Carlos.

Proença, L. A. O., M. A. Schramm, M. S. Tamanaha and T. P. Alves (2007). "Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic." Harmful Algae News **33**.

Proença, L. A. O., M. S. Tamahana and N. P. Souza (2001). "The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in southern Brazilian waters." Atlântica **23**: 59-65.

Queiroga, F. R., L. F. Marques-Santos, H. Hegaret, R. Sassi, N. D. Farias, L. N. Santana and P. M. da Silva (2017). "Effects of cyanobacteria *Synechocystis* spp. in the host-parasite model *Crassostrea gasar* - *Perkinsus marinus*." *Aquatic Toxicology* **187**: 100-107.

Queiroga, F. R., R. T. Vianna, C. B. Vieira, N. D. Farias and P. M. Da Silva (2015). "Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil." *Parasitology* **142**(6): 756-766.

Raghunath, P. (2014). "Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*." *Front Microbiol* **5**: 805.

Ragone Calvo, L. M., C. F. Dungan, B. S. Roberson and E. M. Bureson (2003). "Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay." *Diseases of Aquatic Organisms* **56**(1): 75-86.

Ramos, R. J., L. A. Miotto, M. Miotto, N. Silveira Junior, A. Cirolini, H. S. d. Silva, D. d. P. Rodrigues and C. R. W. Vieira (2014). "Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* in oysters (*Crassostrea gigas*) and waters from bivalve mollusk cultivations in the South Bay of Santa Catarina." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **47**(3): 327-333.

Raszl, S. M., B. A. Froelich, C. R. Vieira, A. D. Blackwood and R. T. Noble (2016). "*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections." *Journal Applied Microbiology* **121**(5): 1201-1222.

Ray, S. M. (1954). *Biological studies of *Dermocystidium marinum* a fungus parasite of oysters*. Doutorado, The Rice Institute.

Reece, K. S., C. F. Dungan and E. M. Bureson (2008). "Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA." *Disease of Aquatic Organisms* **82**(3): 237-248.

Reguera, B., P. Riobo, F. Rodriguez, P. A. Diaz, G. Pizarro, B. Paz, J. M. Franco and J. Blanco (2014). "Dinophysis toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish." *Marine Drugs* **12**(1): 394-461.

Reguera, B., L. Velo-Suárez, R. Raine and M. G. Park (2012). "Harmful Dinophysis species: A review." *Harmful Algae* **14**: 87-106.

Rehnstam-Holm, A. S., A. Godhe, K. Härnström, P. Raghunath, V. Saravanan, B. Collin, I. Karunasagar and I. Karunasagar (2010). "Association between phytoplankton and *Vibrio* spp. along the southwest coast of India: a mesocosm experiment." *Aquatic Microbial Ecology* **58**: 127-139.

Reizopoulou, S., E. Strogyloudi, A. Giannakourou, K. Pagou, I. Hatzianestis, C. Pyrgaki and E. Granéli (2008). "Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata*." *Harmful Algae* **7**(2): 228-234.

Rhodes, L. L. (1998). "Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **32**(4): 537-544.

Ristori, C. A., S. T. Iaria, D. S. Gelli and I. N. Rivera (2007). "Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil." International Journal of Environmental Health Research **17**(4): 259-269.

Rodrigues, L. A. P. and C. D. Carvalho- Filho (2012). "Avaliação da ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía de Todos os Santos." **14**(19): 197-207.

Rojas, M. V. R., M. H. Matté, M. Dropa, M. L. D. Silva and G. R. Matté (2011). "Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and mussels in São Paulo, Brazil." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **53**(4): 201-205.

Romalde, J. L., A. L. Dieguez, A. Lasa and S. Balboa (2014). "New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review." Front Microbiol **4**: 413.

Sabry, R. C. (2010). Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário *Perkinsus*. Tese de doutorado apresentada no Programa de PósGraduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina.

Sabry, R. C., T. C. Gesteira, A. R. Magalhaes, M. A. Barracco, C. Guertler, L. P. Ferreira, R. T. Vianna and P. M. da Silva (2013). "Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceara State, Brazil." Journal of Invertebrate Pathology **112**(1): 24-32.

Sabry, R. C., T. C. V. Gesteira and G. Boehs (2007). "First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary-Ceará, Brazil." Brazilian Journal of Biology **67**(4): 755-758.

Sabry, R. C., R. D. Rosa, A. R. Magalhaes, M. A. Barracco, T. C. Gesteira and P. M. da Silva (2009). "First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast." Diseases of Aquatic Organisms **88**(1): 13-23.

Santos, J. D. (2015). *Vibrios* spp. em águas e ostras cultivadas na comunidade de Medeiros, Paranaguá, PR. Monografia apresentada no Curso de Graduação em Tecnologia em Aquicultura, Universidade Federal do Paraná.

Sar, E. A., M. E. Ferrario and B. Reguera (2002). Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. I. E. d. Oceanografía. Madrid, España.

Sar, E. A., I. Sunesen, A. B. Goya, A. S. Lavigne, E. Tapia, C. García and N. Lagos (2012). "First report of diarrhetic shellfish toxins in mollusks from Buenos Aires province (Argentina) associated with *Dinophysis* spp. : evidence of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and their acylderivatives." Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica **47**(1-2): 5-14.

Sar, E. A., I. Sunesen, A. S. Lavigne and A. B. Goya (2010). "*Dinophysis* spp. asociadas a detección de toxinas diarreas (DSTs) en moluscos y a intoxicación diarreaica en humanos (Provincia de Buenos Aires, Argentina)." Revista de biología marina y oceanografía **45**(3): 451-460.

Schramm, M. A., M. d. S. Tamahana, L. H. Baierão and L. A. d. O. Proença (2006). "Toxinas paralisantes em mexilhões *perna perna* em áreas de cultivo da costa sul do Brasil: estudo de caso." Alimentos e Nutrição **17**(4): 443-450.

Serratore P., Ciulli S., Piano A. and C. A. (2014). Criticism of the purification process of bivalve shellfish: Literature review and our industrial research experiences. Shellfish, human consumption health implication and conservation concerns. New York, US: 1-50.

Silva, C., N. Figueiredo, I. Martins and J. Lima (2017). "Protozoan Parasite *Perkinsus* sp." Infecting *Crassostrea rhizophorae* From the Coast of Rio Grande do Norte (Northeast of Brazil). Research Article **6**(5): 166.

Silva, N. d., V. C. Junqueira and N. F. Silveira (2010). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo, Varela.

Silveira, D. R., C. Milan, J. V. d. Rosa and C. D. Timm (2016). "Fatores de patogenicidade de *Vibrio* spp. de importância em doenças transmitidas por alimentos." Arquivos do Instituto Biológico **83**: 1-7.  
Smayda, T. J. (1997). "Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea." Limnology and Oceanography **42**: 1137-1153.

Smayda, T. J. (1997). "Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea." Limnology and oceanography **42**(5part2): 1137-1153.

Smetacek, V. (1988). Plankton characteristics. H. Postma, JJ Zijlstra (eds.), Ecosystem of the World, Continental Shelves. Elsevier, Amsterdam.: **27**: 93-130.

Smolowitz, R. (2013). "A review of current state of knowledge concerning *Perkinsus marinus* effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the eastern oyster)." Diseases of Aquatic Animals **50**(3): 404-411.

Soares, A. M., G. B. Zanette, D. A. De Souza, V. B. Saraiva, M. H. C. Baeta Neves and M. M. De Oliveira (2016). "Presença de microalgas nocivas associada ao cultivo de mexilhões *Perna perna* da Praia Rasa, Armação dos Búzios, RJ." Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego **10**(1): 99.

Sobrinho P, S., M. T. Destro, B. D. Franco and M. Landgraf (2010). "Correlation between environmental factors and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters harvested in the southern coastal area of Sao Paulo State, Brazil." Applied and Environment Microbiology **76**(4): 1290-1293.

Souza, D. A., G. B. Zanette, M. H. C. B. Neves, M. A. Schramm, L. A. O. Proença and M. M. Oliveira (2015). "Cultivo de Moluscos Bivalves: Algas Nocivas e Bases para Programa de Monitoramento de Ficotoxinas em Fazenda de Maricultura de Arraial do Cabo, RJ." Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego **9**(1): 119-139.

Stehr, C. M., L. Connell, K. A. Baugh, B. D. Bill, N. G. Adams and V. L. Trainer (2002). "Morphological, toxicological, and genetic differences among *Pseudo-Nitzschia* (Bacillariophyceae) species in inland embayments and outer coastal waters of Washington State, USA." Journal of Phycology **38**(1): 55-65.

Sühnel, S., S. C. Johnson, H. J. Gurney-Smith, C. D. S. Ivachuk, A. L. C. Schaefer, C. A. Thomson, M. L. T. Maciel, M. L. Martins, R. Aranguren, A. Figueras and A. R. M. Magalhães (2016). "A

Status Assessment of Perkinsiosis, Bonamiosis, and Mateiliosis in Commercial Marine Bivalves from Southern Brazil." Journal of Shellfish Research **35**(1): 143-156.

Takemura, A. F., D. M. Chien and M. F. Polz (2014). "Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level." Frontiers in Microbiology **5**: 38.

Tall, B. D., J. F. L. Peyre, J. W. Bier, D. B. Shah, M. D. Miliotis and M. Faisal (1999). "*Perkinsus marinus* Extracellular Protease Modulates Survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Hemocytes." Applied and Environmental Microbiology **september**: 4261–4263.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski and S. Kumar (2013). "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." Molecular biology and evolution **30**(12): 2725-2729.

Tavares, J. F., L. A. d. O. Proença and C. Odebrecht (2009). "Assessing the harmful microalgae occurrence and temporal variation in a coastal aquaculture area, southern Brazil."

Thamm, C. A. C. (1990). Características Ecológicas do Fitoplâncton da Baía de Paranaguá: Fotossíntese e Ciclo Anual da Biomassa na Superfície em Relação aos Parâmetros Ambientais. Dissertação apresentada no Mestrado em Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Thessen, A. E., Q. Dortch, M. L. Parsons and W. Morrison (2005). "Effect of Salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) Growth and Distribution." Journal of Phycology **41**(1): 21-29.

Thompson, J. R., L. A. Marcelino and M. F. Polz (2005). Diversity, Sources, and Detection of Human Bacterial Pathogens in the Marine Environment. Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. B. a. Colwell. New York, Springer: 29-68.

Tibiriçá, C. E. J. d. A., L. F. Fernandes and L. L. Mafra Junior (2015). "Seasonal and Spatial Patterns of Toxigenic Species of *Dinophysis* and *Pseudo-nitzschia* in a Subtropical Brazilian Estuary." Brazilian Journal of Oceanography **63**(1): 17-32.

Trainer, V. L. and F. J. Hardy (2015). "Integrative monitoring of marine and freshwater harmful algae in Washington State for public health protection." Toxins **7**(4): 1206-1234.

Utermöhl, H. (1958). "Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel." Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen **9**(1): 1-38.

Vieira, C. B. (2014). Estudo da Perkinsiose em ostras *Crassostrea gasar* cultivadas no Estuário do Rio Mamanguape (PB). Monografia apresentada no Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Paraíba.

Villalba, A., C. Gestal, S. Casas and A. Figueras (2011). "Perkinsiosis en moluscos." Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid: 181-242.

Villalba, A., K. S. Reece, M. Camino Ordás, S. M. Casas and A. Figueras (2004). "Perkinsiosis in molluscs: A review." Aquatic Living Resources **17**(4): 411-432.

Villalba, A., K. S. Reece, M. C. Ordás, S. M. Casas and A. Figueras (2004). "Perkinsosis in molluscs: a review." Aquatic Living Resources **17**(4): 411-432.

Villalobos, L. G., N. Santinelli, V. Sastre, B. Krock and J. L. Esteves (2015). "Dinophysis Species Associated with Diarrhetic Shellfish Poisoning Episodes in North Patagonian Gulfs (Chubut, Argentina)." Journal of Shellfish Research **34**(3): 1141-1149.

Wadt, P. R., L. L. Mafra, Jr., C. P. Dos Santos Tavares, L. F. Fernandes and L. A. de Oliveira Proenca (2017). "Growth, chain formation, and toxin production by southern Brazilian *Pseudo-nitzschia* isolates under laboratory conditions." Environmental Monitoring Assessment **189**(12): 621.

Ward, J. E. (1996). "Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing, and fate." Invertebrate Biology: 218-231.

Westphal, G. G. C.-. (2012). Ecologia da ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) em manguezais da Baía de Guaratuba - PR. Tese de Doutorado apresentada no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Universidade Federal do Paraná.

Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G. Matsumoto and J. Clardy (1985). "Diarrhetic shellfish toxins." Tetrahedron **41**(6): 1019-1025.

Zhang, L. and K. Orth (2013). "Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection." Curr Opin Microbiol **16**(1): 70-77.

Zingone, A. and H. O. Enevoldsen (2000). "The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management." Ocean & Coastal Management **43**(8-9): 725-748.

## 6 ANEXOS

ANEXO 1 – Parâmetros físico-químicos da água do mar coletados em Medeiros e na Ponta Oeste durante as campanhas amostrais entre junho/16 e junho/17.

Amostra	Local	Data	Temperatura (°C)	dp	Salinidade	dp	Transparência (m)	dp	Fosfato ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	dp	Silicato ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	dp	Amônio ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	dp	Nitrato ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	dp	
Parâmetros	Medeiros	jun/16	18		24		4,6										
		out/16	21,5	0,7	22	3,54	1,5	0,42	0,032	0,000	48,643	36,062	0,053	0,001	0,027	0,003	
		nov/16	25,5	0,7	20	0	2,6	0,56	0,031	0,000	29,079	1,173	0,053	0,000	0,026	0,003	
		abr/17	27	0	20	0	1,7	0,14	0,032	0,001	18,762	10,062	0,054	0,001	0,033	0,009	
		jun/17	22,5	0,7	21	1	1,8	0	0,034	0,001	48,587	8,469	0,053	0,000	0,059	0,015	
	Ponta Oeste	jun/2016	17		25		4,2										
		out/2016	21,5	0,7	27,5	0	1,5	0,42	0,0315	0,0007	48,643	36,062	0,053	0,001	0,027	0,002	
		nov/16	24	0	24,5	0,71	2,5	0,7	0,034	0,001	20,778	0,671	0,053	0,001	0,025	0,000	
		abr/17	26	0	25	0	2,3	0,7	0,033	0,002	23,743	2,348	0,053	0,000	0,026	0,003	
		jun/17	22,5	0	36	-	2	-	0,033	-	11,409	-	0,052	-	0,111	-	

ANEXO 2 - Abundância celular de diatomáceas cêntricas encontradas ao longo do estudo no Complexo Estuarino de Paranaguá.

Data	Local	Diatomáceas											
		Cêntricas											
		<i>Actinopychus sp</i>	<i>Chaetoceros sp</i>	<i>Coscinodiscus sp 1</i>	<i>Coscinodiscus sp 2</i>	<i>Cylindrotheca sp</i>	<i>Ditylum sp</i>	<i>Fragilaria sp</i>	<i>Lauderia anulata</i>	<i>Odonella sp</i>	<i>Rhizolenia setigera</i>	<i>Skeletonema sp</i>	<i>Lauderia anulata</i>
Jun16	Medeiros	0	0	3855	1118	0	0	0	0	154	4549	16074	0
Out16	Medeiros	0	0	0	231	3739	0	0	0	39	0	771	0
Nov16	Medeiros	0	18002	617	385	347	0	0	0	193	0	617	0
Abr17	Medeiros	0	0	1017	1056	1253	0	0	887	540	231	14841	887
Jun17	Medeiros	0	1465	2467	1484	0	0	540	0	154	1118	5782	0
Jun16	Ponta Oeste			2775									
Out16	Ponta Oeste	308	0	540	77	0	848	0	0	39	39	848	0
Nov16	Ponta Oeste	925	9541	2216	0	1022	0	887	0	0	0	810	0
Abr17	Ponta Oeste	0	1542	347	540	906	0	0	2236	0	289	158894	2236
Jun17	Ponta Oeste	39	116	1696	0	1272	0	1311	0	0	39	3546	0

ANEXO 3 - Abundância celular de diatomáceas penadas encontradas ao longo do estudo no Complexo Estuarino de Paranaguá.

Data	Local	Diatomáceas							
		Penadas							
		<i>Bacillaria sp</i>	<i>Meuniera membranacea</i>	<i>Pleurosigma sp</i>	<i>Pseudoonitzschia calliantha</i>	<i>Pseudoonitzschia pungens</i>	<i>Pseudo nitzschia total</i>	<i>Thalassionema sp1</i>	<i>Thalassionema sp2</i>
Jun16	Medeiros	0	0	116	0	0		964	0
Out16	Medeiros	0	0	3643	0	0		713	0
Nov16	Medeiros	0	0	925	0	0		0	0
Abr17	Medeiros	0	193	7825	422725	1002	423727	463	1079
Jun17	Medeiros	887	0	5146	0	0		1773	0
Jun16	Ponta Oeste			385				193	
Out16	Ponta Oeste	0	0	482	0	0		1079	0
Nov16	Ponta Oeste	0	0	790	0	0		1446	0
Abr17	Ponta Oeste	0	540	1176	233253	12354	245607	482	2795
Jun17	Ponta Oeste	0	0	1349	0	0		5589	0

ANEXO 4 - Abundância celular de dinoflagelados e outras espécies de microalgas encontradas ao longo do estudo no Complexo Estuarino de Paranaguá.

Data	Local	Dinoflagelados													Outros	
		<i>Alexandrium fraterculus</i>	<i>Ceratium furca</i>	<i>Ceratium fusus</i>	<i>Ceratium humile</i>	<i>Ceratium trichoceros</i>	<i>Ceratium tripus</i>	<i>Dinophysis cf acuminata</i>	<i>Gyrodinium sp</i>	<i>Noctiluca sp</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Prorocentrum scutellum</i>	<i>Protoceratium sp</i>	<i>Protoperidinium sp</i>		<i>Pyrocystis sp</i>
Jun16	Medeiros	0	116	0	0	0	0	617	0	116	193	116	0	0	0	0
Out16	Medeiros	0	0	0	0	0	0	0	887	0	0	0	0	0	0	0
Nov16	Medeiros	0	0	0	0	0	0	0	3754	0	0	0	0	0	0	193
Abr17	Medeiros	0	212	0	0	0	0	0	0	0	77	0	0	0	0	0
Jun17	Medeiros	0	39	0	0	0	0	193	13684	0	193	39	0	0	0	0
Jun16	Ponta Oeste	0	385	154	463	308	308	121265	0	0	1927	4202	0	154	0	39

Out16	Ponta Oeste	270	0	39	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	39
Nov16	Ponta Oeste	0	39	96	0	0	0	116	0	39	0	0	0	0	0	0
Abr17	Ponta Oeste	0	154	0	0	0	0	0	0	0	77	0	0	0	0	0
Jun17	Ponta Oeste	0	231	0	0	0	0	116	0	0	347	193	116	1002	39	39

ANEXO 5 - Intensidade e prevalência da infecção por *Perkinsus* sp. em meio RFTM.

Data	Local	Altura	Comprimento	Aparência	RFTM		Intensidade	Prevalência
					Brânquia	Reto		
jun/16	ponta oeste	7,1	6,3		ok			5/8=0,62
jun/16	ponta oeste	7,8	5,9					
jun/16	ponta oeste	8,1	5,6		ok			
jun/16	ponta oeste	7,9	5,9					
jun/16	ponta oeste	7,6	5,5		ok			
jun/16	ponta oeste	7,6	5,2		ok			
jun/16	ponta oeste	7,5	5,1					
jun/16	ponta oeste	7,2	5,5		ok			
jun/16	medeiros	10,7	5,6					3/12=0,25
jun/16	medeiros	7,6	6,2					
jun/16	medeiros	10,8	5,8		ok			
jun/16	medeiros	8	6,8		ok			
jun/16	medeiros	11,1	5,5					
jun/16	medeiros	8,7	6,6		ok			
jun/16	medeiros	9,4	5,8		ok			
jun/16	medeiros	11,2	8,1					
jun/16	medeiros	9,2	6,4					
jun/16	medeiros	7,9	7,1		ok			
jun/16	medeiros	8,4	6,1					
jun/16	medeiros	10,5	5,8					
set/16	medeiros	9,44			0	3	1	
set/16	medeiros	8,86			0	0	0	
set/16	medeiros	9,33			2	0	1	
set/16	medeiros	8,33			0	1	1	
set/16	medeiros	9,85			0	0	0	
set/16	medeiros	11,61			0	0	0	
set/16	medeiros	8,44			0	0	0	
set/16	medeiros	10,22			0	2	1	
set/16	medeiros	10,95			0	0	0	
set/16	medeiros	8,37			0	0	1	

set/16	medeiros	9,1			0	0	0	
set/16	medeiros	9,8			0	0	0	
set/16	medeiros	9,2			0	0	0	
set/16	medeiros	9,2			0	0	0	
set/16	medeiros	9			?	0	0	
set/16	medeiros	10,6			?	0	0	
set/16	medeiros	9			0	0	0	
set/16	medeiros	10,2			0	0	0	
set/16	medeiros	9			0	0	0	
set/16	medeiros	10,6			0	0	0	
nov/16	ponta oeste	9	6,2		1	1	1	
nov/16	ponta oeste	9,7	6,7		1	0	1	
nov/16	ponta oeste	9,8	6,1		1	0	1	
nov/16	ponta oeste	9,9	6,1		0	0	0	
nov/16	ponta oeste	9,3	5,8		0	0	0	
nov/16	ponta oeste	9,5	5,7		0	0	0	
nov/16	ponta oeste	9,6	5,8		6	0	1	
nov/16	ponta oeste	7,9	6,1		5	0	1	
nov/16	ponta oeste	8,2	6,5		5	5	1	
nov/16	ponta oeste	8,5	5,2		3	1	1	
nov/16	ponta oeste	8,7	5		0	6	1	12/20=0,75
nov/16	ponta oeste	7,9	5,4		6	0	1	
nov/16	ponta oeste	9,4	6		0	0	0	
nov/16	ponta oeste	9,9	5		6	5	2	
nov/16	ponta oeste	8	6		?	?	?	
nov/16	ponta oeste	8	6,2		6	0	1	
nov/16	ponta oeste	7,5	5,3		7	0	1	
nov/16	ponta oeste	10,4	5,8		0	0	0	
nov/16	ponta oeste	7	4,9		6	0	1	
nov/16	ponta oeste	9,5	6		?	?	?	
abr/17	medeiros	8,1	5,1		3	1	1	
abr/17	medeiros	7,9	5		3	0	1	
abr/17	medeiros	7,6	5,2		0	0	0	
abr/17	medeiros	9,2	6,2		0	0	0	
abr/17	medeiros	7,4	5,3		2	0	1	
abr/17	medeiros	7,8	6,4		0	0	0	3/20=0,15
abr/17	medeiros	7,5	5,9		1	0	1	
abr/17	medeiros	8,3	5,4		0	0	0	
abr/17	medeiros	8,9	5,6		0	0	0	
abr/17	medeiros	6,6	5,5		0	0	0	
abr/17	medeiros	8,7	5,7		0	0	0	

abr/17	medeiros	5,8	5,1	microscópio	0	0	0	
abr/17	medeiros	8,8	4,6		2	0	1	
abr/17	medeiros	7,5	5,7		0	0	0	
abr/17	medeiros	7,2	4,1		0	0	0	
abr/17	medeiros	8,4	5,6		5	0	1	
abr/17	medeiros	7,6	5,2		2	4	1	
abr/17	medeiros	7,6	5,5		0	0	0	
abr/17	medeiros	7,5	5,4		2	0	1	
abr/17	medeiros	7,2	5,6		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8,7	5,2	ostras de tamanho maior, mais gordas, mais limpas, sem poliquetas, com bastante ovócitos e durante a microscopia foi visualizado parasita	0	0	0	2/20=0,10
abr/17	ponta oeste	7,6	6,9		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8,9	5,5		1	2	1	
abr/17	ponta oeste	7,4	7		2	0	1	
abr/17	ponta oeste	8,7	5,8		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	9,1	5,7		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	9,3	7		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8	5,9		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8	5,7		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8	5,9		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	7,3	4,6		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8	5,9		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8,1	5,2		1	0	1	
abr/17	ponta oeste	7,8	5,7		2	0	1	
abr/17	ponta oeste	7,6	5,8		0	0	0	
abr/17	ponta oeste	8,8	5,5		5	0	1	
abr/17	ponta oeste	8,3	6,6		4	0	1	
abr/17	ponta oeste	8,4	5,3	0	0	0		
abr/17	ponta oeste	7,7	4,3	0	0	0		
abr/17	ponta oeste	9	4,6	0	0	0		
jun/17	ponta oeste	8,6	5,5	presença de muitos mexilhões pequenos aderidos na concha e a presença de alguns parasitas visíveis no microscópio	41	54	2	14/20=0,70
jun/17	ponta oeste	11,7	7,6		44	20	2	
jun/17	ponta oeste	9,5	7,5		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	10,7	7,5		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	10,6	7		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	10,2	7		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	8,5	6,8		6	0	1	
jun/17	ponta oeste	10,5	6,8		4	0	1	
jun/17	ponta oeste	10,8	6,6		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	9,5	5,4		1	0	1	
jun/17	ponta oeste	10,5	7,2		11	55	2	
jun/17	ponta oeste	8,6	5,3		24	13	2	

jun/17	ponta oeste	9,8	5,1		11	94	3	
jun/17	ponta oeste	9,6	5,7		12	2	2	
jun/17	ponta oeste	8,5	6,5		147	0	3	
jun/17	ponta oeste	10,5	5,6		113	0	3	
jun/17	ponta oeste	7	5,5		0	27	2	
jun/17	ponta oeste	9,3	5,6		6	291	4	
jun/17	ponta oeste	9	6,7		0	0	0	
jun/17	ponta oeste	10	6,4		90	459	4	
jun/17	medeiros	9,5	5,5		15	0	2	
jun/17	medeiros	8,5	5		0	0	0	
jun/17	medeiros	9	6,7		0	0	0	
jun/17	medeiros	8,8	6,7		4	0	1	
jun/17	medeiros	8,6	8,8		1	0	1	
jun/17	medeiros	8,9	6,1		0	185	3	
jun/17	medeiros	10,3	6,4		2	0	1	
jun/17	medeiros	8,3	5,5		0	0	0	
jun/17	medeiros	10,2	7		0	2	1	
jun/17	medeiros	9,3	5,5		0	0	0	
jun/17	medeiros	9,2	5,7		0	0	0	12/20=0,60
jun/17	medeiros	10	5,4		0	0	0	
jun/17	medeiros	8,8	4		13	0	2	
jun/17	medeiros	9,3	6		0	0	0	
jun/17	medeiros	10	6,5		0	0	0	
jun/17	medeiros	9	6,6		8	6	2	
jun/17	medeiros	9,5	6,3		0	375	4	
jun/17	medeiros	9,6	6,5		1009	390	4	
jun/17	medeiros	11,3	5,6		52	92	3	
jun/17	medeiros	8,6	7,6		29		2	

ANEXO 6 - Amostras de ostras infectadas por *Perkinsus* sp. confirmadas por PCR

Data	Local	RFTM	PCR (gênero)	PCR (espécie)	
jun/16	ponta oeste	ok	+	M	O
jun/16	ponta oeste				
jun/16	ponta oeste	ok	+		
jun/16	ponta oeste				
jun/16	ponta oeste	ok	+		
jun/16	ponta oeste	ok	+		
jun/16	ponta oeste				
jun/16	ponta oeste	ok	+		

jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros	ok	+		
jun/16	medeiros	ok	+		
jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros	ok	-		
jun/16	medeiros	ok	+		
jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros	ok	-		
jun/16	medeiros				
jun/16	medeiros				
set/16	medeiros	ok	-		
set/16	medeiros				
set/16	medeiros	ok	+		+
set/16	medeiros	ok	+		+
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros	ok	-		
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros	ok	-	+	
set/16	medeiros				
set/16	medeiros	ok	-	+	
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
set/16	medeiros				
nov/16	ponta oeste	ok	+		
nov/16	ponta oeste	ok	+		
nov/16	ponta oeste	ok	+		
nov/16	ponta oeste				
nov/16	ponta oeste				
nov/16	ponta oeste				
nov/16	ponta oeste	ok	+		
nov/16	ponta oeste	ok	+		
nov/16	ponta oeste	ok	fraco +		
nov/16	ponta oeste	ok	+		





jun/17	medeiros				
jun/17	medeiros	ok	+		
jun/17	medeiros	ok	+		
jun/17	medeiros	ok	+		
jun/17	medeiros	ok	+		
jun/17	medeiros	ok	+		