

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

**EFEITO DO GÁS NATURAL E DO GÁS METANO SOBRE
ZOOPLÂNCTON MARINHO TROPICAL
COM ÊNFASE EM COPEPODA**

XIOMARA FRANCESCA GARCÍA DÍAZ

RECIFE

2012

XIOMARA FRANCHESCA GARCÍA DÍAZ

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Oceanografia, do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de concentração Oceanografia Biológica.

Orientadora

Profa. Dra. Sigrid Neumann Leitão

Co-orientador

Prof. Dr. Ralf Schwamborn

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

D542e Díaz, Xiomara Franchesca García.
Efeito do gás natural e do gás metano sobre zooplâncton marinho tropical com ênfase em Copepoda / Xiomara Franchesca García Díaz. - Recife: O Autor, 2012.
xxii, 145 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Sigrid Neumann Leitão.
Co-Orientador: Prof. Dr. Ralf Schwamborn.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2012.
Inclui Referências.

1. Oceanografia. 2. Zooplâncton. 3. Copepoda. 4. Vazamento acidental. 5. Gás natural. 6. Gás metano. 7. Impacto ambiental. I. Leitão, Sigrid Neumann. (Orientadora). II. Schwamborn, Ralf. (Orientador). III. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.) BCTG/2013-049

XIOMARA FRANCESCA GARCÍA DÍAZ

**EFEITO DO GÁS NATURAL E DO GÁS METANO SOBRE ZOOPLÂNCTON
MARINHO TROPICAL COM ÊNFASE EM COPEPODA**

Examinadores:

Dra. SIGRID NEUMANN-LEITÃO – UFPE

Dr. RAUQUÍRIO MARINHO DA COSTA – UFPA

Dr. MAURO DE MELO JÚNIOR - UFRPE

Dra. LILIA PEREIRA DE SOUZA SANTOS - UFPE

Dr. PAULO SÉRGIO MARTINS DE CARVALHO - UFPE

Suplentes:

Dra. MARIA EDUARDA LACERDA DE LARRÁZABAL - UFPE

Dra. MARIA LUISE KOENING - UFPE

Tese defendida e aprovada em 14 de dezembro de 2012

RECIFE, 2012



*Grandes realizações não são feitas por impulso,
mas por uma soma de pequenas realizações*

Vincent Van Gogh



<http://www.mahalaski.com>

Dedico esta tese à vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Oceanografia da UFPE (Meu segundo lar), por me brindar as possibilidades estruturais, econômicas e emocionais para desenvolver e culminar esta pesquisa.

Estruturais, porque durante o andamento do meu projeto ganhamos instalações e equipamentos novos, que melhoraram nosso ambiente de trabalho. Como o plâncton, migramos do DOCEAN para o Museu de Oceanografia. Essa mudança, apesar de deixar saudades pelo espaço e momentos vividos, criou possibilidades para trabalhar com novas energias. Foi assim que a partir de 2011 iniciei a parte experimental do meu projeto no recém construído Laboratório de Cultivo do Museu de Oceanografia. Agora, ele está à disposição de todas as pessoas interessadas nessa aventura da experimentação com organismos vivos.

Econômicas, porque facilitou o financiamento da pesquisa proveniente de diferentes fontes. Agradeço à FACEPE pela bolsa de pós-graduação recebida durante a maioria do tempo de Doutorado. Agradeço ao CNPq pelo financiamento do Projeto "Transporte e Dispersão de uma Pluma de Gás Natural no Oceano: Caracterização Experimental, Modelagem Matemática e Avaliação de Impactos" que patrocinou à logística dos experimentos de gás natural realizados na região costeira de Suape. Adicionalmente agradeço ao CNPq pela bolsa durante os últimos meses de pós-graduação. Agradeço a PETROBRÁS pelo financiamento de material permanente e de consumo utilizado durante os experimentos e que agora fazem parte do inventário do Laboratório de Cultivo do Museu de Oceanografia. Agradeço especialmente à Profa. Enide Eskinazi Leça pela presteza na intermediação entre a PETROBRAS e o Museu na aquisição de material permanente e de consumo.

Emocional, porque se não fosse pela amizade e cordialidade das pessoas que conheci no DOCEAN, não teria conseguido concluir meu trabalho. Foram muitas as mãos que se estenderam quando mais precisei e, por isso, a todas essas pessoas devo meu agradecimento.

Agradeço especialmente a minha orientadora, professora Sigrid Neumann-Leitão, por ser apoio incondicional tanto profissionalmente como emocionalmente. Ela, como uma mãe carinhosa sempre disposta a escutar, mas ao mesmo tempo a exigir resultados, me incentivou e estimulou durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço à professora Maria Luise Koenig, que me ensinou durante os experimentos que o fitoplâncton é tão fascinante quanto o zooplâncton. A manutenção do cultivo de microalgas foi uma desculpa para o fortalecimento de um relacionamento de muito carinho e respeito.

Agradeço à professora Lilia Pereira De Souza Santos e a equipe do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia da UFPE (Cris, Bia, Deloa, Bruno) pela presteza e ajuda tanto disponibilizando as cepas de microalgas para o cultivo, como pela colaboração durante os experimentos de ecotoxicologia.

Agradeço especialmente ao Professor e amigo George Miranda e Família (Livia, Gabriel e Marina) por me acolher em sua casa durante a estadia em João Pessoa (Paraíba). Durante quatro meses de trabalho intenso na UFPB, George e Família me fizeram sentir em casa.

Agradeço ao Professor Mario Ungulino, ao Professor Pablo Moreira, à Pos-doutoranda Sueny Freitas e ao doutorando Hebertty Dantas, integrantes do Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/ Quimiometria (LAQA) da Universidade Federal da Paraíba, por colaborar na elaboração do procedimento para a medição das concentrações de CH₄ dissolvido na água do mar. O que para mim, no começo ia ser apenas a aplicação de uma metodologia terminou se transformando em um

aprendizado profundo sobre a química dos gases. Aprendi com a experiência, a dificuldade de trabalhar com coisas que não vemos e de medir o instável.

Agradeço a Babie, Renata e Gleice, por me apoiarem durante os experimentos de cultivo. Elas bem sabem a dificuldade do trabalho com organismos vivos. Sacrificaram finais de semana, feriados e noites para correr atrás dos copépodos ao meu lado. Mas a satisfação foi o aprendizado e o fortalecimento da amizade.

Agradeço aos meus amigos (Fabi, Pato, Dani, Vicky, Caro, Sergio, Leo, Thiago, Juliana), minha família brasileira de coração, por fazerem parte da minha vida, por tornarem incríveis os bons momentos e fazerem mais fáceis os momentos difíceis.

Agradeço à Professora Lucia Maria Gusmão, por transformar minha admiração por ela em profundo carinho. No laboratório, ela me contagiou com o gosto pela taxonomia, mas também me brindou colo quando mais precisava. Agora, aposentada, sem dúvida ficou um enorme vazio, não só pela falta da grande professora como também da grande mãe.

Agradeço aos meus amigos e colegas do Laboratório de Zooplâncton do Departamento de Oceanografia da UFPE (Tâmara, Andréa, Val, Renata, Simone, Gleice, Simone Jorge, Cinthya, Érica, Aislan, Pedro, Fenando, Mauro, Igor, Lucas e Alejandro), pelos fortes e diversos laços formados neste caminho acadêmico e profissional.

Agradeço enormemente à minha família por sua constante presença ainda na distância. As raízes que me sustentam são tão fortes que ainda nos momentos de saudades me mantém sempre em pé. Especialmente, agradeço à minha mãe, meu exemplo permanente de feminidade e fortaleza. Sempre mãe, mas com o tempo, cada vez mais amiga.

Durante este período comecei um dos relacionamentos mais importantes da minha vida. A alegria na amizade se tornou alegria no amor e

alegria na convivência. Agradeço a Cleiton Amancio Felix, meu esposo, pelo amor profundo e apoio incondicional. Nós dois começamos uma caminhada há quatro anos, e hoje me sinto muito feliz pelo que temos construído juntos. Agora começamos uma nova etapa, a família está crescendo e nosso amor continua crescendo ainda mais.

Agradeço à vida pelo imenso aprendizado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Local de estudo na área externa da Baía de Suape (Nordeste Brasileiro, Oceano Atlântico Tropical). 21
- Figura 1.2** - Desenho experimental de campo descrevendo os momentos dos arrastos de plâncton (b = antes da injeção de gás natural, GN = durante a injeção de gás natural, a = após a injeção) e o tipo de arrasto (H= Horizontal superficial; O = Oblíquo na coluna de água). 23
- Figura 1.3** - Perfil de salinidade e temperatura na coluna de água para cada campanha realizada nas águas costeiras de área externa da Baía de Suape (Nordeste Brasileiro) durante os experimentos de simulação de plumas de gás natural. 25
- Figura 1.4** - Abundância dos principais grupos zooplanctônicos registrados nas quatro campanhas (A-D) de simulação de vazamentos de Gás Natural em águas costeiras da Baía de Suape (Nordeste do Brasil). Relação entre abundância e os três momentos de injeção de gás natural (b = Antes; GN = Durante a vazão de gás natural fluxo; a = depois). 28
- Figura 1.5** - Ordenação MDS (Similaridade de Bray-Curtis) da abundância de espécies coletadas nas águas costeiras da Baía de Suape (Nordeste do Brasil) em quatro campanhas (A, B, C e D) nos três momentos da injeção de gás natural (Antes=b, Durante=GN e depois=a). Fração menor (120 μm) e maior (300 μm) do mesozooplâncton em superfície (H) e na coluna de 'água (O). 31

- Figura 2.1.1** - Produção diária de ovos por fêmea do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)). 51
- Figura 2.1.2** - Taxa de sobrevivência de adultos do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)). 51
- Figura 2.1.3** - Taxa de eclosão dos ovos (%) do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)). 52
- Figura 2.2.1** - Sobrevivência (%) dos adultos de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*. 69
- Figura 2.2.2** - Produção de ovos (ovos fem⁻¹ dia⁻¹) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*. 70
- Figura 2.2.3** - Taxa de eclosão dos ovos (%) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*. 71
- Figura 2.2.4** - Recrutamento diário de náuplios (Total náuplios dia⁻¹) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*. 72

- Figura 2.3.1** – Taxa de sobrevivência de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório. 89
- Figura 2.3.2** - Produção diária de ovos por fêmea de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório. 89
- Figura 2.3.3** – Taxa de eclosão dos ovos (%) de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório. 90
- Figura 3.1.1.** Valores médios da porcentagem de mortalidade de *Acartia lilljeborgii* ao final de 24 e 48 horas de exposição ao sulfato de zinco (n=3). Resultados apresentando separadamente a mortalidade para fêmeas, machos e sem distinção de sexos. 105
- Figura 3.1.2** - Controle da sensibilidade das populações de *Acartia lilljeborgii* à substância de referência Sulfato de Zinco em 24 e 48 horas. Resultados discriminando fêmeas, machos e sem distinção de sexos. 106
- Figura 3.2.1.** Fortificação da água do mar com diferentes concentrações de gás metano (CH₄) para análise mediante Cromatografia Gasosa (CG) e para uso no Teste ecotoxicológico (TET). 119
- Figura 3.2.2.** Equipamentos e materiais utilizados durante o Procedimento 1. A. Garrafas de vidro de fortificação (RF); B. Manômetro digital; C. Recipientes de amostragem (RA); D. Armazenamento dos RA em caixa de isopor; E. Cilindro de gás metano; F. Cromatógrafo Gasoso. 120

- Figura 3.2.3.** Preparação das amostras para determinação do metano dissolvido na água usando Cromatografia Gasosa (CG). 122
- Figura 3.2.4** - Níveis de gás metano utilizados no Teste Ecotoxicológico (TET). 129
- Figura 3.2.5** - Ensaio agudo do gás metano no copépode planctônico *Acartia lilljeborgii* 129
- Figura 3.2.6** - A. Relação da concentração de metano (mg L^{-1}) dissolvido em função do tempo (Horas) de contato para cada nível de concentração (N1:N5); B. Acréscimo da concentração de metano (mg L^{-1}) em cada nível (N1:N5) para as réplicas consecutivas de acordo com as horas de exposição do TET. 132
- Figura 3.2.7** - A. Sobrevivência (%) dos adultos; B. Produção de ovos (ovos $\text{fem}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); C. Recrutamento diário de náuplios (Total náuplios dia^{-1}) dos copépodes planctônicos *Acartia lilljeborgii* durante o ensaio agudo do gás metano (96 horas). 134

LISTA DE TABELAS

Tabela A - Composição do gás natural.	6
Tabela 1.1 - Dados de campo dos experimentos de simulação de plumas de gás natural com a informação de fluxo de vazão de gás, momento da realização dos arrastos de plâncton com relação à injeção de GN (b=Antes, GN=Durante a injeção de gás natural, a=depois) e maré no momento dos arrastos (PM = preamar, VZ = vazante, BM = baixa mar, EN= enchente).	21
Tabela 1.2 - Resultados do teste não-paramétrico de Mann-Whitney mostrando as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na abundância e biomassa sestônica entre frações do mesozooplâncton (120-300 μm), tipo de arrasto (superfície e coluna de água), períodos climáticos (seco-chuvoso), marés (Quadratura e Sízigia), momentos dos arrastos com relação a injeção de gás natural (antes, durante e depois a injeção) e campanhas (A,B,C e D).	27
Tabela 1.3 - Resumo dos resultados do teste Wilcoxon (signed rank test) das abundâncias dos principais grupos encontrados nas amostras de plâncton comparando os momentos de coleta com relação a injeção de gás natural (b=antes; GN=durante; a=após). A tabela indica a relação entre as abundâncias pela direção do símbolo (< = menor que; > = maior que) e o nível de significância ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).	32
Tabela 2.1.1 – Densidades microalgais usadas para determinar a produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência dos adultos do copépode <i>Temora turbinata</i> .	46

Tabela 2.1.2 – Médias e desvios padrão de cada parâmetro calculado para <i>Temora turbinata</i> alimentados com diferentes dietas de microalgas (<i>T. weissflogii</i> (T.w.), <i>T.chuii</i> (T.c.) e <i>T. weissflogii</i> + <i>T.chuii</i> (T.w.+T.c.)).	50
Tabela 2.1.3 – Resultados do teste ANOVA de duas vias (com interações) para comparar a influência das dietas de microalgas e dias do experimento sobre a produção de ovos, a taxa de eclosão e sobrevivência de adultos do copépoda <i>Temora turbinata</i> . *Diferenças significativas, $p < 0.05$.	50
Tabela 2.2.1 - Dados do biovolume (BV) e biomassa celular (BM) de <i>Thalassiosira weissflogii</i> (T.w.) e <i>Chaetoceros gracilis</i> (C.g.) para determinação da densidade celular de cada tratamento.	63
Tabela 2.2.2 - Média \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados nos copépodes de <i>Acartia lilljeborgii</i> alimentados durante 8 dias com diferentes densidades das diatomáceas <i>Thalassiosira weissflogii</i> (T.w.) e <i>Chaetoceros gracilis</i> (C.g.).	73
Tabela 2.2.3 - Resumo da ANOVA de dois fatores e o teste <i>a posteriori</i> Tukey comparando: A. Espécie de diatomácea e densidade microalgal; B. Densidade microalgal (D) e dias do experimento (d) para cada diatomácea fornecida como recurso alimentar. * indica diferenças significativas.	74
Tabela 2.3.1 - Médias e desvios padrão de cada parâmetro calculado para <i>Temora turbinata</i> e <i>Acartia lilljeborgii</i> alimentados com <i>T. weissflogii</i> .	90
Tabela 2.3.2 - Resumo dos resultados do teste-t comparando a sobrevivência e reprodução de <i>Temora turbinata</i> e <i>Acartia lilljeborgii</i> alimentados com <i>T. weissflogii</i> .	90

Tabela 3.1.1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos medidos no início e final do teste de sensibilidade de <i>Acartia lilljeborgii</i> ao sulfato de zinco (n=3).	102
Tabela 3.1.2 - Resumo do teste ANOVA (Dois fatores) comparando a mortalidade de adultos de <i>Acartia lilljeborgii</i> às 24 e 48 horas (Tempo) e nos diferentes tratamentos (Concentrações). *Diferenças significativas: $F_{crit} < F_{calc}$; $p < 0,05$.	102
Tabela 3.1.3. Resultados de CL_{50} (IC 95%) nos ensaios de sensibilidade (n=3) de <i>A. lilljeborgii</i> ao sulfato de zinco e sua equivalência em Zinco.	104
Tabela 3.1.4 - Comparação da sensibilidade de copépodes planctônicos estuarinos e marinhos ao Zinco.	107
Tabela 3.2.1 - Concentrações de CH_4 utilizadas para preparação das soluções-teste.	117
Tabela 3.2.2 - Resumo das condições do ensaio ecotoxicológico	128
Tabela 3.2.3 - Resultado da análise da concentração de metano ($mg L^{-1}$) dissolvido na água do mar (salinidade 35) em diferentes níveis de concentração (BR e N1 a N5) nas 4 réplicas de fortificação com CH_4 correspondentes aos tempos de exposição do TET (0 a 96 horas) e nos dois momentos de contato com atmosfera das soluções teste fortificadas (0 e 24 horas). * Valor fora da média.	131
Tabela 3.2.4 - Resumo do teste ANOVA (Dois fatores) comparando os níveis de fortificação da água do mar com gás metano e as réplicas de fortificação. *Diferenças significativas: $F_{crit} < F_{calc}$; $p < 0,05$.	131

Tabela 3.2.5 - Média \pm erro padrão dos parâmetros avaliados nos copépodes planctônicos *Acartia lilljeborgii* durante o ensaio agudo do gás metano (96 horas). 135

Tabela 3.2.6 - Resumo da ANOVA de dois fatores (teste a posteriori Tukey) comparando os tratamentos (concentrações de gás metano) e o tempo do teste (96 horas). 135

SUMÁRIO

RESUMO

INTRODUÇÃO GERAL

O Problema	2
A Substância Problema: O Gás Natural	4
O Gás Metano: Principal Composto Do Gás Natural	5
Produção e transporte de gás natural na plataforma continental: possíveis vias de vazamento.	7
Os Organismos Teste: O Zooplâncton e Os Copépodes	8
Os Objetivos e A Hipótese	10
Referências Bibliográficas	

CAPÍTULO 1. O EFEITO DE "BLOWOUTS" DE GÁS NATURAL NA ABUNDÂNCIA E COMPOSIÇÃO DO ZOOPLÂNCTON EM AMBIENTES TROPICAIS MARINHOS

Resumo	17
1.1. Introdução	18
1.2. Materiais e Métodos	20
1.3. Resultados	24
1.3.1. Condições Ambientais	24
1.3.2. Associações Zooplânctônicas	26
1.3.3. Zooplâncton vs. gás natural	30
1.4. Discussão	32
1.5. Conclusões	37
Agradecimentos	
Referências Bibliográficas	

CAPÍTULO 2. CULTIVO DE COPÉPODES PLANCTÔNICOS CALANÓIDEOS PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS: *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889 e *Temora turbinata* (Dana, 1849)

PARTE 1. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DIETAS DE MICROALGAS PARA O CULTIVO DO COPÉPODE CALANOIDEO *Temora turbinata* (Dana, 1849) EM LABORATÓRIO.

Resumo	43
2.1.1. Introdução	44
2.1.2. Material e Métodos	45
2.1.2.1. Cultivo de microalgas	45
2.1.2.2. Coleta dos copépodes	46
2.1.2.3. Cultivo dos copépodes	47
2.1.2.4. Análise dos dados	48
2.1.3. Resultados	48
2.1.3.1. Produção diária de ovos (PDO)	48

2.1.3.2.	Taxa de eclosão	48
2.1.3.3.	Sobrevivência de Adultos	49
2.1.4.	Discussão	52
	Agradecimentos	
	Referências Bibliográficas	

PARTE 2. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DENSIDADES DE DIATOMÁCEAS PARA O CULTIVO EM LABORATÓRIO DO COPÉPODE CALANOIDEO *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889

	Resumo	60
2.2.1.	Introdução	61
2.2.2.	Materiais e Métodos	62
2.2.2.1.	Cultivo de microalgas	62
2.2.2.2.	Coleta dos copépodes	64
2.2.2.3.	Experimento de dieta	64
2.2.2.4.	Análise dos dados	65
2.2.3.	Resultados	66
2.2.3.1.	Sobrevivência de Adultos	66
2.2.3.2.	Produção diária de ovos (PDO)	66
2.2.3.3.	Taxa de eclosão	67
2.2.3.4.	Recrutamento de náuplios	68
2.2.4.	Discussão	75
2.2.4.1.	Influência da dieta na sobrevivência de adultos	75
2.2.4.2.	Influência da dieta na fecundidade	76
2.2.4.3.	Influência da dieta na taxa de eclosão e recrutamento de náuplios	77
2.2.5.	Conclusões	80
	Referências Bibliográficas	

PARTE 3. COMPARAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E FECUNDIDADE DOS COPÉPODES PLANCTÔNICOS *Temora turbinata* (Dana, 1849) E *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1892 ALIMENTADOS COM *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

	Resumo	86
2.3.1.	Introdução	87
2.3.2.	Material e Métodos	87
2.3.3.	Resultados	88
2.3.4.	Discussão	91
2.3.5.	Conclusões	92
2.3.6.	Referências Bibliográficas	

CAPÍTULO 3. EFEITO AGUDO DO GÁS METANO EM *Acartia lilljeborgii*

PARTE 1. SENSIBILIDADE DE *Acartia lilljeborgii* AO SULFATO DE ZINCO.

	Resumo	96
3.1.1.	Introdução	97

3.1.2.	Materiais e Métodos	99
3.1.2.1.	Preparação das Soluções	99
3.1.2.2.	Coleta dos organismos-teste	99
3.1.2.3.	Ensaio de toxicidade aguda com <i>Acartia lilljeborgii</i>	100
3.1.2.4.	Análise estatística	100
3.1.3.	Resultados	101
3.1.4.	Discussão	107
3.1.5.	Conclusões	109
	Referências Bibliográficas	
Parte 2. TOXICIDADE DE GASES DISSOLVIDOS NA ÁGUA DO MAR: Implementação de uma metodologia ecotoxicológica com gás metano.		
	Resumo	112
	Lista de Siglas	113
3.2.1.	Introdução	114
3.2.2.	Materiais e Métodos	116
3.2.2.1.	Procedimento 1. Determinação das concentrações de gás metano dissolvido na água do mar.	116
3.2.2.1.1.	Fortificação da água do mar com gás metano.	117
3.2.2.1.2.	Análise do gás metano dissolvido na água do mar através da técnica de Head-space Estático (HSE)	118
3.2.2.1.2.1.	Determinação do volume do <i>Head-space</i> .	118
3.2.2.1.2.2.	Preparação das amostras	121
3.2.2.1.2.3.	Técnica do <i>Head-space</i> Estático (HSE)	121
3.2.2.1.2.4.	Análise de Cromatografia Gasosa	126
3.2.2.2.	Procedimento 2. Avaliação do efeito agudo do gás metano em <i>Acartia lilljeborgii</i> .	126
3.2.2.2.1.	Coleta dos organismos-teste	126
3.2.2.2.2.	Ensaio de toxicidade aguda com <i>Acartia lilljeborgii</i>	127
3.2.2.2.3.	Análise dos dados	130
3.2.3.	Resultados	130
3.2.3.1.	Procedimento 1	130
3.2.3.2.	Procedimento 2	133
3.2.4.	Discussão	135
3.2.5.	Conclusões	138
	Referências Bibliográficas	
4	Considerações Finais	142

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto do gás natural na comunidade do zooplâncton marinho, como consequência de uma liberação acidental (*blowout*) desse poluente em ecossistemas costeiros. A hipótese a ser testada postula que o gás natural causa um efeito tóxico na comunidade planctônica marinha, refletida na alteração dos atributos ecológicos do zooplâncton marinho costeiro (mudanças na biomassa, densidade, riqueza, diversidade e equitabilidade), e no efeito agudo (alta taxa de mortalidade; diminuição na produção de ovos e sucesso de eclosão) nas populações de copépodos planctônicos marinhos. Para testar a hipótese o projeto se dividiu em três etapas. A primeira consistiu em determinar as variações na estrutura das comunidades de zooplâncton marinho de uma região costeira do nordeste brasileiro (Suape) durante experimentos em campo de *blowouts* subsuperficiais de gás natural. Como resultado foi observado uma tendência de aumento de densidade durante a injeção de gás natural em náuplios de Copepoda e Chaetognatha em todas as campanhas e a presença de organismos bentônicos na coluna de água como resposta ao efeito físico da ascensão das bolhas de gás, denominado efeito de fonte. Estas duas respostas podem ser utilizadas como indicadores ecológicos de plumas gás em áreas de exploração. O efeito de fonte acumulou e deslocou organismos causando mudanças temporárias na estrutura zooplanctônica. O efeito do gás natural sobre a comunidade de zooplâncton em campo foi mascarado pelas variáveis ambientais e o curto tempo de exposição ao gás. A segunda etapa avaliou durante experimentos realizados no laboratório, a sobrevivência e reprodução (porcentagem de sobrevivência, produção de ovos e taxa de eclosão de náuplios) de copépodos planctônicos representativos da região tropical do Atlântico ocidental para serem usados como potenciais organismos-teste para ensaios ecotoxicológicos. As espécies *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889 e *Temora turbinata* (Dana, 1849) foram estudadas definindo *A. lilljeborgii* como a melhor opção para a cultura em laboratório, devido ao seu potencial reprodutivo (maior fecundidade) e sua ampla distribuição e densidades elevadas nas águas estuarinas do nordeste do Brasil. A terceira etapa permitiu o desenvolvimento de uma metodologia utilizando a Cromatografia Gasosa para medição de gás metano (principal componente do gás natural) dissolvido na água do mar e sua aplicação em ensaios ecotoxicológicos para determinar o efeito nas populações de *Acartia lilljeborgii*. Este trabalho conseguiu tanto desenvolver e aplicar uma metodologia com uma estrutura experimental de laboratório simples, quanto obter resultados ecotoxicológicos em curto prazo que podem ser utilizados para avaliar o impacto ecológico do aumento da concentração do gás metano na água do mar. Esta metodologia pode ser aplicada com gás natural em estudos futuros buscando avaliar o impacto que vazamentos acidentais no mar podem causar sobre a fauna e flora marinha e dessa forma estabelecer o risco real deste poluente. Embora este trabalho tenha mostrado que efeitos ecológicos e ecotoxicológicos de poluentes gasosos nos ecossistemas marinhos podem ser avaliados, o trabalho com gases e sua interação com o ambiente é de grande complexidade e precisa de mais investimento e continuidade para obter resultados definitivos.

Palavras-chave: Zooplâncton, Copepoda, vazamento acidental, gás natural, gás metano, impacto ambiental.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of natural gas in marine zooplankton communities as a result of an accidental blowout of this pollutant in coastal ecosystems. The hypothesis to be tested postulates that natural gas will cause a toxic effect on marine plankton community, reflected in the alteration of ecological attributes of coastal marine zooplankton (changes in biomass, density, richness, diversity and evenness), and the acute effect (high mortality, decreased egg production and hatching success) in planktonic marine copepod populations. To test the hypothesis the project was divided into three stages. The first was to determine the variations in the structure of communities of marine zooplankton in a coastal region of northeastern Brazil (Suape) during field experiments of natural gas subsurface blowouts. As a result it was observed a density increase of Copepoda nauplii and Chaetognatha during natural gas injections and the presence of benthic organisms in the water column in response to the physical effect of the rise of gas bubbles, called fountain effect. These two responses could be used as ecological indicators of gas plumes in exploration areas. The accumulation and displacement of organisms by the fountain effect caused temporary changes in zooplankton structure. The effect of natural gas on the zooplankton community in the field was masked by environmental variables and the short time of exposure to the gas. The second stage evaluated the survival and reproduction (adult survival, egg production and hatching rate) of representative planktonic copepods of the tropical western Atlantic for use as potential ecotoxicological test organisms in laboratory. The species *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889 and *Temora turbinata* (Dana, 1849) were studied defining *A. lilljeborgii* as the best option for culture in the laboratory, due to their reproductive potential (higher fertility) and its wide distribution and high densities in estuarine waters of northeastern Brazil. The third stage enabled the development of a method using gas chromatography to measure methane gas (main component of natural gas) dissolved in seawater and its application in ecotoxicological assays to determine the effect on the populations of *Acartia lilljeborgii*. This work could both develop and implement a methodology with a simple experimental structure of laboratory, as obtain ecotoxicological results in short term that can be used as to evaluate the ecological impact of the increasing concentration of methane gas in seawater. This methodology can be applied to natural gas in future studies to assess the impact that accidental releases at sea can cause on marine fauna and flora, and thus to establish the pollutant real risk of this pollutant. Although this work has shown that ecological and ecotoxicological effects of gaseous pollutants on marine ecosystems can be assessed, work with gases and their interaction with the environment is very complex and needs more investment to continuity to get definitive results.

Keywords: Zooplankton, Copepoda, accidental blowout, natural gas, methane gas, environmental impact.

☞ INTRODUÇÃO GERAL ☞

O Problema

A indústria mundial de petróleo e gás, e mais especificamente a brasileira, vive um momento único, marcado pelo aumento nos preços de venda e pela descoberta de gigantescos campos petrolíferos no litoral brasileiro, que vão do estado do Espírito Santo ao estado de Santa Catarina, na região denominada Pré-Sal. A produção nacional de petróleo cresceu aproximadamente 26% de 2005 para 2010 (CNI, 2012). Porém é uma atividade que representa alto potencial de impacto para o ambiente marinho, podendo gerar mudanças na estrutura das comunidades e efeitos (letais ou subletais) nas populações (GOMES et al., 2000). Um dos maiores desafios da indústria de petróleo e gás é lograr combinar o crescimento econômico, a inclusão social e a conservação ambiental.

O contexto do presente trabalho está relacionado com a atividade de extração de petróleo e gás na determinação do efeito que uma liberação (*blowout*) ou vazamento de gás natural no ambiente marinho poderia ter sobre as comunidades aquáticas. A toxicidade de gases dissolvidos é considerada baixa com relação a outros derivados do petróleo (BROOKS e SACKED, 1973; SACKED e BROOKS, 1975), justificando a falta de estudos ambientais e ecotoxicológicos nessa área. No entanto, apesar de ser um poluente invisível, o gás natural e seus principais constituintes como, por exemplo, o metano, podem ser os hidrocarbonetos mais abundantes liberados durante um vazamento acidental em plataforma de extração no mar (KESSLER et al., 2011).

Em contraste com os hidrocarbonetos oleosos (petróleo e derivados), os quais tem sido objeto de amplos e detalhados estudos ecotoxicológicos no mundo inteiro, o gás natural e seus componentes têm escassas análises ambientais, para o estabelecimento de controles e regulamento (PATIN, 1999). O gás natural está composto por hidrocarbonetos alifáticos saturados (metano e seus homólogos) e dióxido de carbono, sulfatos de hidrogênio, nitrogênio e hélio. A proporção dos compostos depende principalmente da origem, tipo, gênese, local do depósito, estrutura geológica da região. O comportamento biogeoquímico, a concentração e a distribuição do metano e seu derivados

no ambiente aquático depende de vários fatores. São gases pouco solúveis em água e em regiões tropicais suas concentrações na água do mar são muito baixas ($< 22\text{mL L}^{-1}$) (ATKINSON e RICHARDS, 1973). É por isto, que o incremento nas concentrações de hidrocarbonetos de baixo peso molecular (principalmente metano e etano) indica locais impactados, muitas vezes próximos a áreas de produção de petróleo (BROOKS e SACKED, 1973; SACKED e BROOKS, 1975). Embora, segundo esses autores, estes gases dissolvidos não tenham um impacto considerável no ambiente marinho, são considerados indicadores da presença de outros compostos mais tóxicos, relacionados com poluição por gás e petróleo.

Alguns ensaios de toxicidade têm sido realizados com copépodes planctônicos, constatando que a sensibilidade a substâncias químicas dissolvidas na água varia dependendo da espécie e das características ecológicas do biotipo (DUSSART e DELAYE, 2001). A espécie *Acartia tonsa* Dana, 1849, por exemplo, tem sido utilizada em estudos de avaliação de efeitos causados por metais como cobre, prata e zinco (PEDROSO et al., 2007; PINHO et al., 2007; IHARA et al., 2010), derivados de petróleo, detergentes (ROSSATO, 2008; ÁVILA et al., 2010) e organoclorados (HEINLE e BEAVEN, 1980). O copépodo *Calanus finmarchicus* (Gunnerus, 1770) foi utilizado como organismo-teste em estudo com DDT (HARDING et al., 1981) e Dioxido de Carbono (CAROTENUTO et al., 2007). As espécies *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889 e *Temora stylifera* (Dana, 1849) tem sido utilizadas no Brasil em ensaios de toxicidade com Cobre, Cromo, Zinco e DSS (RESGALLA e LAITANO, 2002), sendo espécies potenciais para serem certificadas em estudos de ecotoxicidade devido à sensibilidade e ampla distribuição em ecossistemas brasileiros.

No entanto, estudos com compostos gasosos são escassos e têm uma logística complexa o que dificulta a execução experimental. Com o aumento na pesquisa relacionada com mudanças climáticas e acidificação dos oceanos, alguns ensaios toxicológicos têm sido realizados para avaliar o incremento da concentração de Dióxido de Carbono na sobrevivência, reprodução e comportamento dos copépodos *Acartia steueri* Smirnov, 1936

(KURIHARA et al., 2004), *Calanus finmarchicus* (CAROTENUTO et al., 2007) e *Acartia tonsa* (DUPONT e THORNDYKE, 2010). Os únicos estudos ecotoxicológicos encontrados relacionados com toxicidade aguda e crônica de gás natural em copépodes planctônicos foram os ensaios de gás natural condensado utilizando como organismo-teste a espécie *Acartia longiremis* (Lilljeborg, 1853) e com hidratos de gás natural (rocha) utilizando a espécie *Idyaea furcata* (Baird, 1837) (KOSHELEVA et al. 1994; KOSHELEVA et al. 1997).

Pouco se conhece sobre a biogeoquímica do gás natural (metano e seus derivados) nos ecossistemas marinhos, e menos ainda, dos efeitos que estes compostos podem causar a nível subespecífico, populacional e de comunidade. Esta lacuna de informação só pode ser preenchida estudando a biologia das espécies e realizando testes ecotoxicológicos que permitam esclarecer o impacto dos poluentes com a finalidade de contribuir para a conservação dos ambientes marinhos tropicais brasileiros. Estes resultados podem contribuir com o fornecimento de uma metodologia de gerenciamento emergencial e de contingência para análise dos riscos de uma eventual liberação de gás natural resultante de um evento de *blowout* em ecossistemas costeiros.

A Substância Problema: O Gás Natural

O gás natural (GN) é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos (compostos orgânicos) e não hidrocarbonetos (compostos inorgânicos). Os principais constituintes do GN são os hidrocarbonetos parafínicos (Tabela - A). Entre eles, o composto que apresenta uma participação predominante é o metano (CH₄) refletindo de forma geral as principais propriedades da mistura gás natural (VAZ et al, 2008).

No Brasil, a composição típica do gás natural é dominada pelo metano em porcentagem volumétrica superior a 80%. A proporção e composição dependem da localização do reservatório, e se o reservatório é associado ou não a reservatórios de petróleo, do tipo de matéria orgânica da qual foi

originado, da geologia do solo e do tipo de rocha que foi extraído (CAMACHO, 2005).

O Gás Metano: Principal Composto Do Gás Natural

A concentração de saturação do metano na água é de 23 mg L⁻¹ sendo pouco comum encontrar valores acima dessa concentração no ambiente marinho. Altas concentrações de metano no oceano estão relacionadas com áreas de atividade hidrotermal (SCHMITT et al., 1991), no entanto, também pode ser liberado naturalmente por infiltrações de hidrocarbonetos, decomposição de hidratos de clatratos, produção biogênica ou através de vazamentos na exploração de petróleo e gás (KESSLER et al., 2011).

O metano pode ser encontrado nos oceanos basicamente em três formas: Hidratos, Solubilizado e livre. O Hidrato de gás ou clatrato é um composto cristalino no qual as moléculas de água, associadas umas às outras com ligações de hidrogênio, encapsulam moléculas de gás como o metano e dióxido de carbono (CLENNELL, 2000). Os hidratos de gás são formados quando uma quantidade de metano é produzida por bactérias (principal gás biogênico nos oceanos) em pequenas profundidades (<1000m) e quando há desestruturação da matéria orgânica em zonas profundas (PAULL et al., 1994).

O gás livre e os clatratos representam o excesso de metano acima da solubilidade no sistema. No caso de haver um baixo conteúdo de metano no sistema, não serão encontradas na vizinhança do limite de fase nem clatratos ou gases livres: será encontrado somente metano em solução, em concentração abaixo do nível de saturação (CLENNELL, 2000). A solubilidade do metano em água é baixa, e varia em função da temperatura e da pressão hidrostática (CLENNELL, 2000).

Tabela A - Composição do gás natural.

	Composto	Composição	Propriedades	% no GN
	Alcanos lineares (Parafínicos)	Cadeias de carbono com ligações simples (1-12 C) Ex: Metano, Etano, Propano, etc.	Estáveis e quimicamente inertes. Incolores, inodores, e inflamáveis.	± 90%
	Alcanos cíclicos (naftênicos)	Cadeias fechadas em forma de anel. Comumente series de 3 a 4 átomos de C Ex: Ciclopropano	Estáveis	
HIDROCARBONETOS	Aromáticos (benzênicos)	Têm como base o Benzeno (6 átomos de carbono em forma de anel ligado por valências simples e duplas alternadas). Ex: Benzeno, tolueno		
Compostos orgânicos constituídos por átomos de carbono e hidrogênio	Olefinas	Hidrocarbonetos insaturados (ligações duplas entre os átomos de carbono) Ex: Eteno, propeno	Muito reativos	
	Compostos de enxofre			0,1%-7%
	Compostos de nitrogênio			0,01-1%
	Compostos oxigenados			0,06-0,4%
	Compostos organometálicos	Derivados de Vanádio e Níquel		
NÃO HIDROCARBONETOS		Nitrogênio (N ₂) Dióxido de carbono (CO ₂) Água (H ₂ O) Gás sulfídrico (H ₂ S), Sulfeto de carbonila(COS), Dissulfeto de carbono (CS ₂) Mercaptans (R-SH) Mercúrio (Hg) Hélio (He) Argônio (Ar) Oxigênio (O ₂) Hidrogênio (H ₂)		≤ 10%

A quantidade de metano armazenado nos clatratos está estimada entre 1×10^{15} a $115 \times 10^{15} \text{ m}^3$ se constituindo em uma das maiores reservas de hidrocarbonetos existentes e que podem ter um impacto importante no ciclo de carbono global (HEESCHEN et al., 2005).

A toxicidade do metano é considerada do tipo asfixiante simples, que está dada a gases inertes que quando encontrados em altas concentrações em ambientes confinados, reduzindo a disponibilidade do oxigênio. Anomalias nas concentrações de oxigênio dissolvido na água do mar por causa do aumento nas concentrações de metano já foram registradas tanto no laboratório (KOSHELEVA et al., 2004) como em campo (KESSLER et al., 2011), sendo então a hipóxia uma das principais causas de mortalidade em organismo aquáticos.

Produção e transporte de gás natural na plataforma continental: possíveis vias de vazamento.

A cadeia produtiva de petróleo e gás apresenta grande complexidade e envolve um conjunto de etapas cujos impactos ambientais potenciais variam em natureza e magnitude conforme a atividade desenvolvida e o local onde está sendo executada (CNI, 2012).

O ponto de produção é o lugar de onde o gás natural é extraído associado a poços de petróleo ou diretamente de poços de gás não associados. Quando a produção de gás é na plataforma continental é necessário de um tratamento primário para que este possa escoar até um ponto mais próximo aos consumidores em condições seguras. Nas plataformas marítimas o gás deve ser desidratado antes de ser enviado para terra, para evitar a formação de hidratos, que são compostos sólidos capazes de obstruir os gasodutos. Em outras ocasiões é necessário retirar compostos ácidos contaminantes, como compostos de enxofre e gás carbônico. Nesse caso, o gás é tratado em uma unidade de dessulfurização ou remoção de CO_2 , na qual esses contaminantes são eliminados da corrente de gás (VAZ et al, 2008).

O gás natural condicionado é transferido dos campos de produção para as unidades de processamento de gás (UPGNs). Em muitos dos sistemas de produção localizados na plataforma continental o escoamento do gás produzido ocorre por dutos submarinos de grande extensão. A especificação do gás transferido deve atender a requisitos técnicos que garantam essa movimentação de forma segura e continuada, sem ocorrência de hidratos ou altas taxas de corrosão. Aos dutos utilizados para essa movimentação dá-se o nome de dutos de transferência de gás natural. Existe também a possibilidade de transporte marítimo de gás natural na fase líquida (Gás Natural Liquefeito GNL). O GNL tem seu volume reduzido em cerca de 600 vezes, podendo ser transportado mais facilmente por meio de navios, barcaças ou caminhões criogênicos a uma temperatura de -160°C . Nesse caso, para ser utilizado, o gás deve ser novamente vaporizado em equipamentos apropriados (VAZ et al, 2008). Embora sejam atividades cuidadosamente controladas, os riscos de vazamento acidental de gás podem ocorrer tanto na etapa de produção como na etapa de transporte da cadeia produtiva.

Os Organismos Teste: O Zooplâncton e Os Copépodes

A sensibilidade das espécies marinhas a variações no ecossistema podem ser refletidas nos diferentes níveis de organização, desde sub-organísmico até de comunidade (UNDERWOOD e PETERSON, 1988). Os efeitos nos níveis altos de organização são extrapolados de testes padrão de toxicidade. Estes testes identificam os efeitos nos indivíduos, tanto os efeitos letais em curto prazo, como os efeitos crônicos em longo prazo. Porém, extrapolar do indivíduo para o ecossistema é uma tarefa complexa, porque as conexões entre estes níveis são indiretas e às vezes enganosas. Incluir vários níveis de organização no estudo de avaliação permite uma melhor predição dos efeitos e riscos no ecossistema.

O zooplâncton ocupa uma posição importante no ambiente pelágico marinho agrupando uma grande variedade de organismos de diferentes filos taxonômicos. Tem uma grande importância nas redes tróficas por controlar a

produção fitoplanctônica e ao mesmo tempo ser recurso alimentar para larvas e adultos de organismos nectônicos e bentônicos (HARRIS et al., 2000). Mudanças na comunidade planctônica ocasionam modificações significativas estruturais em diferentes níveis tróficos do ecossistema marinho (LONGHURST e PAULY, 2007). Pelo seu caráter dinâmico, com elevadas taxas de reprodução e perda, a comunidade planctônica responde rapidamente as alterações físico-químicas do meio aquático (BRANDINI et al., 1997). De forma geral, os representantes mais numerosos do zooplâncton marinho são os copépodos, pequenos crustáceos que possuem um papel central na teia alimentar pelágica. Por ser uma comunidade de importância ecológica e de rápida resposta as mudanças ambientais, este grupo foi escolhido para avaliar os efeitos dos experimentos com gás natural.

A medição da abundância, diversidade e produção zooplanctônica é uma ótima ferramenta para caracterizar os ecossistemas marinhos. Tendo em conta que Copepoda é um dos grupos dominantes nestes ambientes, a produção de ovos é de grande interesse trofodinâmico visto que muitos organismos do sistema pelágico são consumidores diretos de ovos e náuplios de copépodes (BRADFORD-GRIEVE et al., 1999). A taxa de produção de ovos é considerada como uma das principais referências da disponibilidade alimentar para Copepoda, já que tal produção está diretamente relacionada com a ingestão de alimento, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (KLEPPEL et al., 1998). Por outro lado, os ovos e náuplios de copépodes são fundamentais na primeira dieta de larvas de peixe e potencialmente indicadores da disponibilidade alimentar para níveis tróficos mais elevados (MCKINNON e DUGGAN, 2001).

Um dos principais fatores limitantes num processo de avaliação de impactos está associado à quantidade, qualidade e precisão das informações disponíveis para sua elaboração. De forma sintética, as principais informações que poderão idealmente contribuir para esta avaliação estão ligadas à compilação de dados bióticos, abióticos e sócio-econômicos da região impactada, e aos conhecimentos sobre impactos de *blowouts* ocorridos e/ou simulados em outras regiões do mundo.

No Brasil, a avaliação de impactos ambientais começou a ser introduzida como um instrumento da Política Nacional do Meio Ambiente com a Lei 6.938/81. Pela primeira vez, uma Lei considerava o imperativo de se conciliar o desenvolvimento econômico com a preservação ambiental e qualidade de vida. Esta mesma Lei criou o Sistema Nacional de Meio Ambiente, integrado por um órgão colegiado: o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Este órgão, através da Resolução CONAMA Nº 001/86 constituiu um marco da política ambiental brasileira, através da instituição da obrigatoriedade de Estudos de Impacto Ambiental (EIA) no Brasil. No Brasil, são as resoluções do CONAMA que estabelecem normas e padrões que pretendem manter compatibilidade entre as atividades humanas de desenvolvimento e o meio ambiente ecologicamente equilibrado.

Portanto, não pode restar dúvida quanto à necessidade de uma Avaliação de Impactos Ambientais no contexto do processo de exploração de gás natural, sendo uma condição para a instalação ou continuação desta atividade em qualquer ambiente. Especificamente no ambiente marinho, onde existem ecossistemas muito frágeis e ainda pouco estudados, este é um instrumento de caráter preventivo de elevada importância.

Os Objetivos e A Hipótese

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o impacto do gás natural na comunidade mesozooplancctônica marinha (principalmente no grupo Copepoda), como consequência de uma eventual liberação (*blowout*) desse poluente em ecossistemas costeiros e/ou oceânicos. A hipótese sobre a qual este trabalho foi desenvolvido afirma que o gás natural pode causar um efeito negativo na comunidade zooplancctônica (principalmente nos copépodes planctônicos marinhos), refletido na modificação na estrutura da comunidade (composição, abundancia, diversidade) e alteração na sobrevivência e reprodução das populações (alta taxa de mortalidade, diminuição na produção de ovo, diminuição na taxa de eclosão).

Os objetivos específicos propostos para desenvolver a pesquisa foram:

- ❖ Determinar a estrutura na comunidade mesozooplânctônica da região costeira de Suape (Pernambuco), a través da composição específica e análise dos índices de diversidade durante marés de sizígia e quadratura de um período seco e chuvoso;
- ❖ Acompanhar com arrastos de plâncton os experimentos em campo da evolução de plumas de gás natural (GNV) criadas artificialmente, e verificar se existe uma resposta na estrutura do mesozooplâncton causada pelo contato com o poluente;
- ❖ Selecionar a espécie de copépode planctônico para ser utilizada nos testes de toxicidade, usando como critérios sua representatividade na região costeira do nordeste brasileiro e os antecedentes bibliográficos em sensibilidade e facilidade de cultivo;
- ❖ Determinar a produção de ovos dos copépodes planctônicos selecionados e padronizar a metodologia de cultivo, procurando manter um estoque das espécies para a posterior realização dos testes de toxicidade;
- ❖ Realizar testes de toxicidade com diferentes concentrações de gás natural (gás metano) com a espécie de copépode planctônico selecionada, observando possíveis variações nos parâmetros biológicos: sobrevivência e reprodução;
- ❖ Determinar se existem concentrações de gás natural (gás metano) que causem toxicidade aguda na sobrevivência (mortalidade) e/ou na reprodução (redução na produção de ovos e taxas de eclosão) da espécie de copépode planctônico selecionada;
- ❖ Avaliar a sensibilidade da espécie selecionada de copépode planctônico ao gás metano.

Está pesquisa se dividiu em três etapas que correspondem aos três CAPÍTULOS expostos nesta tese. O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos no estudo da estrutura da comunidade mesozooplanctônica da região costeira de Suape, em diferentes momentos de uma série de vazamentos artificiais de gás natural realizados em campo. Este trabalho fez parte do macroprojeto, aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): "Transporte e Dispersão de uma Pluma de Gás Natural no Oceano: Caracterização Experimental, Modelagem Matemática e Avaliação de Impactos", executado pelas equipes de Física e Zooplâncton da Universidade Federal de Pernambuco. O segundo capítulo avaliou a sobrevivência e reprodução em laboratório de duas espécies de copépodes planctônicos representativos do nordeste brasileiro, *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii*, para serem usadas como potenciais organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos. Por último, o terceiro capítulo trata da padronização e aplicação de uma metodologia para avaliação de toxicidade de gases dissolvidos na água do mar, utilizando como organismo-teste o copépode planctônico *Acartia lilljeborgii* e como substância-teste o gás metano. Esta última fase foi realizada em cooperação com o Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/ Quimiometria (LAQA) da Universidade Federal da Paraíba.

Referências Bibliográficas

ATKINSON, L. P. E RICHARDS, F. A. 1973. Measuring of methane dissolved in sea water. *Deep Sea Research*, 14 (6).

ÁVILA, T. R.; BERSANO, J. G. F.; FILLMANN, G. 2010, Lethal and sub-lethal effects of the water-soluble fraction of a light crude oil on the planktonic copepod *Acartia tonsa*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5: 19-25.

BRADFORD-GRIEVE, J. M.; MARKHASEVA, E. L.; ROCHA, C. E. F.; ABIAHY, B. 1999. Copepoda Em: BOLTOVSKOY, D. (Ed.) *South Atlantic Zooplankton*. Leiden: Backhuys Publishers. p. 869-1098.

BRANDINI, F.P.; LOPES, R.M.; GUTSEIT, K.S.; SPACH, H.L.; SASSI, R. 1997. Planctonologia na plataforma continental do Brasil - Diagnose e revisão Bibliográfica. Fundação de Estudos do MAR-FEMAR, 195p.

BROOKS, J.M.; SACKED, W.M. 1973. Sources, sinks and concentrations of light hydrocarbons in the Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research*, 78 (24): 5248–5258.

CAMACHO, F.T. 2005. Regulação da indústria de gás natural no Brasil. Rio de Janeiro: Interciência. 113 p.

CAROTENUTO, Y.; PUTZEYS, S.; SIMONELLI, P.; PAULINO, A.; MEYERHÖFER, M.; SUFFRIAN, K.; ANTIA, A.; NEJSTGAARD J.C.. 2007. Copepod feeding and reproduction to phytoplankton development during the PeECE III mesocosmos experiment. *Biogeosciences Discussions*: 4, 3913-3936.

CLENELL, M.B. 2000. Hidrato De Gás Submarino: Natureza, Ocorrência E Perspectivas Para Exploração Na Margem Continental Brasileira. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3): 397-410.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (CNI). Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis. 2012. A contribuição do setor brasileiro de petróleo, gás e biocombustíveis para o desenvolvimento sustentável no país. Brasília, 81 p.

DUPONT, S.; THORNDYKE, M.C. 2010. Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – What we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discuss.*, 6: 3109–3131.

DUSSART, B.H.; DEFAYE, D. 2001. Introduction to the Copepoda. Guides to the identification of the macroinvertebrates of the continental waters of the world. Brackhuys Publishers, Leiden, 344pp.

GOMES, A.B.; PALMA, J.J.C.; SILVA, C.G. 2000. Causa e consequências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18 (3): 447 – 454.

HARDING G.C.; VASS, W.P.; DRINKWATER, K.F. 1981. Importance of feeding, direct uptake from sea water and transfert from generation to generation in the accumulation of an organochlorine (DDT) by the marine planktonic copepod *Calanus finmarchicus*. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 39: 101 - 119.

HARRIS, R.; WIEBE, P.; LENZ, J.; SKJOLDAL, H.R.; HUNTLEY, M. 2000. Zooplankton methodology manual. Academic Press, 684p.

HEESCHEN, K.U.; COLLIER, R.W.; ANGELIS, M.A.; SUESS, E.; REHDER, G.; LINKE, P.; KLINKHAMMER, G.P. 2005. Methane sources, distributions, and fluxes from cold vent sites at Hydrate Ridge, Cascadia Margin. *Global Biogeochemical Cycles*, 19: 1-19.

HEINLE, D. T.; BEAVEN, M.S. 1980. Toxicity of chlorine produced oxidants to estuarine copepods. Em: *Aquatic Invertebrate Bioassays*. Buikema/Cairns, Editorial Baltimore. p.109-130.

IHARA P. M.; PINHO G. L. L.; FILLMANN G. 2010. Avaliação do Copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como Organismo-Teste para Ensaio de Toxicidade Crônica. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5 (1): 27-32.

KESSLER, J.D.; VALENTINE, D.L.; REDMOND, M.C.; DU, M.; CHAN, E.W.; MENDES, S.D.; QUIROZ, E.W.; VILLANUEVA, C.J.; SHUSTA, S.S.; WERRA, L.M.; YVON-LEWIS, S.A.; WEBER, T.C. 2011. A Persistent Oxygen Anomaly Reveals the Fate of Spilled Methane in the Deep Gulf of Mexico. *Science*, 331: 312-315.

KLEPPEL, G. S.; BURKART, C.A.; HOUCHIN, L. 1998. Nutrition and the regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 1000–1007.

KOSHELEVA, V. V.; NOVIKOV, N. A.; MIGALOVSKI, I. P.; GORBACHEVA, E. A.; LAPTEVA, A. N. 1997. Responses of marine organisms to environmental pollution during oil and gas development on the shelf of the Barents Sea. PINRO, Murmansk, 95p.

KOSHELEVA, V.; MIGALOVSKY, I.P.; NOVIKOV, M.A.; GORBACHEVA, E.A.; LAPTEVA, A.M. 1994. On the pollution reactions of hydrobiontes of the environment at the oil-gas deposits exploration in the Barent sea. PINRO, Murmansk, p. 267-275.

KURIHARA, H.; SHIMODE, S.; SHIRAYAMA, Y. 2004. Sub-Lethal Effects of Elevated Concentration of CO₂ on Planktonic Copepods and Sea Urchins. *Journal of Oceanography*, 60: 743 -750.

LONGHURST, A.R.; PAULY, D. 2007. *Ecologia dos oceanos tropicais*. Edusp, São Paulo. 419p.

MCKINNON, A. D.; DUGGAN, S. 2001. Summer egg production rates of paracalanid copepods in subtropical waters adjacent to Australia's NorthWest Cape. *Hydrobiologia*, 453/454: 121–132.

PATIN, S.A. 1999. Environmental impact of the offshore oil and gas industry. Ecomonitor Publishing, East Northport, New York. 425p.

PAULL, C.K.; USSLER III, W.; BOROWSKI, W.S. 1994. Sources of methane to form marine gas hydrates, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 715: 392-409.

PEDROSO, M. S.; PINHO, G. L. L.; RODRIGUES, S.C.; BIANCHINI, A. 2007. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquat. Toxicol.*, 82:173-180.

PINHO, G. L. L.; PEDROSO, M. S.; RODRIGUES, S.C.; SOUZA, S.S.; BIANCHINI, A. 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquat. Toxicol.*, 84: 62-70.

REGALLA Jr., C.; LAITANO, K.S. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, 6: 153-163.

ROSSATO, M. 2008. Avaliação do copépode *Acartia tonsa* como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos: Comparação entre diferentes espécies utilizadas no Brasil. Monografia (Graduação), Curso de Oceanologia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 62 p.

SACKETT, W.M.; BROOKS, J.M. 1975. Use of low molecular-weight hydrocarbons as indicators of marine pollution. In: NBS Marine Pollution Monitoring (petroleum). Proceedings of Symposium and workshop held at NBS, Gaithersburg, Maryland May 13-17. 172-173 pp.

SCHMITT, M.; FABER, E.; BOTZ, R.; STOFFERS, P. 1991. Extraction of Methane from Seawater Using Ultrasonic Vacuum Degassing. *Analytical Chemistry*, 63 (5): 529-532.

UNDERWOOD, A.J.; PETERSON, C.H. 1988. Towards an ecological framework for investigating pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 46: 227-234.

VAZ, C.E.; MAIA, J. L.; SANTOS, W.G. 2008. Tecnologia da Indústria do Gás Natural. São Paulo, Blucher, 416p.

CAPÍTULO 1

O EFEITO DE “BLOWOUTS” DE GÁS NATURAL NA ABUNDÂNCIA E COMPOSIÇÃO DO ZOOPLÂNCTON EM AMBIENTES TROPICAIS MARINHOS

O EFEITO DE “BLOWOUTS” DE GÁS NATURAL NA ABUNDÂNCIA E COMPOSIÇÃO DO ZOOPLÂNCTON EM AMBIENTES TROPICAIS MARINHOS

Resumo

Vazamentos acidentais durante as atividades de exploração de gás natural (GN) em plataforma continental representam riscos potenciais para as comunidades marinhas. A fim de estudar possíveis mudanças na abundância e composição da comunidade zooplanctônica causadas pelo efeito físico de vazamentos de GN, experimentos em campo foram acompanhados por coletas de plâncton. Quatro campanhas foram realizadas na região costeira em frente à Baía de Suape (Pernambuco, nordeste do Brasil), durante as marés de sizígia e quadratura, nas estações seca e chuvosa de 2007 e 2008. Arrastos horizontais na superfície e oblíquos na coluna de água com redes de plâncton de 120 e 300 micrometros de abertura de malha foram realizados antes, durante e depois (momentos) de plumas artificiais de GN injetadas a 30 m de profundidade (totalizando 56 amostras). Não foram observadas diferenças significativas na composição, abundância e biomassa do zooplâncton entre os momentos de fluxo. No entanto, diferenças significativas na abundância de grupos específicos do mesozooplâncton foram encontradas. Uma tendência por abundâncias baixas antes e depois da injeção de gás natural e maior abundância durante o fluxo de GN foi observada em náuplios de Copepoda e Chaetognatha em todas as campanhas. Este padrão foi registrado nos dois grupos em amostras coletadas na superfície com rede de 120 µm. Adicionalmente, organismos ticolplanctônicos (juvenis de Gastropoda bentônicos) foram registrados em amostras coletadas exclusivamente durante a injeção de GN. O fluxo de GN acumulou e deslocou organismos pelo efeito de fonte das plumas de gás natural causando mudanças nas associações zooplanctônicas. O efeito observado foi exclusivamente mecânico e temporário, constatado pelo deslocamento e acumulação de espécies mesozooplanctônicas nas camadas superficiais e pelo deslocamento de espécies de ambientes bentônicos para o ambiente pelágico exclusivamente durante os momentos da vazão. O grau do impacto relacionado com o efeito de fonte causado por descargas acidentais de gás natural seria dependente da distância de alcance da pluma, da velocidade de expansão e da turbulência desenvolvida no momento da vazão.

Palavras chave: Náuplios de Copepoda, Chaetognatha, Ticolplâncton, Baía de Suape, Atlântico tropical, Nordeste Brasileiro.

1.1 Introdução

A Avaliação de Risco Ecológico analisa a probabilidade da ocorrência de efeitos ecológicos adversos como resultado da exposição a um ou mais estressores (U.S. EPA, 1998). A ligação entre o estressor e a resposta do organismo ou associação de organismos é acessível principalmente por inferência, na ausência de conhecimento completo e detalhado. Muito utilizado em ciências econômicas e de saúde, a avaliação de risco tem um curto histórico de aplicação em sistemas ecológicos e até ainda mais curto para sistemas estuarinos e costeiros (PASTOROK et al., 2002).

A extração de petróleo e gás em áreas costeiras e de plataforma é uma indústria dominante e em crescimento contínuo na produção de energia. Enquanto as reservas de petróleo puderem ser extraídas e outras fontes de energia limpa ainda não sejam rentáveis, a indústria do petróleo continuará avançando cada vez mais. Em países como o Brasil, a descoberta de novas reservas de petróleo no mar profundo representa um aumento de atividades em ambientes marinhos, e conseqüentemente, um aumento nos riscos de acidentes.

A sustentabilidade nas atividades de exploração de petróleo em ecossistemas marinhos é um dos maiores desafios dessa indústria. Os programas de monitoramento de qualidade ambiental durante as atividades de exploração, comumente procuram detectar mudanças nos componentes abióticos e/ou bióticos para avaliar o grau de impacto dentro de limites permitidos, sem comprometer o funcionamento natural dos ecossistemas. No entanto, uma das maiores dificuldades é a determinação dos fatores naturais e/ou antropogênicos que estão provocando respostas nos sistemas biológicos (BEAUGRAND, 2005). Muitas vezes, em áreas costeiras, processos de deterioração ambiental (ex: hipoxia e acúmulo de substâncias tóxicas) e outros impactos antropogênicos (por exemplo, assoreamento, entrada de pesticidas, derrames de petróleo) se sobrepõem (ATCHISON et al., 1996), tornando difícil relacionar diretamente o impacto com suas respectivas causas.

O gás natural (GN) é um combustível fóssil encontrado em rochas porosas no subsolo, composto por gases inorgânicos e hidrocarbonetos saturados, principalmente o metano (CAMACHO, 2005). Os estudos sobre o efeito desses hidrocarbonetos gasosos no campo e, especialmente, os impactos sobre organismos, populações e ecossistemas aquáticos são muito limitados (PATIN, 1999). Para avaliar os riscos potenciais da exploração de gás natural, alguns estudos têm sido realizados para simular vazamentos de gás natural e plumas em águas profundas (DASANAYAKA e YAPA, 2009; CHEN e YAPA, 2004a; CHEN e YAPA, 2004b; YAPA et al., 2004; JOHANSEN, 2003; YAPA et al., 2001). Poucos estudos ecotoxicológicos avaliando o efeito do gás natural na biota marinha têm sido realizados e, ainda assim, com acesso muito restrito (KOSHELEVA et al., 1994; 1997). Por essa razão, um vazamento acidental deste poluente em áreas costeiras e oceânicas ainda tem consequências ecológicas desconhecidas para as comunidades marinhas.

Estudos de simulação envolvendo componentes bióticos e abióticos fornecem uma visão geral da resposta de uma atividade antropogênica e muitas vezes prevêm o que pode acontecer em situações extremas. A coleta de dados e informações que permitam a diferenciação de mudanças naturais, de alterações ou mudanças resultantes da atividade humana é fundamental para identificar as "causas e efeitos" na avaliação ambiental dos ecossistemas marinhos (MOZETO e ZAGATTO, 2006).

A análise dos padrões de diversidade a nível regional e em escala global é motivada pela necessidade de um planejamento sistemático de conservação, mas também contribuem dando robustez as informações básicas para estudos de simulação de impactos antropogênicos (MARGULES e PRESSEY, 2000). Considerando que os padrões de diversidade continental e seus preditores são conhecidos pelo número de taxa, nossa compreensão da diversidade marinha global tem sido mais limitada (RUTHERFORD et al., 1999). Entre as comunidades marinhas, o zooplâncton abrange um grande número de grupos taxonômicos e tem sido utilizado como indicador de mudanças ambientais (BEAUGRAND, 2005). A estrutura do zooplâncton pode definir as características do ambiente que os seus organismos habitam (por exemplo,

águas oceânicas ou neríticas; eutróficas ou oligotróficas) (NEUMANN-LEITÃO et al., 1999; 2008) e seu monitoramento pode esclarecer as causas das suas mudanças.

No presente estudo, os experimentos realizados em campo sob condições naturais e inserindo como agente estressor a pluma de gás natural, buscaram determinar se haveria modificações na abundância e composição da comunidade zooplanctônica por causa da exposição a esse poluente. Com este experimento pode-se definir se entre os grupos zooplanctônicos há grupos que possam ser mais sensíveis à presença do poluente e possivelmente serem utilizados como indicadores biológicos de vazamentos de gás natural em áreas adjacentes a exploração de petróleo e gás.

1.2. Materiais e Métodos

A região de Suape está localizada 40 km ao sul da cidade de Recife (Nordeste brasileiro, Oceano Atlântico tropical) (Figura 1.1). Nesta área, um complexo portuário foi construído em 1979/1980. Desde então, centenas de indústrias foram instaladas, incluindo uma refinaria de petróleo e gás. O clima da região é quente-úmido, pseudo-tropical (Koppen Am'), com uma média anual de temperatura de 24 °C e precipitações de 1500 a 2000 mm ano⁻¹ concentradas entre março e agosto. A umidade é superior a 80%. Os ventos predominantes são de sudeste.

Quatro campanhas foram conduzidas na área externa da Baía de Suape, em uma estação localizada a 11 km da costa (8° 24'S - 34° 51' W) (Figura 1.1) e com 30 m de profundidade. Cada uma das quatro campanhas de campo caracterizou forçantes hidrodinâmicas diferentes que poderiam influenciar a evolução de uma pluma de gás natural (GN) no caso de um vazamento acidental originado no fundo do mar (Tabela 1.1). Estas forçantes hidrodinâmicas foram definidas pelas estações seca e chuvosa (efeito da sazonalidade, maior/menor intensidade de ventos e os diferentes níveis de estratificação vertical da coluna de água) e pelas marés de sizígia e quadratura.

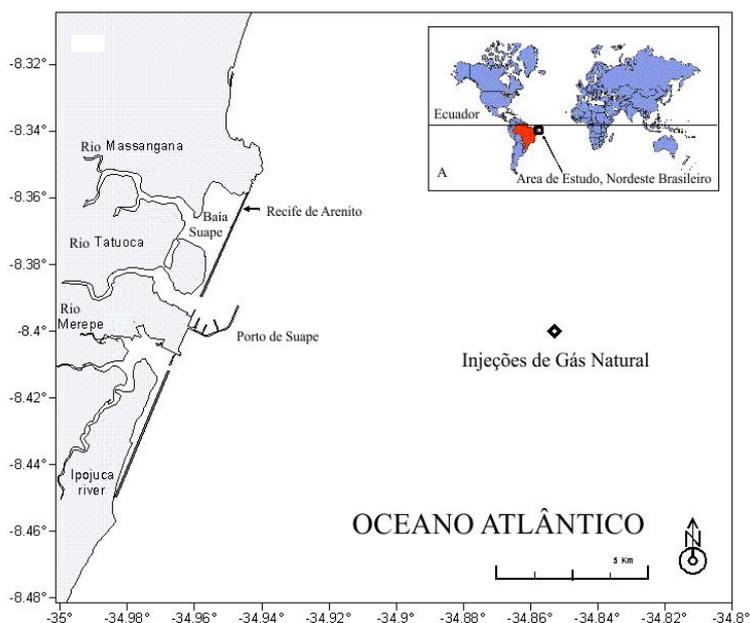


Figura 1.1 - Local de estudo na área externa da Baía de Suape (Nordeste Brasileiro, Oceano Atlântico Tropical).

Tabela 1.1 - Dados de campo dos experimentos de simulação de plumas de gás natural com a informação de fluxo de vazão de gás, momento da realização dos arrastos de plâncton com relação à injeção de GN (b=Antes, GN=Durante a injeção de gás natural, a=depois) e maré no momento dos arrastos (PM = preamar, VZ = vazante, BM = baixa mar, EN= enchente).

Estação	Camp.	Data	Maré	Hora	Vazão GN (L seg ⁻¹)	Tempo vazão (min)	Momento Injeção GN	Número de amostras
Seca	A	17/12 /2007	Quad.	PM 09:15	-	-	b	4
				VZ 11:58	6.7	68	GN	4
				VZ 13:10	-	-	a	4
	B	23/12 /2007	Sizígia	BM 09:01	-	-	b	4
				EN 09:44	3.3	28	GN	4
				EN 11:30	-	-	a	4
Chuvosa	C	05/07 /2008	Sizígia	BM 11:22	-	-	b	4
				BM 12:30	2.5	10	GN	4
				EN 13:45	-	-	a	4
	D	10/07 /2008	Quad.	PM 9:37	-	-	b	4
				VZ 10:24	3.3	16	GN	4
				VZ 12:35	-	-	a	4
				VZ 12:48	3.3	14	GN	4
				VZ 13:13	-	-	a	4

Três navios foram utilizados. Um para executar as injeções de gás natural, outro para registrar as variáveis físicas da coluna de água (intensidade e direção das correntes, temperatura e salinidade) e o último para realização dos arrastos de plâncton. Em cada campanha, o primeiro navio conduziu as injeções de gás natural, com o auxílio de equipamento de compressão (mod. Douat CD2V280) e uma mangueira flexível posicionada no fundo da estação (Figura 1.2).

Uma vazão de GN foi realizada nas três primeiras campanhas (A, B e C) e duas na última campanha (D). Cada vazão incluiu fluxos diferentes (0,8, 1,7 e/ou 2,5 L s⁻¹), com intervalos entre si, somando fluxos diferentes em cada campanha (Tabela 1.1). O tempo de exposição ao GN na coluna de água foi o tempo correspondente a cada vazão (Tabela 1). Dados de salinidade e temperatura na coluna de água foram simultaneamente registrados com CTD (mod. SBE-19 plus Seacat Profiler) e as informações de correntes foram registrados com ADCP (Workhorse mod. Rio Grande 600 Khz).

Para determinar a composição e abundância do zooplâncton antes, durante e depois da injeção de GN, amostras de plâncton foram coletadas nos três momentos (Figura 1.2). Arrastos horizontais foram realizados na superfície a uma velocidade de três (3) nós durante cinco (5) minutos. Arrastos oblíquos (de 10 m de profundidade até a superfície) foram realizados simultaneamente na coluna de água. Duas redes padrão de plâncton foram utilizadas, ambas com 30 centímetros de diâmetro de boca, sendo uma com 120 µm (menor fração do mesozooplâncton) e a outra com 300 µm (maior fração do mesozooplâncton) de abertura da malha. Um total de 56 amostras foram coletadas. Na boca de cada rede foi adaptado um fluxômetro para determinar o volume de água filtrada. As amostras foram fixadas com formaldeído a 4%, neutralizado com tetraborato de sódio. As campanhas de A e D foram realizadas durante a maré vazante (VZ), a campanha B durante a maré enchente (EN) e a campanha C durante a maré baixa (BM) (Tabela 1.1).

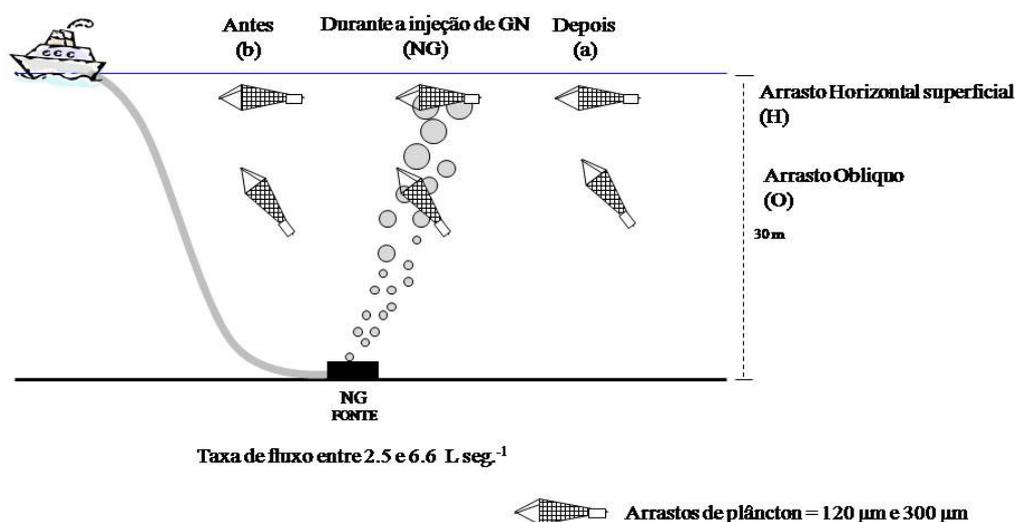


Figura 1.2 - Desenho experimental de campo descrevendo os momentos dos arrastos de plâncton (b = antes da injeção de gás natural, GN = durante a injeção de gás natural, a = após a injeção) e o tipo de arrasto (H= Horizontal superficial; O = Oblíquo na coluna de água).

No laboratório, foi obtida a biomassa sestônica úmida (mg m^{-3}) de acordo com a metodologia de Omori e Ikeda (1984) e a abundância (Ind. m^{-3}) com base na média aritmética de três sub-amostras de 5 ml retiradas da amostra completa (250 mL). A diversidade (Shannon, 1948) e equitabilidade (Pielou, 1967) foram calculadas a partir do grupo Copepoda, para estimar a diversidade da comunidade (Shannon, 1948). Foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Witney para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na comunidade zooplânctônica entre as frações de tamanho (120 μm = menor; 300 μm = maior), entre os tipos de arrastos (Superficial e coluna da água), entre as estações (seca - chuvosa), entre as campanhas (A, B, C e D) e entre os momentos de arrasto com relação à injeção de gás natural (b=antes; GN=durante; a = após a injeção de gás). Foi realizada uma análise de ordenação multivariada de escala multidimensional não-paramétrica (MDS) com a abundância da totalidade dos taxa registrados (transformação a Ln) da totalidade das amostras (o estresse indica a qualidade do ajuste variando entre 0.05 muito bom e 0.2 satisfatório). Os índices e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do software PRIMER 5.2.8. Adicionalmente foi

aplicado o teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$) para identificar os grupos que poderiam descrever tendências entre o momento do arrasto com relação à injeção de gás natural (b=antes; GN=durante; a = após a injeção de gás) utilizando o programa BIOESTAT 5.0.

1.3. Resultados

1.3.1. Condições Ambientais

Nas quatro campanhas foram observadas pequenas diferenças nas variáveis físicas. Na estação seca (Campanhas A e B), a temperatura média da superfície foi de $26,6 \pm 0,82$ °C e a salinidade foi de $37,1 \pm 0,13$. Durante a estação chuvosa (campanhas C e D) a temperatura ($26,3 \pm 0,06$ °C) e salinidade ($36,7 \pm 0,33$) foram ligeiramente menores (Figura 1.3).

A salinidade foi homogênea na coluna de água refletindo o caráter exclusivamente marinho da estação. As chuvas foram altas durante a campanha C, que se refletiu na baixa salinidade registrada na superfície. A temperatura na coluna de água mostrou diferenças entre as estações seca e chuvosa. A estação seca apresentou uma coluna estratificada com uma temperatura superficial de $27,5^{\circ}\text{C}$ e uma profundidade média da termoclina de 14 m na campanha A e de 20 m na campanha B (Figura 1.3). Durante a estação chuvosa, as temperaturas foram mais baixas do que na estação seca e homogêneas na coluna de água. Apenas a campanha C mostrou uma diminuição pequena da temperatura na superfície devido às chuvas (Figura 1.3).

Durante a estação seca a direção das correntes prevaleceu em sentido S-SW quando os ventos Alísios do nordeste estão presentes. De forma contrária, durante o período chuvoso as correntes tiveram predominantemente direção NE, provavelmente por efeito dos ventos Alísios do sudeste, comuns durante este período. A maior Intensidade das correntes foi de $0,8 \text{ m s}^{-1}$ na superfície e foi observada durante a maré baixa na estação chuvosa (campanha C).

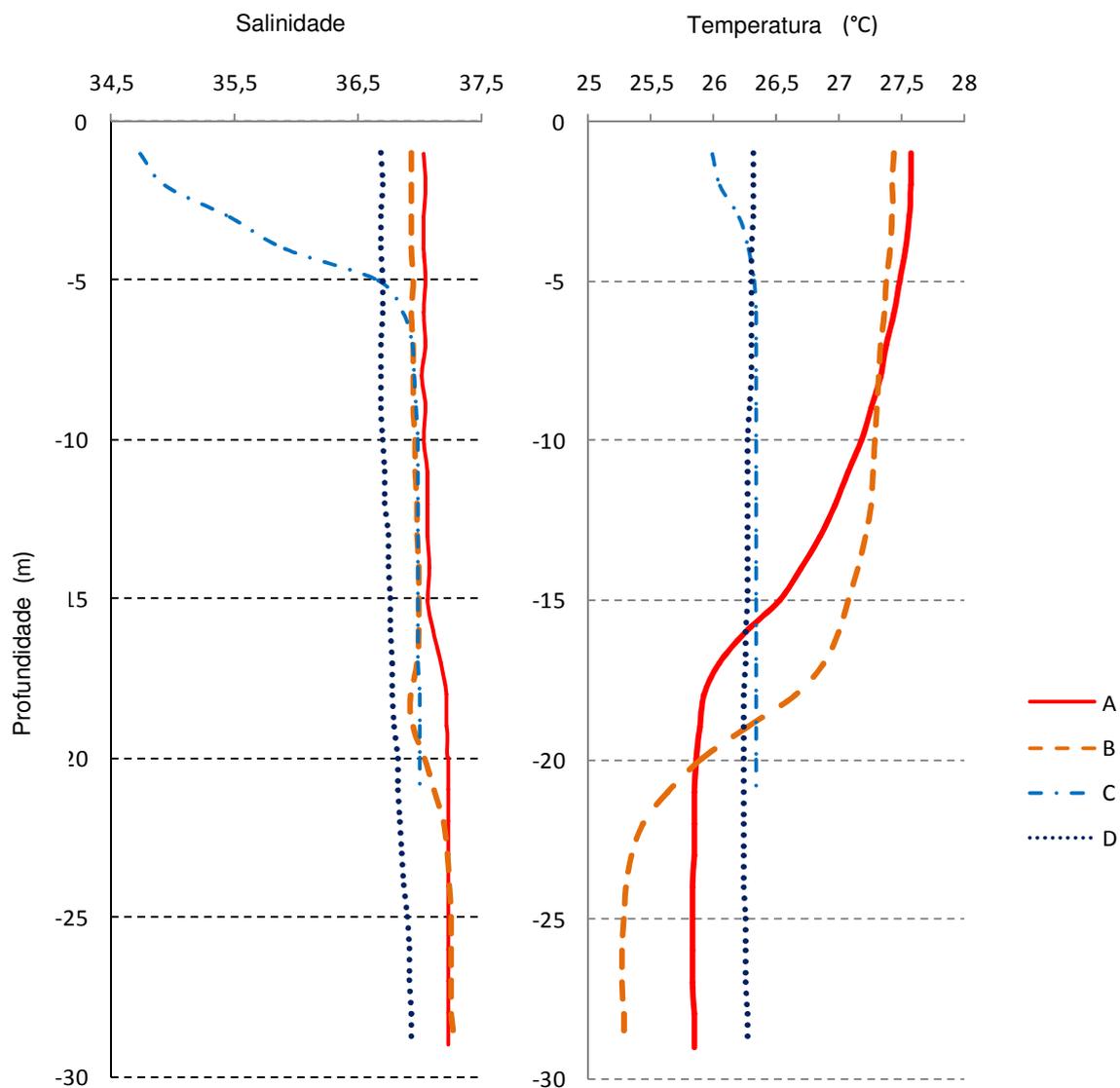


Figura 1.3 - Perfil de salinidade e temperatura na coluna de água para cada campanha realizada nas águas costeiras de área externa da Baía de Suape (Nordeste Brasileiro) durante os experimentos de simulação de plumas de gás natural.

1.3.2. Associações Zooplânctônicas

Um total de 203 taxa foram identificados nas amostras de plâncton. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos coletados com rede de 120 e 300 micrômetros de abertura de malha nos arrastos horizontal na superfície e oblíquos na coluna de água (Tabela 1.2). Nas amostras coletadas com rede de 120 µm foram capturados organismos da menor fração do mesozooplâncton, sendo Crustacea o grupo dominante (abundância relativa de 70%) em todas as amostras. Indivíduos adultos de Copepoda dominaram na superfície (arrastos superficiais horizontais) e os náuplios de Copepoda na coluna de água (arrastos oblíquos). A maior fração do mesozooplâncton na superfície manteve o domínio de Copepoda, com uma menor abundância de larvas de decápodes durante a estação seca e jovens de Gastropoda e larvas de Teleostei durante a estação chuvosa (Figura 4). Na coluna de água o domínio de Copepoda diminuiu e foi observada uma maior abundância de foraminíferos (*Tetromphalus bulloides* (d'Orbigny, 1839)) na estação seca e jovens Gastropoda e larvas de Teleostei durante a estação chuvosa (Figura 1.4).

Duas espécies de Copepoda foram frequentes e dominantes em todas as amostras. Estas espécies foram *Undinula vulgaris* (Dana, 1849) e *Clausocalanus furcatus* (Brady, 1883), representados principalmente por copepoditos (jovens) na menor fração do mesozooplâncton e por indivíduos adultos na maior fração. Na menor fração do mesozooplâncton, tanto na superfície como na coluna de água, foram encontradas as espécies de Copepoda *Oithona nana* Giesbrecht, 1893, *Calocalanus pavo* (Dana, 1852), *Corycaeus giesbretchi* Dahl F., 1894 e *Farranula gracilis* (Dana, 1849) e o Appendicularia *Oikopleura longicauda* (Vogt, 1854). Náuplios de Copepoda foram também encontradas com abundâncias elevadas (> 10 ind. m⁻³) e alta frequência (> 70%). Já na maior fração do mesozooplâncton, os organismos representados com maior abundância (> 10 ind. m⁻³) e frequências (> 70%) foram *Temora stylifera* (Dana, 1849), *Acrocalanus longicornis* Giesbrecht, 1888, larvas zoea de Brachyura, *Oikopleura longicauda* e ovos de Teleostei.

Tabela 1.2 - Resultados do teste não-paramétrico de Mann-Whitney mostrando as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na abundância e biomassa sestônica entre frações do mesozoplâncton (120-300 μm), tipo de arrasto (superfície e coluna de água), períodos climáticos (seco-chuvoso), marés (Quadratura e Sízígia), momentos dos arrastos com relação a injeção de gás natural (antes, durante e depois a injeção) e campanhas (A,B,C e D).

Variáveis		Abundância			Biomassa sestônica		
		U	Z	p-value	U	Z	p-value
Estação	Seca/Chuvosa	260.5	2.0447	0.0204*	178	3.4107	0.0003*
Maré	Quad. / Sízígia	256	2.1193	0.017*	280	1.7219	0.0425*
Arrasto	Sup. / Coluna	278	1.8681	0.0309*	187	3.3593	0.0004*
Fração do mesozoop.	120 μm / 300 μm	94	4.8833	< 0.0001*	281	1.8189	0.0345*
Momento	b/GN	146	0.4457	0.3279	133	0.8596	0.195
	b/a	144	0.5094	0.3052	150	0.3184	0.3751
	GN/a	162	1.0279	0.152	161	1.055	0.1457
Fração-Arrasto	120-C / 120-S	64	1.5622	0.0591	46	2.3893	0.0084*
	120-C / 300-C	24	3.4001	0.0003*	65	1.5163	0.0647
	120-C / 300-S	10	4.0434	< 0.0001*	25	3.3542	0.0004*
	120-S / 300-C	38	2.7569	0.0029*	71	1.2406	0.1074
	120-S / 300-S	22	3.492	0.0002*	66	1.4703	0.0707
	300-C / 300-S	46	2.3893	0.0084*	45	2.4352	0.0074*
Campanha	A-B	63	0.5196	0.3017	61	0.6351	0.2627
	A-C	13	3.4064	0.0003*	5	3.8682	< 0.0001*
	A-D	106	0.5449	0.2929	62	2.2576	0.012*
	B-C	20	3.0022	0.0013*	15	3.2909	0.0005*
	B-D	119	0.0389	0.4845	96	0.9342	0.1751
	C-D	21	3.8536	< 0.0001*	4	4.5153	< 0.0001*

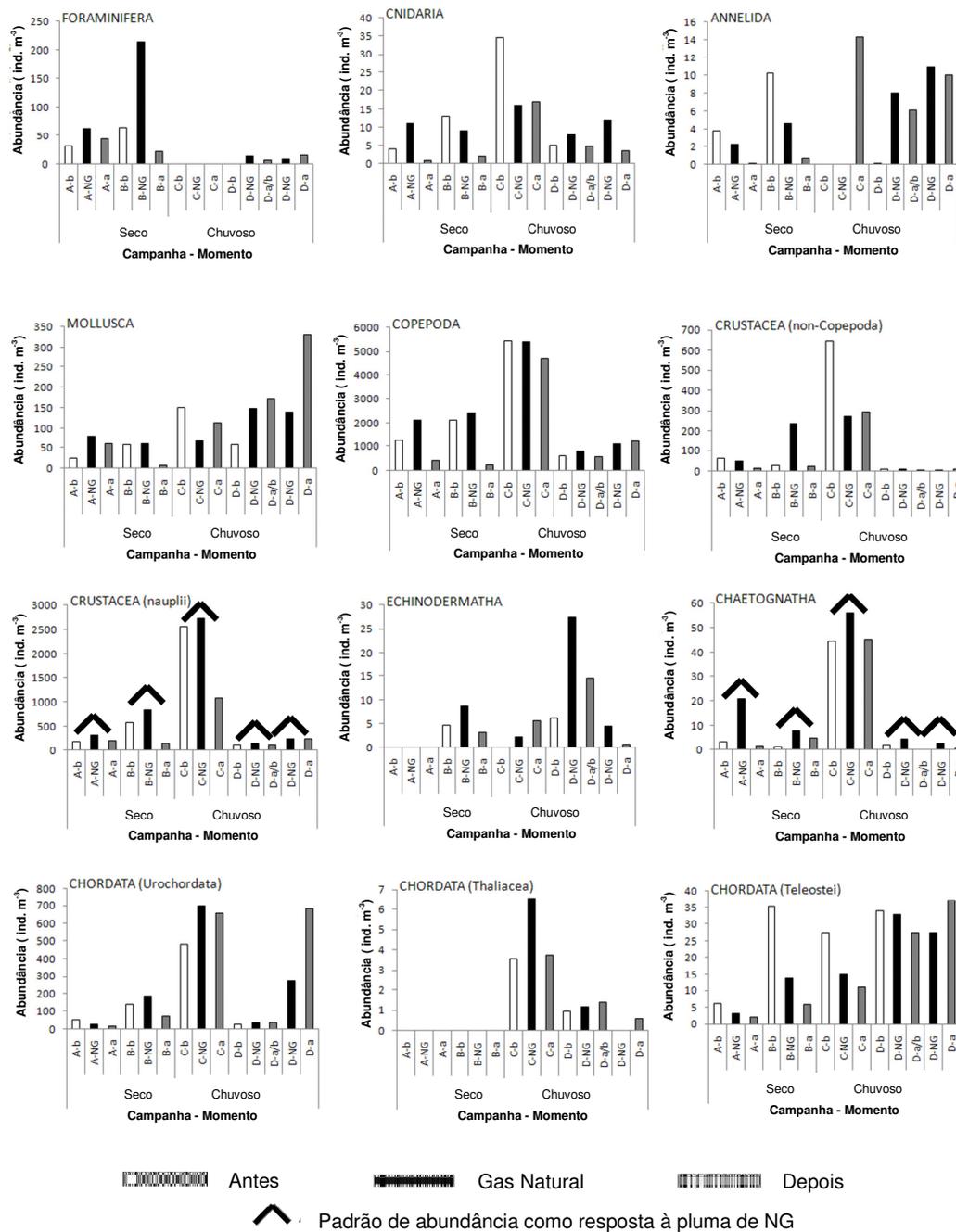


Figura 1.4 - Abundância dos principais grupos zooplancctônicos registrados nas quatro campanhas (A-D) de simulação de vazamentos de Gás Natural em águas costeiras da Baía de Suape (Nordeste do Brasil). Relação entre abundância e os três momentos de injeção de gás natural (b = Antes; GN = Durante a vazão de gás natural fluxo; a = depois).

Diferenças significativas na abundância e biomassa entre o tamanho da malha, tipo de arrasto, as marés e estações foram encontradas (Tabela 1.2). As abundâncias entre as dois tamanhos de malha foram maiores na fração menor (1376 ± 808 ind. m^{-3}) do que na fração maior (263 ± 449 ind. m^{-3}) do mesozooplâncton. A abundância foi menor em superfície (595 ± 950 ind. m^{-3}) e maior na coluna de água (1043 ± 1220 ind. m^{-3}). Durante a maré de quadratura as abundâncias foram maiores do que na maré de sizígia, com valores de 1283 ± 1391 ind m^{-3} e 471 ± 668 ind. m^{-3} , respectivamente. A estação chuvosa apresentou abundâncias superiores do que na estação seca, com valores de 1035 ± 1256 ind m^{-3} e 530 ± 808 ind m^{-3} , respectivamente.

Embora tenham sido observadas semelhanças na composição específica entre as quatro campanhas, foram observadas diferenças significativas entre a campanha C, a primeira da estação chuvosa, e as outras três campanhas (Tabela 1.2). Foi evidente um aumento na composição específica, na abundância e biomassa durante essa campanha. As menores temperaturas e salinidades caracterizaram esta campanha na camada superficial (5 m) (Figura 3), devido às chuvas durante o período de coleta. As espécies com abundâncias elevadas em todas as amostras desta campanha foram *Subeucalanus pileatus* (Giesbrecht, 1888), *Centropages velificatus* (Dana, 1849), *Temora turbinata* (Dana, 1849), *Eupronoe minuta* Claus, 1879, *Penilia avirostris* Dana, 1849 e *Lucifer faxoni* Borradaile, 1915. As abundâncias apresentaram a mesma tendência que a biomassa sestônica, observando uma correlação direta entre as duas variáveis ($R^2 = 0,79$). As menores abundâncias foram registradas durante a estação seca na Campanha A e maior durante a estação chuvosa na Campanha C (Figura 1.4). A Biomassa sestônica foi maior durante a estação chuvosa (Campanha C), variando entre $1,54$ mg m^{-3} e $287,2$ mg m^{-3} (Figura 1.4).

Os índices ecológicos tiveram valores predominantemente médios, com diversidades entre 0,98 e 3,41 bits ind^{-1} e equitabilidades entre 0,3 e 0,9. Tanto os valores mínimos como os máximos de diversidade e equitabilidade foram encontrados na maior fração do mesozooplâncton. A menor diversidade e equitabilidade foram registradas na Campanha B (estação seca) na coluna

de água devido às altas densidades de *Undinula vulgaris* antes da injeção de gás natural. A maior diversidade foi registrada na campanha D (estação chuvosa) e maior equitabilidade na campanha A, ambas durante a injeção de gás natural e em superfície.

1.3.3. Zooplâncton vs. gás natural

Entre os três momentos relacionados com a injeção de gás (antes, durante e depois), não foram encontradas diferenças significativas na abundância total do mesozooplâncton ou na biomassa sestônica (Tabela 1.2). No entanto, foram registradas diferenças na abundância dos principais grupos zooplanctônicos (Tabela 1.3). Náuplios de Copepoda e Chaetognatha foram os únicos grupos de zooplâncton que apresentaram o mesmo padrão em todas as campanhas: abundâncias baixas antes e após a injeção, e mais abundantes durante a injeção de gás natural (Figura 1.4). O padrão observado em Chaetognatha foi uma resposta multi-específica, não sendo registrado este mesmo padrão separadamente para cada uma das espécies deste grupo (*Pterosagitta draco* (Krohn, 1853), *Sagitta hexaptera* d'Orbigny, 1836, *Sagitta enflata* Grassi, 1881, *Sagitta tenuis* Conant, 1896, *Sagitta friderici* Ritter-Záhony, 1911, *Sagitta hispida* Conant, 1895, *Sagitta serratodentata* Krohn, 1853 e *Krohnitta pacifica* (Aida, 1897)).

Indivíduos presentes exclusivamente durante a injeção de gás natural foram encontrados com baixas abundâncias. O principal táxon foi Gastropoda, representado por 10 jovens de espécies bentônicas. Outros táxons encontrados foram Foraminifera, Siphonophora (*Abylopsis tetragona* (Otto, 1823), *Bassia bassensis* Quoy & Gaimard, 1827 e *Sulculeolaria* spp.), Anellida (*Traviopsis* sp. e Larvas), Brachyura (zoeas e megalopa) e Urochordata (*Doliolum denticulatum* Quoy & Gaimard, 1834). A presença de Tícoplâncton em amostras de superfície e na coluna de água durante a injeção de gás natural, principalmente de indivíduos bentônicos, pode indicar um deslocamento temporário das espécies para a superfície.

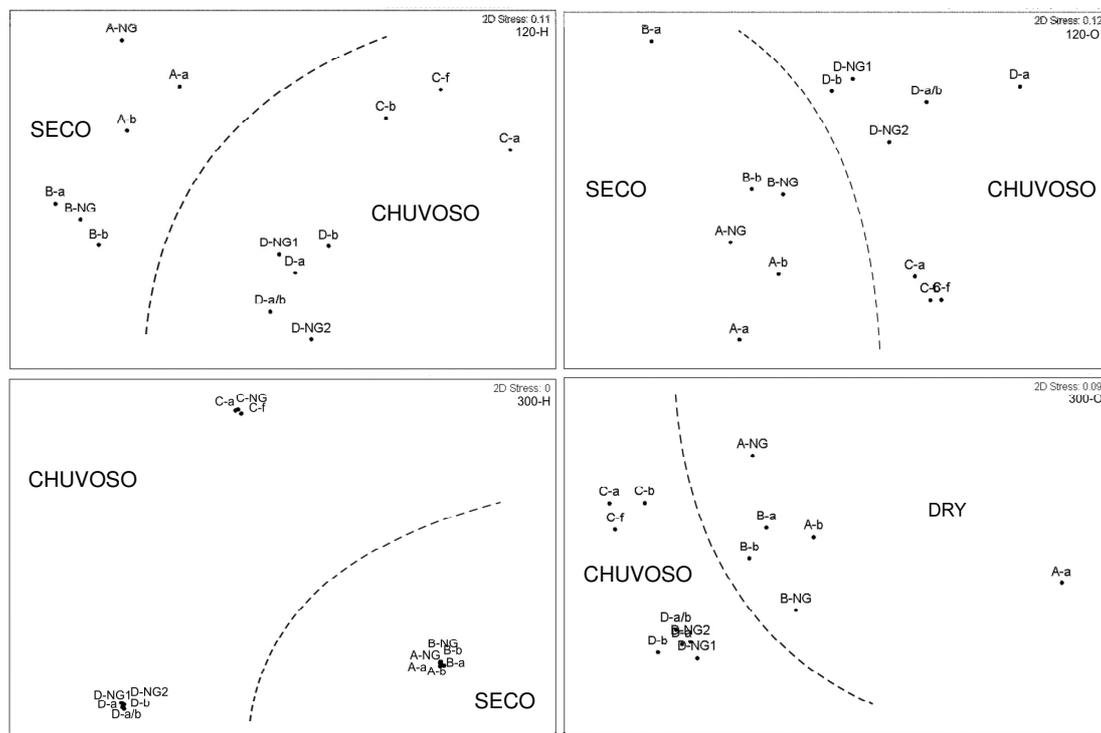


Figura 1.5 - Ordenação MDS (Similaridade de Bray-Curtis) da abundância de espécies coletadas nas águas costeiras da Baía de Suape (Nordeste do Brasil) em quatro campanhas (A, B, C e D) nos três momentos com relação à injeção de gás natural (Antes=b, Durante=GN e depois=a). Fração menor (120 μ m) e maior (300 μ m) do mesozoplâncton em superfície (H) e na coluna de 'água (O).

No entanto, a injeção de GN não foi o principal fator para o agrupamento de amostras e espécies. O MDS mostrou semelhanças entre as amostras da mesma campanha (Figura 1.5). Diferenças significativas entre as campanhas mostraram que a combinação entre as marés e períodos sazonais foi o fator explicativo das associações de amostras e espécies na área de estudo.

Tabela 1.3 - Resumo dos resultados do teste Wilcoxon (signed rank test) das abundâncias dos principais grupos identificados nas amostras de plâncton comparando os momentos de coleta com relação à injeção de gás natural (b=antes; GN=durante; a=após). A tabela indica a relação entre as abundâncias pela direção do símbolo (< = menor que; > = maior que) e o nível de significância ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

GRUPOS	Todo			Menor Fração			Maior Fração			Coluna			Superfície		
	b-GN	GN-a	b-a	b-GN	GN-a	b-a	b-GN	GN-a	b-a	b-GN	GN-a	b-a	b-GN	GN-a	b-a
Foraminifera	<*	>*	-	<*	-	-	-	>*	>*	<*	>**	-	-	-	-
Cnidaria	-	>**	>*	-	<*	-	>*	-	>*	-	>*	>*	-	-	-
Plathyhelmintha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nematoda	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Annelida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<*
Mollusca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Copepoda (náuplios)	-	>*	-	-	>*	-	-	-	-	-	-	-	<*	-	-
Copepoda (copepoditos jovens e adultos)	<*	>*	-	<*	-	-	-	-	-	-	>**	>*	<*	-	<*
Crustacea (não-copepoda)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<*	-	>*	-	-	-
Briozoa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Echinodermatha	-	>*	-	-	-	-	-	-	-	-	>**	-	-	-	-
Chaetognatha	<*	>*	-	<*	>**	-	-	-	-	-	-	-	<**	>*	-
Rotifera	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Appendicularia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thaliacea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<*	-
Teleostei (larvas e ovos)	-	-	>*	>*	-	-	-	-	>*	>*	-	-	-	-	-

1.4. Discussão

A crescente pressão para atender as demandas de energia através da exploração de petróleo e gás tem aumentado significativamente o desenvolvimento de atividades na zona costeira e de plataforma no Brasil. Novas indústrias estão sendo criadas, ameaçando o frágil e já impactado ecossistema costeiro. A produção e transporte de petróleo e gás representa

um risco constante de vazamentos acidentais e operacionais, tornando necessária a simulação de diversos cenários de vazamentos acidentais para tentar avaliar o possível efeito nas comunidades marinhas.

As características das massas de água da plataforma leste brasileira estão refletidas na composição e biomassa zooplanctônica (EKAU e KNOPPERS, 1999). As águas da Corrente Sul Equatorial (SEC) no leste brasileiro são oligotróficas e caracterizadas por uma baixa produtividade primária ($< 0,2 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (EKAU e KNOPPERS, 1999) e baixas biomassas zooplanctônicas (BOLTOVSKOY, 1999). No nordeste brasileiro, a biomassa mesozooplanctônica diminui da área nerítica para a área oceânica. A biomassa apresenta valores superiores a 100 mg m^{-3} em áreas neríticas e inferior a 15 mg m^{-3} em áreas oceânicas (NEUMANN-LEITÃO et al., 1999; NEUMANN-LEITÃO et al., 2008). Em Pernambuco (nordeste do Brasil), o valor médio registrado de biomassa zooplanctônica é de $15,84 \text{ mg m}^{-3}$ (GUSMÃO, 2000). No presente estudo, realizado em uma região costeira de Pernambuco, os valores estiveram dentro do esperado para a região (média de $60,48 \text{ mg m}^{-3}$), com uma importante contribuição de organismos holoplanctônicos e uma importação de biomassa possivelmente pela deriva passiva e a migração ativa de espécies nectônicas e bentônicas.

As variações hidrológicas causadas por períodos sazonais influenciaram a abundância do mesozoplâncton. Durante a estação chuvosa (principalmente na campanha C) foram observadas as maiores abundâncias. O aumento da produtividade primária causado pelo aumento de nutrientes nas camadas superficiais (EKAU e KNOPPERS, 1999) acontece geralmente durante períodos chuvosos e promove o aumento da produtividade secundária. Por outro lado, durante a estação seca, as abundâncias menores provavelmente foram causadas pela estratificação térmica da coluna de água que impede a mistura das águas de profundidade com maior concentração de nutrientes com as camadas da superfície (EKAU e KNOPPERS, 1999). Estudos sobre a matéria em suspensão e a produtividade primária em águas costeiras do estado de Pernambuco (PASSAVANTE e FEITOSA, 1995; ESKINAZI-LEÇA et al., 1989; GOMES, 1989) verificaram esta

variação sazonal. A entrada de nutrientes pelos rios durante a estação chuvosa pode ir além das zonas costeiras (EKAU e KNOPPERS, 1999) enriquecendo águas próximas e favorecendo a produção secundária. No entanto, devido à implantação do complexo industrial no porto de Suape, a hidrodinâmica local foi alterada, impedindo a entrada de águas de baixa salinidade na área costeira e aumentando a presença de espécies marinhas na área estuarina (SILVA et al., 2004). A baixa variação dos valores de salinidade na área de estudo e a predominância de indivíduos holoplanctônicas mostrou o caráter marinho do local de estudo. A redução da salinidade superficial na campanha C foi causada pela chuva forte durante a campanha e não pela influência continental.

O holoplâncton dominou as comunidades estudadas. Copepoda foi o grupo dominante como tem sido registrado em outros estudos realizados na região (GUSMÃO, 2000; NEUMANN-LEITÃO et al., 1999, NEUMANN-LEITÃO et al., 2008). *Undinula vulgaris* e *Clausocalanus furcatus* foram representados nas duas frações do mesozooplâncton com altas abundâncias e frequências, mostrando diferenças apenas na fase de desenvolvimento (náuplios e copepoditos jovens na fração menor e copepoditos adultos na maior fração). *Undinula vulgaris* e *Clausocalanus furcatus* são copépodes epipelágicos muito comuns em águas de plataforma no Brasil (BJÖRNBERG, 1981; VALENTIN e MONTEIRO-RIBAS, 1993) e em águas tropicais e subtropicais do mundo (BJÖRNBERG, 1981. BRADFORD-GRIEVE et al., 1999; SAMEOTO, 1986; FRAGOPOULU e LYKAKIS, 1990) sendo também abundantes e frequentes durante o presente estudo.

Uma tendência por abundâncias baixas antes e depois da injeção de gás natural e maior abundância durante o fluxo de GN foi observada em náuplios de Copepoda e Chaetognatha em todas as campanhas. As fases iniciais de vida são as formas mais vulneráveis a alterações ambientais (MEDINA et al., 2002). Copepoda foi o grupo dominante, mas apenas o padrão de abundância dos náuplios permitiu detectar uma tendência em resposta ao fluxo de GN, indicando maior sensibilidade e menor resistência a ressuspensão do que copepoditos jovens e adultos. Por outro lado, as espécies

de Chaetognatha são comumente usadas como bioindicadores devido à relação entre a sua abundância e distribuição com as massas de água e correntes (PIERROT-BULTS e CHIDGEY, 1988). Espécies estenotípicas de Chaetognatha podem refletir as características da água em que estão imersas. A resposta desta associação multi-específica de chaetognatos e náuplios de copépodes pode ser um indicador do fluxo ascendente causado pela pluma de gás. A presença de espécies ticoplanctônicas (jovens de Gastropoda bentônicos) exclusivamente durante o momento da injeção de GN comprovou o deslocamento de espécies bentônicas para o ambiente pelágico, sustentando a idéia de acúmulo e/ou deslocamento de espécies como indicador ecológico de plumas de gás. O efeito de fonte, já observado como resultado da ascensão das bolhas de gás natural (FRIEDL e FANNELOP, 2000), exerce uma força mecânica que pode causar o deslocamento e acumulação de espécies na superfície. O deslocamento e acumulação de espécies podem ter efeitos ecológicos nos ambientes marinhos. Os efeitos indiretos (ou secundários) podem causar mudanças funcionais e estruturais na comunidade, como alterações no comportamento das populações, mudança nas taxas de concorrência por predação e pastagem, mascarando os efeitos reais do poluente (FLEEGER et al., 2003). Podem ocorrer efeitos indiretos do tipo "bottom-up", como mudanças na captação de presas pelo zooplâncton e "top-down" quando a abundância e composição das principais consumidores são modificados (FLOEGER et al., 2003; HJORTH, 2005). Essas alterações na estrutura das comunidades podem impactar positivamente ou negativamente, podendo gerar alterações de relevância ecológica.

Estudos de modelagem simulando plumas de gás natural descrevem o fluxo ascendente e sua interação com a água de superfície quando o gás é liberado em águas profundas (FRIEDL e FANNELOP, 2000; YAPA et al., 2001). O comportamento das plumas de gás é controlado por condições termodinâmicas e cinéticas e, de uma forma geral, depende da temperatura, profundidade e salinidade (YAPA et al., 2001). Neste trabalho, a pouca profundidade (baixa pressão), a água da superfície equatorial (temperatura estável) e o caráter marinho do local (salinidade estável) não influenciaram o comportamento da pluma de gás e transferiram as possíveis variações para

outras características tais como o tempo de duração da vazão e o volume de gás injetado. Se a intensidade do fluxo é baixa, muitos dos organismos zooplancônicos com boa capacidade natatória podem se afastar da pluma de gás. Além disso, o rápido processo de evaporação de GN quando o fluxo é pequeno, de curta duração e com alta turbulência facilita a saída do poluente em forma de gás e diminui o efeito tóxico que poderia exercer na forma dissolvida.

A resposta de um organismo a um evento de estresse causado por poluentes pode ser muito diferente no ambiente natural em comparação com a resposta em condições laboratoriais padronizados, tais como as testadas em toxicologia aquática (HJORTH, 2005). Experimentos ecotoxicológicos com organismos zooplancônicos mostraram que a CL_{50} de GN (concentração que causou a morte de 50% da população) durante uma exposição de 96 horas foi de $5,5 \text{ mg L}^{-1}$, sem aeração e de $1,75 \text{ mg L}^{-1}$ com aeração (UMORIN et al., 1991). Alguns outros estudos registram valores similares de CL_{50} (96 horas) de gás natural para o zooplâncton, zoobentos e alevinos de peixes marinhos ($0,6$ - $1,8 \text{ mg L}^{-1}$) (BORISOV et al., 1994; KOSHELEVA et al., 1997). No presente estudo não foi medida a concentração de gás natural dissolvida na água do mar durante as injeções, impossibilitando fazer inferências sobre a toxicidade da GN durante os experimentos.

Vazamentos acidentais de gás natural ocorridos nos últimos 30 anos (Uniacke em 1984, o vazamento de gás na Índia em 1999, o vazamento de gás no Mar de Asov em 1982 e 1985; o vazamento na P-40 em novembro de 2011 na costa de Rio de Janeiro no Brasil e o vazamento na plataforma Elgin em março de 2012 no Mar do Norte na Europa, entre outros) mantem a alerta de possíveis novos acidentes enquanto continuarem as atividades de exploração em ambientes marinhos de águas rasas e profundas. Os efeitos crônicos na produtividade e/ou nas taxas reprodutivas dos organismos marinhos após a exposição a altas concentrações de gás natural dissolvido na água têm sido pouco estudados (Lincoln, 2002). Existe a necessidade de incentivar a realização de Investigações ecológicas e toxicológicas sobre os efeitos do gás natural em ambientes tropicais para entender melhor o risco que este

poluente pode oferecer ao ecossistema marinho e reforçar as medidas de prevenção e ação no caso de um vazamento acidental de gás durante as atividades de exploração.

1.5. Conclusões

Este trabalho permitiu verificar a mudança na abundância e composição da comunidade mesozooplancônica causada pela pluma de gás natural. O efeito observado foi exclusivamente mecânico e temporário, constatado pelo deslocamento e acumulação de espécies das duas frações mesozooplancônicas estudadas (náuplios de Copepoda e Chaetognatha) da coluna de água para as camadas superficiais e pelo deslocamento de espécies de ambientes bentônicos para o ambiente pelágico (juvenis de gastrópoda) exclusivamente durante os momentos da vazão. A relevância ecológica do deslocamento e acumulação de espécies alóctonas dependeria da intensidade e permanência do estressor no ambiente.

Agradecimentos

Este estudo fez parte do projeto "Transporte e dispersão de uma pluma de gás natural no oceano: caracterização experimental, modelagem matemática e avaliação de impacto", financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e executado pelos laboratórios de Oceanografia Física e de Zooplâncton do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil). Gostaríamos de agradecer a todas as pessoas que participaram dos experimentos de campo.

Referências Bibliográficas

ATCHISON, G.J.; SANDHEINRICH, M.B.; BRYAN, M.D. 1996. Effects of environmental stressors on interspecific interactions of aquatic animals. Em: Newman, M.C., Jagoe, C.H. (Eds.), *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 319–345.

BEAUGRAND, G. 2005. Monitoring pelagic ecosystems using plankton indicators. *J. Mar. Sci.*, 62: 333-338.

BJÖRNBERG, T.K.S. 1981. Copepoda *Em*: Boltovskoy, D. (ed.). Atlas del zooplancton del Atlántico Sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplancton marino. Mar del Plata: INIDEP, p. 587-680.

BOLTOVSKOY, D. (ed), 1999. South Atlantic Zooplankton. Leiden, Backhuys Publishers, 1706 p.

BORISOV, V.P.; OSETROVA, N.V.; PONOMARENKO, V.P.; SEMENOV, V.N. 1994. Impact off the offshore oil and gas developments on the bioresources of Barents sea. Moscow: VNIRO, 251 p.

BRADFORD-GRIEVE, J.M.; MARKHASEVA, E.L.; ROCHA, C.E.F.; ABIAHY, B. 1999. Copepoda *Em*: Boltovskoy, D. (ed.). South Atlantic Zooplankton. Leiden: Backhuys Publishers, p. 869-1098.

CAMACHO, F.T. 2005. Regulação da indústria de gás natural no Brasil. Rio de Janeiro: Interciência, 113 p.

CHEN, F.; YAPA, P. 2004a. Modeling gas separation from a bent deepwater oil and gas jet/plume. *J. Mar. Sys.*, 45(3-4): 189-203.

CHEN, F., YAPA, P., 2004b. Three-dimensional visualization of multi-phase (oil/gas/hydrate) plumes. *Env. Mod. & Soft.*, 19(7-8): 751-760.

DASANAYAKA, L.K., YAPA, P., 2009. Role of plume dynamics phase in a deepwater oil and gas release model. *J. Hydro-env. Res.*, 2: 243-253.

EKAU, W.; KNOPPERS, B. 1999. An introduction to the pelagic system of the North-East and East Brazilian waters. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 47 (2/3): 113-132.

ESKINAZI-LEÇA, E.; SILVA-CUNHA, M.G.G.; KOENING, M.L. 1989. Variação quantitativa do fitoplâncton na plataforma continental de Pernambuco (Brasil). *Insula*, 19: 37-46.

FLEEGER, J.W.; CARMAN, K.R.; NISBET, R.M. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic systems. *Sci. Total Env.*, 317: 207-233.

FRAGOPOULU, N.; LYKAKIS, J.J. 1990. Vertical distribution and nocturnal migration of zooplankton in relation to the development of the seasonal thermocline in Patraikos. *Gulf. Mar. Biol.*, 104: 381-387.

FRIEDL, M.J.; FANNELOP, T.K.; 2000. Bubble plumes and their interaction with the water surface. *App. Ocean Res.* 22: 119-128.

GASTON, K. J., 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature*, 405: 220-227.

GOMES, A.S.; PALMA, J.J.C.; SILVA, C.G. 2000. Causas e consequências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. *Braz. J. Geophys.*, 18 (3): 447-454.

GUSMÃO, L.M.O. 2000. Comunidades zooplanctônicas nas províncias nerítica e oceânica do estado de Pernambuco-Brasil (Latitude 7°32,98' a 8°41,51'S - Longitude 34°04,47' a 35°01,51'W). Tese (Oceanografia) - UFPE, Recife. 108p.

HJORTH, M. 2005. Response of marine plankton to pollutant stress. Integrated community studies of structure and function. National Environmental Research Institute, Danish, p. 28.

JOHANSEN, Ø. 2003. Development and verification of deep-water blowout models. *Mar. Poll. Bull.*, 47: 360-368.

KOSHELEVA, V.; MIGALOVSKY, I.P.; NOVIKOV, M.A.; GORBACHEVA, E.A.; LAPTEVA, A.M. On the pollution reactions of hydrobiontes of the environment at the oil-gas deposits exploration in the Barent sea. PINRO, Murmansk, 1994.

KOSHELEVA, V.V.; NOVIKOV, N.A.; MIGALOVSKI, I.P.; GORBACHEVA, E.A.; LAPTEVA, A.N. 1997. Responses of marine organisms to the environmental pollution during oil and gas development on the shelf of Barent Sea. Murmansk: PINRO, p.95.

LINCOLN, D. 2002. Sense and nonsense – The environmental impacts of exploration on marine organisms offshore Cape Breton. Cape Breton Island, Nova Scotia, p.17.

MARGULES, C. R.; PRESSEY, R. L. 2000. Systematic conservation planning. *Nature* 405, 243–253.

MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D.J. 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:17–22.

MOZETO, A., ZAGATTO, P., 2006. Introdução de agentes químicos no ambiente. *Em: Ecotoxicologia aquática. Princípios e aplicações.* Zagatto, P., Bertolotti, E. (eds). Editora Rima, São Paulo, 15-38p.

NEUMANN-LEITÃO, S., GUSMÃO, L.M.O., SILVA, T.A., NASCIMENTO-VIEIRA, D.A., SILVA, A.P., 1999. Mesozooplankton biomass and diversity in coastal and oceanic waters off North-Eastern Braz. *Arch. Fish. Mar. Res.* 47 (2/3): 153-165.

NEUMANN-LEITÃO, S.; SANT'ANNA, E.M.E.; GUSMÃO, L.M.O.; NASCIMENTO-VIEIRA, D.A.; PARANAGUÁ, M.N.; SCHWAMBORN, R. 2008. Diversity and distribution of the mesozooplankton in the tropical Southwestern Atlantic. *J. Plank. Res.* 30(7): 795-805.

OMORI, M.; T. IKEDA. *Methods of Marine Zooplankton Ecology*. New York: Jhon Willy, 1984. 332p.

PASSAVANTE, J.Z.O.; FEITOSA, F.A.N. 1995. Produção primária do fitoplâncton da plataforma continental de Pernambuco (Brasil): Área de Piedade. *Bol. Tec. Cient. CEPENE* 3(1): 7-22.

PASTOROK, R.A.; BARTELL, S.M.; FERSON, S.; GINZBURG, L.R. 2002. *Ecological modeling in risk assessment: chemical effects on populations, ecosystems, and landscapes*. CRC Press, 22p.

PATIN, S. 1999. *Environmental impact of the offshore oil and gas industry*. Ecomonitor publishing. East Northport: New York, 425p.

PIELOU, E.C. 1977. *Mathematical ecology*. New York, Wiley, 385 p.

PIERROT-BULTS, A.C.; CHIDGEY, K.C. 1988. *Chaetognatha, Synopses of the British fauna (New series)*. Leiden: The Linnean Society of London and the Estuarine and Brackishsciences Association 39, 66p.

RUTHERFORD, S.; D'HONDT, S.; PRELL, W. 1999. Environmental controls on the geographic distribution of zooplankton diversity. *Nature*, 400: 749-753.

SAMEOTO, J.X.D. 1986. Influence of the biological and physical environment on the vertical distribution of mesozooplankton and micronecton in the eastern tropical Pacific. *Mar. Biol.*, 93: 263-279.

SHANNON, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *Boll. Sys. Tech. J.*, 27: 379-423.

SILVA, A.P.; NEUMAN-LEITAO, S.; SCHWAMBON, R.; GUSMAO, L.M.O.; SILVA, T.A. 2004. Mesozooplankton of an Impacted Bay in North Eastern Brazil. *Braz. Arch. Bio. Tech.*, 47 (3): 485-493.

SILVA, A.P.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SCHWAMBORN, R.; GUSMÃO, L.M.O.; SILVA, T.A. 2004. Mesozooplankton of an Impacted Bay in North Eastern Brazil. *Brazilian archives of Biology and technology*, 47(3): 485-493.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1998. *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. Federal Register 63(93): 26846 - 26924.

UMORIN, P.P.; VINOGRADOV, G.A.; MAVRIN, A.S.; VERBITSKI, V.B.; BRUZNITSKI, A.A. 1991. Impact of the bottled gas on ichthyofauna and zooplankton organisms. *In: Theses of the Second All-Union Conference of Fisheries Toxicology 2: 222-224.*

VALENTIN, J.L.; MONTEIRO-RIBAS, W.M. 1993. Zooplankton community structure on the east-southeast Brazilian continental shelf (18-23°S latitude). *Cont. Shelf Res. 13(4): 407-424.*

YAPA, P. D.; ZHENG, L.; CHEN, F. 2001. A model for deepwater oil/gas blowouts. *Mar. Poll. Bull., 43(7/12): 234-41.*

YAPA, P.D.; ASCE, M.; CHEN, F. 2004. Behavior of Oil and Gas from Deepwater Blowouts. *Journal of Hydraulic Engineering: 540-553.*

CAPÍTULO 2

**CULTIVO DE COPÉPODES PLANCTÔNICOS CALANÓIDEOS PARA TESTES
ECOTOXICOLÓGICOS: *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889 e *Temora
turbinata* (Dana, 1849)**

PARTE 1. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DIETAS DE MICROALGAS PARA O CULTIVO DO COPÉPODE CALANOIDEO *Temora turbinata* (Dana, 1849) EM LABORATÓRIO.

DÍAZ, X.F.G.; BARKOKEBAS, B.; CAMPELO, R.P.S.; KOENING, M.L.; SCHWAMBORN, R.; NEUMANN-LEITÃO, S. 2012. An evaluation of different microalgal diets for the culture of the calanoid copepod *Temora turbinata* (dana, 1849) in the laboratory. *Tropical Oceanography*, 40(1): 133-142.

Resumo

Temora turbinata (Dana, 1849) é uma espécie de copépode planctônico exótico de ampla distribuição no Nordeste brasileiro, com potencial para ser usado em testes ecotoxicológicos e como recurso de alimento vivo na aquicultura. Com o objetivo de determinar a melhor dieta para a manutenção dessa espécie em laboratório foi realizado um experimento no período de 8 dias. Foram avaliadas a sobrevivência dos adultos, a taxa de produção diária de ovos e a taxa de eclosão dos ovos dessa espécie. Copépodes adultos de *Temora turbinata* foram alimentados com três dietas diferentes, duas monoalgais (*Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle e *Tetraselmis chuii* (Butcher)) e uma mista combinando as duas espécies de microalgas. As dietas monoalgais e mista foram ofertadas aos copépodes na mesma proporção de biomassa (1 mg C L⁻¹ dia⁻¹). Entre as três dietas analisadas, o tratamento com *T. weissflogii* foi considerado a melhor opção por manter maiores taxas de produção de ovos e maiores porcentagens de sobrevivência dos adultos de *Temora turbinata*. Apesar do maior recrutamento de náuplios nos organismos alimentados com *T. chuii*, esta microalga diminuiu a produção de ovos e a sobrevivência dos adultos quando adicionada na dieta.

Palavras chave: Copépode exótico, sobrevivência, taxa de produção diária de ovos, taxa de eclosão dos náuplios, *Thalassiosira weissflogii*, *Tetraselmis chuii*.

2.1.1. Introdução

Temora turbinata (Dana, 1849) é uma espécie epiplanctônica de ampla distribuição, encontrada em áreas tanto costeiras como oceânicas, em águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, exceto na região leste do Pacífico (BRADFORD-GRIEVE et al., 1999). No Brasil, apresenta uma ampla distribuição e abundância em águas estuarinas e costeiras (SILVA, et al., 2004; ARAUJO et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2008; SANTOS et al., 2009; PESSOA et al., 2009). *T. turbinata* é uma espécie exótica, introduzida no Brasil a partir da década de 90 provavelmente através de águas de lastro (ARAÚJO E MONTÚ, 1993). Esta espécie é encontrada conjuntamente com a espécie nativa *Temora stylifera*, existindo registros do afastamento da população nativa para fora da plataforma continental e a substituição em alguns locais pela espécie exótica (ARA, 2002; CEPAN, 2009).

Temora turbinata é uma espécie onívora, que se alimenta basicamente de microalgas e detritos (ESKINAZI-SANT'ANNA, 2000). Como a maioria dos calanóideos, *T. turbinata* gera correntes na água para facilitar a ingestão das partículas em suspensão (HWANG E TURNER, 1995; HWANG et al., 1998; TURNER et al., 1998). No entanto, a ingestão dessas partículas é realizada seletivamente, demonstrada pelo registro predominante de frústulas de diatomáceas nas pelotas fecais desta espécie (ESKINAZI-SANT'ANNA, Op cit.). Definir a dieta certa que favoreça o crescimento e reprodução desta espécie é fundamental para o seu cultivo.

São poucos os copépodes calanóideos que possuem protocolos de cultivo definidos. O copépode planctônico *Acartia tonsa* (Dana, 1849) é um dos mais cultivados no Brasil para realização de testes toxicológicos, no entanto, esta espécie não está amplamente distribuída em áreas tropicais dificultando sua obtenção nesta região. *Temora turbinata* pode ser uma boa espécie para cultivo devido à sua ampla distribuição e densidades elevadas nas águas costeiras do nordeste do Brasil. A identificação das melhores condições de cultivo para esta espécie irá facilitar a criação de um protocolo para a sua manutenção em laboratório.

O objetivo do experimento foi comparar a produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência do copépoda planctônico *Temora turbinata*, com três diferentes dietas de microalgas (Tratamentos), duas monoalgais e uma mista. Foi utilizada uma dieta monoalgal de diatomáceas (*Thalassiosira weissflogii* = T.w.), uma dieta monoalgal de clorofíceas (*Tetraselmis chuii* = T.c.) e uma mista incluindo as duas microalgas (T.w.+T.c.). A hipótese a ser testada postula que o tipo de dieta (microalgas) afeta a produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência de *T. turbinata*, sabendo que dietas mistas de microalgas favorecem a reprodução e desenvolvimento dos adultos (BUTTINO et al., 2009) e que as diatomáceas são desfavoráveis para o sucesso de ovos para incubação (MIRALTO et al., 1999; IANORA, 2005).

2.1.2. Material e Métodos

2.1.2.1. Cultivo de microalgas

As espécies fitoplanctônicas usadas como recurso alimentar para os copépodes foram *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariófica) e *Tetraselmis chuii* (Clorofícea). Três dietas foram testadas (Tratamentos), duas monoalgais (Tratamento 1 = *T. weissflogii* (T.w.), Tratamento 2 = *T. chuii* (T.c.)) e uma mista (Tratamento 3 = *T. weissflogii* e *T. chuii* (T.w.+T.c.)). Os cultivos foram mantidos em erlenmeyers de 500 mL com meio F/2 (GUILLARD, 1975) preparado com água do mar com 36 de salinidade, uma temperatura média de $\pm 21^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de 24h de luz (lâmpadas fluorescentes de 20W). Os cultivos foram mantidos na fase exponencial por diluição com meio F/2 Guillard a cada dois dias. A concentração celular oferecida aos copépodes foi ajustada em cada dieta para obter uma concentração aproximada de $0.98\mu\text{g C cop.}^{-1}\text{ mL}^{-1} = 98\mu\text{gC cop.}^{-1}\text{ dia}^{-1}$ (BUTTINO et al., 2009). A densidade diária de cada microalga foi calculada a partir do biovolume e seu equivalente em conteúdo de carbono (HILLEBRAND et al., 1999; MENDEN-DEUER E LESSARD, 2000). Foram determinados o biovolume (BV) e a biomassa (BM) a partir da média do diâmetro (d) e a altura (h) de 30 células de *T. weissflogii* e do diâmetro maior

(h) e menor (d) de *T.chuii* (Tabela 2.1.1). A dieta mista (Tratamento 3) foi estimada considerando um aporte de carbono de 50% de cada microalga. A densidade do cultivo foi estimada diariamente a partir de uma sub-amostra de 1 mL e contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico com auxílio de um contador manual.

Tabela 2.1.1 – Densidades microalgais usadas para determinar a produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência dos adultos do copépode *Temora turbinata*.

Dieta de microalgas	Tamanho (μm)		Biovolume (μm^3)	Carbono ($10^{-5} \mu\text{g C}$)	Densidade microalgal	
	Diâmetro	Altura			10^3 cé. mL^{-1}	$\mu\text{g C mL}^{-1}$
<i>T. weissflogii</i> (T.w.)	12.5	12.5	1534.0	11.04	9.06	1
<i>T. chuii</i> (T.c.)	7.5	12.5	552.2	9.05	11.05	1
<i>T. weissflogii</i> (T.w.)					4.53	0.5
<i>T. chuii</i> (T.c.)					5.52	0.5

2.1.2.2. Coleta dos copépodes

Os copépodes foram coletados na região costeira da praia de Boa Viagem na cidade de Recife (Nordeste brasileiro). Foram realizados arrastos verticais sucessivos com uma rede cônica de plâncton com abertura de malha de 300 μm . Para diminuir o estresse dos organismos, foi adaptado um copo coletor cego no extremo da rede. Os organismos acumulados no copo foram vertidos cuidadosamente em sacolas pretas (5L) previamente colocadas em baldes com tampa. Em cada balde foi adaptada uma mangueira conectada a uma bomba aeradora (bateria), para permitir a oxigenação dos indivíduos durante o percurso ao Laboratório de Cultivo do Departamento de Oceanografia da UFPE. Adicionalmente foi coletada água do mar e foram aferidas a temperatura e salinidade do local.

2.1.2.3. Cultivo dos copépodes

No laboratório, foram triados adultos saudáveis de *T. turbinata* (antenas completas, boa movimentação), e foram inseridos separadamente machos e fêmeas em béquers de 200 mL para aclimação durante 24 horas. Em cada béquer foi colocado água do local filtrada com uma rede de abertura de malha de 45 µm para evitar a presença de protozoários. A salinidade (36), temperatura de coleta (25°C) e aeração suave foram mantidas constantes durante o experimento.

Depois do período de aclimação (dia 0) foi realizado um experimento de 8 dias de duração para determinar o efeito da dieta de microalgas na reprodução e na sobrevivência de *Temora turbinata*. Em béquers de 100 mL foram adicionados 50 mL de água do mar com a dieta de microalgas correspondente a cada tratamento. Posteriormente, foram introduzidos 2 fêmeas e 2 machos em cada béquer constituindo a unidade experimental. As unidades experimentais foram levadas a uma incubadora com controle de temperatura e fotoperíodo. Cada tratamento teve 5 réplicas.

Diariamente, os indivíduos foram transferidos a um novo béquer com a dieta de cada tratamento pronta. As unidades experimentais, já sem os indivíduos adultos, foram analisadas sob estereomicroscópio para realizar a contagem de ovos e determinar a taxa diária de produção de ovos. Os ovos foram transferidos para placas de Petri pequenas e incubados por mais 48 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram observadas no estereomicroscópio para contar os náuplios eclodidos e determinar a taxa de eclosão de ovos. A sobrevivência de fêmeas e machos foi registrada diariamente durante o experimento. Quando algum dos indivíduos (um macho ou uma fêmea) morria, era substituído por um indivíduo novo retirado do cultivo estoque. Se as duas fêmeas morriam, essa unidade experimental era finalizada (metodologia de Buttino et al., 2009).

2.1.2.4. Análise dos dados

Os pré-requisitos para aplicação de testes paramétricos foram realizados (ex: Distribuição normal, homogeneidade de variância, independência dos tratamentos e aleatoriedade dos dados). O efeito da dieta e o tempo de cultivo na produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência de adultos de *Temora turbinata* foram analisados usando uma ANOVA de dois fatores (com interação). Para a realização das análises foi utilizado o programa Bioestat 5.0.

2.1.3. Resultados

2.1.3.1. Produção diária de ovos (PDO)

Variações significativas na produção diária de ovos (PDO) de *T. turbinata* foram observadas entre as dietas administradas e entre os dias de cultivo, além de confirmar interações entre as duas variáveis (Tabela 2.1.2; Figura 2.1.1). O valor médio da PDO foi maior quando alimentados com *T. weissflogii* que quando alimentados exclusivamente com *T. chunii* ou com a dieta mista (Tabela 2.1.2). Os copépodes alimentados com *T. weissflogii* apresentaram o maior valor de PDO, no terceiro dia do experimento, com um valor médio de 12.4 ± 6.3 ovos $\text{fem.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Figura 2.1.1). Os valores máximos de PDO com as dietas de *T. chunii* e a dieta mista foram de 4.6 ± 7.0 ovos $\text{fem.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e 7.6 ± 8.8 ovos $\text{fem.}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no quinto e quarto dia do experimento, respectivamente (Figura 2.1.1). Não houve produção de ovos nos três últimos dias de cultivo nas unidades experimentais mantidas com *T. chunii* (Figura 2.1.1).

2.1.3.2. Taxa de eclosão

A porcentagem da taxa de eclosão dos ovos de *T. turbinata*, foi baixa e instável para as três dietas testadas (Figura 2.1.2). A maior porcentagem de taxa de eclosão foi obtida com *T. chunii* e a menor com a dieta mista (Tabela

2.1.2). Dos cinco dias nos quais se observou uma produção diária de ovos nos copépodes alimentados com *T. chuii*, foram registrados náuplios exclusivamente no segundo e quarto dia do experimento, obtendo uma taxa de eclosão de 92,3% e 73,7%, respectivamente (Figura 2.1.2). A produção e eclosão de ovos foram mais frequentes com *T. weissflogii*, mas a porcentagem de eclosão foi menor que a obtida com *T. chuii*, com valores máximos de 50% (Figura 2.1.2). A dieta mista mostrou a menor taxa de eclosão do experimento (Tabela 2.1.2; Figura 2.1.2). Não houve variações significativas entre os tratamentos e nem entre os dias de cultivo (Tabela 2.1.3).

Para comparar a produção de *T. turbinata* com as diferentes dietas durante o período total do experimento, foi calculado o número total de náuplios recrutados (número total de ovos por fêmea durante o experimento multiplicado pela porcentagem da taxa de eclosão). Os resultados mostraram taxas baixas de recrutamentos de náuplios durante o período do experimento com as três dietas (Tabela 2.1.2). A dieta com *T. chuii* mostrou os melhores resultados com uma taxa de 20,3 náuplios fem^{-1} e a dieta mista mostrou os piores resultados com uma taxa de 7,6 náuplios fem^{-1} (Tabela 2.1.2).

2.1.3.3. Sobrevivência de Adultos

A maior porcentagem de sobrevivência dos adultos de *T. turbinata* foi encontrada com *T. weissflogii* (Tabela 2.1.2). Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e entre os dias do experimento (Tabela 2.1.3). Com *T. weissflogii* a sobrevivência de adultos foi diminuindo paulatinamente, com um decréscimo no quinto dia, até obter no final do experimento uma sobrevivência de 75% (Figura 2.1.3). Com a dieta mista, foi observada uma diminuição paulatina, com um decréscimo no terceiro dia, e posteriormente se manteve aproximadamente constante chegando a uma sobrevivência de adultos de 70% no final do experimento (Figura 2.1.3). Com *T. chuii* foram registradas as menores taxas, observando uma sobrevivência estável até o quinto dia do experimento e posteriormente uma diminuição na sobrevivência com um valor final de 35% (Figura 2.1.3).

Tabela 2.1.2 – Médias e desvios padrão de cada parâmetro calculado para *Temora turbinata* alimentados com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.), *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)).

Dieta	Ovos fem. ⁻¹ dia ⁻¹	Taxa de eclosão (%)	Recrutamento de náuplios fem. ⁻¹	Sobrevivência de adultos (%)
T.w.	3.6 ± 5,0	12.3 ± 0,2	15.6	83.3 ± 0,2
T.c.	1.5 ± 4,2	33.2 ± 0,5	20.3	69.4 ± 0,3
T.w.+T.c.	1.8 ± 3,6	11.5 ± 0,1	7.6	79.4 ± 0,1

Tabela 2.1.3 – Resultados do teste ANOVA de duas vias (com interações) para comparar a influência das dietas de microalgas e dias do experimento sobre a produção de ovos, a taxa de eclosão e sobrevivência de adultos do copépoda *Temora turbinata*. *Diferenças significativas, $p < 0.05$.

	Ovos fem. ⁻¹ dia ⁻¹			Taxa de eclosão (%)		Sobrevivência de adultos (%)	
	g.l.	F	p	F	p	F	p
Dieta	2.96	5.8275	0.0044*	0.2211	0.8044	1.0531	0.3539
Dias	7.96	3.6427	0.0019*	0.6716	0.6975	2.8148	0.0105*
Interações	14.96	3.2578	0.0005*	1.122	0.3488	0.9114	0.5496

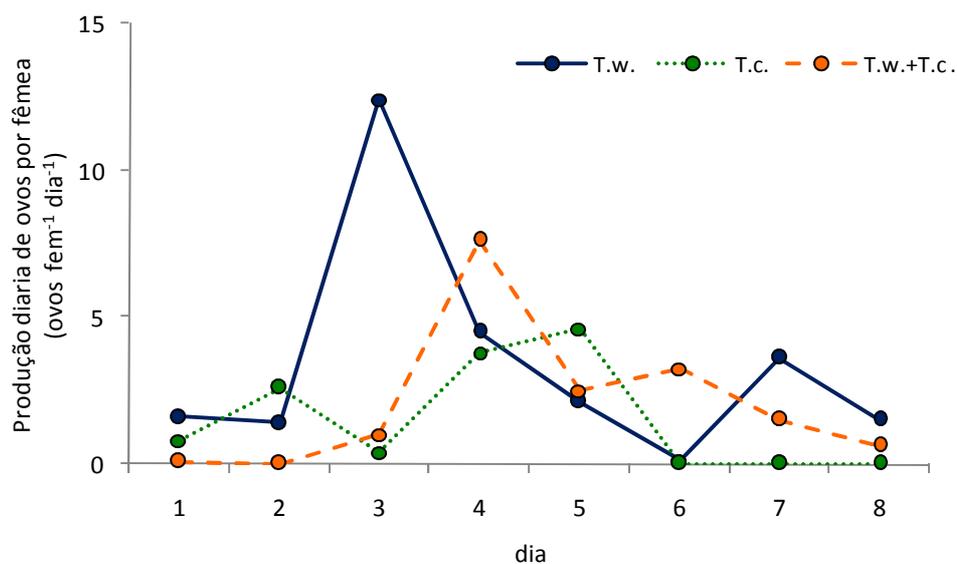


Figura 2.1.1 - Produção diária de ovos por fêmea do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)).

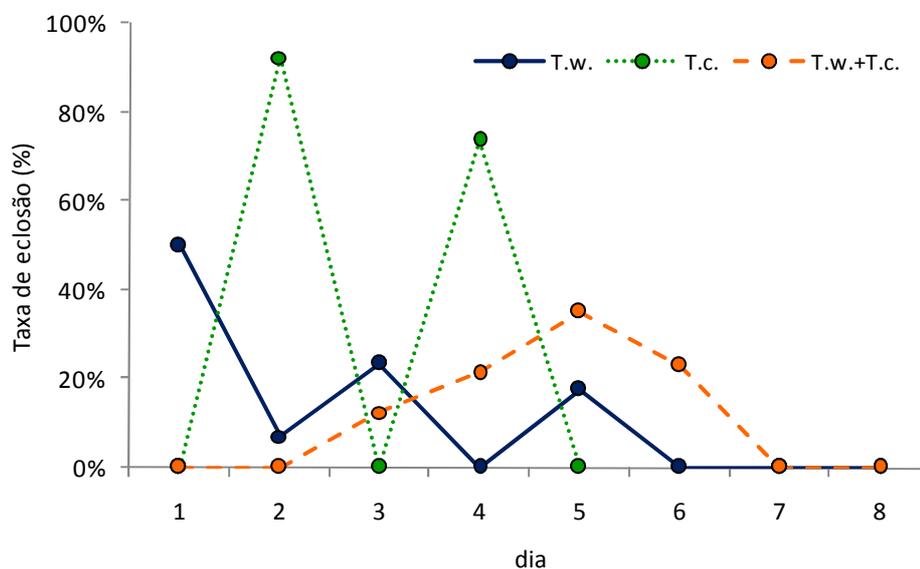


Figura 2.1.2 – Taxa de eclosão dos ovos (%) do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)).

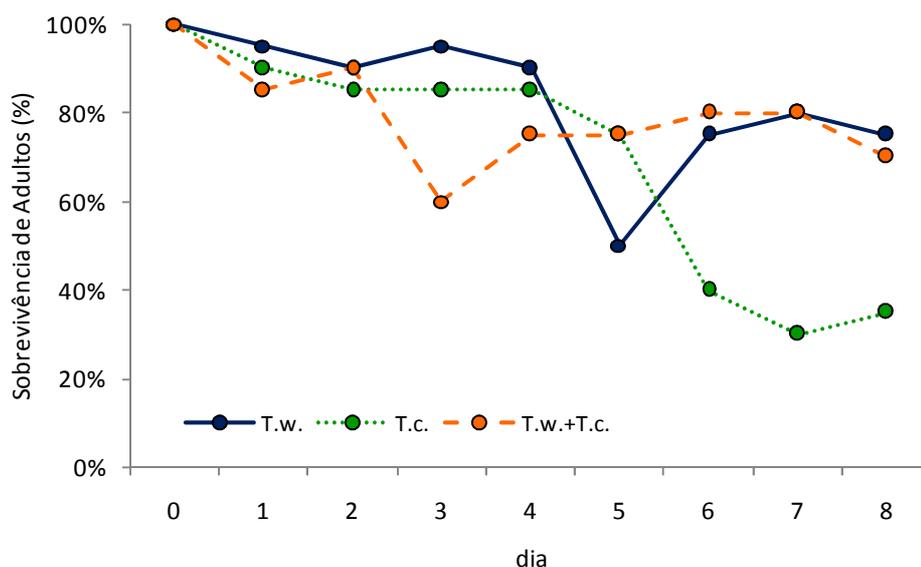


Figura 2.1.3 – Taxa de sobrevivência de adultos do copépoda planctônico *Temora turbinata* alimentado com diferentes dietas de microalgas (*T. weissflogii* (T.w.); *T. chuii* (T.c.) e *T. weissflogii* + *T. chuii* (T.w.+T.c.)).

2.1.4. Discussão

No ambiente natural, os copépodes podem incluir uma grande variedade de itens alimentares em sua dieta básica, composta principalmente por diatomáceas, dinoflagelados, protozoários, bactérias e detritos (ESKINAZI-SANT'ANNA e BJÖRNBERG, 2000). Perante uma alta disponibilidade e diversidade de alimento, muitos copépodes têm a capacidade de selecionar os itens a serem ingeridos (COWLESS, 1979). No entanto, as diatomáceas são à base do modelo clássico das cadeias alimentares envolvendo os copépodes como consumidor primário e os peixes como consumidor final (MIRALTO et al., 1999; IRIGOIEN et al., 2002). Está comprovado que o tipo e a qualidade do alimento modificam fortemente os processos de desenvolvimento e a fecundidade dos copépodes (IANORA, 2005). O alimento deve fornecer metabólitos primários tais como proteínas, ácidos graxos e vitaminas para o bom desenvolvimento dos indivíduos. Dietas monoalgais podem conter deficiências em nutrientes essenciais (JONÁSDOTTIR e KIØRBE, 1996; JONES E FLYNN, 2005), minerais (URABE e WATANABE, 1992), ácidos graxos insaturados

(MULLER-NAVARRA et al., 2000), esteróis (KLEIN BRETELER et al., 1999) ou aminoácidos (KLEPPEL et al., 1998). Por isso, existem diversos estudos utilizando dietas plúrialgais para favorecer as taxas de fecundidade e de desenvolvimento dos copépodes (MAUCHLINE, 1998). Por outro lado, dietas plúrialgais podem incrementar os custos de produção e o tempo-efetivo de cultivo para propósitos de aquicultura (BUTTINO et al., 2009).

A dieta monoalgal de *T. weissflogii* foi a que apresentou os melhores resultados quanto aos valores de fecundidade de *Temora turbinata*, em comparação com as dietas monoalgal de *T. chuii* e a mista (T.w.+T.c.). De forma geral, em estudos realizados tanto em campo como em laboratório, existe uma relação diretamente positiva entre a produção de ovos dos copépodes e a concentração de diatomáceas (BAN et al., 1997; IRIGOIEN et al., 2000). Em experimentos realizados com *Temora stylifera* alimentada com uma dieta monoalgal de *T. weissflogii* foram observados altos valores de fecundidade, mas baixas taxas de eclosão (CEBALLOS e IANORA, 2003). O uso de diatomáceas tem sido evitado em alguns estudos devido ao seu reconhecido efeito negativo na taxa de eclosão de ovos (MIRALTO et al, 1999; IANORA, 2005). Nos copépodes *Acartia stueri* e *Centropages hamatus* foram observadas tanto baixas fecundidades como taxa de eclosão quando alimentados exclusivamente com esta microalga (BAN et al., 1997). Dietas monoalgais de Criptofíceas (*Rhodomonas baltica* Karsten) e dinoflagelados (*Prorocentrum minimum* (Pavillard)) têm mostrado bons resultados tanto na taxa de produção de ovos como na taxa de eclosão em *Temora stylifera* (BUTTINO et al., 2009) sendo uma boa alternativa para o uso de diatomáceas.

Embora obtendo melhores resultados com a dieta monoalgal de *T. weissflogii*, os valores de fecundidade de *T. turbinata* foram semelhantes (valor máximo de 12,4 ovos fem⁻¹ dia⁻¹) com relação a outros estudos realizados com a mesma espécie em campo (HOPCROFT e ROFF, 1998) e em laboratório (KAMINSKI e MONTU, 2005; MELO JUNIOR, 2009). Em experimentos realizados em águas tropicais (~28°C) foram registrados valores médios entre 8 e 18 ovos fêm.⁻¹ dia⁻¹ (HOPCROFT e ROFF, 1998). Em águas subtropicais brasileiras (~ 20 °C), a produção da população de *T. turbinata* foi menor do que a obtida

neste estudo, com valores médios de $2,6 \pm 2,4$ ovos $\text{fem}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (MELO JUNIOR, 2009). Esses valores não foram muito diferentes dos valores médios encontrados em experimentos em laboratório com temperaturas menores ($\sim 20^\circ\text{C}$), registrados entre 5 a 21 ovos $\text{fem}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (KAMINSKI e MONTU, 2005). Esta espécie apresenta baixas taxas de fecundidade, se comparada com outros copépodes calanóideos de águas tropicais (ex: *Acartia tonsa*, 99 ovos $\text{fem}^{-1} \text{dia}^{-1}$) (HOPCROFT e ROFF, 1998). Provavelmente, as menores taxas de produção de ovos foram causadas pelo tipo de diatomácea oferecida, sendo que melhores taxas foram obtidas a partir de dietas com *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros calcitrans* (KAMINSKI E MONTU, 2005). O conteúdo nutricional é específico para cada microalga, sendo descrito, por exemplo, que dependendo do tipo e a quantidade dos compostos antimetabólicos, os efeitos negativos de algumas diatomáceas na reprodução dos copépodes podem ser diferentes (CEBALLOS e IANORA, 2003).

O taxa de eclosão de *T. turbinata* foi muito baixa, observando uma taxa de produção descontínua com interrupções na eclosão dos ovos durante todo o experimento, com as três dietas testadas. A taxa de eclosão foi maior com *T. chunii*, provavelmente pela ausência dos metabolitos antimetabólicos encontrados nas diatomáceas. As diatomáceas possuem aldeídos insaturados produzidos como uma atividade química de defesa ante a predação, produzindo em alguns copépodes baixa viabilidade de ovos, malformações nos náuplios e taxas baixas de desenvolvimento (IANORA, 2005). Altas fecundidades e baixas taxas de eclosão, já foram registradas em numerosos estudos de copépodes alimentados com dietas de diatomáceas, comprovando o efeito negativo deste grupo nos embriões, mas não nos indivíduos adultos (MIRALTO et al., 1999). A utilização de *T. chunii* neste estudo foi proposta como dieta alternativa para evitar o efeito deletério das diatomáceas na taxa de eclosão e devido a registros prévios de preferência alimentar de organismos zooplânctônicos pelas clorofíceas (TAVARES E MATSUMURA-TUNDISI, 1984; SÍPAÚBA-TAVARES, 1988). As clorofíceas têm sido consideradas adequadas como fonte alimentar em cultivos de organismos zooplânctônicos por apresentar paredes celulares finas, o que implica num baixo conteúdo de cinzas e uma alta relação entre o carbono orgânico e o

peso seco (SIPAÚBA-TAVARES E ROCHA, 1994). No entanto, apesar da aparente maior taxa de eclosão e de recrutamento de náuplios com *T. chuii*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

A porcentagem de sobrevivência de *T. turbinata* foi muito baixa com *T. chuii* e, de forma contrária, foi observado que na dieta mista, a porcentagem de sobrevivência se incrementou tanto quanto com a dieta monoalgal de *T. weissflogii*. Estes resultados mostram que a clorofíceia *T. chuii* não favoreceu a produção de ovos nem a sobrevivência dos adultos de *T. turbinata* e que apesar da baixa viabilidade dos ovos, a dieta monoalgal de *T. weissflogii* favoreceu a produção de ovos e a sobrevivência dos adultos. Uma dieta monoalgal pode favorecer a reprodução e desenvolvimento dos copépodes, desde que possua os requerimentos nutricionais essenciais para cada espécie. Outras dietas monoalgais de diatomáceas (ex: *Thalassiosira* spp.) e dinoflagelados, que mostraram bons resultados em experimentos prévios em laboratório (CEBALLOS e IANORA, 2003; IANORA, 2005), podem ser utilizadas em futuros experimentos com *T. turbinata* para favorecer o recrutamento da população. Desta forma, é necessário testar outras dietas que possam incrementar a taxa de eclosão de ovos para melhorar as taxas de fecundidade e a sobrevivência da espécie em condições de laboratório.

Agradecimentos

À FACEPE pela bolsa que permitiu dedicação do primeiro autor à pesquisa. À PETROBRAS pelo financiamento parcial da pesquisa.

Referências Bibliográficas

ARA, K. 2002. Temporal variability and production of *Temora turbinata* (Copepoda: Calanoida) in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Scientia Marina*, 66(4): 399-406.

ARAÚJO, H.; MONTÚ, M. 1993. Novo registro de *Temora turbinata* (Dana, 1949) (Copepoda, Crustácea) para águas atlânticas. *Nauplius*, 1: 89-90.

ARAUJO, H.M.P.; NASCIMENTO-VIEIRA, D.A.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SCHWAMBORN, R.; LUCAS, A.P.O.; ALVES, J.P.H. 2008. Zooplankton community

dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4): 751-762.

BAN, S.; BURNS C.; CASTEL, J.; CHAUDRON, Y.; CHRISTOU, E.; ESCRIBANO, R.; FONDA UMANI, S.; GASPARINI, S.; GUERRERO RUIZ, F., HOFFMEYER, M.; IANORA, A.; KANG, H.; LAABIR, M.; LACOSTE, A.; MIRALTO, A.; NING, X.; POULET, S.; RODRIGUEZ, V.; ROUNGE, J.; SHI, J.; STARR, M.; UYE, S.; WANG, J. 1997. The paradox diatom-copepod interactions. *Marine Ecology Progress series*, 157: 287-293.

BRADFORD-GRIEVE, J.M.; MARKHASEVA, E.L.; ROCHA, C.E.F.; ABIAHY, B. Copepoda In: BOLTOVSKOY, D. (Ed.). *South Atlantic Zooplankton*. Leiden: Backhuys Publishers, 1999. p. 869-1098.

BUTTINO, I.; IANORA, A.; BUONO, S.; VITELLO, V. 2009. Are monoalgal diets inferior to pluralalgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*? *Marine Biology*, 156: 1171-1182.

CAVALCANTI, E.A.H.; NEUMANN-LEITÃO, S.; VIEIRA, D.A.N. 2008. Mesozooplâncton do sistema estuarino de barra das Jangadas, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3): 436-444.

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

CEPAN, Contextualização sobre espécies exóticas invasoras. Dossiê Pernambuco. Recife, 2009. 63 p.

COWLES, T.J. 1979. The feeding response of copepods from the Peru upwelling system: food size selection. *Journal of Marine Research*, 13: 601-622.

ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; BJÖRNBERG, T.K.S. 2000. Conhecimento atual sobre o comportamento alimentar de copépodes Calanoida em ambientes marinhos. *Trabalhos Oceanográficos*. Universidade Federal de Pernambuco, 28(1): 11 – 20.

ESKINAZI-SANT'ANNA, E.M. Estudo da dieta natural de *Parvocalanus crassirostris*, *Paracalanus quasimodo*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata* (Copepoda, Calanoida), no Canal de São Sebastião (SP, Brasil). São Paulo, 2000. 317f. Tese (Doutorado em Oceanografia). Universidade de São Paulo.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH W.L.; CHANLEY M.H. (Eds). Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. p. 26-60.

HILLEBRAND, H.; DURSELEN, C.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35: 403-424.

HOPCROFT, R.R.; ROFF, J.C. 1998. Zooplankton growth rates: the influence of size in nauplii of tropical marine copepods. *Marine Biology*, 132: 87-96.

HWANG, J.S.; CHEN, Q.C.; WONG, C.K. 1998. Taxonomic composition and grazing rate of calanoid copepods in coastal waters of northern Taiwan. *Crustaceana*, 71: 378-389.

HWANG, J.S.; TURNER, J.T. 1995. Behaviour of cyclopoid, harpacticoid and calanoid copepods from coastal waters of Taiwan. *Marine Ecology*, 16: 207-216.

IANORA, A. Birth control effects of diatoms on copepod reproduction. In: Lee C.; O'Bryen P.J.; Marcus N.H. Copepods in aquaculture. Blackwell Publishing, 2005. p. 31-48.

IRIGOIEN, X.; HARRIS, R.P.; HEAD, R.N.; HARBOUR, D. 2000. The influence of diatom abundance on the egg production rate of *Calanus helgolandicus* in the English channel. *Limnology and Oceanography*, 45:1433-1439.

IRIGOIEN, X.; HARRIS, R.P.; VERHEYE, H.M.; JOLY, P.; RUNGE, J.; STARR, M.; POND, D.; CAMPBELL, R.; SHREEVE, R.; WARD, P.; SMITH, A.N.; DAM, H.G.; PETERSON, W.; TIRELLI, V.; KOSKI, M.; SMITH, T.; HARBOUR, D.; DAVIDSON, R. 2002. Copepod hatching success in marine ecosystems with high diatom concentrations. *Nature*, 419: 387-389.

JONÁSDOTTIR, S.H.; KIØRBE, T. 1996. Copepod recruitment and food composition: do diatom affect hatching success?. *Marine Biology*, 125: 743-750.

JONES, R.H.; FLYNN, K.J. 2005. Nutritional status and diet composition affect the value of diatoms as copepod prey. *Science*, 307: 1457-1459.

KAMINSKI, S.M.; MONTU, M.A. 2005. Produção de ovos dos copepodes costeiros *Acartia tonsa*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata*, da praia do Cassino – Rio Grande – RS. *Atlantica*, Rio Grande, 27(2):103-111.

KLEIN BRETELER, W.; SCHOGT, N.; BAAS, M.; SCHOUTEN, S.; KRAAY, G. 1999. Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Marine Biology*, 135: 191-198.

KLEPPEL, G.S.; BURKHART, C.A.; HOUCHIN, L. 1998. Nutritional and regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography*, 43: 1000-1007.

MAUCLINE, J. 1998. The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology*, 33: 1-710.

MELO JUNIOR, M. Produção secundária e aspectos reprodutivos de copépodes pelágicos ao largo de Ubatuba (SP, Brasil). São Paulo, 2009. 205f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

MENDEN-DEUER, S.; LESSARD, E.J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, 45(3): 569-579.

MIRALTO, A.; BARONE, G.; ROMANO, G.; POULET, S.A.; IANORA, A.; RUSSO, G.L.; BUTTINO, I.; MAZZARELLA, G.; LAABIR, M.; CABRINI, M.; GIACOBBE, G. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402: 173-176,

MULLER-NAVARRA, D.C.; BRETT, M.T.; LISTON, A.M.; GOLDMAN, C.R. 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*, 403: 74-77.

PESSOA, V.T.; NEUMANN-LEITÃO, S.; GUSMÃO, L.M.O.; SILVA, A.P.; PORTO-NETO, F.F. 2009. Comunidade zooplancônica na baía de Suape e nos estuários dos rios Tatuoca e Massangana, Pernambuco (Brasil). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(1): 80-94.

SANTOS, T.G.; GUSMÃO, L. M. O.; NEUMANN-LEITÃO, S.; CUNHA, A. G. 2009. Zooplâncton como indicador biológico da qualidade ambiental nos estuários dos rios Carrapicho e Botafogo, Itamaracá – PE. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(1): 44-56.

SILVA, A.P.; NEUMAN-LEITAO, S.; SCHWAMBON, R.; GUSMAO, L.M.O.; SILVA, T.A. 2004. Mesozooplankton of an Impacted Bay in North Eastern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(3): 485-493.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. 1994. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para a alimentação de larvas e alevinos de peixes: I - Algas clorofíceas. *Biotemas*, 6(11): 93-106.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. 1994. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para a alimentação de larvas e alevinos de peixes: I - Algas clorofíceas. *Biotemas*, 6(11): 93-106.

TAVARES, L.H.S. & MATSUMURA-TUNDISI, T., 1984. Feeding in adult females of *Argyrbdiaptomus furcatus* (Sars, 1901), Copepoda-Calanoidea, of Lobo Reservoir (Broa), São Carlos, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, 113:15-23.

TURNER, J.T.; HOPCROFT, R.R.; LINCOLN, J.A.; HUESTIS, C.S.; TESTER, P.A.; ROFF, J.C. 1998. Zooplankton feeding ecology: grazing by marine copepods and cladocerans upon phytoplankton and cyanobacteria from Kingston Harbour, Jamaica. *Marine Ecology*, 19: 195-208.

URABE, J.; WATANABE, Y. 1992. Possibility of N or P limitation for planktonic cladocerans: an experimental test. *Limnology and Oceanography*, 37: 244-251.

PARTE 2. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DENSIDADES DE DIATOMÁCEAS PARA O CULTIVO EM LABORATÓRIO DO COPÉPODE CALANOIDEO *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889

Resumo

Acartia lilljeborgii é um copépode mesoplanctônico estuarino dominante no Nordeste Brasileiro, podendo ser utilizado como organismo-teste para estudos de impacto ambiental nesta região. Ensaio de regime alimentar permitem conhecer a biologia da espécie e facilitam a sua manutenção em laboratório. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito de quatro densidades equivalentes em concentração de Carbono (0,25; 0,5; 1; 2 $\mu\text{g C mL}^{-1}$) de duas espécies de diatomáceas (*Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle e *Chaetoceros gracilis* Schütt) na sobrevivência e reprodução de *Acartia lilljeborgii*. Durante o experimento (8 dias), mantiveram-se os cultivos de microalgas na fase exponencial ($\pm 21^\circ\text{C}$; 24h luz). Os copépodes foram coletados no estuário da Baía do Pina (Recife, Pernambuco) e transportados ao laboratório onde procedeu-se a seleção de adultos saudáveis, posteriormente aclimatados durante 24 horas (Salinidade 36; 25°C ; fotoperíodo 12:12e). Após aclimação, 2 fêmeas e 2 machos foram introduzidos em béquers (50 mL) com a dieta de microalgas correspondente a cada tratamento (5 réplicas). Foi determinada a sobrevivência de adultos, produção diária de ovos, taxa de eclosão e recrutamento total de náuplios. Os dados foram tratados com o teste ANOVA fatorial (Teste a posteriori Tukey, $p \leq 0,05$). Houve influência da densidade e da espécie de diatomácea nas variáveis analisadas. Uma relação diretamente proporcional entre as densidades e as variáveis foi observada nos copépodes alimentados com *Chaetoceros gracilis* e inversamente proporcional nos copépodes alimentados com *Thalassiosira weissflogii*. As porcentagens de sobrevivência variaram entre 59,7 e 90,6%, apresentando o valor mais alto com a menor densidade de *Thalassiosira weissflogii*. Uma sobrevivência semelhante foi obtida com a maior densidade de *Chaetoceros gracilis* ($85,4 \pm 6,6\%$). Os maiores valores nas variáveis reprodutivas (produção diária de ovos: $17,6 \pm 2,3$ ovos fêmea dia⁻¹, taxa de eclosão: $76,3 \pm 3,3\%$ e recrutamento total de náuplios: 280) foram obtidos com *Chaetoceros gracilis*. Concentrações superiores a $1 \mu\text{g C mL}^{-1}$ desta diatomácea, favoreceram a sobrevivência e reprodução de *Acartia lilljeborgii*. Embora com sobrevivências e taxas reprodutivas mais baixas, *Thalassiosira weissflogii* gerou resultados semelhantes aos obtidos com *Chaetoceros gracilis*, mas com densidades 4 vezes menores. Os resultados sugerem que diferentes concentrações de carbono são necessárias quando diferentes fontes de alimento são fornecidas para *Acartia lilljeborgii*.

Palavras Chave: *Thalassiosira weissflogii*; *Chaetoceros gracilis*; dieta.

2.2.1. Introdução

O copépode planctônico *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht 1892 está amplamente distribuído ao longo da costa da América central e sul no oceano Atlântico (GONZÁLEZ e BOWMAN, 1965; BJÖRNBERG, 1981; ALMEIDA PRADO-POR e LANSAC-TÔHA, 1984). No Brasil, *A. lilljeborgii* é considerada uma espécie frequente e dominante nas comunidades mesozooplanctônicas de águas estuarinas (e.g. TUNDISI et al., 1973; NASCIMENTO-VIEIRA e ESKINAZI SANT'ANNA, 1989; GAETA et al., 1990; WANDENESS et al., 1997; DIAS, 1999). Esta espécie foi registrada como dominante em diversos estuários do nordeste brasileiro, entre os quais se encontram o Canal de Santa Cruz (PORTO NETO et al., 1999), Porto de Suape (SILVA et al., 2004), estuário do rio Anil (MARTINS et al., 2006), porto do Pecém (GARCIA et al., 2007), estuário do rio Sergipe (ARAÚJO et al., 2008), estuário de Barra das Jangadas (CAVALCANTI et al., 2008), estuários dos rios Carrapicho e Botafogo (SANTOS et al., 2009) e estuário do rio Coruripe (CAVALCANTI et al., 2011). Na bacia do Pina (Recife, Pernambuco), os trabalhos que citam esta espécie estão relacionados com estudos de diversidade e abundância zooplanctônica e estudos de indicadores biológicos (OLIVEIRA et al., 2007; SANTOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; PESSOA, 2009). Pouco se sabe sobre a biologia desta espécie dominante e seu papel na produtividade deste ecossistema.

As espécies de *Acartia* são consideradas de fácil cultivo em pequena e grande escala, para ser usadas como alimento alternativo na aquicultura marinha (KLEPPEL et al., 2005) e como organismo-teste em ecotoxicologia (GRETCHEN et al., 2006; IHARA et al., 2010). São copépodes onívoros, que se adaptam a diferentes dietas mantendo altas taxas de sobrevivência e reprodução (SAIZ et al., 2007). Embora esteja comprovado que os copépodes se alimentam de uma ampla variedade de partículas (KLEPPEL, 1993), as diatomáceas são consideradas, há muito tempo, um dos principais itens alimentares destes microcrustáceos na natureza (FLEMING, 1939). No laboratório, as diatomáceas são amplamente utilizadas nos cultivos de copépodes, por sua facilidade de cultivo e seu rápido crescimento. Com estudos de dieta pode ser avaliado o potencial de cultivo de *A. lilljeborgii* no

laboratório e possam ser adaptados protocolos de cultivo de outras espécies (ex: *A. tonsa*).

O objetivo do presente estudo foi comparar a sobrevivência de adultos, a produção diária de ovos, a taxa de eclosão e o recrutamentos de náuplios do copépoda planctônico *Acartia lilljeborgii*, alimentado com diferentes densidades das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*. A hipótese testada postula que as diferentes concentrações de diatomáceas (tanto em qualidade como em quantidade da dieta) afetam a sobrevivência e reprodução de *Acartia lilljeborgii* em condições de laboratório.

2.2.2. Materiais e Métodos

2.2.2.1. Cultivo de microalgas

As espécies fitoplanctônicas usadas como recurso alimentar para os copépodes foram as diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* (T.w.) e *Chaetoceros gracilis* (C.g.). Quatro densidades celulares foram testadas (Tratamentos), baseadas em estudos prévios que afirmam que entre 0.5 e 0.98 $\mu\text{g C mL}^{-1}$ se encontra a concentração de carbono considerada ótima para copépodes calanóideos (BUTTINO et al., 2009). Concentrações de carbono maiores e menores que a concentração ótima foram dispostas em quatro (4) tratamentos: Densidade 1 (D1) = 0.25 $\mu\text{g C mL}^{-1}$, Densidade 2 (D2) = 0.5 $\mu\text{g C mL}^{-1}$, Densidade 3 (D3) = 1 $\mu\text{g C mL}^{-1}$ e Densidade 4 (D4) = 2 $\mu\text{g C mL}^{-1}$.

A densidade celular de cada tratamento foi calculada a partir do biovolume (BV) de cada diatomácea através das seguintes equações:

Chaetoceros (forma prisma elíptico): $BV = (\pi/4) * a * b * c$ (HILLEBRAND et al., 1999)

Thalassiosira (forma cilíndrica): $BV = (\pi/4) * (d^2) * h$ (HILLEBRAND et al., 1999)

O biovolume (BV) de *Chaetoceros gracilis* (μm^3) foi determinado pela média da medição do diâmetro (d) e a altura (h) de 30 células (Tabela 2.2.1).

O biovolume (BV) de *Thalassiosira weissflogii* (μm^3) foi determinado pela média da medição da secção apical (a), secção transapical (b) e altura da valva (c) de 30 células (Tabela 2.2.1). As células independentes foram medidas no microscópio composto utilizando uma régua adaptada à ocular previamente calibrada.

A biomassa celular (BM) em μg de carbono das diatomáceas foi determinada pela seguinte relação, estabelecida para microalgas pertencentes à ordem Bacillariophyceae (Tabela 2.2.1):

$$BM = (0,288 * BV^{0,811}) / 10^{-6} \quad (\text{MENDEN-DEUER E LESSARD, 2000})$$

Com o valor de biomassa celular das duas diatomáceas foram definidas as densidades celulares necessárias para fornecer o conteúdo de carbono desejado por copépode (Tabela 2.2.1). Durante o experimento, realizou-se diariamente a contagem das microalgas para calcular o volume de cada tratamento a ser adicionado de acordo com o crescimento das populações.

Tabela 2.2.1 - Dados do biovolume (BV) e biomassa celular (BM) de *Thalassiosira weissflogii* (T.w.) e *Chaetoceros gracilis* (C.g.) para determinação da densidade celular de cada tratamento.

	T.w	C.g.	
BV (μm^3)=	1533,98	471,79	Equivalência em Concentração de Carbono ($\mu\text{g C mL}^{-1}$)
BM ($10^{-5} \mu\text{gC}$) =	11,04	4,02	
Tratamentos	Densidade celular (10^3 cél mL^{-1})		
D1	2,3	6,2	0,25
D2	4,5	12,4	0,50
D3	9,1	24,9	1,00
D4	18,1	49,7	2,00

As microalgas foram mantidas em erlenmeyers de 500 mL com meio F/2 Guillard preparado com água do mar com 36 de salinidade, temperatura média de $\pm 21^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de 24h de luz (lâmpadas fluorescentes de 20W). Durante o experimento, os cultivos foram mantidos na fase exponencial, repicando a cada dois dias.

2.2.2.2. Coleta dos copépodes

Os organismos foram coletados no estuário da Baía do Pina na cidade de Recife (Nordeste brasileiro). Foram realizados arrastos verticais sucessivos com uma rede cônica de plâncton de abertura de malha de 300 μm . Para diminuir o estresse dos organismos, foi adaptado um copo coletor cego no extremo da rede. Os organismos acumulados no copo foram vertidos cuidadosamente em baldes de 20 L com tampa e acondicionados em sacolas pretas. Em cada balde foi colocado uma bomba aeradora (bateria), para permitir a oxigenação dos indivíduos durante o percurso ao Laboratório de Cultivo da UFPE. Adicionalmente, coletou-se água do mar e foram aferidas a temperatura e salinidade do local.

2.2.2.3. Experimento de dieta

No laboratório, foram retirados sob estereomicroscópio adultos saudáveis de *A. lilljeborgii* (antenas completas, boa movimentação) dos baldes de coleta, e foram inseridos separadamente machos e fêmeas em béquers de 200 mL para aclimação durante 24 horas. Nos béquers foi colocada previamente água do local filtrada com uma rede de abertura de malha de 45 μm para evitar a presença de protozoários. As condições ambientais foram controladas em laboratório, mantendo a salinidade (36) e temperatura de coleta (25°C), fotoperíodo 12:12 (luz:escuridão) e aeração suave.

Depois do período de aclimação (dia 0) foi realizado um experimento de 8 dias de duração. Em cada béquer foram colocados 50 mL de água do mar filtrada com a dieta de microalgas correspondente a cada tratamento

(Tabela 2.2.1). Posteriormente, foram introduzidas 2 fêmeas e 2 machos em cada béquer constituindo a unidade experimental. As unidades experimentais foram levadas a uma incubadora com controle de temperatura e fotoperíodo. Para cada tratamento foram realizadas 5 réplicas.

Diariamente, os indivíduos foram transferidos a um novo béquer com a dieta de cada tratamento pronta. As unidades experimentais, já sem os indivíduos adultos, foram analisadas sob estereomicroscópio para realizar a contagem de ovos (incluindo as cascas vazias) e determinar a taxa diária de produção de ovos ($PDO = \text{Média do número total de ovos} / 2 \text{ fêmeas}$). Os ovos foram transferidos a placas de petri pequenas e incubados por mais 24 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram observadas no estereomicroscópio para contar os náuplios eclodidos, determinar a taxa de eclosão de ovos ($\%TEO = \text{Média do número total de náuplios} / \text{Média número do total de ovos} * 100$) e de náuplios recrutados no final do experimento ($\text{Número total de ovos por fêmea} * \%TEO$). A sobrevivência de fêmeas e machos foi registrada diariamente durante o experimento ($\%SA = - \text{número total de adultos vivos por dia} / \text{Número total de copépodes adultos no início do experimento} * 100$). Quando algum dos indivíduos (um macho ou uma fêmea) morria, era substituído por um indivíduo novo retirado do cultivo estoque. Se as duas fêmeas morriam, essa unidade experimental finalizava (metodologia de Buttino et al., 2009).

2.2.2.4. Análise dos dados

Os pré-requisitos para aplicação de testes paramétricos foram testados (Distribuição normal e homogeneidade de variância). Os dados foram transformados para Ln. Diferenças significativas entre as dietas (diatomáceas e densidades; densidades e dias de cultivo) na sobrevivência de adultos, produção diária de ovos e sucesso de eclosão de *A. lilljeborgii* foram analisados usando uma ANOVA de dois fatores ($F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$; $p < 0,05$). As diferenças significativas detectadas ($p < 0,05$) foram analisadas com um teste *a posteriori* Tukey. Para a realização das análises foi utilizado o programa Bioestat 5.0.

2.2.3. Resultados

2.2.3.1. Sobrevivência de Adultos

Os adultos de *A. lilljeborgii* apresentaram maiores sobrevivências quando alimentados com a menor densidade de *T. weissflogii* e a maior de *C. gracilis* (Figura 2.2.1; Tabela 2.2.2). Os valores foram predominantemente maiores do que 60% e sem diferenças significativas entre as duas diatomáceas (Tabela 2.2.3.A.).

A porcentagem de sobrevivência de adultos alimentados com *T. weissflogii* variou entre 67,2 e 90,6% (Tabela 2.2.2), obtendo-se os melhores resultados com a menor densidade da microalga ($0,25 \mu\text{g C dia}^{-1}$). Houve diferenças significativas entre os tratamentos e os dias de cultivo na sobrevivência dos copépodes alimentados com *T. weissflogii* (Tabela 2.2.3.B.). A sobrevivência foi significativamente maior com a menor densidade ($0,25 \mu\text{g C dia}^{-1}$) do que com os outros três tratamentos. Durante o experimento, a sobrevivência no dia 2 foi significativamente maior do que no dia 6.

Caso contrário foi observado com a diatomácea *C. gracilis*, sendo a maior densidade ($2 \mu\text{g C dia}^{-1}$) a que favoreceu a sobrevivência de *A. lilljeborgii*, com porcentagens que variaram entre 59,7 e 85,4%. A sobrevivência foi significativamente menor no tratamento com a menor densidade ($0,25 \mu\text{g C dia}^{-1}$) que nos dois tratamentos com as maiores densidades (1 e $2 \mu\text{g C dia}^{-1}$). Também foram encontradas diferenças significativas entre os dias do experimento, observando uma diminuição gradual na sobrevivência com o aumento do tempo e uma diminuição marcadamente significativa no último dia do cultivo com relação aos dias anteriores.

2.2.3.2. Produção diária de ovos (PDO)

A produção diária de ovos (PDO) apresentou a mesma tendência observada na sobrevivência dos copépodes. Adultos alimentados com *T. weissflogii* tiveram maior PDO com a menor densidade da microalga e adultos

alimentados com *C. gracilis* tiveram maior PDO com a maior densidade (Figura 2.2.2; Tabela 2.2.2).

Os adultos alimentados com *T. weissflogii* apresentaram PDO's que variaram entre 6,2 e 10,1 ovos fem. dia⁻¹. Houve diferenças significativas tanto entre os tratamentos como entre os dias de cultivo (Tabela 2.2.3.B). Entre os tratamentos, a menor densidade da microalga (0,25 µg C dia⁻¹) apresentou PDO's significativamente maiores que as obtidas com as densidades de 1 e 2 mg C dia⁻¹. Com relação aos dias de cultivo, foi observado um pico de PDO no dia 5 (maiores PDO's obtidas com a D1: 18,4±3,6 e a D2: 20,4±5,7) significativamente maior que os resultados obtidos no primeiro e nos últimos dias do experimento (dia 1, 7 e 8).

Os copépodes alimentados com *C. gracilis* alcançaram maiores PDO's que os alimentados com *T. weissflogii*. Os valores médios variaram entre 2,0 e 17,6 ovos fem. dia⁻¹. Diferenças foram detectadas entre os tratamentos, sendo as densidades de 0,25 e 0,5 µg C dia⁻¹ significativamente menores que os outros dois tratamentos. Não houve diferenças significativas entre os dias do experimento (Tabela 2.2.3.B.).

2.2.3.3. Taxa de eclosão

Da mesma forma que na sobrevivência de adultos e na PDO, as menores densidades de *T. weissflogii* e as maiores de *C. gracilis* favoreceram a taxa de eclosão dos copépodes (Figura 2.2.3; Tabela 2.2.2).

Os adultos alimentados com *T. weissflogii* apresentaram taxas de eclosão entre 38,5 e 57,0% obtendo a maior porcentagem quando alimentados com a segunda menor densidade (0,5 µg C dia⁻¹). Não houve diferenças significativas na taxa de eclosão entre as densidades de *T. weissflogii* e nem entre os dias de cultivo (Tabela 2.2.3.B.).

Os copépodes alimentados com *C. gracilis* tiveram taxas de eclosão que variaram entre 27,5 e 76,3%. A maior taxa foi obtida com a terceira densidade desta microalga ($1,0 \mu\text{g C dia}^{-1}$). Houve diferenças significativas entre os tratamentos, sendo a taxa de eclosão dos copépodes alimentados com a menor densidade de *C. gracilis* ($0,25 \mu\text{g C dia}^{-1}$) significativamente menor do que as taxas obtidas com os outros tratamentos. A taxa obtida com a terceira densidade ($1,0 \mu\text{g C dia}^{-1}$) foi significativamente maior que a alcançada com a maior densidade ($2,0 \mu\text{g C dia}^{-1}$). Não houve diferenças significativas entre os dias do experimento (Tabela 2.2.3.B.).

2.2.3.4. Recrutamento de náuplios

O recrutamento total de náuplios variou entre 96 e 206 em todo o experimento, nos copépodes alimentados com *T. weissflogii* (Tabela 2.2.2). O maior recrutamento de náuplios por dia foi alcançado no dia 5 com um valor de 64 náuplios (Figura 2.2.4). A segunda densidade microalgal ($0,5 \mu\text{g C dia}^{-1}$) favoreceu o recrutamento de náuplios, obtendo um valor médio de $27,5 \pm 19,8$ (Figura 2.2.4). As menores densidades (D1 e D2) apresentaram recrutamentos de náuplios significativamente maiores do que os obtidos com os outros tratamentos (Tabela 2.2.3). Quanto aos dias do experimento, o primeiro e os últimos dias (d1, d7 e d8) apresentaram recrutamentos significativamente menores que os outros dias do ensaio (Tabela 2.2.3).

A quantidade total de nauplios recrutados durante o experimento nos copépodes alimentados com *C. gracilis* variaram entre 12 e 208 indivíduos, obtendo recrutamentos significativamente maiores com as duas maiores densidades ($1,0$ e $2,0 \mu\text{g C dia}^{-1}$) (Tabela 2.2.3). O terceiro tratamento ($1,0 \mu\text{g C dia}^{-1}$) apresentou médias diárias altas de recrutamento ($39,6 \pm 12,5$), principalmente depois do terceiro dia do experimento (Figura 2.2.4). Não houve diferenças entre os dias do experimento (Tabela 2.2.3).

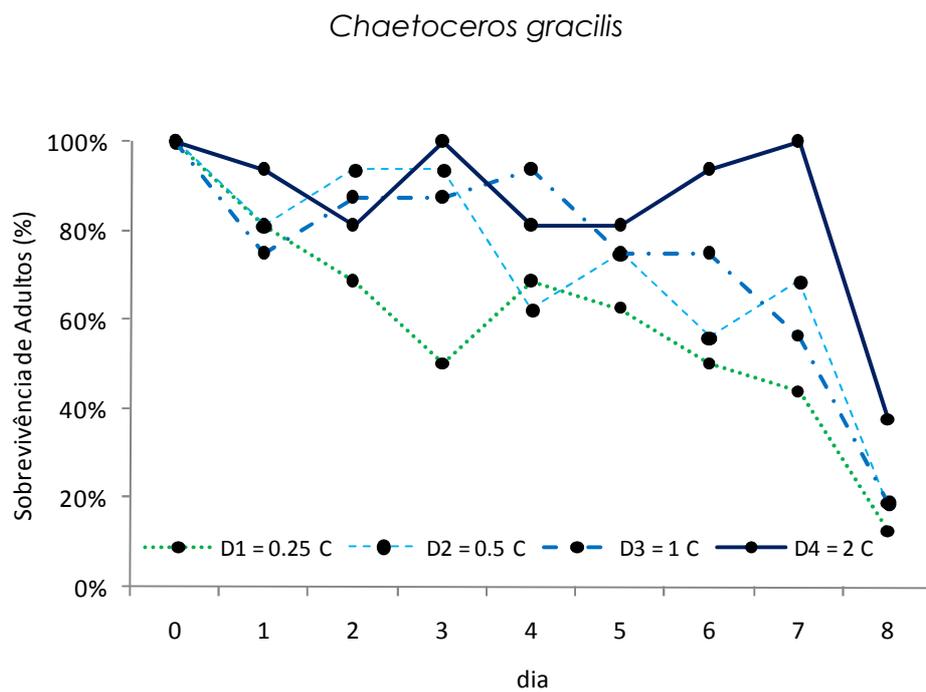
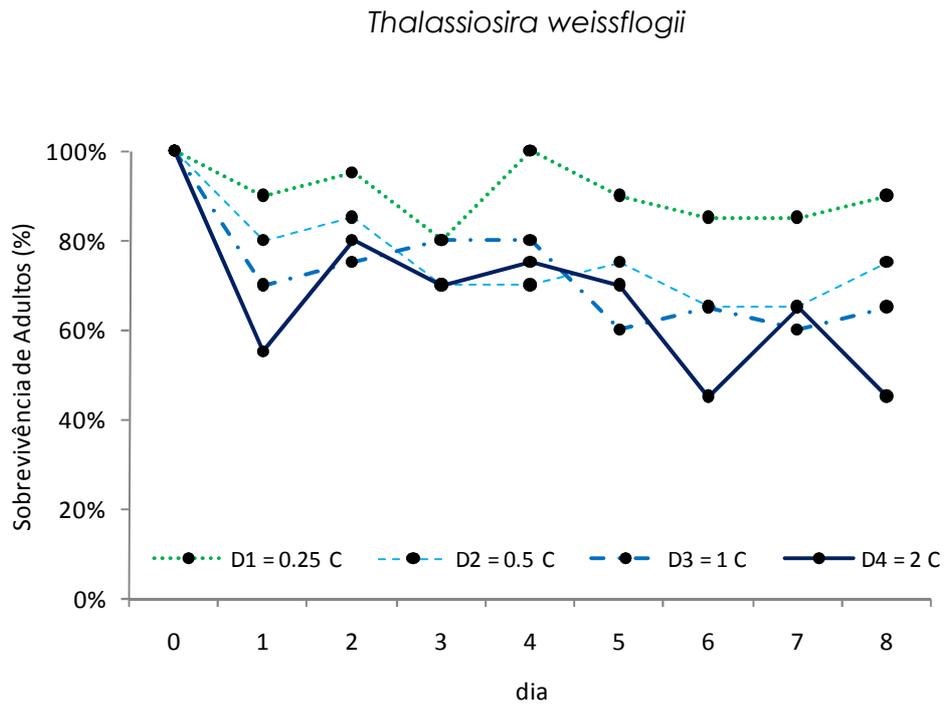


Figura 2.2.1 - Sobrevivência (%) dos adultos de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*.

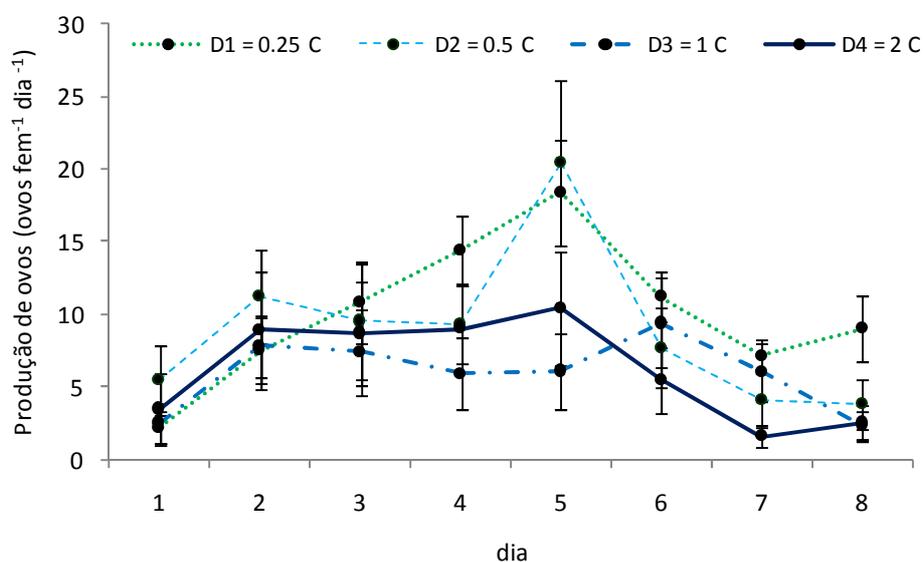
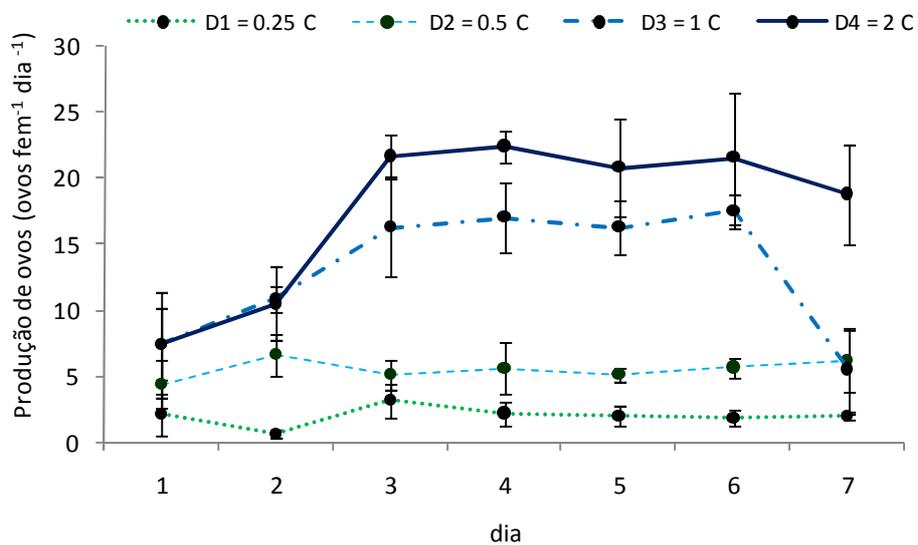
Thalassiosira weissflogii*Chaetoceros gracilis*

Figura 2.2.2 - Produção de ovos (ovos fem⁻¹ dia⁻¹) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*.

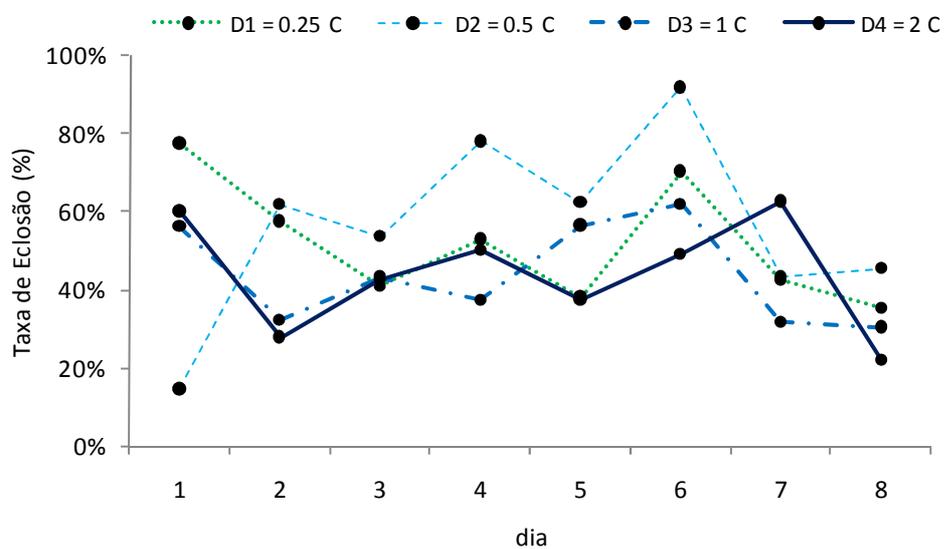
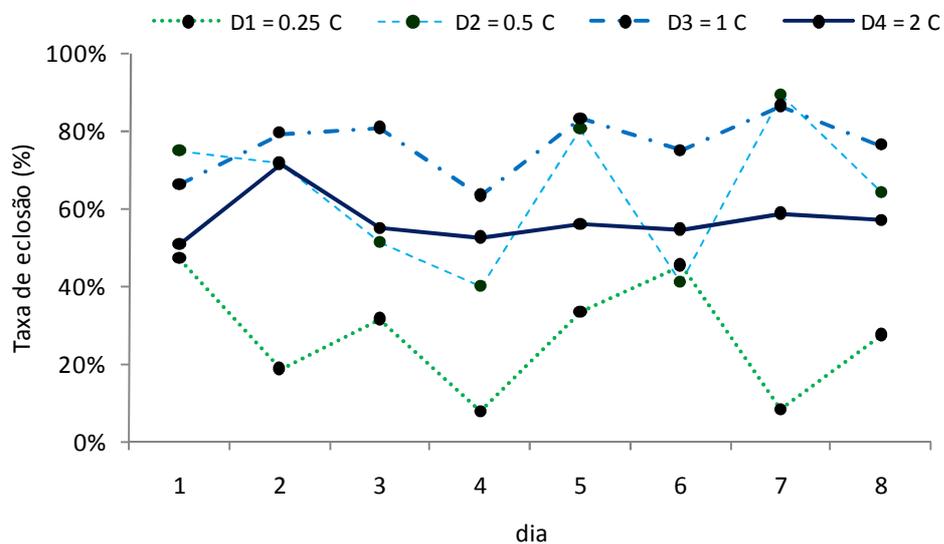
Thalassiosira weissflogii*Chaetoceros gracilis*

Figura 2.2.3 - Taxa de eclosão dos ovos (%) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*.

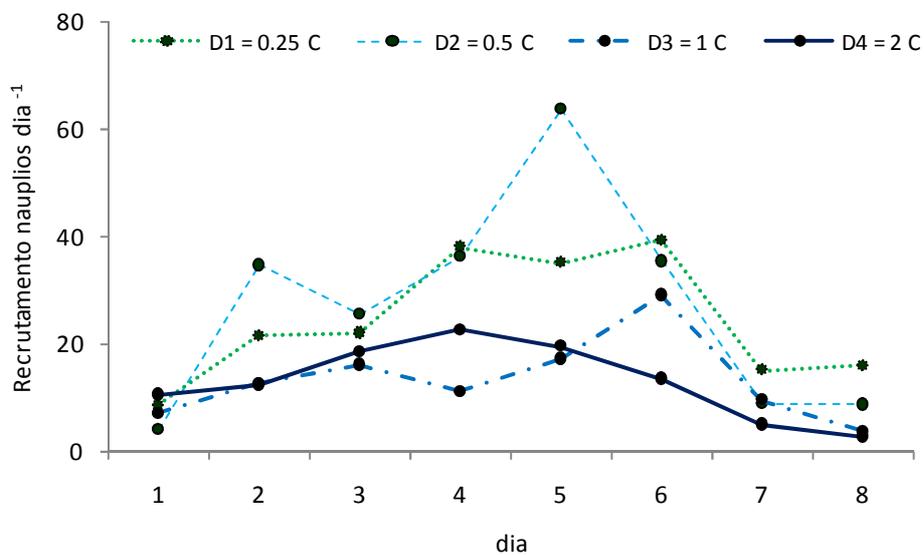
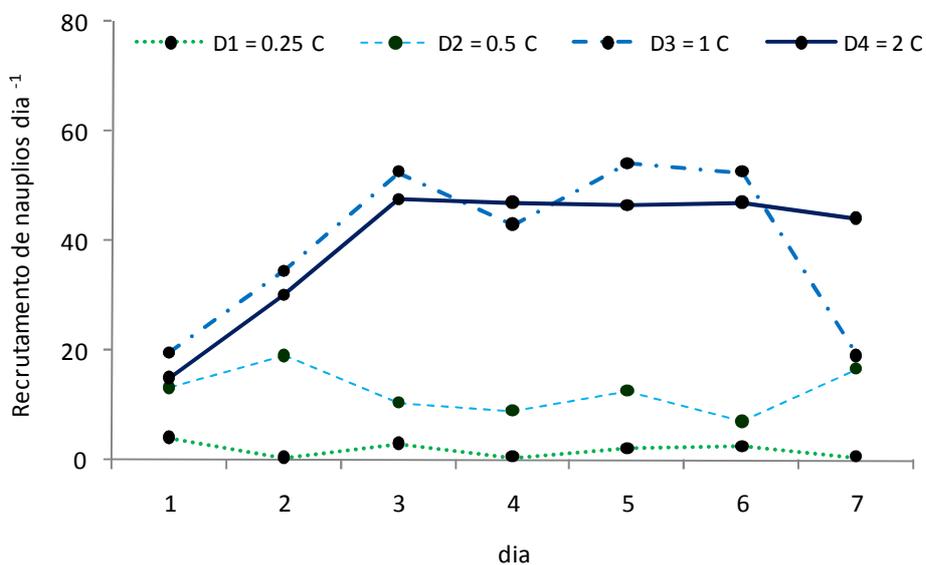
Thalassiosira weissflogii*Chaetoceros gracilis*

Figura 2.2.4 - Recrutamento diário de náuplios (Total náuplios dia⁻¹) dos copépodes de *Acartia lilljeborgii* alimentados com diferentes densidades celulares das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*.

Tabela 2.2.2 - Média \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados em *Acartia lilljeborgii* alimentados durante 8 dias com diferentes densidades das diatomáceas *Thalassiosira weissflogii* (T.w.) e *Chaetoceros gracilis* (C.g.).

	T.w.	C.g.
Tratamento	Sobrevivência de adultos (%)	Sobrevivência de adultos (%)
D1 = 0.25 C	90,6 \pm 2,3	59,7 \pm 8,3
D2 = 0.5 C	76,1 \pm 3,7	72,2 \pm 8,3
D3 = 1 C	72,8 \pm 4,3	74,3 \pm 8,2
D4 = 2 C	67,2 \pm 5,8	85,4 \pm 6,6
Tratamento	Produção de ovos (Ovos fem. ⁻¹ dia ⁻¹)	Produção de ovos (Ovos fem. ⁻¹ dia ⁻¹)
D1 = 0.25 C	10,1 \pm 1,6	2,0 \pm 0,3
D2 = 0.5 C	8,9 \pm 1,8	5,5 \pm 0,3
D3 = 1 C	5,9 \pm 0,8	13,0 \pm 1,9
D4 = 2 C	6,2 \pm 1,1	17,6 \pm 2,3
Tratamento	Taxa de eclosão (%)	Taxa de eclosão (%)
D1 = 0.25 C	51,7 \pm 5,2	27,5 \pm 6,2
D2 = 0.5 C	56,2 \pm 7,8	64,1 \pm 7,5
D3 = 1 C	43,6 \pm 4,2	76,3 \pm 3,3
D4 = 2 C	43,9 \pm 4,8	57,0 \pm 2,6
Tratamento	Total de náuplios recrutados	Total de náuplios recrutados
D1 = 0.25 C	206	12
D2 = 0.5 C	204	89
D3 = 1 C	114	277
D4 = 2 C	96	280

Tabela 2.2.3 - Resumo da ANOVA de dois fatores e o teste *a posteriori* Tukey comparando: A. Espécie de diatomácea e densidade microalgal; B. Densidade microalgal (D) e Dias do experimento (d) para cada diatomácea fornecida como recurso alimentar. * indica diferenças significativas.

A.

Resposta Biológica	ANOVA-Dois fatores			
	Diatomáceas ($F_{crit} = 5,99$)		Densidades ($F_{crit} = 6,59$)	
	$F_{(1;6;0,05)}$	p	$F_{(3;4;0,05)}$	p
Taxa de sobrevivência	0.1372	0.7316	0.0140	0.9973
Produção de ovos	0.1498	0.7210	0.3272	0.8084
Taxa de eclosão	0.3905	0.5781	0.6812	0.6206
Recrutamento de nauplios	0.0100	0.9237	0.1747	0.9066

B.

Resposta Biológica	ANOVA-Dois fatores - <i>Thalassiosira weissflogii</i>					
	Densidades ($F_{crit} = 2,99$)		Teste Tukey	dias ($F_{crit} = 2,43$)		Teste Tukey
	$F_{(3;28;0,05)}$	p		$F_{(7;24;0,05)}$	p	
Taxa de sobrevivência	17.5729	< 0.0001*	D1 > D2,D3 e D4	2.8438	0.0296*	d2 > d6
Produção de ovos	4.3108	0.0160*	D1 > D3	6.2382	0.0007*	d5 > d1, d7 e d8
Taxa de eclosão	1.2221	0.3264	-	1.6045	0.1885	-
Recrutamento de nauplios	6.2192	0.0037*	D1 > D3 e D4 / D2 > D4	9.5283	< 0.0001*	d1 < d3, d4, d5 e d6 / d8 < d2, d3, d4, d5 e d6 / d7 < d4, d5 e d6

Resposta Biológica	ANOVA-Dois fatores - <i>Chaetoceros gracilis</i>					
	Densidades ($F_{crit} = 3,01$)		Teste Tukey	dias ($F_{crit} = 2,49$)		Teste Tukey
	$F_{(3;24;0,05)}$	p		$F_{(7;21;0,05)}$	p	
Taxa de sobrevivência	8.7184	0.0008*	D1 < D3 e D4	12.7365	< 0.0001*	d8 < Todos os dias
Produção de ovos	51.4205	< 0.0001*	D1 < D2, D3 e D4 / D2 < D3 e D4	2.3934	0.0572	-
Taxa de eclosão	16.3957	< 0.0001*	D1 < D2, D3 e D4	1.2376	0.3333	-
Recrutamento de nauplios	44.2050	< 0.0001*	D1 < D2, D3 e D4 / D2 < D3 e D4	0.6621	0.6825	-

2.2.4. Discussão

2.2.4.1. Influência da dieta na sobrevivência de adultos

Altas porcentagens de sobrevivência em copépodes calanóides planctônicos alimentados com *T. weissflogii* já foram registradas em estudos prévios (CEBALLOS e IANORA, 2003; OHS et al., 2010). Uma sobrevivência de 100% foi observada nas fêmeas de *Temora stylifera* quando alimentadas com esta microalga (CEBALLOS e IANORA, 2003). Pelo contrario, com outras diatomáceas (*Thalassiosira rotula* Meunier, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, e *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin) foi observado uma redução na sobrevivência depois do sexto dia do experimento (CEBALLOS e IANORA, 2003). A sobrevivência do copépode *Pseudodiaptomus pelagicus* Herrick alimentado com *T. weissflogii* foi significativamente maior que quando alimentado com dietas monoalgais de *C. gracilis*, *Rhodomonas lens* Pascher & Ruttner e *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (OHS et al., 2010). Estes resultados indicaram que o fornecimento de *T. weissflogii* favorece a sobrevivência desta espécie em condições de laboratório.

As porcentagens de sobrevivência de copépodes de *A. lilljeborgii* alimentados com *C. gracilis* também foram altas quando comparadas com os resultados obtidos com *T. weissflogii*, no entanto, no oitavo dia do experimento foi registrado uma diminuição drástica na sobrevivência da espécie. A causa desta mortalidade não pode ser atribuída á concentração de carbono, já que o efeito foi observado nos quatro tratamentos. Este efeito indesejado provavelmente foi causado pela falta de ressuspensão das partículas de alimento nas unidades experimentais. Durante as 24 horas antes da troca do novo meio (experimento semi-estático), se formava um biofilme¹ de *C. gracilis* no fundo dos béquers. Foi observado que quando os copépodes se alimentavam no fundo do béquer, arrastavam pedaços do biofilme ficando

¹ Definição de Biofilme: matriz polimérica de aspecto gelatinoso, aderida a uma superfície sólida, quase sempre imersa em meio líquido, constituída essencialmente por microrganismos, pelas substâncias poliméricas extracelulares que estes excretam e por água. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo ao conjunto a designação de biofilme (Characklis e Wilderer, 1989).

aderidos nas cerdas das antenas e da rama caudal, dificultando com o tempo a natação até impedir sua movimentação. A deposição das células no fundo sem ressuspensão e a capacidade das microalgas do gênero *Chaetoceros* pela formação de partículas exopoliméricas transparentes (TEP) formadoras do biofilme (PASSOW, 2002) afetaram negativamente a sobrevivência dos adultos. A formação de biofilme não foi observada nas unidades experimentais com adição de *T. weissflogii*, mostrando a necessidade de manter um sistema de ressuspensão no cultivo quando os organismos forem alimentados com microalgas formadoras de TEPs.

2.2.4.2. Influência da dieta na fecundidade

Os copépodes do gênero *Acartia* apresentam um alto potencial reprodutivo, devido aos registros de altas PDO's em ecossistemas marinhos. Em regiões tropicais ($T > 20^{\circ}\text{C}$), foram registradas PDO's máximas para *A. lilljeborgii* de 88 ovos fêm⁻¹ dia⁻¹ e para *A. tonsa* de $69,8 \pm 7,4$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹ (HOPCROFT e ROFF, 1998). Já em regiões subtropicais, a temperatura e concentração de fitoplâncton são os fatores determinantes das flutuações da PDO (ARA, 2001), registrando valores de PDO para *A. lilljeborgii* (Lagoa de Cananeia, Brasil) de $66,8 \pm 15,1$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹ (ARA, 2001); para *A. grani* Sars G.O., 1904 (Baía de Malaga, Espanha) de 27,3 ovos fêm. dia⁻¹ (RODRIGUEZ et al., 1995); para *A. hongii* Soh & Suh, 2000 (mar Amarelo, Coréia) de 23,2 ovos fêm. dia⁻¹ (YOUN e CHOI, 2006) e para *A. lilljeborgii* (Ubatuba, Brasil) de $2,2 \pm 1,2$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹ (MELO, 2009).

Em estudos de dieta sob condições controladas, os copépodes do gênero *Acartia* apresentam menores PDO's que as registradas em campo. Neste estudo, *A. lilljeborgii* apresentou maiores e mais estáveis PDO's ($49,7 \times 10^3$ cél mL⁻¹ = $17,6 \pm 2,3$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹) quando alimentada com *C. gracilis* e, PDO's menores ($2,3 \times 10^3$ cél mL⁻¹ = $10,1 \pm 1,6$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹) com alguns picos de maior produção com *T. weissflogii* (Figura 2.2.2), sugerindo o favorecimento de *C. gracilis* na PDO desta espécie. Em ensaios realizados com *Acartia tonsa* foram observados resultados opostos e contrastantes com os observados neste estudo, encontrando a maior PDO (60×10^3 cél mL⁻¹ = $28 \pm$

0,5 ovos fêm⁻¹ dia⁻¹) em organismos alimentados com *T. weissflogii* e menores PDO's (840×10^3 cél mL⁻¹ = $20,1 \pm 1,0$ ovos fêm⁻¹ dia⁻¹) quando alimentadas com *C. gracilis* (TEIXEIRA et al., 2010). De acordo com os dados obtidos para o copépoda *A. tonsa*, *T. weissflogii* foi considerada a melhor opção para alcançar atas taxas de PDO (TEIXEIRA et al., 2010). No entanto, o presente estudo e ensaios realizados com o copépode *A. steueri* Smirnov, 1936 mostraram que baixas fecundidades e taxas de eclosão foram obtidas quando alimentados exclusivamente com *T. weissflogii* (BAN et al., 1997).

Embora alguns estudos considerem que a produção de ovos aumenta com o incremento nas concentrações de diatomáceas tanto no laboratório como em campo (IRIGOIEN et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2010), no presente estudo foi observado que a PDO de *A. lilljeborgii* diminuiu quando com o incremento na densidade celular de *T. weissflogii*. Desta forma, o excesso de alimento no experimento foi prejudicial para as taxas reprodutivas da espécie. De forma contrária, a PDO de *A. lilljeborgii* aumentou com o aumento da densidade celular de *C. gracilis*, seguindo o padrão observado na maioria dos estudos de dieta. O tamanho da microalga fornecida é importante na eficiência de captura do copépode (IRIGOIEN et al., 2003) e nas quantidades de biomassa necessária para alcançar os requerimentos nutricionais dos copépodes (TEIXEIRA et al., 2010). Microalgas de maior tamanho, como *T. weissflogii*, são de mais fácil captura e suprem com menor biomassa os requerimentos nutricionais e, pequenas microalgas, como *C. gracilis*, exigem um esforço de captura maior, sendo preciso maiores quantidades para alcançar os requerimentos nutricionais da espécie. Adicionalmente, alguns trabalhos afirmam que os copépodes respondem favoravelmente ao conteúdo nutricional fornecido em partículas maiores (KLEPPEL et al., 2005). Essa relação entre o tamanho da microalga, a eficiência de captura e a disponibilidade nutricional para o copépode, explica a melhor PDO obtida com menores densidades de *T. weissflogii* e maiores de *C. gracilis*, indicando que diferentes concentrações de carbono são requeridas dependendo do recurso alimentar fornecido para obter uma estabilização na PDO. Os

resultados obtidos também sugerem que maiores densidades de *C. gracilis* e menores densidades de *T. weissflogii* poderiam gerar melhores PDO's.

2.2.4.3. Influência da dieta na taxa de eclosão e recrutamento de náuplios

A densidade e a espécie de diatomácea tiveram influência sobre a taxa de eclosão e recrutamento de náuplios de *A. lilljeborgii*. A maior taxa de eclosão de ovos (76,3%) e o maior recrutamento de náuplios (277) durante o experimento foram obtidos com a terceira maior densidade ($24,9 \times 10^3$ cél mL⁻¹) de *C. gracilis*. Por outro lado, com *T. weissflogii* os resultados foram menores, apresentando a melhor taxa de eclosão de ovos (56,2%) e o maior recrutamento de náuplios (204 indivíduos) com a segunda maior densidade ($4,5 \times 10^3$ cél mL⁻¹) desta microalga. Taxas reprodutivas maiores e mais estáveis nos copépodes alimentados com *C. gracilis*, indicaram esta microalga como a melhor opção de recurso alimentar para *A. lilljeborgii* em condições de laboratório. No entanto, com baixas densidades de *T. weissflogii* foram obtidas taxas reprodutivas menores mais semelhantes às registradas com *C. gracilis* e maiores sobrevivências de adultos. O custo-benefício na escolha do recurso alimentar tem que ser avaliado, principalmente para fins de cultivo de *A. lilljeborgii* em mediana e grande escala.

Em algumas espécies de copépodes calanóideos como *Acartia steueri* e *Centropages hamatus* (Lilljeborg, 1853), a alimentação com *T. weissflogii* diminuiu a fecundidade e a taxa de eclosão, mais em outras como *Calanus helgolandicus* (Claus, 1863), *C. Pacificus* Brodsky, 1948 e *Temora stylifera* (Dana, 1849), inibiu unicamente a taxa de eclosão dos náuplios (BAN et al., 1997; CEBALLOS e IANORA, 2003). No presente estudo não foram observadas variações drásticas na taxa de eclosão nos copépodes alimentados com *T. weissflogii* e *C. gracilis*, e de forma contrária, os valores foram estáveis ao longo do experimento principalmente quando alimentados com a maior densidade de *C. gracilis*. O efeito negativo das diatomáceas na taxa de eclosão, de copépodes cultivados em laboratório tem sido amplamente documentado (MIRALTO et al., 1999). As duas principais hipóteses para esse efeito deletério estão relacionadas, primeiro com deficiências nutricionais de dietas

monoalgais de diatomáceas e segundo, com a presença de aldeídos insaturados tóxicos nas diatomáceas que bloqueiam a embriogênese (IRIGOIEN *et al.*, 2002; CEBALLOS e IANORA, 2003). Este efeito deletério das diatomáceas está diretamente refletido na taxa de eclosão e desenvolvimento dos náuplios, o que não foi observado no presente estudo. Algumas diatomáceas não afetam o recrutamento de náuplios de copépodes em curtos períodos de tempo (IRIGOIEN *et al.*, 2002) pelo que estudos de maior duração (> 8 dias) são necessários para verificar essa relação (CEBALLOS e IANORA, 2003). Também tem sido observado que o efeito deletério das diatomáceas e a resposta dos copépodes são específicos (POHNERT *et al.*, 2002; CEBALLOS e IANORA, 2003), impossibilitando a extrapolação de resultados específicos para o grupo todo e fazendo necessários testes diretamente com as espécies de interesse.

As tentativas de manutenção dos náuplios de *Acartia lilljeborgii* em laboratório para dar início ao cultivo estoque, não foram bem sucedidas. O tamanho das microalgas disponíveis (*Thalassiosira weissflogii*; *Chaetoceros gracilis* e *Tetraselmis chunii*) foi maior do que o requerido para alimentação dos náuplios desta espécie. Tentativas posteriores foram realizadas com a microalga *Nannochloropsis* sp. obtendo bons resultados de sobrevivência (aprox. duas semanas) mas não foram ainda padronizados. Ensaios de dieta durante os diferentes estágios de desenvolvimento desta espécie são necessários para a padronização do cultivo em condições de laboratório. O cultivo estoque é fundamental para dar continuidade a ensaios tanto de dieta como ecotoxicológicos. Dessa forma, serão evitados esforços de campo muitas vezes falidos na coleta, como foi enfrentado no presente trabalho, pela captura insuficiente do número de organismos requeridos para os testes e pela coleta de organismos em diferentes idades (provenientes de diferentes ninhadas) e em diferentes condições de saúde (parasitados ou com deformidades).

2.2.5. Conclusões

De acordo com os resultados deste estudo, *A. lilljeborgii* é uma opção interessante para cultivo em laboratório devido ao seu alto potencial reprodutivo e sua alta sobrevivência. No laboratório, o tipo de microalga e a densidade de fornecimento afetaram a sobrevivência dos adultos, a taxa de produção de ovos, a taxa de eclosão e o recrutamento de náuplios de *A. lilljeborgii*. A microalga que favoreceu a sobrevivência dos adultos (90,6%) foi *T. weissflogii* fornecida na menor densidade testada equivalente a uma concentração de 0,25 µg de carbono por mL. As taxas reprodutivas alcançadas com *T. weissflogii* foram menores que as alcançadas com *C. gracilis*, mas menores densidades foram necessárias para alcançar valores semelhantes. A microalga que favoreceu a reprodução de *A. lilljeborgii* foi *C. gracilis* fornecida nas maiores densidade testadas (24,9 e 49,7 x 10³ cél mL⁻¹) equivalentes a 1 e 2 µg de carbono por mL respectivamente. A sobrevivência dos adultos de *A. lilljeborgii* alimentados com *C. gracilis* pode ser melhorada mantendo um sistema de ressuspensão das células que se depositam no fundo e que criam um biofilme que se adere às cerdas dos copépodes afetando a movimentação e sobrevivência da espécie.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA PRADO-POR, M. S. E LANSAC-TÔHA, F. A. L. 1984. The distribution of brackish water Calanoida (Copepoda) along the coast of Brazil. *Hydrobiologia*, 113:147–50.

ARA, K. 2001. Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht in the Cananeia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* 445: 205–215.

ARAUJO, H.M.P.; NASCIMENTO-VIEIRA, D.A.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SCHWAMBORN; R., LUCAS; A.P.O. E ALVES, J.P.H. Zooplankton community dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. *Braz. J. Biol.*, 68(4): 751-762, 2008.

BAN, S.; BURNS, C.; CASTEJ, J.; CHAUDRON, Y.; CHRISTOU, E.; ESCRIBANO, R.; UMANI, S.F.; GASPARINI, S.; RUIZ, F.G.; HOFFMEYER, H.; IANORA, A.; KANG, H.K.; LAABIR, M.; LACOSTE, A.; MIRALTO, A.; NING, X.; POULET, S.; RODRIGUEZ, V.; RUNGE, J.; SHI, J.; STARR, M.; UYE, S.I.; WANG, Y. 1997. The paradox of diatom-copepod interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 287-293.

BJÖRNBERG, T.S.K. 1981. Copepoda. In: BOLTOVSKOY D. (Ed), Atlas del zooplancton del Atlantico Sudoccidental y Metodos de Trabajos con el Zooplancton Marino. INIDEP, Mar del Plata, Argentina, p. 587-677.

BUTTINO, I.; IANORA, A.; BUONO, V.; Vitello, V.; Sansone, G.; Miralto, A. 2009. Are monoalgal diets inferior to pluralgal diets to maximize cultivation of the calanoid *Temora stylifera*. *Mar. Biol.*, 156: 1171-1182.

CAVALCANTI, E. A. H. ; LARRAZÁBAL, M. E. L. ; CARNAÚBA, A. F. ; GOMES, N. L. A. ; NASCIMENTO-VIEIRA, D. Mesozooplâncton do estuário do rio Coruripe – coruripe/al. A. V Simposio Brasileiro de Oceanografia. Oceanografia e Políticas Públicas Santos, SP, Brasil – 2011.

CAVALCANTI, ELIANE V.H.; NEUMANN-LEITÃO, SIGRID; VIEIRA, DILMA A. DO N. Mesozooplâncton do sistema estuarino de barra das Jangadas, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3): 436-444, 2008.

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

CHARACKLIS, W. G., WILDERER, P. A.(eds.) 1989. Structure and function of biofilms, Dahlem Conference Life Science Research Report No. 46. Wiley, Berlin.

DIAS, C.O. 1999. Morphological abnormalities of *Acartia lilljeborgii* (Copepoda, Crustacea) in the Espírito Santo Bay (E.S. Brazil). *Hydrobiologia*, 394: 249-251.

FLEMING, R. H. 1939. The control of diatom populations by grazing. *J. Cons. Cons. Int. Explor. Mer*, 14: 210-227.

GAETA, S. A.; ABE, D. S.; SUSINI, S. M.; LOPES R. M.; METZLER, P. M. 1990. Produtividade primaria, plâncton e covariáveis ambientais no Canal de São Sebastião durante o outono. *Rev. Brasil. Biol.*, 50: 963-974.

GARCIA, T.M.; LIMA, J.P.; CASTRO FILHO, R.S. 2007. Mesozooplâncton da região costeira próxima ao terminal portuário do Pecém – Estado do Ceará. *Arq. Ciên. Mar*, 40(2): 19 – 25.

GONZALEZ, J.G.; BOWMAN, T.E. 1965. Planktonic copepods from Bahia fosforescente, Puerto Rico, and adjacent waters. Proc. U.S. natn. Mus., 117 (3513): 241-304.

GRETCHEN K. BIELMYER, MARTIN GROSEL L., KEVIN V. BRIX. 2006, Toxicity of Silver, Zinc, Copper, and Nickel to the Copepod *Acartia tonsa* Exposed via a Phytoplankton Diet. Environ. Sci. Technol. 40, 2063-2068.

HILLEBRAND, H.; DURSELEN, C-D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol., 35, 403-424.

HOPCROFT, R.R.; ROFF, J.C. 1998. Zooplankton growth rates: Influence of female size and resources on egg production of tropical marine copepods. Mar. Biol., 132: 79-86.

IANORA A., POULET S.A. & MIRALTO A. 2003. The effects of diatoms on copepod reproduction: A review. Phycologia, 42: 351-363.

IHARA P. M.; PINHO G. L. L.; FILLMANN G.. 2010. Avaliação do Copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como Organismo-Teste para Ensaio de Toxicidade Crônica. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 5 (1): 27-32.

IRIGOIEN X.; HARRIS, R.P.; VERHEYE, H.M.; JOLY, P.; RUNGE, J.; STARR, MICHAEL; POND, D.; CAMPBELL, R.; SHREEVE, R.; WARD, P.; SMITH, A.N.; DAM, H.G.; PETERSON, W.; TIRELLI, V.; KOSKI, M.; SMITH, T.; HARBOUR, D.; DAVIDSON, R. 2002; Copepod hatching success in marine ecosystems with high diatom concentrations. Nature, 419: 387-388.

IRIGOIEN X.; HEAD, R.N.; HARRIS, R.P.; CUMMINGS, D.; HARBOUR, D.; MEYER-HARMS, B. 2000. Feeding selectivity and egg production of *Calanus Helgolandicus* in the English Channel. Limn. And Ocean., 45: 44-54.

IRIGOIEN, X.; TITELMAN, J.; HARRIS R.P. 2003. Feeding of *Calanus finmarchicus* nauplii in the Irminger Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser., 262: 193-200.

KLEPPEL, G.S. 1993. On the diets of calanoid copepods. Mar. Ecol. Prog. Series. 99: 183-195.

KLEPPEL, G.S.; HAZZARD, S.H.E.; BURKART, C.A. 2005. Maximizing the nutritional values of copepods in aquaculture: managed versus balanced nutrition. In: Lee C-S, O'Bryen PJ, Marcus NH (eds) Copepods in aquaculture. Blackwell Publisher, Iowa, USA, pp. 49-59.

MARTINS, A.L.P.; LOPES, M.J.S.; MELO, O.T. 2006. Zooplâncton como bioindicador da qualidade ambiental no estuário do rio anil, São Luís, Maranhão. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 19: 51-60.

MELO, M. 2009. Produção secundária e aspectos reprodutivos de copépodes pelágicos ao largo de Ubatuba (SP, Brasil). Tese (Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

MENDEN-DEUER, S.; LESSARD, E.J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.*, 45(3), 569–579.

MIRALTO, A.; BARONE, G.; ROMANO, G.; POULET, S.A.; IANORA, A.; RUSSO, G.L.; BUTTINO, I.; MAZARELLA, G.; LAABIR, M.; CABRINI, M.; GIACOBBE, M.G. 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402: 173-176.

NASCIMENTO-VIEIRA, D. A.; SANT'ANNA, E. E. Composição do zooplâncton no estuário do Rio Timbó (Pernambuco-Brasil). *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, 20: 77-97, 1987/1989.

OHS, C.L.; CHANG, K.L.; GRABE, S.W.; DIMAGGIO, M.A.; STENN, E. 2010. Evaluation of dietary microalgae for culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*, 307(3–4): 225–232.

OLIVEIRA, G. C.; GUSMÃO, L. M. O.; PORTO NETO, F. F. MACROZOOPLÂNCTON DO COMPLEXO ESTUARINO DA BACIA DO PINA (RECIFE - PE). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

OLIVEIRA, G. C.; GUSMÃO, L. M. O.; SILVA, T. A.; NEUMANN – LEITÃO, S. 2009. Variação tidal e temporal do microzooplâncton em um estuário tropical. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço – MG.

PAFFENHÖFER, G.A.; IANORA, A.; MIRALTO, A.; TURNER, J. T.; KLEPPEL, G. S.; RIBERA D'ALCALÀ, M.; CASOTTI, R.; CALDWELL, G. S.; POHNERT, G.; FONTANA, A.; MULLER-NAVARRA, D.; JÓNASDÓTTIR, S.; ARMBRUST, V.; BÅMSTEDT, U.; BAN, S.; BENTLEY, M. G.; BOERSMA, M.; BUNDY, M.; BUTTINO, I.; CALBET, A.; CARLOTTI, F.; CAROTENUTO, Y.; D'IPPOLITO, G.; FROST, B.; GUISANDE, C.; LAMPERT, W.; LEE, R. F.; MAZZA, S.; MAZZOCCHI, M. G.; NEJSTGAARD, J. C.; POULET, S.A.; ROMANO,

G.; SMETACEK, V.; UYE, S.; WAKEHAM, S.; WATSON, S.; WICHARD, T. 2005. Colloquium on diatom–copepod interactions. *Mar Ecol. Prog. Ser. Vol.*, 286: 293–305.

PASSOW, U. 2002. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology-Progress Series*, 236: 1-12.

PESSOA, V.T. Mesozooplâncton da Baía do Pina, Recife, Pernambuco. *Dissertação, Oceanografia (UFPE)*. 2009.

POHNERT, G.; LUMINEAU, O.; CUEFF, A.; ADOLPH, S.; CORDEVANT, C.; LANGE, M.; POULET, S. 2002. Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defense against copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 245: 33-45.

PORTO NETO, F.F.; NEUMANN-LEITÃO, S.; GUSMÃO, L.M.O.; NASCIMENTO-VIEIRA, D.A.; SILVA, A.P.; SILVA, T.A. 1999. Variação sazonal e nictemeral do zooplâncton no canal de Santa Cruz, Itamaracá, PE, Brasil. *Trab. Oceanog. Univ. Fed. PE*, 27(2): 43-58.

RODRIGUEZ, V.; GUERRERO, F.; BAUTISTA, B. 1995. Egg production of individual copepods *Acartia grani* Sars from coastal waters: seasonal and diet variability. *J. Plank. Res.* 17(12): 2233-2250.

SAIZ, E.; CALBET, A.; ATIENZA, D.; ALCARAZ, M. 2007. Feeding and production of zooplankton in the Catalan Sea (NW Mediterranean). *Progr. Oceanog.*, 74: 313–328.

SANTOS, D.A. O zooplâncton como indicador da qualidade ambiental do Parque dos Manguezais de Pernambuco. *Dissertação, Oceanografia (UFPE)*. 2008.

SANTOS, T.G.; GUSMÃO, L.M.O.; NEUMANN-LEITÃO, S.; CUNHA, A.G. 2009. Zooplâncton como indicador biológico da qualidade ambiental nos estuários dos rios Carrapicho e Botafogo, Itamaracá – PE. *Rev. Bras. Eng. Pesca*, 4(1): 44-56.

SILVA, A.P.; Neumann-Leitão, S.; Schwamborn, R.; Gusmão, L.M.O.; Silva, T.A.A. 2004. Mesozooplankton of an Impacted Bay in North Eastern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(3): 485-493.

TEIXEIRA, P.F.; KAMINSKI, S.M. AVILA, T.R. CARDOZO, A.P.; BERSANO, J.G.F.; BIANCHINI, A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod

Acartia tonsa (Dana, 1896). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 82(2): 333-339.

TUNDISI J.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; KUTNER, M.B. 1973. Plankton studies in a mangrove environment. VIII. Further investigations on primary production, standing stock of phytoand zooplankton and some environmental factors. Institute Revue Ges. Hydrobiologia, 58: 925-940.

WANDENESS, A.P.; MATTOS, M.A.R.; NOGUEIRA, C.S.R. 1997. Copepoda (Crustacea) of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. I. Specific composition. Brazilian Archives of Biology and Technology, 40(2): 377-381.

YOUN, S.H.; CHOI, J.K. 2006. Egg production of the copepod *Acartia Hongi* in Kyeonggi Bay, Korea. Journal of Marine Systems, 67: 217-224.

PARTE 3. COMPARAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E FECUNDIDADE DOS COPÉPODES PLANCTÔNICOS *Temora turbinata* (Dana, 1849) E *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1892 ALIMENTADOS COM *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.

Resumo

Temora turbinata (Tt) e *Acartia lilljeborgii* (Al) são copépodes epiplanctônicos comumente encontrados em águas estuarinas e costeiras do estado de Pernambuco (nordeste do Brasil). O objetivo deste estudo foi comparar a produção diária de ovos, sucesso de eclosão de ovos e sobrevivência de adultos dos copépodes *T. turbinata* e *A. lilljeborgii* no laboratório com fins ecotoxicológicos. Indivíduos de *T. turbinata* foram coletados na região costeira da praia de Boa Viagem (temperatura: 25 °C ; salinidade: 36), e os indivíduos de *A. lilljeborgii* no estuário da Baía do Pina (temperatura: 27 °C; salinidade: 30), ambos na cidade do Recife. Após aclimatação (24 horas), quatro indivíduos (2 fêmeas e 2 machos) foram introduzidos em cada recipiente e foram mantidas em estufa com temperatura controlada (idêntica à in situ) e fotoperíodo (12:12). No laboratório, os indivíduos foram alimentados durante 8 dias com a microalga *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle fornecida em uma concentração de 1 µg C L⁻¹ dia⁻¹. Todas as médias das variáveis analisadas comparando as duas espécies foram significativamente diferentes (Teste t: $t_{(0,05,14)}$; $t_{calc} > t_{tab}$). O maior percentual de sobrevivência de adultos alimentados com *T. weissflogii* foi encontrado em *T. turbinata*. No entanto, a produção diária de ovos e taxa de eclosão foram maiores em *A. lilljeborgii*. Além disso, o recrutamento de náuplios durante o experimento foi significativamente maior em *A. lilljeborgii*. De acordo com os resultados, *A. lilljeborgii* pode ser a melhor opção para a cultura em laboratório, devido ao seu potencial reprodutivo (maior fecundidade) e sua ampla distribuição e densidades elevadas nas águas costeiras do nordeste do Brasil. *T. turbinata* é uma espécie introduzida em águas brasileiras e em comparação com outras espécies de copépodes planctônicos calanoides, tem baixas taxas de fertilidade. No caso do gênero *Acartia*, outras espécies mais comuns em águas subtropicais brasileiras já têm protocolos de cultivo para efeitos toxicológicos. A identificação das melhores condições de cultivo para *A. lilljeborgii* irá facilitar a elaboração de um protocolo para a sua manutenção em laboratório.

Palavras chave: Taxa de produção diária de ovos, taxa de eclosão de ovos, recrutamento de náuplios.

2.3.1. Introdução

Acartia lilljeborgii e *Temora turbinata* são copépodes calanoides mesozooplanctônicos dominantes nas águas estuarinas e costeiras do estado de Pernambuco (Brasil). *T. turbinata* é uma espécie de águas oceânicas e costeiras presente em massas de água tropical e subtropical na margem oeste do Oceano Atlântico Sul (BOLTOVSKOY, 1999). *A. lilljeborgii* pode ser encontrada em regiões costeiras e em estuários desde a Argentina e ao longo da costa Brasileira (SABATINI e MARTOS, 2002). De acordo com suas distribuições espaciais, estas duas espécies são consideradas eurihalinas e euritérmicas.

No ambiente natural, a fecundidade das espécies determina diretamente o recrutamento e a dinâmica da população dos copépodes (ARA, 2001). Em aquicultura, espécies com maior fecundidade aumentam a produção. A escolha de espécies nativas para cultivo facilita a captura, manutenção e renovação dos estoques, tanto com o intuito de serem utilizadas como recurso alimentar no cultivo de peixes marinhos como para fins ecotoxicológicos. A comparação da produção diária de ovos, a taxa de eclosão e a sobrevivência destas duas espécies mantidas com uma dieta de *T. weissflogii* permitiram determinar a melhor opção para cultivo em pequena escala com fins ecotoxicológicos.

2.3.2. Material e Métodos

A sobrevivência e reprodução de *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* foram comparadas a partir dos resultados obtidos na Parte 1 e 2 do presente capítulo. Os resultados de sobrevivência de adultos (%), produção diária de ovos (ovos fem.⁻¹ dia⁻¹), taxa de eclosão de ovos (%) e recrutamento de náuplios de copépodes adultos alimentados com a diatomácea *T. weissflogii* na proporção de biomassa de 1 mg C L⁻¹ dia⁻¹ foram comparados durante experimentos de 8 dias. Foi utilizado o teste t-student para comparação de médias das duas espécies para todas as variáveis analisadas (verificando igualdade de variâncias).

2.3.3. Resultados

A sobrevivência de adultos das duas espécies foi semelhante até o dia 5 do experimento. A sobrevivência de *T. turbinata* caiu significativamente até 50% e voltou a valores acima de 75% nos três últimos dias, enquanto que em *A. lilljeborgii* se manteve sem variações significativas acima de 60% (Figura 2.3.1). Embora a média da sobrevivência entre as duas espécies tenha sido próximas (Tabela 2.3.1), a queda marcante na sobrevivência de *A. lilljeborgii* determinou a diferença significativa entre as duas espécies.

A média da produção diária de ovos foi predominantemente maior em *A. lilljeborgii* durante todo o experimento que a obtida em *T. turbinata* (Figura 2.3.2). A média da produção diária de ovos de *A. lilljeborgii* no dia 6 do experimento foi duas vezes maior que a de *T. turbinata* (Tabela 2.3.1).

A taxa de eclosão de ovos foi a variável que apresentou a diferença mais acentuada (Tabela 2.3.1). Em *A. lilljeborgii* a média de eclosão se manteve aproximadamente em 40%, com um aumento no dia 5 do experimento (Figura 2.3.3) que elevou a média de eclosão para 55,4% (Tabela 2.3.1). De forma contrária, a taxa de eclosão de *T. turbinata* foi diminuindo paulatinamente com o tempo até não registrar mais náuplios a partir do dia 6 do experimento (Figura 2.3.3). Esta diminuição se viu refletida no recrutamento de náuplios por fêmea no final do experimento, sendo significativamente maior para *A. lilljeborgii* do que para *T. turbinata* (Tabela 2.3.1 e 2.3.2).

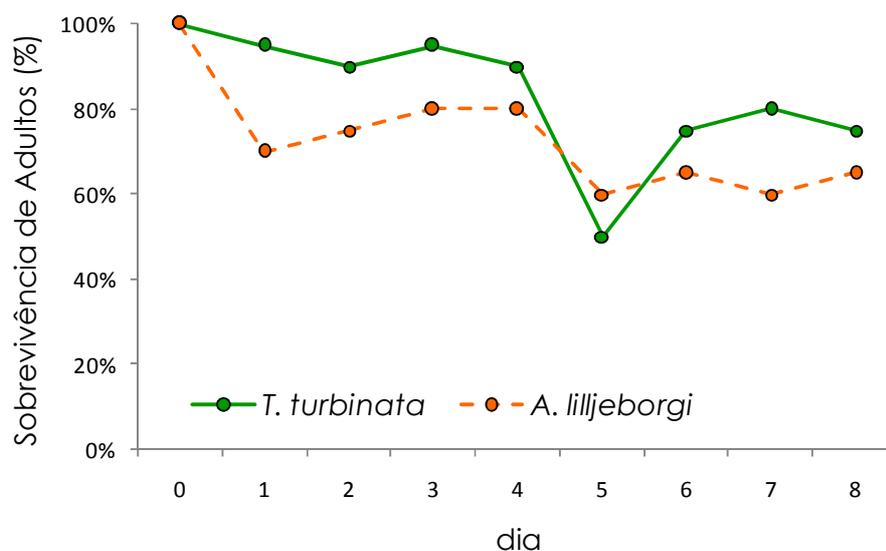


Figura 2.3.1 – Taxa de sobrevivência de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório.

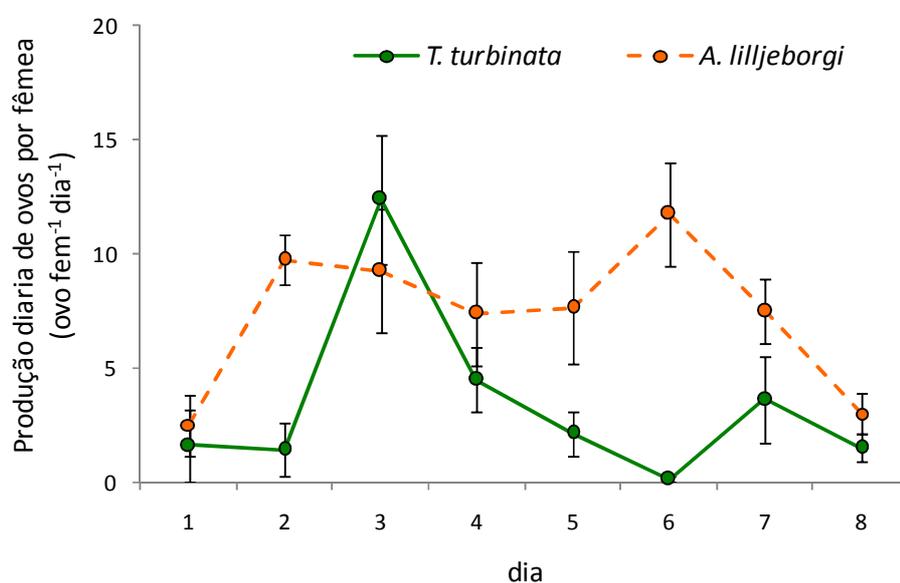


Figura 2.3.2 – Média (\pm D.P.) da Produção diária de ovos por fêmea de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório.

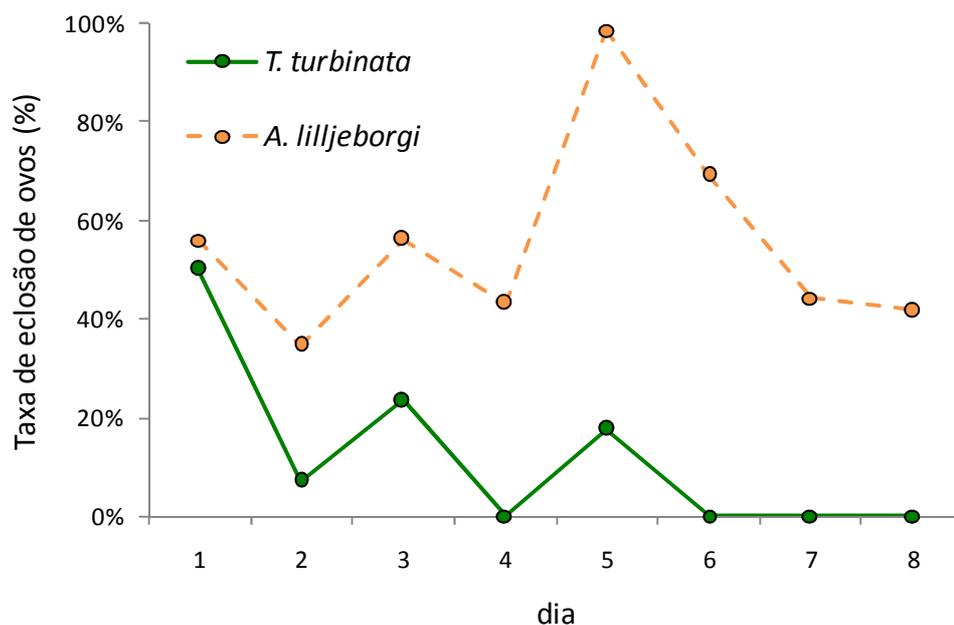


Figura 2.3.3 – Taxa de eclosão dos ovos (%) de adultos dos copépodes planctônicos *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com a microalga *T. weissflogii* em condições de laboratório.

Tabela 2.3.1 - Médias e desvios padrão de cada parâmetro calculado para *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com *T. weissflogii*.

Espécies	Sobrevivência de Adultos (%)	Produção diária de ovos por fêmea (ovo fem. ⁻¹ dia ⁻¹)	Taxa de eclosão de ovos (%)	Náuplios recrutados f ⁻¹
<i>T. turbinata</i>	83.3 ± 15	3.4 ± 2.9	12.3 ± 20	15.6
<i>A. lilljeborgii</i>	76.11 ± 31	7.3 ± 4.0	55.4 ± 20	131.6

Tabela 2.3.2 - Resumo dos resultados do teste-t comparando a sobrevivência e reprodução de *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii* alimentados com *T. weissflogii*.

Teste t	Sobrevivência de Adultos (%)	Produção diária de ovos por fêmea (ovo fem. ⁻¹ dia ⁻¹)	Taxa de eclosão de ovos (%)
t _{tab} (0.05,14)	2,14	-2,14	-2,14
t _{calc}	3,13	-18,45	-21,62

2.3.5. Discussão

Uma maior porcentagem de sobrevivência de adultos foi observada em *T. turbinata* (Tt: 83,3% ± 15; Al: 76,11% ± 31). Ensaios prévios analisando a sobrevivência desta espécie quando alimentada com dietas monoalgais de *T. weissflogii* (Bacillariophyceae) e *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) mostraram melhores valores quando alimentada com a diatomácea (DÍAZ *et al.*, 2012). De forma contrária, os ensaios de dieta analisando a sobrevivência de *A. lilljeborgii* realizados com diferentes diatomáceas e diferentes densidades mostraram que a densidade que favoreceu a sobrevivência desta espécie foi quatro vezes menor a 1 mg C L⁻¹ dia⁻¹ (Capítulo 1, parte 2). Estes resultados comprovam que a resposta do copépode ao recurso alimentar é específica (IANORA *et al.*, 2003), sendo necessária a experimentação com diversas dietas para estabelecer protocolos ideais de cultivo para cada espécie.

As taxas de fecundidade de *T. turbinata* (valor máximo 12,4 ovos fem⁻¹ dia⁻¹) foram semelhantes a dados registrados no ambiente natural (HOPCROFT e ROFF, 1998; MELO, 2009) e no laboratório (KAMINSKI e MONTU, 2005) para esta espécie. As baixas taxas de produção de ovos podem ser causadas pelo tipo de diatomácea fornecida. Melhores resultados foram obtidos em copépodes alimentados com *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd e *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano (KAMINSKI e MONTU, 2005). O conteúdo nutricional é específico em cada microalga e o tipo e quantidade de componentes antimitóticos em algumas diatomáceas podem causar efeitos negativos nas taxas reprodutivas (CEBALLOS e IANORA, 2003), indicando que apesar das altas sobrevivências com *T. weissflogii*, provavelmente outras microalgas podem gerar melhores taxas de fecundidade para *T. turbinata*.

A produção de ovos foi maior para *A. lilljeborgii*. Entre estas duas espécies, já foi registrado um número maior de ovos por postura em *A. lilljeborgii* (*A. lilljeborgii*: 2-4 ovos, *T. turbinata*: 1-2 ovos) (MELO, 2009) sugerindo uma maior produção desta espécie em condições naturais. Uma maior taxa de reprodução em condições de laboratório foi obtida em copépodes desta

espécie alimentados com densidades de *T. weissflogii* quatro vezes menores a $1 \text{ mg C L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Capítulo 1, parte 2). Em outras espécies do gênero *Acartia* (*Acartia stueri*), baixa fecundidade e taxas de eclosão foram observadas quando foram exclusivamente alimentados com *T. weissflogii* (BAN et al., 1997). Uma alta taxa de fecundidade é fundamental para manter uma alta produção em cultivos mantidos em condições de laboratório, sendo necessário testar outras dietas (mono ou plurialgais) a fim de se obter melhores resultados.

A taxa de eclosão de ovos de *T. turbinata* foi baixa. Ensaio anteriores realizados com a mesma espécie mostraram melhores resultados quando fornecida a microalga *Tetraselmis chuii* como recurso alimentar (DÍAZ et al., 2012), devido provavelmente a ausência dos metabolitos antimetabólicos das diatomáceas (CEBALLOS e IANORA, 2003). No entanto, os resultados obtidos para *A. lilljeborgii* foram significativamente maiores quando alimentadas com a densidade de $1 \text{ mg C L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de *T. weissflogii* e comprovadamente maiores quando alimentadas com densidades menores desta mesma microalga (Capítulo 1, parte 2). A melhor produção de ovos e taxas de eclosão geraram maiores recrutamentos de náuplios em *A. lilljeborgii* (Tt: 15,6 náuplios fem.⁻¹; Al: 131,6 náuplios fem.⁻¹), indicando esta espécie como a melhor opção com fins de cultivo no laboratório. Outras espécies do gênero *Acartia*, mais comuns em águas subtropicais brasileiras, já têm protocolos de cultura em laboratório para fins ecotoxicológicos. A espécie *Acartia tonsa* é um dos copépodes planctônicos mais frequentemente cultivados para utilização de testes toxicológicos, no entanto *A. tonsa* não está amplamente distribuída em áreas tropicais, sendo de difícil coleta nesta região. A identificação das melhores condições de cultura para *A. lilljeborgii* irá facilitar a criação de um protocolo para a sua manutenção em laboratório.

Conclusão

Acartia lilljeborgii é a melhor opção para cultivo em laboratório devido ao seu potencial reprodutivo (maior fecundidade) e sua ampla distribuição e densidades elevadas nas águas costeiras do nordeste do Brasil.

Referências Bibliográficas

ARA, K. 2001. Daily egg production rate of the planktonic calanoid copepod *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht in the Cananéia Lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, 445: 205–215.

BAN, S.; BURNS C.; CASTEL, J.; CHAUDRON, Y.; CHRISTOU, E.; ESCRIBANO, R.; FONDA UMANI, S.; GASPARINI, S.; GUERRERO RUIZ, F., HOFFMEYER, M.; IANORA, A.; KANG, H.; LAABIR, M.; LACOSTE, A.; MIRALTO, A.; NING, X.; POULET, S.; RODRIGUEZ, V.; ROUNGE, J.; SHI, J.; STARR, M.; UYE, S.; WANG, J. 1997. The paradox diatom-copepod interactions. *Marine Ecology Progress series*, 157: 287-293.

BOLTOVSKOY, D. *South Atlantic Zooplankton*. Leiden: Backhuys, 1999. 1627p.

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

DÍAZ, X.F.G.; BARKOKEBAS, B.; CAMPELO, R.; KOENING, M.L.; SCHWAMBORN, R.; NEUMANN-LEITÃO, S. 2012. An evaluation of different microalgal diets for the culture of the calanoid copepod *Temora turbinata* (Dana, 1849) in the laboratory. *Tropical Oceanography*, 40 (1): 133-142.

HOPCROFT, R.R.; ROFF, J.C. 1998. Zooplankton growth rates: the influence of size in nauplii of tropical marine copepods. *Marine Biology*, 132: 87-96.

IANORA, A. Birth control effects of diatoms on copepod reproduction. In: Lee C.; O'Bryen P.J.; Marcus N.H. *Copepods In Aquaculture*. Blackwell Publishing, 2005. p. 31-48.

KAMINSKI, S.M.; MONTU, M.A. Produção de ovos dos copepodes costeiros *Acartia tonsa*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata*, da praia do Cassino – Rio Grande – RS. 2005. *Atlantica*, Rio Grande, 27(2): 103-111.

MELO, M.J. Produção secundária e aspectos reprodutivos de copépodes pelágicos ao largo de Ubatuba (SP, Brasil). São Paulo, 2009. 205f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

SABATINI, M.; MARTOS, P. 2002. Mesozooplankton features in a frontal area off northern Patagônia (Argentina) during spring 1995 and 1998. *Scientia Marina*, 66(3): 215-232.

CAPÍTULO 3

EFEITO AGUDO DO GÁS METANO EM *Acartia lilljeborgii*

PARTE 1. SENSIBILIDADE DE *Acartia lilljeborgii* AO SULFATO DE ZINCO.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade de *A. lilljeborgii* utilizando como poluente de referência o zinco ($ZnSO_4$), para padronizar o seu uso como organismo-teste em estudos toxicológicos no nordeste brasileiro. As concentrações testadas de $ZnSO_4$ foram 2, 4, 6, 8 e 10 mg L⁻¹. Os organismos foram coletados em campo (Bacia do Pina, Recife) e aclimatados no laboratório durante 24 horas mantendo as condições de coleta (Tem: 27±0,7 °C; Sal: 30,5±0,7) e com fornecimento de alimento (*Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*). No início de cada ensaio (n=3), adultos saudáveis (fêmeas e machos) foram colocados em béquers com 50 mL da solução-teste. Para cada concentração foram realizadas 3-5 réplicas. O tempo de duração dos ensaios foi de 48 horas. Os valores de CL₅₀ (IC 95%) foram obtidos pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber. Uma ANOVA de dois fatores foi utilizada para determinar diferenças entre o controle e as soluções-teste e entre o tempo de exposição. Os resultados mostraram uma evidente relação dose-resposta em 24 e 48 horas, registrando um aumento gradual na mortalidade com o aumento nas concentrações do sulfato de zinco. Da mesma forma, foi observada uma relação entre o aumento da mortalidade e o maior tempo de exposição. A taxa média de mortalidade no controle foi de 13% após 48 horas, validando os resultados dos testes. A mortalidade no controle e na concentração de 2 mg L⁻¹ foi significativamente menor do que a observada nas concentrações de 6, 8 e 10 mg L⁻¹ de $ZnSO_4$. A CL₅₀ foi de 2,94 mg.L⁻¹ $ZnSO_4$ (IC95%=2,44-4,26) após 48 horas de exposição sendo o equivalente em zinco de 0,67 mg.L⁻¹ (IC95%=0,56-0,97). Os machos se mostraram mais sensíveis do que as fêmeas à exposição ao Zn, no entanto, não foram detectadas diferenças significativas. Outros estudos realizados com *A. lilljeborgii* como organismo-teste e zinco como substância de referência, obtiveram valores de CL₅₀ após 48 horas semelhantes aos obtidos neste estudo (0,64 - 0,89 mg L⁻¹). Outras espécies de copépodes planctônicos utilizadas no Brasil mostraram CL₅₀ maiores que as encontradas no presente estudo, indicando a *Acartia lilljeborgii* como uma espécie com alto potencial para ser utilizada em testes ecotoxicológicos.

Palavras Chave: Copepoda, Toxicologia marinha, efeito agudo.

3.1.1. Introdução

O uso de substâncias de referência avalia a sensibilidade do lote de organismos usado nos testes ecotoxicológicos. Fatores como a idade dos organismos, condições de cultivo, sexo, origem, estabilidade genética, estado imunológico, funcionamento digestivo, equilíbrio hormonal, entre outros, afetam estes testes. Também são usadas as substâncias de referência para avaliar a precisão dos métodos utilizados em cada laboratório e a habilidade do pessoal na execução dos ensaios. O uso dessa substância contribui para garantir a repetibilidade e reprodutibilidade dos testes como requerimento fundamental do controle de qualidade dos laboratórios de ecotoxicologia (ZAGATTO, 2006).

Uma substância de referência deve seguir certos critérios para sua seleção: Ser um contaminante ambiental; ser fácil de analisar quimicamente; estar disponível no mercado com pureza consistente; ser solúvel e estável em água; ter alta toxicidade; ter toxicidade consistente, não variável e não específica para os diferentes grupos de organismos e ter dados ecotoxicológicos básicos estabelecidos. O ideal seria utilizar mais de uma substância de referência, no entanto, os custos das análises tornam esta prática inviável. Assim, a melhor solução é escolher a substância de referência em função do objetivo do estudo (ZAGATTO, 2006).

O Sulfato de zinco é um composto não carcinogênico, pelo qual não precisa de cuidados especiais durante sua manipulação, a diferença de outras substâncias de referência (ex: Dicromato de Potássio). No entanto, tem como limitação que a toxicidade do Zinco varia significativamente dependendo do pH, alcalinidade, dureza, ácidos húmicos, matéria orgânica e outros quelantes orgânicos das águas naturais (ZAGATTO, 2006). Em crustáceos, a toxicidade do zinco está relacionada com a inibição de reações enzimáticas. Isto afeta a base das funções biológicas como respiração e osmorregulação. O efeito agudo do zinco tem sido avaliado para várias espécies e determinadas as doses letais respectivas. Doses subletais de zinco

afetam as funções fisiológicas e o comportamento dos organismos marinhos sem causar diretamente a morte (VERRIOPOULOS e HARDOUVELIS, 1988).

Poucas espécies marinhas e estuarinas (ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) e *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758), os misidáceos *Mysidopsis juniae* da Silva, 1979 e *Mysidium gracile* (Dana, 1852) e a bactéria *Vibrio fisheri* (Beijerinck, 1889)) apresentam ensaios ecotoxicológicos normalizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 2005, 2006 a,b). Existe uma necessidade de ampliar as opções de organismos-teste utilizando espécies nativas representativas, para facilitar a obtenção e manutenção dos indivíduos e refletir nos ensaios as condições ambientais reais de cada local. Os copépodes são organismos representativos dos ecossistemas estuarinos e marinhos, chegando muitas vezes a constituir 90% das comunidades planctônicas (BOLVTOSKOY, 1999) e são considerados organismos-teste muito sensíveis a poluentes orgânicos e inorgânicos no laboratório (NIPPER et al., 1993; RESGALLA e LAITANO, 2002). No Brasil têm sido realizados alguns ensaios agudos e crônicos utilizando copépodes planctônicos como organismos-teste alternativos. Entre as espécies avaliadas se encontram *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht, 1889, *Acartia tonsa* Dana, 1849, *Temora stilyfera* Dana, 1849 e *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) (NIPPER et al., 1993; RESGALLA e LAITANO, 2002; IHARA et al., 2010). Entre elas, *Acartia tonsa* tem sido a mais amplamente usada em testes ecotoxicológicos.

As espécies potenciais para serem usadas em ecotoxicologia devem reunir uma série de critérios para serem utilizadas rotineiramente como organismo-teste, tais como: curto ciclo de vida, facilidade de cultivo e/ou representatividade ecológica. Os copépodes além de serem considerados organismos abundantes nos ambientes planctônicos marinhos, são considerados espécies sensíveis a poluentes orgânicos e inorgânicos (NIPPER et al., 1993). Estas duas características são fundamentais para a escolha de uma espécie como potencial organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos. Estudos utilizando *Acartia lilljeborgii* como potencial organismo-teste já foram realizados no sul e sudeste Brasileiro (NIPPER et al., 1990; NIPPER et al., 1993). No entanto, até agora não foi estabelecido um protocolo para sua utilização em

bioensaios para estudos de impacto ambiental. No Brasil, o copépode *Acartia tonsa* tem sido estudado como organismo-teste e é coletado e cultivado com sucesso no sul do Brasil (GRETCHEN et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2010; IHARA et al., 2010), mas não é uma espécie abundante no norte e nordeste brasileiro dificultando sua coleta com fins de cultivo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de *A. lilljeborgii* ao sulfato de zinco, como um dos critérios para estabelecer o uso deste copépode planctônico como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos para a região.

3.1.2. Materiais e Métodos

3.1.2.1. Preparação das Soluções

A Solução estoque de Sulfato de zinco ($ZnSO_4$) foi preparada em um balão aforado de 500 mL colocando 500 mg de $ZnSO_4$ em 0.5 Litros de água do mar (Salinidade de 35) previamente filtrada ($0,45\mu m$) e esterilizada (UV). A partir da solução estoque foram preparadas as concentrações das soluções-teste de 2, 4, 6, 8 e 10 mg L^{-1} . Em béqueres de 100 mL (unidade experimental) foram colocados 50mL das soluções-teste. Cinco repetições do experimento foram realizadas. Para cada concentração e para o controle foram realizadas de 3-5 réplicas. Foram medidos no começo e no final do experimento os parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), Salinidade, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH, para registrar possíveis variações entre os tratamentos.

3.1.2.2. Coleta dos organismos-teste

Os indivíduos de *Acartia lilljeborgii* utilizados durante o experimento foram coletados na Bacia do Pina, área estuarina urbana da cidade de Recife (Nordeste brasileiro). As coletas foram realizadas com uma rede padrão de plâncton de $200\mu m$ de abertura de malha e um copo cego adaptado no final da rede. Os arrastos foram verticais em intervalos curtos de tempo (± 2 minutos) e repetidos várias vezes. O plâncton coletado foi vertido cuidadosamente em um balde com água do local e mantido com aeração

moderada. Foram aferidas a temperatura e salinidade local (Temperatura: $27\pm 0,7$ °C; Salinidade: $34,5\pm 0,7$). Os organismos foram transportados rapidamente para o Laboratório de Cultivo do Departamento de Oceanografia da UFPE. Posteriormente foram selecionados adultos saudáveis de *A. lilljeborgii* e colocados separadamente machos e fêmeas em recipientes de 1 L para aclimatação durante 24 horas. Durante a aclimatação, os organismos foram mantidos nas condições do local de coleta (temperatura e água do local filtrada) com aeração moderada e fornecimento de microalgas cultivadas no laboratório (*Thalassiosira weissflogii* e *Chaetoceros gracilis*) em excesso.

3.1.2.3. Ensaios de toxicidade aguda com *Acartia lilljeborgii*

Em cada unidade experimental foram colocadas na mesma quantidade fêmeas (4) e machos (4) em boas condições de saúde (antenas completas e movimentação rápida). O tempo de duração do experimento foi de 48 horas, sendo registrada diariamente a mortalidade de machos e fêmeas separadamente. O critério para determinar se o indivíduo estava vivo ou morto foi baseado na imobilidade (nenhum movimento após contato leve com a ponta da pipeta Pasteur). Os indivíduos mortos foram retirados de cada unidade experimental para evitar formação de detritos e proliferação de bactérias. No final do experimento, foram contados tanto os indivíduos mortos como os vivos. O experimento foi realizado sem fornecimento de alimentação. Este procedimento foi repetido 5 vezes.

3.1.2.4. Análise estatística

Os valores de CL_{50} (concentração letal que mata 50% dos organismos da população) e os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977). Posteriormente foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores para determinar diferenças significativas entre a mortalidade acumulada dos copépodes no controle e nas soluções-teste (Tratamentos) e

entre o tempo de exposição aos tratamentos (24 e 48 horas) utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0.

3.1.3. Resultados

Os parâmetros físico-químicos medidos no começo e no final do experimento não apresentaram variações significativas (Tabela 3.1.1). A taxa média de mortalidade no controle inferior a 20% após 48 horas necessária para validação dos resultados do teste (ZAGATTO, 2006), foi alcançada apenas em 3 das 5 repetições realizadas, provavelmente devido a erros na manipulação no laboratório ou a saúde da população estudada. As duas repetições com resultados invalidados foram excluídos das análises.

Uma evidente relação dose-resposta foi observada desde as primeiras 24 horas, registrando um aumento gradual na mortalidade dos indivíduos com o aumento nas concentrações de sulfato de zinco (Figura 3.1.1). A média de porcentagem de mortalidade nas fêmeas, nos machos, e agrupando a totalidade dos organismos (sem distinção de sexos) foi significativamente menor no controle e na concentração de 2 mg L⁻¹ do que na concentração de 6, 8 e 10 mg L⁻¹ (Tabela 3.1.2). Unicamente nas fêmeas, foi observado também que a mortalidade na concentração de 4 mg L⁻¹ foi significativamente menor do que na concentração de 10 mg L⁻¹ (Tabela 3.1.2).

Da mesma forma, foi observada uma relação diretamente proporcional entre a mortalidade e o tempo de exposição (Figura 3.1.1). Tanto para as fêmeas como para os machos, os resultados obtidos às 24 horas foram significativamente menores que os registrados às 48 horas (Tabela 3.1.2). Uma mortalidade de 100% dos indivíduos expostos à concentração de 10 mg L⁻¹ foi registrada às 24 horas e, superior a 90% quando expostos às concentrações de 6 e 8 mg L⁻¹ às 48 horas (Figura 3.1.1).

Tabela 3.1.1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros físico-químicos medidos no começo e final do teste de sensibilidade de *Acartia lilljeborgii* ao sulfato de zinco (n=3).

ENSAIO	PARÂMETROS	OD (mg L ⁻¹)	Salinidade	Temp. (°C)	pH
INICIO	Controle	6,93 \pm 1,29	35,00 \pm 0,00	25,93 \pm 0,09	7,93 \pm 0,26
INICIO	10 mg ZnSO ₄ L ⁻¹	7,17 \pm 1,29	35,00 \pm 0,00	25,73 \pm 0,64	7,97 \pm 0,10
FINAL	Controle	7,00 \pm 1,23	34,67 \pm 0,58	25,00 \pm 0,00	7,99 \pm 0,08
FINAL	10 mg ZnSO ₄ L ⁻¹	7,00 \pm 1,21	34,33 \pm 0,58	25,00 \pm 0,00	8,04 \pm 0,01

Tabela 3.1.2 – Resumo do teste ANOVA (Dois fatores) comparando a mortalidade de adultos de *Acartia lilljeborgii* às 24 e 48 horas (Tempo) e nos diferentes tratamentos (Concentrações) . *Diferenças significativas: $F_{crit} < F_{calc}$; $p < 0,05$.

Sexo	Tempo ($F_{crit} = 4,75$)			Concentrações ($F_{crit} = 3,11$)		
	$F_{(1;12;0,05)}$	p	T. Tukey	$F_{(5;12;0,05)}$	p	T. Tukey
Fêmeas	6,60	0,049*	24h < 48h	21,76	0,003*	Co e 2 mg L ⁻¹ < 6, 8 e 10 mg L ⁻¹ ; 4 mg L ⁻¹ < 10 mg L ⁻¹
Machos	7,57	0,040*	24h < 48h	15,50	0,006*	Co e 2 mg L ⁻¹ < 6, 8 e 10 mg L ⁻¹
Sem distinção de sexo	7,43	0,041*	24h < 48h	20,21	0,004*	Co e 2 mg L ⁻¹ < 6, 8 e 10 mg L ⁻¹

Para efeitos comparativos com outros experimentos de sensibilidade realizados tanto com *A. lilljeborgii* como com outras espécies marinhas, além de analisar os resultados de 24 horas e 48 horas com sulfato de zinco, também foram calculadas as CL50 expressas em termos de zinco (Tabela 3.1.3). Os valores de CL50 diminuíram com o aumento do tempo de exposição ao poluente (Tabela 3). Uma CL50 média de 4,86 de sulfato de zinco (equivalente a 1,10 mg L⁻¹ de zinco) foi obtida às 24 horas e de 2,94 mg L⁻¹ (equivalente a 0,67 mg L⁻¹ de zinco) às 48 horas de exposição (Tabela 3.1.3). Os valores de CL50 foram menores nos machos do que nas fêmeas, indicando maior sensibilidade dos machos a este poluente (Tabela 3.1.3). No entanto, o resultado da ANOVA comparando a mortalidade de machos e fêmeas após 24 e 48 horas não indicou diferenças significativas.

Foi elaborado um gráfico-controle para estabelecer a faixa de aceitação dos resultados de sensibilidade de *Acartia lilljeborgii* ao sulfato de zinco (Figura 3.1.2). O gráfico para as populações avaliadas (sem distinção de sexos) e diferenciando fêmeas e machos foi elaborado com a média dos 3 ensaios válidos após 24 e 48 horas e o limite inferior e superior da faixa de aceitação foram estabelecidos com \pm duas vezes o desvio padrão dos dados. Os resultados mostraram uma faixa mais ampla para fêmeas e uma faixa mais estreita para machos, principalmente, após 48 horas (Figura 3.1.2). Esse gráfico controle deve ser incrementado para futura padronização do uso de *Acartia lilljeborgii* como organismo-teste e o teste agudo de sensibilidade deve ser realizado paralelamente com cada ensaio ecotoxicológico proposto no laboratório.

Tabela 3.1.3. Resultados de CL₅₀ (IC 95%) nos ensaios de sensibilidade (n=3) de *A. lilljeborgii* ao sulfato de zinco e sua equivalência em Zinco.

ENSAIO	TEMPO	SEXO	CL ₅₀ ZnSO ₄ (IC95%)	CL ₅₀ Zn (IC95%)
1	24h	Sem distinção	5,70 (5,07 - 6,40)	1,30 (1,15-1,46)
		Fêmeas	6,72 (5,20 - 7,66)	1,53 (1,18-1,74)
		Machos	5,53 (4,40 - 6,34)	1,26 (1,00-1,44)
	48h	Sem distinção	3,92 (3,30 - 4,67)	0,89 (0,75-1,06)
		Fêmeas	4,76 (4,40 - 5,14)	1,08 (1,00-1,17)
		Machos	3,02 (2,12 - 4,29)	0,69 (0,48-0,98)
2	24h	Sem distinção	6,44 (5,95 - 6,97)	1,46 (1,35-1,59)
		Fêmeas	6,64 (5,96 - 7,39)	1,51 (1,36-1,68)
		Machos	5,10 (4,22 - 6,18)	1,16 (0,96-1,41)
	48h	Sem distinção	5,30 (5,00 - 5,62)	1,21 (1,14-1,28)
		Fêmeas	5,54 (5,07 - 6,07)	1,26 (1,15-1,38)
		Machos	4,66	1,06
3	24h	Sem distinção	4,36 (3,68 - 5,16)	0,99 (0,84 - 1,17)
		Fêmeas	4,57 (3,07 - 6,80)	1,04 (0,70 - 1,55)
		Machos	3,93 (3,16 - 4,90)	0,89 (0,72 - 1,11)
	48h	Sem distinção	2,44	0,56
		Fêmeas	2,00	0,45
		Machos	2,83	0,64
Média - 24h	Sem distinção	4,86	1,10	
	Fêmeas	5,29	1,20	
	Machos	4,68	1,06	
Média - 48h	Sem distinção	2,94	0,67	
	Fêmeas	2,98	0,68	
	Machos	3,13	0,71	

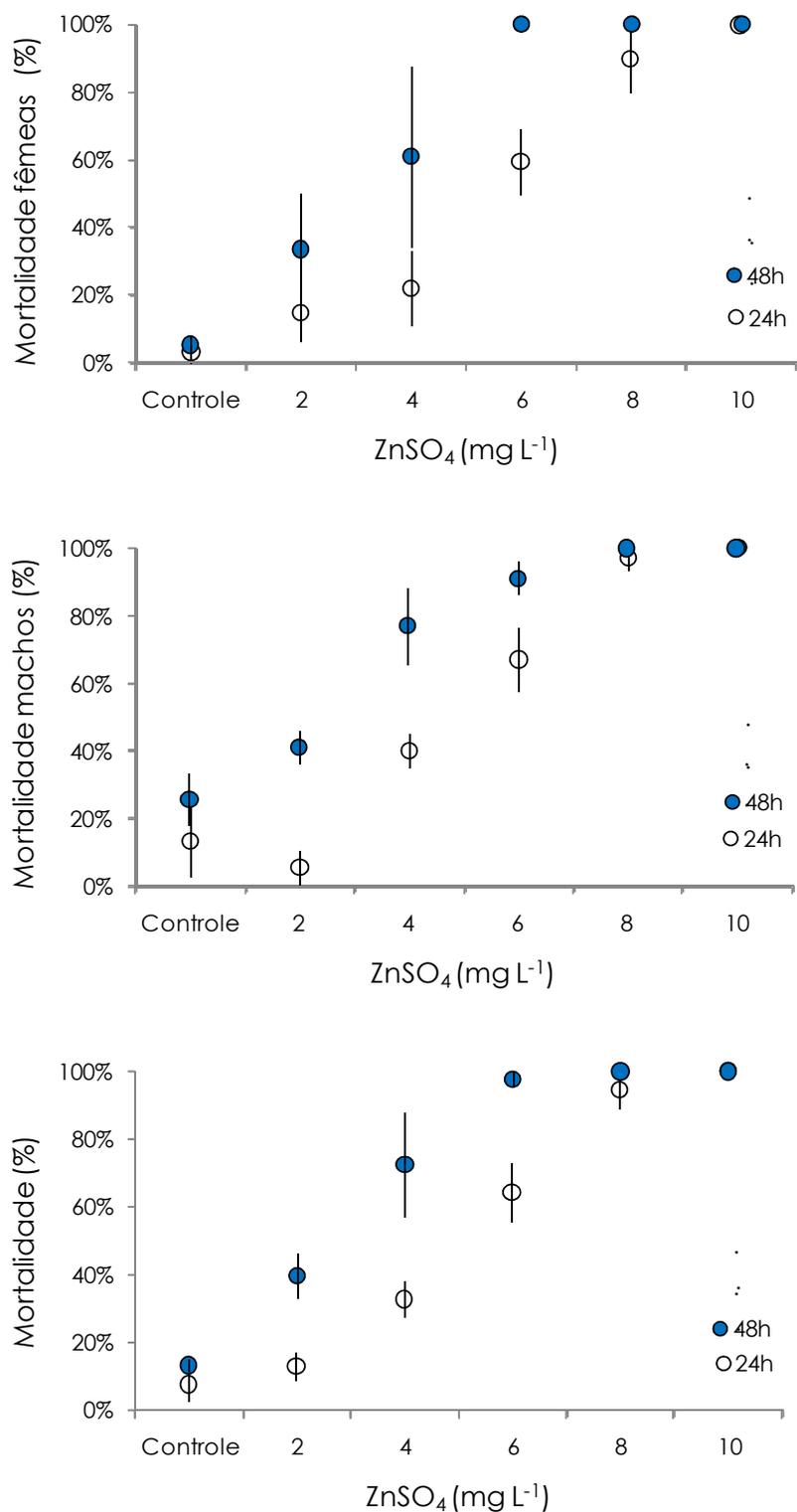


Figura 3.1.1 - Valores médios da porcentagem de mortalidade (\pm D.P.) de *Acartia lilljeborgii* ao final de 24 e 48 horas de exposição ao sulfato de zinco ($n=3$). Resultados apresentando separadamente a mortalidade para fêmeas, machos e sem distinção de sexos.

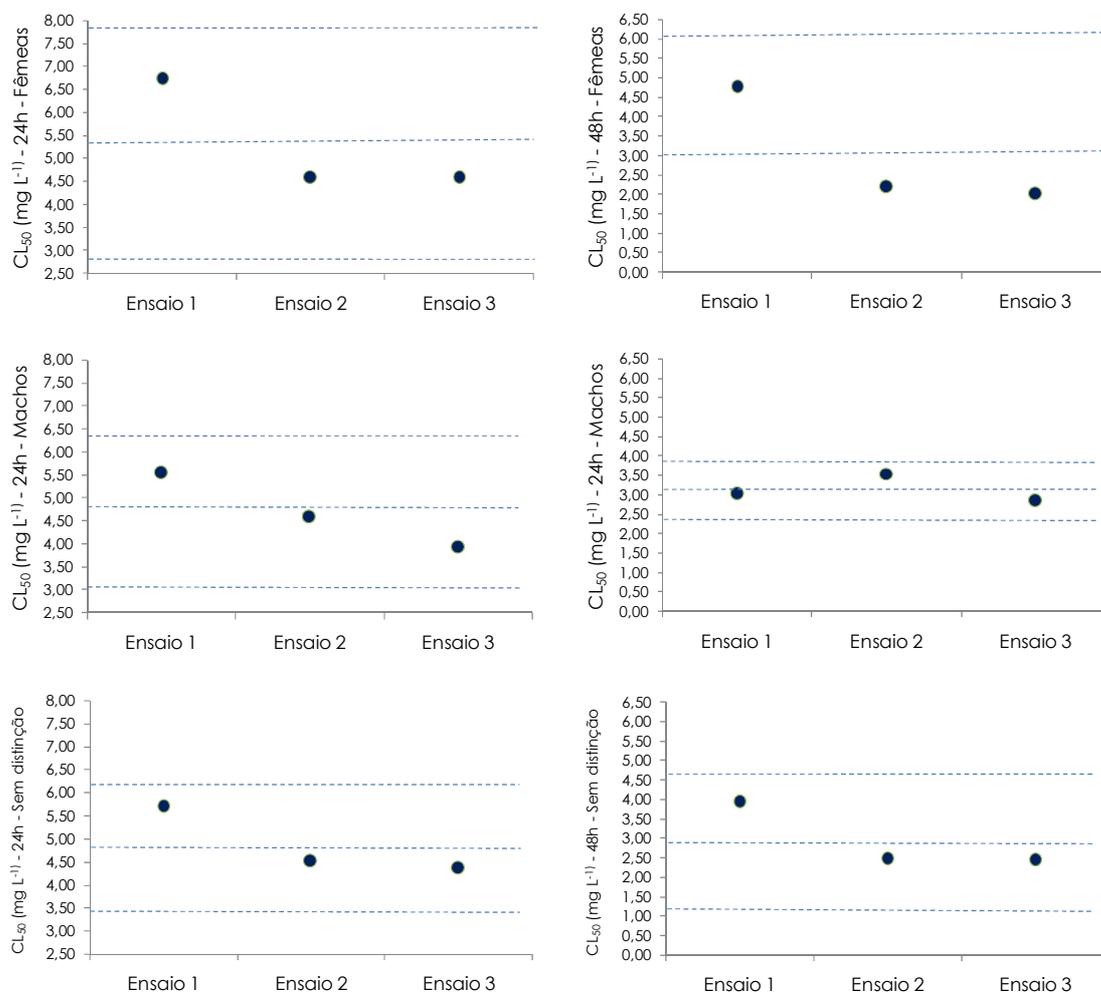


Figura 3.1.2 - Controle da sensibilidade das populações de *Acartia lilljeborgii* à substância de referência Sulfato de Zinco em 24 e 48 horas. Resultados discriminando fêmeas, machos e sem distinção de sexos.

3.1.4. Discussão

O Sulfato de Zinco é uma substância que está sendo amplamente utilizada como referência na realização de ensaios ecotoxicológicos crônicos e agudos com organismos marinhos (RESGALLA e LAITANO, 2002). Embora o uso de uma única substância para avaliar a resposta de uma população não reflita totalmente a complexidade das condições reais, permite avaliar laboratorialmente a sensibilidade do lote de organismos utilizado conjuntamente com o teste executado (ZAGATTO, 2006).

Alguns ensaios prévios de sensibilidade têm sido realizados com esta espécie, indicando-a como uma opção interessante para ser utilizada como organismo-teste. Ensaios agudos de sensibilidade ao zinco realizados previamente com *A. lilljeborgii* obtiveram valores menores de CL_{50} do que os encontrados no presente estudo (Tabela 3.1.4). A resposta de *Acartia lilljeborgii* ao sulfato de zinco no presente estudo foi próxima à observada em outros copépodes planctônicos marinhos como *Acartia tonsa*, *Acartia simplex* Sars G.O., 1905, *Temora stylifera* e *Paracalanus parvus* (Claus, 1863) (Tabela 3.1.4). Indivíduos adultos de *A. lilljeborgii* já foram utilizados em ensaios toxicológicos com outros poluentes, encontrando valores de $CE_{50}=0,24$ mg L⁻¹ para Cobre (CETESB,1991) e de $CE_{50}=1,40 - 2,60$ para DSS (CETESB,1991; NIPPER et al.,1993).

Tabela 3.1.4 - Comparação da sensibilidade de copépodes planctônicos estuarinos e marinhos ao Zinco.

Espécie	CL_{50} Zn (mg L ⁻¹)	Sal	Tem (°C)	Tempo	Referência
<i>Acartia lilljeborgii</i>	1,10	34-35	25±0,5	24h	Presente estudo
<i>Acartia lilljeborgii</i>	0,67	34-35	25±0,5	48h	Presente estudo
<i>Acartia lilljeborgii</i>	0,37	32-35	25±2	48h	Nipper et al., 1993
<i>Temora stylifera</i>	0,04	32-35	25±2	48h	Nipper et al., 1993
<i>Acartia tosa</i>	0,86	30	24	48h	Ihara et al., 2010
<i>Acartia simplex</i>	1,86	35±0,5	17±1	24h	Arnott e Ahsanullah, 1979
<i>Paracalanus parvus</i>	1,38	35±0,5	17±1	24h	Arnott e Ahsanullah, 1979

A CL_{50} determinada para esta espécie (2,94 mg L⁻¹ de ZnSO₄) foi menor que a observada em *Acartia tonsa* (3,80 mg.L⁻¹) (IHARA *et al.*, 2010), ao final de 48 horas de exposição ao sulfato de zinco. *Acartia tonsa* é um organismo recomendado internacionalmente para ensaios ecotoxicológicos agudos (ISSO 14669) e possui características ecológicas e fisiológicas comparáveis às de *Acartia lilljeborgii*. As duas espécies são estuarinas e costeiras, são epiplanctônicas e os organismos adultos apresentam tamanhos semelhantes (0,9-1,5 mm) (BRADFORD-GRIEVE *et al.*, 1999). Por serem copépodes que liberam os ovos diretamente na água (não formam sacos ovíferos), os ovos podem ser armazenados (4°C na escuridão) (BARATA *et al.*, 2002) e eclodidos posteriormente para testes crônicos utilizando indivíduos nos primeiros estágios de vida, comumente mais sensíveis a diversos poluentes (ANDERSEN *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2002). Apresentam um ciclo de vida curto (10 a 14 dias desde o ovo até o organismo adulto) (MAUCHINE, 1998), facilitando a obtenção de respostas rápidas a agentes químicos. No entanto, *Acartia tonsa* ao contrário de *Acartia lilljeborgii*, apresenta protocolos de cultivo padronizados que permitem a manutenção e disponibilidade permanente de organismos em laboratório. Embora *Acartia lilljeborgii* seja uma espécie abundante no norte e nordeste brasileiro facilitando sua coleta nessa região, a variabilidade natural na abundância da espécie pode dificultar a coleta em quantidades suficientes de organismos para realização de ensaios ecotoxicológicos, precisando muitas vezes de grandes esforços de campo. Adicionalmente, a manutenção de organismos no laboratório permite definir a idade dos lotes e ter um maior controle sobre o grupo de organismos utilizado no ensaio ecotoxicológico.

Existe a necessidade de utilizar organismos-teste de maior ocorrência na área onde se pretende realizar o estudo de impacto ambiental e onde não ocorrem as espécies protocoladas (RESGALLA e LAITANO, 2002). A elaboração de um protocolo de cultivo é fundamental para a viabilidade desta espécie como organismo-teste. A alta sensibilidade de *Acartia lilljeborgii* a metais como o zinco, destaca esta espécie como uma opção de alto interesse na região para avaliar toxicidade aquática.

3.1.5. Conclusões

Acartia lilljeborgii se mostrou uma espécie com alto potencial para ser utilizada em testes ecotoxicológicos. A mortalidade desta espécie exposta a diferentes concentrações de sulfato de zinco durante um ensaio agudo de 48 horas mostrou uma alta sensibilidade a este poluente, quando comparada com outras espécies de copépodes planctônicos utilizadas como organismo-teste no Brasil (*Acartia tonsa* CL₅₀=0,86; *Acartia simplex* CL₅₀=1,86; *Paracalanus parvus* CL₅₀=1,38)

Referências Bibliográficas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005, NBR 15308, Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade aguda - métodos de ensaio com misidáceos (Crustacea). Rio de Janeiro, 17p.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006a, NBR 15411, Ecotoxicologia Aquática: Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, (Parte 1, 2, 3), p. 14-15, 18.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2006b, NBR 15350, Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica de curta duração: método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro, 17p.

ANDERSEN, H. R.; WOLLENBERGER, L.; HALLING-SOERENSEN, B.; KUSK, K.O. 2001. Development of copepod nauplii to copepodites—a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 2821–2829.

ARNOTT, G.H.; AHSANULLAH, M. 1979. Acute Toxicity of Copper, Cadmium and Zinc to Three Species of Marine Copepod. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 30(1): 63 – 71.

BOLTOVSKOY, D. *South Atlantic Zooplankton*. Leiden: Backhuys, 1999. 1627

BRADFORD-GRIEVE, J.M.; CHANG, F.H.; GALL, M.; PICKMERE, S.; RICHARDS, F. 1997. Size-fractionated phytoplankton standing stocks and

primary production during austral winter and spring 1993 in the Subtropical Convergence region near New Zealand. *N.Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 31: 201– 224.

BARATA, C.; MEDINA, M.; TELFER, T.; BAIRD, D. J. 2002. Determining Demographic Effects of Cypermethrin in the Marine Copepod *Acartia tonsa*: Stage-Specific Short Tests Versus Life-Table Tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 373–378.

CETESB. 1991. Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos- Testes com organismos marinhos.

GRETCHEN, K.; BIELMYER, MARTIN GROSEL L.; KEVIN V.; BRIX. 2006. Toxicity of Silver, Zinc, Copper, and Nickel to the Copepod *Acartia tonsa* Exposed via a Phytoplankton Diet. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2063-2068.

HAMILTON, MARTIN A., RUSSO, ROSEMARIE C., AND THURSTON, ROBERT V.. 1977. "Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentration in Toxicity Bioassays". *Environmental Science and Technology*, 11: 714-719.

IHARA P. M.; PINHO G. L. L.; FILLMANN G. 2010. Avaliação do Copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como Organismo-Teste para Ensaios de Toxicidade Crônica. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5 (1): 27-32.

ISO – International Organization for Standardization, 1999, ISO 14669:1999, Water Quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Geneva.

MAUCHINE, J. 1998. The biology of calanoid copepods. In: Blaxter L, Southward A, Tyler P (eds) *Advances in marine biology*, vol. 3. Academic Press, London, 710 p.

MEDINA, M.; BARATA, C.; TELFER, T.; BAIRD, D.J. 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:17–22.

NIPPER, M. G.; BADARÓ-PEDROSO, C.; JOSÉ, V. F.; MELO, S. I. R. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil: Mysis and copepods. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 99-106.

NIPPER, M.G.; BARDARO-PEDROSO, C.; JOSÉ, V.F.; PROSPERI, V.A. 1990. Marine Bioassay and their applications in coastal management and biological monitoring. II Simposio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Estrutura, Função e Manejo. *Proc. Vol.1*: 160-168.

RESGALLA; LAITANO, 2002. Sensibilidade Dos Organismos Marinhos Utilizados Em Testes De Toxicidade No Brasil. *Notas Téc. Facimar*, 6: 153-163.

TEIXEIRA, P.F.; KAMINSKI, S.M. AVILA, T.R. CARDOZO, A.P.; BERSANO, J.G.F.; BIANCHINI, A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(2): 333-339.

VERRIOPOULOS, G.; HARDOUVELIS, D. 1988. Effects of Sublethal Concentration of Zinc on Survival and Fertility in Four Successive Generations of *Tisbe*. *Marine Pollution Bulletin*, 19(4): 162 - 166.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. Em: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima, 2006. p.1-13.

Parte 2. TOXICIDADE DE GASSES DISSOLVIDOS NA ÁGUA DO MAR: Implementação de uma metodologia ecotoxicológica com gás metano.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo a implementação de uma metodologia de avaliação de toxicidade de gás metano dissolvido relacionados com a indústria de exploração de gás e petróleo em ambientes marinhos. A hipótese testada afirma que o gás metano pode causar um efeito agudo na sobrevivência e reprodução de copépodes planctônicos marinhos. Foi selecionado como substância-teste o gás metano e como organismo-teste o copépode planctônico *Acartia lilljeborgii*. Para determinar as concentrações de metano dissolvido foi adaptado o procedimento de *Head-space* Estático. Foi avaliada a mortalidade, produção diária de ovos e taxa de eclosão de copépodes adultos submetidos a cinco concentrações de metano dissolvido na água do mar (0,08; 0,18; 0,38; 1,02; 2,00 mg L⁻¹) em um teste semi-estático de 96 horas de duração. A mortalidade dos indivíduos adultos de *A. lilljeborgii* foi significativamente maior na maior concentração de gás metano (2 mg L⁻¹). Também foi observada uma diferença significativa na produção diária de ovos entre os tratamentos. O presente estudo permitiu desenvolver um método eficiente não apenas para determinação de gás metano dissolvido na água do mar com uma estrutura experimental de laboratório simples, mas também para realização de testes ecotoxicológicos em curto prazo. O aprimoramento da metodologia pode ser utilizada para avaliar o impacto deste poluente nas comunidades marinhas.

Palavras chave: *Acartia lilljeborgii*, Ensaio agudo, *Head-space* estático, cromatografia gasosa.

Lista de siglas

A _(g)	Gás A no estado gasoso
A _(L)	Gás A em uma solução aquosa.
A _{HS}	Analito no <i>Head-space</i>
A _L	Analito na água do mar
CG	Cromatógrafo Gasoso; Cromatografia gasosa
C _L	Concentração de solubilidade máxima do gás na água no sistema em equilíbrio
C _T	Concentração total do gás na amostra de água do mar
D	Densidade
HS	Head-space
HSE	Head-space estático
K _{eq}	Constante de equilíbrio da troca gasosa entre a fase líquida e gasosa quando o equilíbrio termodinâmico é alcançado.
K _H	Constante de Henry
M-LHS	Massa do tubo e seu respectivo retirando com uma pipeta automática o volume correspondente ao <i>Head-space</i>
MM	Massa molar do gás
MM	Peso molecular do gás
M _{RA}	Massa do recipiente de amostragem
M _{total}	Massa do tubo com seu respectivo septo totalmente preenchida com água deionizada
n _A	Quantidade de matéria, mols
P	Pressão
P _A	Pressão parcial do gás
R	Constante dos gases ideais
RA	Recipiente de amostragem
RF	Recipiente de fortificação
S	Salinidade
T	Temperatura
T _{amostra}	Temperatura da amostra
TET	Teste Ecotoxicológico
V _A	Volume ocupado pelo gás A
V _{HS}	Volume do <i>Head-space</i> no recipiente de amostragem do sistema fechado
V _L	Volume do líquido no recipiente de amostragem do sistema fechado.
V _T	Volume total do recipiente de amostragem no sistema fechado
X _A :	Fração molar do gás
β _A	Coefficiente de solubilidade de Bunsen

3.2.1. Introdução

Vazamentos acidentais durante as atividades de exploração de gás natural e petróleo na plataforma continental apresentam riscos potenciais para as comunidades marinhas. A P-40 em novembro de 2011 na costa de Rio de Janeiro (Brasil) e a plataforma Elgin em março de 2012 no Mar do Norte (Europa) são exemplos de acidentes recentes de vazamentos de gás em plataformas marítimas. Adicionalmente, durante vazamentos de petróleo, diversos gases também são liberados. O gás metano foi o hidrocarboneto mais abundante lançado durante o derramamento de óleo da plataforma Deepwater Horizon no Golfo do México em 2010 (KESSLER et al., 2011). A duração desse vazamento foi de 83 dias e foi estimado um vazamento aproximado total de metano de $1,25 \times 10^{10}$ mols equivalente a $3,06 \times 10^{11}$ Litros (VALENTINE et al., 2010). A distribuição e destino dos hidrocarbonetos gasosos abundantes durante um vazamento são também importantes na determinação do impacto do acidente, mas não são ainda bem compreendidas (VALENTINE et al., 2010). Em áreas costeiras e oceânicas tropicais, um lançamento deste poluente durante um vazamento acidental ainda tem consequências ecológicas desconhecidas. Para avaliar os riscos potenciais de vazamentos de gás, têm sido realizados alguns estudos para simular plumas de gás natural em águas profundas (YAPA et al., 2001; JOHANSEN, 2003; CHEN e YAPA, 2004; DASANAYAKA e YAPA, 2009) e existem alguns poucos estudos sobre os efeitos ecotoxicológicos do gás natural em organismos marinhos (KOSHELEVA et al., 1994; 1997).

O metano (CH_4) é um hidrocarboneto parafínico que tem uma participação predominante no gás natural (maior de 80%). Foi selecionado como substância-teste porque reflete de forma geral as principais propriedades do gás natural (VAZ et al., 2008) e porque facilita a obtenção de um resultado direto e quantificável na aplicação da metodologia avaliada. O metano presente na água do mar possui diversas fontes, entre as quais se encontram a degradação anaeróbia da matéria orgânica pela atividade microbiana, redução de hidrocarbonetos clorados, combustão incompleta de combustíveis fósseis, a entrada na água de poluentes presentes no ar, fontes

hidrotermais e, vazamentos acidentais de petróleo e gás (LOMOND e TONG, 2011). Existe uma troca de metano oceano-atmosfera o que têm motivando numerosos estudos sobre o efeito deste gás estufa nas mudanças climáticas (HEESCHEN et al., 2005; KESSLER et al., 2011).

Para determinar as concentrações de metano dissolvido na água do mar foi adaptado o procedimento de *Head-space* Estático, uma das técnicas cromatográficas atualmente utilizadas para determinação de gases dissolvidos. Com esta técnica, uma alíquota de água é removida de um recipiente de amostra selado para criar um volume de *Head-space* definido. Quando as fases líquida e gasosa, dentro do sistema fechado, entram em equilíbrio, uma pequena fração do *Head-space* é retirada com uma seringa e é injetada no cromatógrafo para análise (LOMOND e TONG, 2011). Esta técnica tem sido usada para analisar hidrocarbonetos gasosos dissolvidos em águas naturais continentais, estuarinas e marinhas (JOHNSON et al., 1990; KAMPBELL e VANDEGRIFT, 1998; LOMOND e TONG, 2011).

O organismo-teste escolhido foi o copépode planctônico *Acartia lilljeborgii* Giesbrecht 1892. Embora não se encontra entre as espécies marinhas e estuarinas normatizadas para uso em ensaios ecotoxicológicos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 2005, 2006a,b), *A. lilljeborgii* reúne os critérios básicos para ser utilizada como organismo-teste. Esses critérios são: curto ciclo de vida, facilidade de cultivo e/ou representatividade ecológica. No Brasil, *A. lilljeborgii* é considerada uma espécie frequente e dominante nas comunidades mesozooplancônicas de águas estuarinas (NEUMANN-LEITÃO, 1995; SILVA et al., 2004; MARTINS et al., 2006; ARAUJO et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2008; DIAS et al., 2009; SANTOS et al., 2009). De forma geral, os copépodes são organismos representativos dos ecossistemas estuarinos e marinhos (BOLVTOSKOY, 1999) e são considerados organismos-teste muito sensíveis a poluentes orgânicos e inorgânicos testados em laboratório (NIPPER et al., 1993; RESGALLA e LAITANO, 2002).

O objetivo da presente pesquisa foi a implementação de uma metodologia de avaliação de toxicidade de gás metano dissolvido

relacionados com a indústria de exploração de gás e petróleo em alto mar como uma ferramenta ecotoxicológica. A hipótese a ser testada postula que o gás metano pode causar um efeito agudo na sobrevivência e reprodução de copépodes marinhos.

3.2.2. Materias e Métodos

O experimento foi desenvolvido através de dois procedimentos. O primeiro procedimento (Procedimento 1) envolveu a padronização das soluções-teste com as diferentes concentrações de gás metano dissolvido na água do mar e a determinação dos níveis de exposição (fortificação). O segundo procedimento (Procedimento 2) correspondeu ao ensaio ecotoxicológico agudo do gás metano em *Acartia lilljeborgii*.

3.2.2.1. Procedimento 1. Determinação das concentrações de gás metano dissolvido na água do mar.

A preparação e determinação das concentrações de gás metano dissolvido na água do mar para serem utilizadas no teste ecotoxicológico foram realizadas no Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/ Quimiometria (LAQA) da UFPB. A padronização das concentrações e das técnicas foi realizada abrangendo as seguintes fases: Fortificação de água marinha com gás metano; extração do gás metano dissolvido na água do mar através da técnica de *Head-space* estático (HSE); elaboração da curva de calibração e determinação das concentrações de gás metano através de cromatografia gasosa.

As concentrações de gás metano dissolvidas na água do mar foram escolhidas utilizando como referência a CL_{50} ($0,72 \text{ mg L}^{-1}$) encontrada para o copépode planctônico *Idyaea furcata* (Baird, 1837) (ordem Copepoda, subordem Harpacticoida) exposto a diferentes concentrações de gás natural (KOSHELEVA et. al., 1994). Foram selecionadas duas concentrações inferiores e duas superiores à CL_{50} teórica (Tabela 3.2.1).

Tabela 3.2.1 - Concentrações de CH₄ utilizadas para preparação das soluções-teste.

Tratamentos	Concentração de CH ₄ Injetada no <i>Head-space</i> do RF (ml L ⁻¹)	Concentração Desejada de CH ₄ dissolvido na água do mar (mg L ⁻¹)
BR	0	0
N1	2,4	0,18
N2	4,4	0,33
N3 (CL ₅₀ teórico)	8,2	0,72
N4	15,9	1,44
N5	31,3	2,88

3.2.2.1.1. Fortificação da água do mar com gás metano.

O processo de fortificação consistiu na adição do gás metano a água do mar visando à máxima dissolução do gás (Figura 3.2.1). Para cada concentração (Tabela 3.2.1) foi utilizada uma (1) garrafa de vidro âmbar de 1L (RF) e um septo de silicone adaptado à boca da garrafa (Figura 3.2.2.A.). Em cada garrafa foi colocado um litro (1L) de água do mar (35 de salinidade) previamente filtrada por poro de 5 micrometros e tratamento com UV. A garrafa foi fechada usando o septo de silicone com boa vedação. Através de uma mangueira foi transferido gás metano puro (99,8% mol/mol) de um cilindro (Figura 3.2.2.E.) para um balão de látex. O balão com gás (pressão interna entre 30 e 20 mbar) foi fechado com um septo de silicone adaptado à boca do balão mantendo boa vedação. A fortificação de metano foi realizada retirando com uma seringa a quantidade de gás metano (previamente definida para cada concentração) através do septo de silicone adaptado ao balão de látex e injetando no *Head-space* do recipiente de fortificação (Tabela 3.2.1). Os seis RF foram agitados simultânea e vigorosamente por 5 minutos para dissolução máxima do gás na água do mar. Após a agitação, os recipientes foram mantidos emborcados em repouso durante 24 horas para atingir o equilíbrio termodinâmico entre as duas fases (líquido e *head-space*).

3.2.1.1.2. Análise do gás metano dissolvido na água do mar através da técnica de *Head-space* Estático (HSE)

3.2.1.1.2.1. Determinação do volume do *Head-space*.

Os recipientes de amostragem (RA) utilizados foram tubos de ensaio de vidro com capacidade de 70 mL (Figura 3.2.2.C.). Setenta e dois (72) tubos com seus respectivos septos de silicone foram marcados. O volume do *Head-space* e da água do mar foram determinados gravimetricamente. As medições foram realizadas em uma balança analítica marca Shimadzu modelo AY220 com capacidade de 120 g e precisão de 0,0001g.

As fórmulas utilizadas para calcular os volumes foram as seguintes:

$$V_T = (M_{\text{total}} - M_{\text{RA}})/0,0996 \quad (1)$$

$$V_{\text{HS}} = (M_{\text{total}} - M_{\text{LHS}})/0,0996 \quad (2)$$

$$V_L = (W_{\text{total}} - (M_{\text{total}} - M_{\text{LHS}}))/0,0996 \quad (3)$$

Onde, V_T na Equação 1 é o volume total do recipiente de amostragem no sistema fechado (mL); M_{total} é a massa do tubo com seu respectivo septo totalmente preenchida com água deionizada (mg) e M_{RA} é a massa (mg) do recipiente de amostragem (tubo e septo secos).

V_{HS} na Equação 2 é o volume do *Head-space* no recipiente de amostragem do sistema fechado (mL); M_{LHS} é a massa (mg) do tubo e seu respectivo septo retirando com uma pipeta automática o volume correspondente ao *Head-space*

V_L na Equação 3 é o volume do líquido no recipiente de amostragem do sistema fechado.

Pela relação de densidade (0,996 mg de água = 1 mL de água) as unidades de massa foram transformadas em unidades de volume. Todas as medições foram realizadas em triplicata e utilizados os valores médios para o cálculo das concentrações de metano dissolvido.

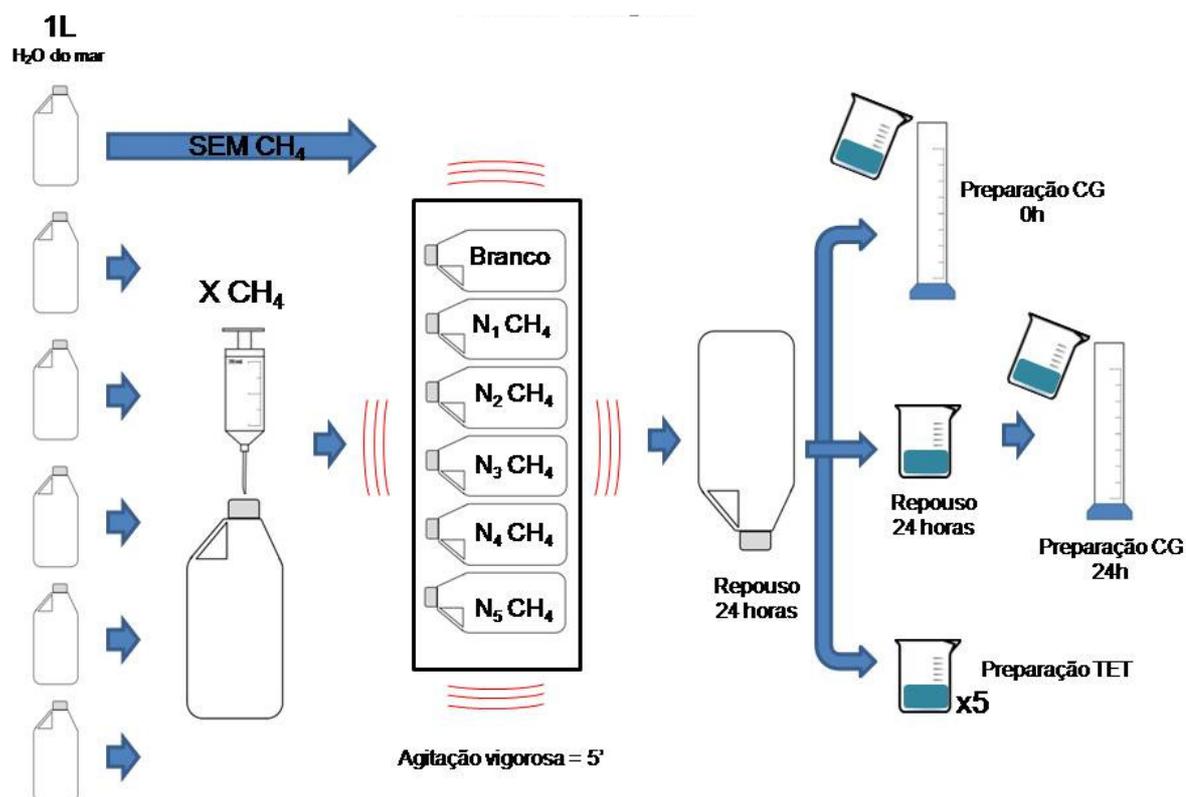


Figura 3.2.1. Fortificação da água do mar com diferentes concentrações de gás metano (CH_4) para análise mediante Cromatografia Gasosa (CG) e para uso no Teste ecotoxicológico (TET).

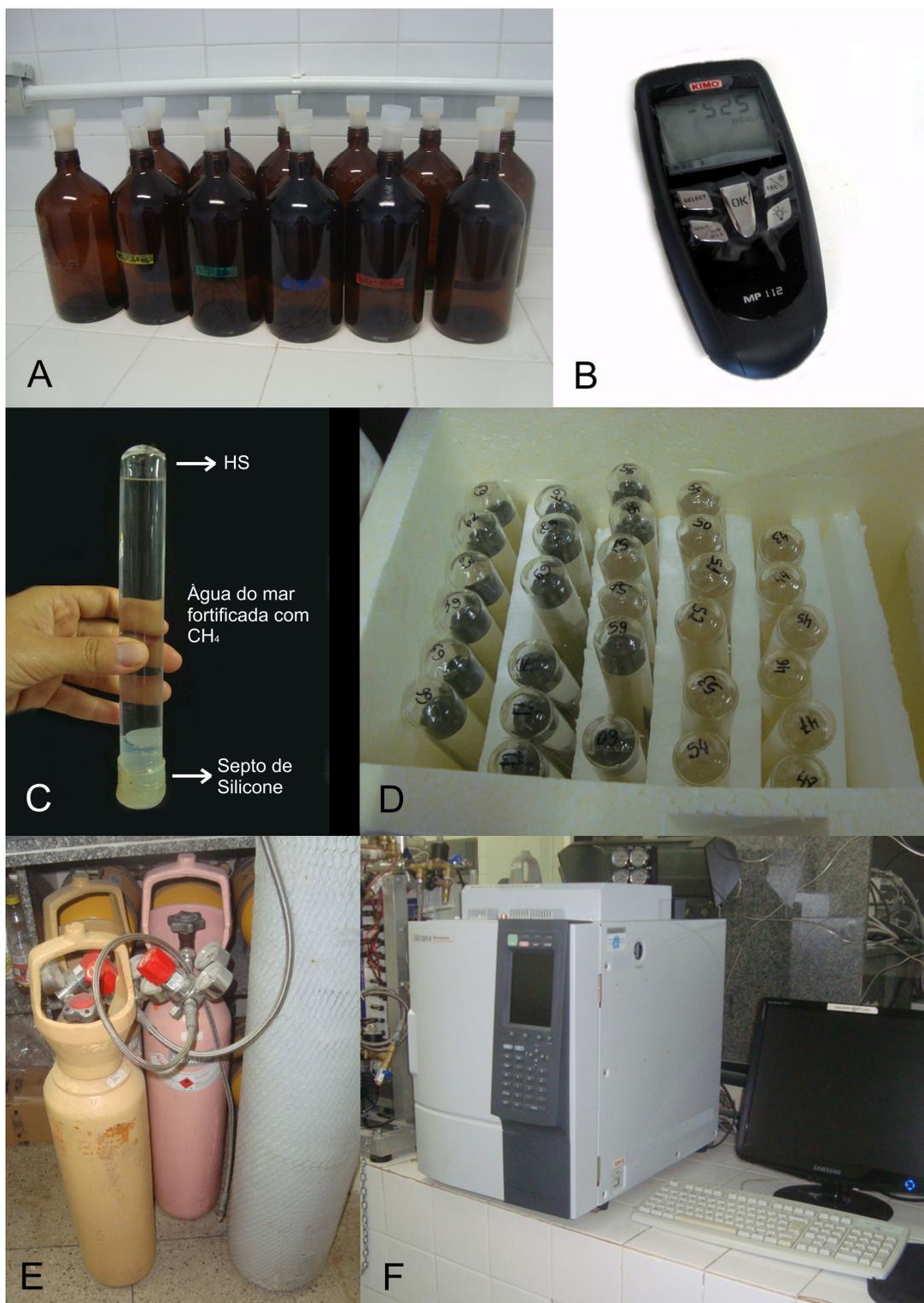


Figura 3.2.2. Equipamentos e materiais utilizados durante o Procedimento 1. A. Garrafas de vidro de fortificação (RF); B. Manômetro digital; C. Recipientes de amostragem (RA); D. Armazenamento dos RA em caixa de isopor; E. Cilindro de gás metano; F. Cromatógrafo Gasoso.

3.2.2.1.2.2. Preparação das amostras

As amostras analisadas pela técnica HSE, foram preparadas da mesma forma que no procedimento de determinação do volume do *Head-space*, só que com a mesma água do mar utilizada para o teste ecotoxicológico (TET). Para isso, todo o volume do tubo foi preenchido com a amostra. Dez mililitros (10 mL) da amostra foram retirados com a pipeta automática e foi colocado o septo com a agulha de seringa fixa (Figura 3.2.3). A pressão foi aferida com um manômetro digital marca Kimo Modelo MP112 (faixa de medição: 0 até ± 2000 mbar; resolução: 1 mBar; precisão: ± 2 mbar) (Figura 3.2.2.B). A agulha foi mantida no septo até equilíbrio da pressão interna do RA com a atmosférica (zero mBar). A agulha foi retirada e o tubo foi armazenado emborcado em caixa de isopor (T aprox. 23°C) até análise pela técnica HSE (Figura 3.2.2.D.).

3.2.2.1.2.3. Técnica do *Head-space* Estático (HSE)

O gás metano dissolvido na água do mar foi analisado pela técnica de *Head-space* Estático (HSE). A técnica e os cálculos foram realizados seguindo a metodologia de Kampbell e Vandergriff (1998).

A equação da regressão linear da curva de calibração foi usada para determinar a pressão parcial do gás (P_A). A curva de calibração foi realizada utilizando a mesma preparação da amostra explicada no item 2.1.2.1. mas com água do mar sintética (salinidade 35). A pressão interna de todos os RA foi equilibrada com a pressão atmosférica (zero mBar) e aferida com o manômetro digital. Do cilindro (Figura 3.2.2.E.), gás metano puro foi colocado em um balão de látex e adaptado um septo de silicone à boca do balão com boa vedação. Com uma seringa foi retirado o gás metano e injetado nos RA em diferentes pressões (Entre 0 e 50 mbar). Os RA foram agitados vigorosamente durante 4 minutos e posteriormente deixados emborcados em repouso durante 10 minutos. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do RA e injetada no cromatógrafo gasoso (CG) na mesma pressão do *Head-space* no momento da coleta. Para fazer a curva de calibração foi relacionada a pressão parcial versus a área do pico obtida no CG (Figura 3.2.2.F.).

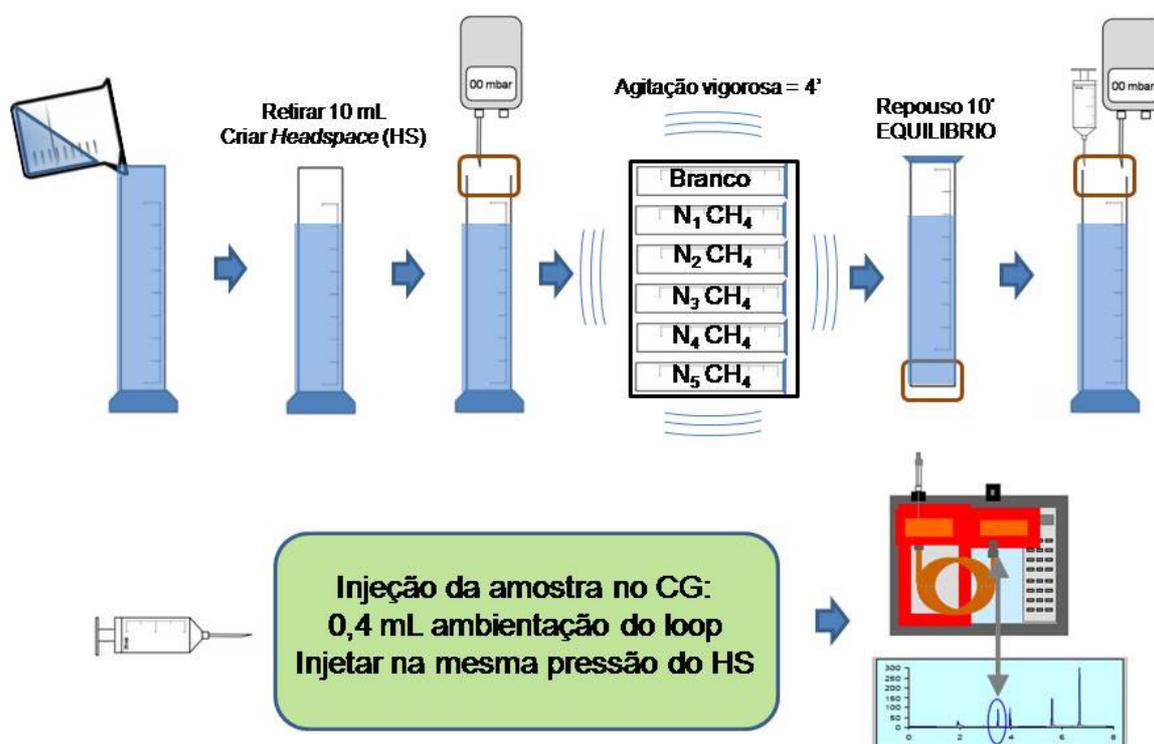
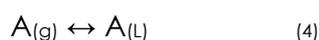


Figura 3.2.3. Preparação das amostras para determinação do metano dissolvido na água usando Cromatografia Gasosa (CG).

Em um recipiente fechado, a fase gasosa diretamente acima e em contato com o líquido e denominada de *Head-space*. A técnica de *Head-space* estático consiste em retirar uma alíquota do *Head-space* e transferi-la ao cromatógrafo gasoso para separação, detecção e quantificação (Snow e Bullock, 2010). Esta técnica está fundamentada nas leis de solubilidade dos gases e equilíbrio gasoso (Libes, 2009) como descrito na continuação. O equilíbrio gasoso pode ser expresso pela seguinte equação:



Onde $A_{(g)}$ representa o gás A no estado gasoso e $A_{(L)}$ representa o gás A em uma solução aquosa. Para uma solução diluída na qual as concentrações são aproximadamente iguais, a constante de equilíbrio termodinâmico para o

equilíbrio de troca gasosa entre as fases líquida e gasosa esta expressa pela seguinte equação:

$$K_{eq} = [A_{(L)}] / [A_{(g)}] \quad (5)$$

$A_{(g)}$ é geralmente expressa em pressão parcial (P_A). Aplicando a equação de estado dos gases ideais $P_A \cdot V_A = n_A RT$, então P_A está relacionada com $A_{(g)}$ da seguinte forma:

$$[A_{(g)}] = n_A / V_A = P_A / RT \quad (6)$$

Substituindo P_A / RT na equação 5:

$$[A_{(L)}] = (K_{eq} / RT) \cdot P_A \quad (7)$$

Esta relação é denominada lei de Henry que postula que: “a solubilidade de um gás dissolvido em um líquido é proporcional à pressão parcial do gás acima do líquido” e usualmente é conhecida pela seguinte expressão:

$$[A_{(L)}] = K_H \cdot P_A \quad (8)$$

A Constante de Henry (K_H) na equação 8 pode ser expressa em função do coeficiente de solubilidade de Bunsen (β_A) da seguinte forma:

$$K_H = 1 / \beta_A \quad (9)$$

O coeficiente de Bunsen é específico para cada gás e varia dependendo da salinidade (S), temperatura (T) e pressão (P) (Yamamoto, 1976). Para o gás metano dissolvido em água do mar, o coeficiente de Bunsen está expresso nas unidades de 1 mL de $CH_{4(STP)}$ dissolvido em 1L de água quando o equilíbrio é alcançado e a pressão é de 1 atm (LIBES, 2009). Já que a K_H na dedução de Kampbell e Vandergriff (1998) deve ser expressa em mol de água dividido por mol do gás (mol H_2O /mol CH_4) a equação 9 deve ser

multiplicada por $(55,5 * 24,45)$, sabendo que 1 L de água tem 55,5 mol (KAMPBELL e VANDERGRIFT,1998) e o volume molar do gás é 24,45 mL nas condições padrão (Temperatura: 25°C; pressão: 1 atm). Dessa forma, foram calculadas as K_H correspondentes aos $\beta_{(34; 24\text{ }^\circ\text{C}; 1\text{ atm})}$ e $\beta_{(36; 24\text{ }^\circ\text{C}; 1\text{ atm})}$ e obtida a média das duas constantes. A constante de Henry então utilizada no presente trabalho para ser aplicada na dedução de Kampbell e Vandergriff (1998) foi de $52344,54_{(35; 24\text{ }^\circ\text{C}; 1\text{ atm})}$.

A dedução de Kampbell e Vandergriff (1998) utilizada para calcular a concentração de metano nas amostras de água de mar fortificada, começa admitindo que o sistema líquido-gás está em equilíbrio, podendo considerar que:

$$X_A = P_A / K_H \quad (10)$$

Onde na Equação 10, X_A é a fração molar do gás A, P_A a pressão parcial do gás A e K_H a Constante de Henry.

Para o cálculo da fração molar do gás, a relação entre o número de mols do gás na fase gasosa (n_A) e do líquido (n_L) está dada pela Equação 11:

$$X_A = n_A / (n_A + n_L) \quad (11)$$

Sabendo que 1 L de água têm 55,5 mols, e considerando a densidade igual a $1,0\text{ g L}^{-1}$, a equação é organizada na Equação 12 da seguinte maneira:

$$n_A = X_A (n_A + 55,5) \quad (12)$$

Kampbell e Vandergriff (1998) consideram que $n_A * X_A \ll n_A$, podendo ajustar a Equação 13 da seguinte forma:

$$n_A \cong 55,5 X_A \text{ ou } n_A \cong (55,5 * P_A) / K_H \quad (13)$$

Assim, n_A é o número de mols do gás em 1,0 L de água.

Para a concentração de solubilidade máxima do gás na água no sistema em equilíbrio (C_L) em $g L^{-1}$, temos que:

$$C_L = n_A * MM * (1000 \text{ mg/g}) \quad (14)$$

Onde na Equação 14, MM corresponde a Massa molar do gás ($g \text{ mol}^{-1}$)

A densidade (D) deve ser corrigida em $g L^{-1}$ em virtude da variação da temperatura da amostra. Na Equação 15 a temperatura deve ser colocada em °K:

$$D = (MM / 22,4) / (T_{\text{amostra}} / 273,15) \quad (15)$$

Posteriormente, calcula-se o volume em mL do analito no *Head-space* (A_{HS}) utilizando a pressão parcial (P_A) obtida com a equação da regressão linear da curva cromatográfica de calibração como na Equação 16:

$$A_{HS} = (V_{HS}) * (P_A) \quad (16)$$

Onde A_{HS} corresponde aos mililitros do analito no *head-space*.

$$A_L = (A_{HS} / V_L) * (D) * (1000 \text{ mg/gr}) * (1 \text{ L} / 1000 \text{ mL}) \quad (17)$$

A concentração do analito na água do mar está expressa como na equação 17, onde, D é a densidade ($g.L^{-1}$) calculada na equação 15 e V_L é o Volume de água no RA (L).

Finalmente, a concentração total do gás na amostra de água do mar (C_T) é calculada pela Equação 18:

$$C_T = A_L + C_L \quad (18)$$

3.2.1.1.2.4. Análise de Cromatografia Gasosa

A alíquota gasosa retirada do *Head-space* é injetada dentro da coluna do cromatógrafo e quantificada através de um detector de ionização de chama (FID). Foi usado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2014) com uma coluna capilar CG-GasPro de 30 metros (0.32 μm) (Figura 3.2.2.F.). O gás de arraste foi hélio de alta pureza com um fluxo na coluna de 1,40 mL.min⁻¹. Todas as análises foram realizadas no modo isotérmico, mantida a temperatura da coluna em 90 °C. O tempo de análise total por corrida foi de 4 minutos.

O princípio básico da quantificação se baseia na relação proporcional entre a área dos picos registradas no cromatograma e a pressão parcial do gás em análise. Assim, é fundamental para a confiabilidade da análise que a área dos picos seja medida o mais exato e reprodutível possível.

3.2.1.2. Procedimento 2. Avaliação do efeito agudo do gás metano em *Acartia lilljeborgii*.

3.2.1.2.1. Coleta dos organismos-teste

Os indivíduos de *Acartia lilljeborgii* utilizados durante o experimento foram coletados na Bacia do Pina, área estuarina urbana da cidade de Recife (Nordeste brasileiro). As coletas foram realizadas com uma rede padrão de plâncton de 200 μm de abertura de malha e um copo cego adaptado no final da rede. Os arrastos foram verticais em intervalos curtos de tempo (± 2 minutos) e repetidos várias vezes. O plâncton coletado foi vertido cuidadosamente em um balde com água do local e mantido com aeração moderada. Foram aferidas a temperatura e salinidade local (Temperatura: 27°C; Salinidade: 35). Os organismos foram transportados rapidamente para o Laboratório de Cultivo de Plâncton do Departamento de Oceanografia da UFPE. Posteriormente foram selecionados adultos saudáveis de *A. lilljeborgii* e

colocados separadamente machos e fêmeas para aclimação durante 24 horas. Durante a aclimação, os organismos foram mantidos nas condições do local de coleta (temperatura e água do local) com aeração moderada e fornecimento de microalgas cultivadas no laboratório (*Thalassiosira weissflogii*).

3.2.1.2.2. Ensaio de toxicidade aguda com *Acartia lilljeborgii*

Para determinar a concentração de CH₄ que causa letalidade a 50% dos indivíduos (CL₅₀) do copépode planctônico *A. lilljeborgii* foram testadas diferentes concentrações de gás metano dissolvido na água do mar. O experimento foi realizado simultaneamente com o teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco (Resultados do Ensaio 3 descrito na Parte 1, CAPÍTULO 2). Todos os tratamentos foram realizados com 3 réplicas (Figura 3.2.4; Tabela 3.2.2).

De cada RF fortificado diariamente com as diferentes concentrações de CH₄ dissolvido na água do mar (como descrito no item 2.1.1.) foram vertidos 80 mL de solução-teste em cada béquer. Posteriormente em cada unidade experimental foram colocados 8 indivíduos (4 fêmeas e 4 machos) de *A. lilljeborgii* em boas condições de saúde e previamente alimentados e aclimatados. O experimento foi mantido em uma câmara de germinação (com alternância de temperatura B.D.O. Marca Marconi – M402) com condições controladas de temperatura e fotoperíodo (12 horas luz : 12 horas escuridão).

Após 24 horas foram contados os indivíduos mortos. Os indivíduos vivos foram transferidos a um novo béquer com solução-teste (teste semi-estático). As novas unidades experimentais foram levadas para incubação por mais 24 horas. Posteriormente foi realizada a contagem de ovos para determinação de produção diária de ovos por dia. Depois da contagem, os ovos foram incubados durante mais 24 horas. Após 24 horas foi registrado o número de náuplios presentes para calcular a Taxa de eclosão. Este procedimento foi realizado diariamente durante 96 horas.

Tabela 3.2.2 - Resumo das condições do ensaio ecotoxicológico

Espécie-teste	<i>Acartia lilljeborgii</i>
Organismos	Fêmeas e machos adultos em boas condições de saúde
Alimento	<i>Thalassiosira weissflogii</i> em concentração de 0.25 µgC mL ⁻¹ por copépode.
Tipo de teste	Agudo, semi-estático
Periodo de exposição	96 horas
Frasco teste	Béquers de 100 mL
Réplicas	3 por tratamento, 4 fêmeas e 4 machos
Volume da solução-teste	80 mL
Controle	Água do mar filtrada por poro de 5 micrômetros e tratamento UV
Salinidade	35
Temperatura	±27 °C
Fotoperíodo	12 horas luz : 12 horas escuridão
Aeração	Não
Parâmetros analisados	Mortalidade 24, 48, 72 e 96h Produção de ovos dia ⁻¹ : 24, 48, 72 e 96h Taxa de eclosão dia ⁻¹ : 24, 48, 72 e 96h
Observações	Contagem e remoção de copépodes mortos a cada 24 horas Medição de Salinidade, Temperatura, OD e pH em uma réplica de cada tratamento (incluindo o controle) no início e final do teste.
Aceitabilidade do Teste	A mortalidade média do controle deve ser inferior a 20% (Zagatto, 2006). A CL ₅₀ da substância de Referência (Sulfato de Zinco) Deve estar dentro dos limites aceitáveis já determinados previamente.

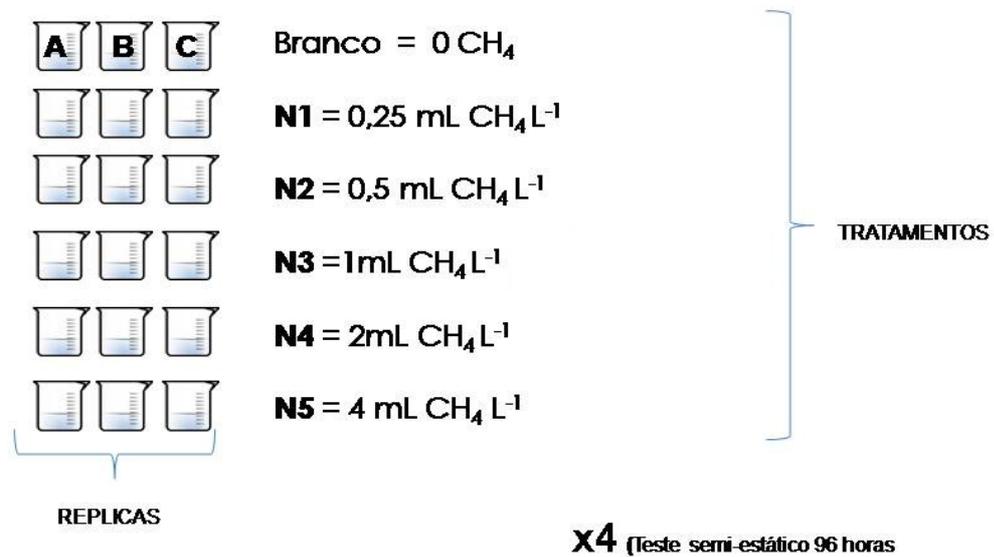


Figura 3.2.4 - Níveis de gás metano utilizados no Teste Ecotoxicológico (TET).

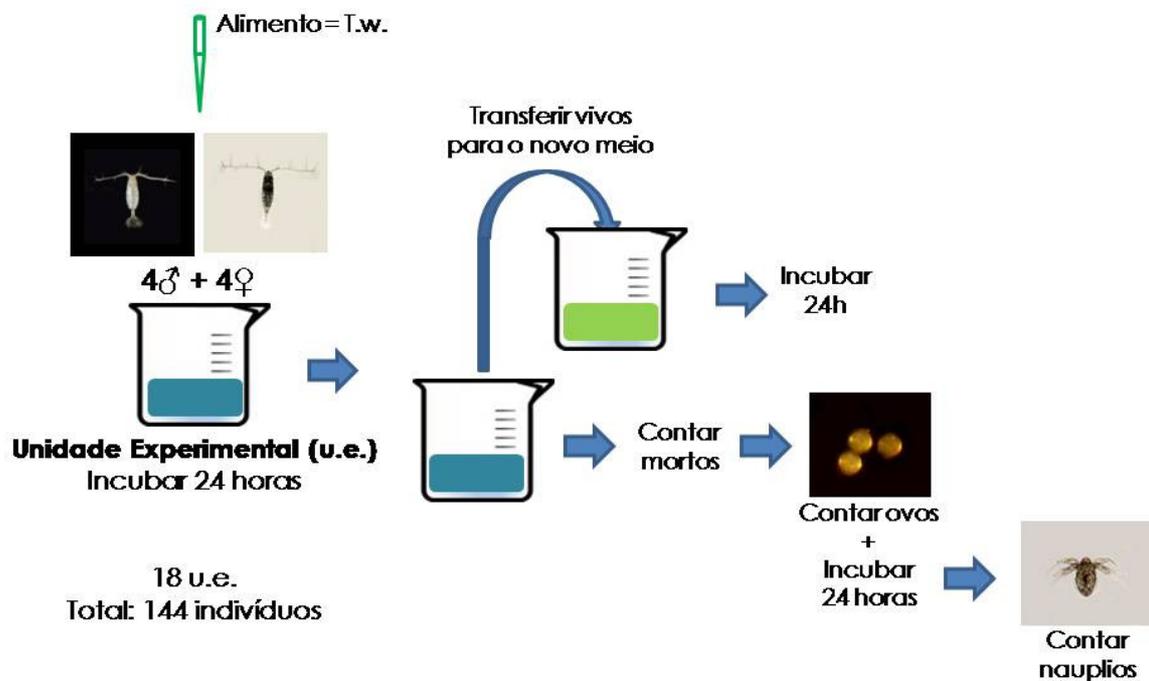


Figura 3.2.5 - Ensaio agudo do gás metano no copépode planctônico *Acartia lilljeborgii*

3.2.1.2.3. Análise dos dados

Os pré-requisitos para aplicação de testes paramétricos foram testados (Distribuição normal e homogeneidade de variância). Os dados foram transformados para Ln. Diferenças significativas entre os níveis de fortificação da água do mar com gás metano e as réplicas foram analisados usando uma ANOVA de dois fatores. Adicionalmente, as diferenças significativas entre os níveis de fortificação e o tempo de exposição ao poluente na sobrevivência de adultos, produção diária de ovos a taxa de eclosão de *A. lilljeborgii* foram analisados usando uma ANOVA de dois fatores. As diferenças significativas detectadas ($F_{\text{crítico}} < F_{\text{calculado}}$; $p < 0,05$) foram analisadas com o teste a posteriori Tukey. Para a realização das análises foi utilizado o programa Bioestat 5.0.

3.2.3. Resultados

3.2.3.1. Procedimento 1

A metodologia implementada para fortificação de água do mar com gás metano mostrou resultados reprodutíveis em todos os níveis de fortificação testados (Tabela 3.2.3). Isso foi constatado ao não encontrar diferenças significativas entre as fortificações realizadas durante as 96 horas do TET (Tabela 3.2.4). Somente foi registrado um resultado fora da média das réplicas (RF: N5 – 96H), sinalizando um possível erro na preparação da amostra (Tabela 3.2.3; Figura 3.2.6.A.). Excluindo esse resultado (Figura 3.2.6.B.) o desvio padrão dos dados se manteve baixo ($\pm 0,14$) confirmando a reprodutibilidade na preparação das soluções. Entre os valores esperados (Tabela 3.2.1) e os valores alcançados na fortificação (Tabela 3.2.3) houve diferenças significativas (teste t pareado $_{(2,78;0,05)} = 4,28$), mostrando a grande dificuldade de trabalho com compostos gasosos e a necessidade de uma calibração e preparação das amostras muito cuidadosa. No entanto, as concentrações estiveram dentro dos limites propostos.

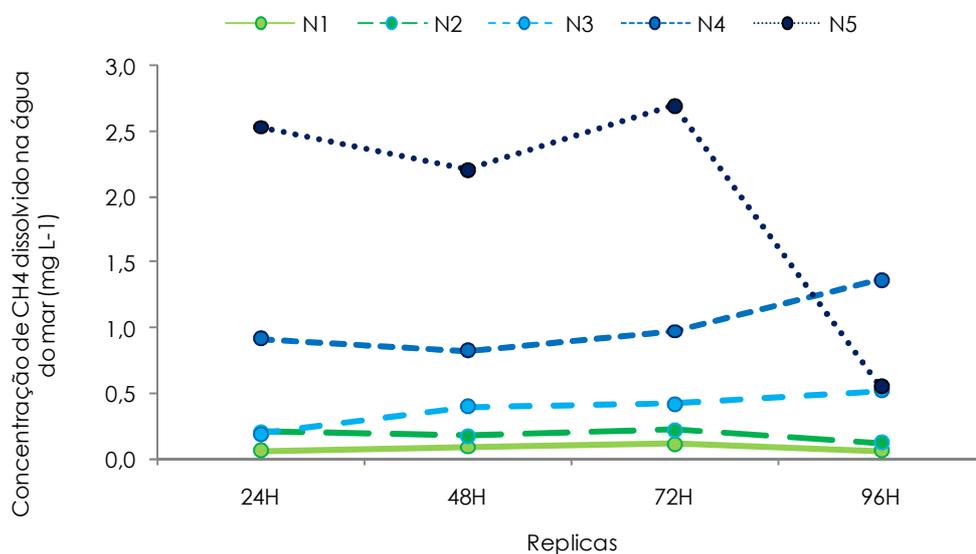
Tabela 3.2.3 - Resultado da análise da concentração de metano (mg L^{-1}) dissolvido na água do mar (salinidade 35) em diferentes níveis de concentração (BR e N1 a N5) nas 4 réplicas de fortificação com CH_4 correspondentes aos tempos de exposição do TET (0 a 96 horas) e nos dois momentos de contato com atmosfera das soluções teste fortificadas (0 e 24 horas). * Valor fora da média.

Recipiente	Nível	Concentração Total CH_4 (mg L^{-1})						
		24H	48H	72H	96H	MÉDIA	DP	
RF - 0H	BR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Perda de CH_4 depois de 24 horas
	N1	0,06	0,09	0,11	0,06	0,08	0,03	
	N2	0,20	0,17	0,22	0,12	0,18	0,04	
	N3	0,19	0,40	0,42	0,52	0,38	0,14	
	N4	0,92	0,82	0,97	1,37	1,02	0,24	
	N5	2,54	2,21	2,70	0,55*	2,00 *(2,48)	0,99 *(0,25)	
Béquer - 24H SEM COPEPODOS	BR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,46%
	N1	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	
	N2	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	N3	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	
	N4	0,06	0,04	0,04	0,05	0,05	0,01	
	N5	0,13	0,14	0,14	0,30	0,18	0,08	
							Média	93,26%
Béquer - 24H COM COPEPODOS	BR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	94,82%
	N1	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	
	N2	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	
	N3	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	
	N4	0,03	0,01	0,04	0,03	0,03	0,01	
	N5	0,06	0,03	0,08	0,11	0,07	0,03	
							Média	96,25%

Tabela 3.2.4 – Resumo do teste ANOVA (Dois fatores) comparando os níveis de fortificação da água do mar com gás metano e as réplicas de fortificação.
*Diferenças significativas: $F_{\text{crit}} < F_{\text{calc}}$; $p < 0,05$.

Fortificação	F_{calc}	p	T. Tukey
Níveis ($F_{\text{crit}} = 3,26$)	$F_{(4,12,0,05)} = 150,9$	0,0003*	N1 e N2 < N4 e N5 N3 < N5
Réplicas ($F_{\text{crit}} = 3,49$)	$F_{(3,12,0,05)} = 0,4384$	0,7325	-

A



B

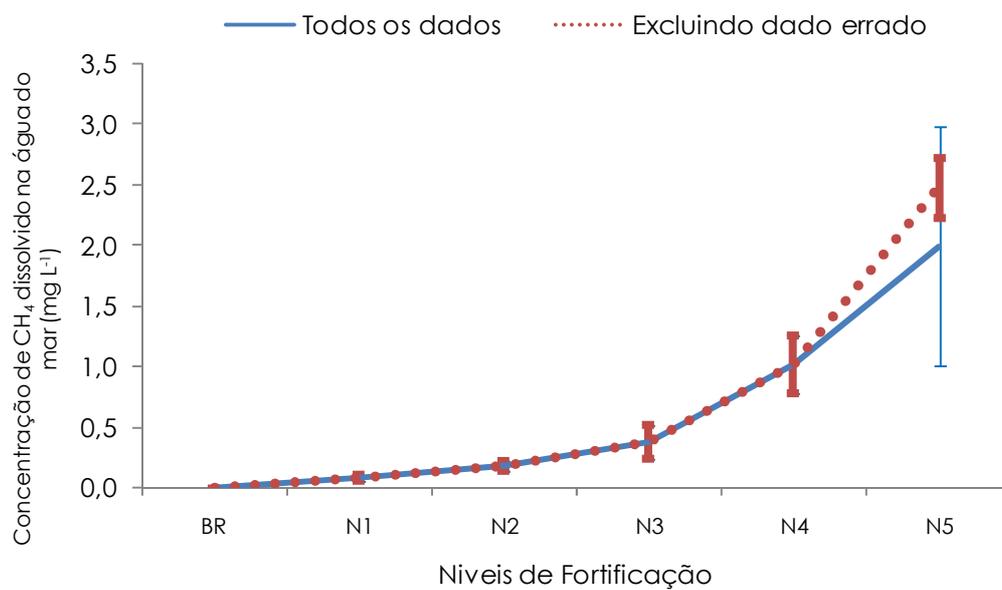


Figura 3.2.6 - A. Relação da concentração de metano (mg L⁻¹) dissolvido em função do tempo (Horas) de contato para cada nível de concentração (N1:N5); B. Acréscimo da concentração de metano (mg L⁻¹) em cada nível (N1:N5) para as réplicas consecutivas de acordo com as horas de exposição do TET.

Como esperado, houve perda de metano nas unidades experimentais depois de 24 horas de contato com a atmosfera, na mesma proporção independente dos níveis de fortificação (Tabela 3.2.3). A perda de metano depois de 24 horas, nas unidades experimentais sem copépodes foi menor em 3% do que a perda de metano nas unidades experimentais com copépodes (Tabela 3.2.3).

3.2.3.2. Procedimento 2

Os parâmetros químicos aferidos durante o TET (pH e OD) não apresentaram diferenças entre os níveis de fortificação ($F_{(5;5;0,5)}=0,3012$; $p=0,89$). Foi observada uma diferença significativa na concentração de oxigênio nas soluções teste antes de colocar os organismos (0h) e depois de 24 horas com os organismos e em contato com a atmosfera ($F_{(5;5;0,5)}=93,76$; $p=0,0006$). Os valores de OD às 0 horas foram significativamente maiores ($5,80 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$) do que às 24 horas ($3,80 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$).

Os resultados do TET mostraram diferenças significativas na sobrevivência e reprodução de indivíduos de *A. lilljeborgii* (Figura 5; Tabela 3.2.5 e 3.2.6). A mortalidade dos indivíduos adultos de *A. lilljeborgii* foi significativamente maior na maior concentração de gás metano dissolvido na água ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) do que no controle e nos níveis de fortificação N1 e N2. Também foi observada uma diferença significativa na produção diária de ovos, encontrando quantidades significativamente menores no nível N4 do que nos níveis N2 e N3 (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas na taxa de eclosão entre os tratamentos (Tabela 3.2.6).

Da mesma forma, foram observadas diferenças significativas ao longo do tempo de ensaio, encontrando um aumento gradual na mortalidade com o aumento do tempo de exposição e, ao contrário, uma maior produção diária de ovos e taxa de eclosão nos primeiras 24 e 48 horas do ensaio (Tabela 3.2.6). Apesar das diferenças observadas, não foi possível calcular a CL_{50} já que a sobrevivência da população se manteve acima de 50% até o final do ensaio de 96 horas (Figura 3.2.5.A.; Tabela 3.2.5).

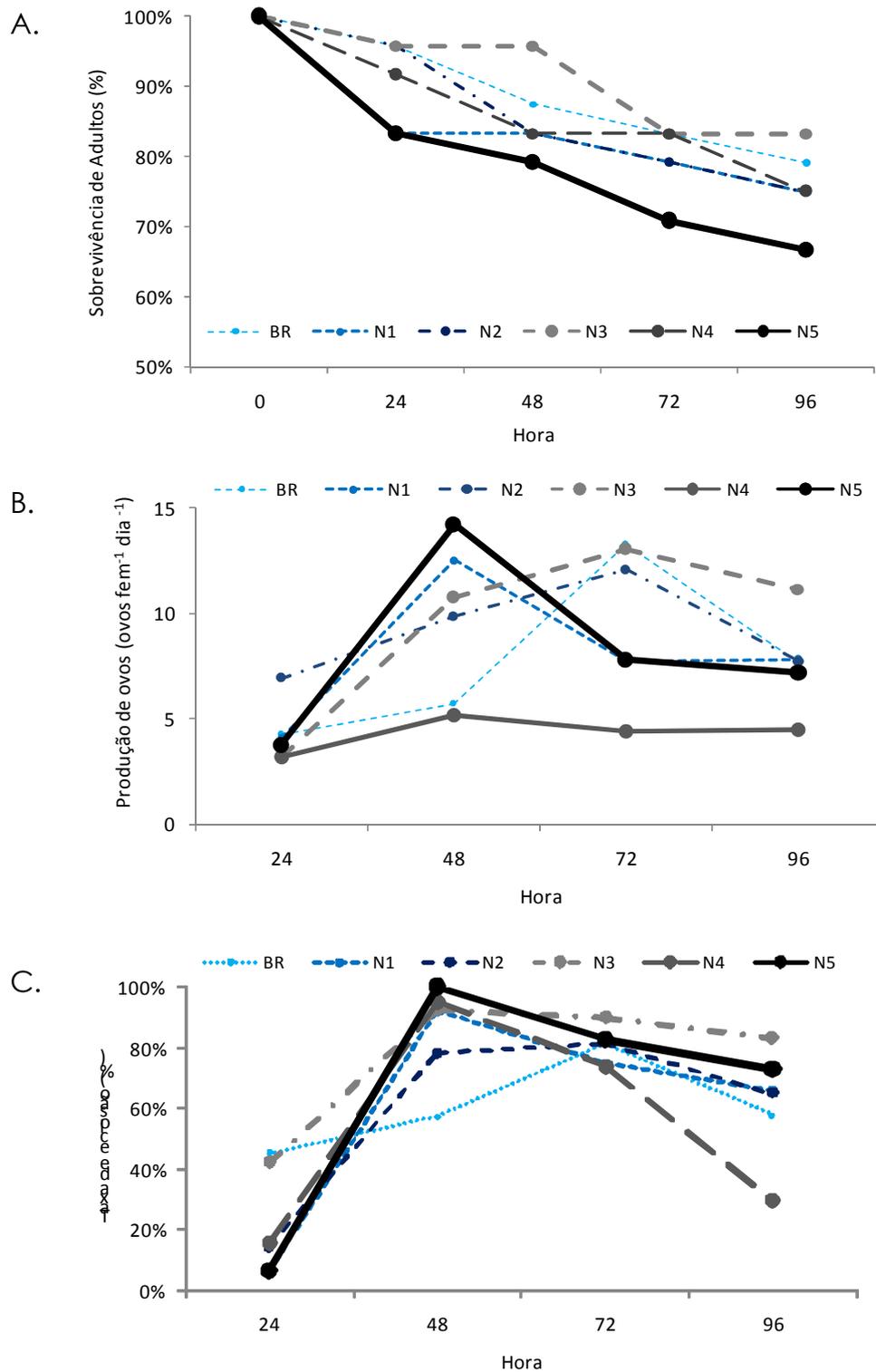


Figura 3.2.7 - A. Sobrevivência (%) dos adultos; B. Produção de ovos (ovos fem⁻¹ dia⁻¹); C. Recrutamento diário de náuplios (Total náuplios dia⁻¹) dos copépodes planctônicos *Acartia lilljeborgii* durante o ensaio agudo do gás metano (96 horas).

Tabela 3.2.5 - Média \pm erro padrão dos parâmetros avaliados nos copépodes planctônicos *Acartia lilljeborgii* durante o ensaio agudo do gás metano (96 horas).

Tratamento	Sobrevivência de adultos (%)	Produção de ovos (Ovos fem. ⁻¹ dia ⁻¹)	Taxa de eclosão (%)	Total de náuplios recrutados
Branco	89,2 \pm 1,8	7,7 \pm 2,0	60,4 \pm 7,6	56
N1	84,2 \pm 1,9	8,0 \pm 1,7	59,7 \pm 18,7	58
N2	86,7 \pm 2,2	9,1 \pm 1,2	59,7 \pm 15,5	65
N3	91,7 \pm 1,6	9,5 \pm 2,2	76,8 \pm 11,7	88
N4	86,7 \pm 1,9	4,3 \pm 0,4	53,5 \pm 18,6	28
N5	80,0 \pm 2,6	8,2 \pm 2,2	65,5 \pm 20,4	65

Tabela 3.2.6 - Resumo da ANOVA de dois fatores (teste a posteriori Tukey) comparando os tratamentos (concentrações de gás metano) e o tempo do teste (96 horas).

Resposta Biológica	Níveis de CH ₄ (F _{crit} = 2,62)		Teste Tukey	Hora (F _{crit} = 3,01)		Teste Tukey
	F _(5;24;0,05)	p		F _(3;24;0,05)	p	
Taxa de sobrevivência	142,228	0,0001*	N5 < BR, N3 e N4; N1 < N3	357,628	< 0,0001*	24h > 48, 72 e 96h; 48h > 72 e 96h
Produção de ovos	33,456	0,0313*	N4 < N2 e N3	103,849	0,0008*	24h < 48, 72 e 96h
Taxa de eclosão	0,8457	0,5394	-	151,01	0,0002*	24h < 48, 72 e 96h

3.2.4. Discussão

A implementação da metodologia de fortificação e extração de gás metano demonstrou eficiência e robustez frente a uma matriz que sempre traz desafios em aplicações analíticas, principalmente envolvendo análises ambientais reais. A partir do planejamento experimental foram obtidos os resultados esperados de concentração de metano (mg L⁻¹) dissolvido em água do mar (salinidade 35) para os cinco níveis de concentração (Tabela 3.2.3). Independente da presença dos copépodes esperava-se diminuição na concentração do metano no intervalo de 0 a 24 horas por causa da perda

natural do metano dissolvido, proporcional à concentração da fortificação. Contudo, a presença dos copépodes afetou ainda mais a perda de metano ao longo do experimento (Tabela 3.2.3). O metano foi conservado nos RA sendo esta outra característica importante nos resultados metodológicos, que demonstra sua robustez e a sua coerência nos níveis de concentração e horas de exposição testadas.

Uma etapa crítica desse experimento foi o armazenamento das amostras para serem analisadas no final do TET. Contudo foi observada uma sincronia nos dados (Figura 3.2.6.A e 3.2.6.B.) ao longo do tempo de procedimentos e independente do tempo de armazenamento (5 dias) sem observar variações tendenciosas de perdas de metano. Uma réplica do nível 5 (N5) apresentou um dado espúrio que pode-se atribuir a erros operacionais durante a preparação da amostra.

Anomalias nas concentrações de oxigênio dissolvido por causa do aumento nas concentrações de metano já foram registradas tanto no laboratório (KOSHELEVA *et al.*, 2004) como em campo (KESSLER *et al.*, 2011). Um complexo estudo ecotoxicológico para determinar os efeitos de diversos compostos relacionados com a exploração de petróleo e gás foi realizado na Rússia, e entre os compostos estudados estava o gás natural (KOSHELEVA *et al.*, 2004). Nesse experimento foi avaliado o efeito do gás natural em vários parâmetros físico-químicos, encontrando-se um efeito negativo no oxigênio dissolvido com concentrações superiores a $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ de gás natural dissolvido (KOSHELEVA *et al.*, 2004). A queda máxima do conteúdo de oxigênio dissolvido (30% com relação ao controle) foi observada no primeiro dia do teste e posteriormente as concentrações foram se equilibrando até não observar diferenças com o controle (KOSHELEVA *et al.*, 2004). O estudo atribuiu a restauração das concentrações de oxigênio à volatilização rápida do gás da água para o ambiente (KOSHELEVA *et al.*, 2004). No monitoramento do acidente do golfo do México, também foi constatada a relação inversa entre as concentrações do gás metano e de oxigênio dissolvido (KESSLER *et al.*, 2011). O estudo constatou que a perda de metano para a atmosfera foi pequena (<0.01%) devido aos fortes ventos durante o vazamento e que a

presença de grandes concentrações de metano na água favoreceu a proliferação de bactérias metanotróficas que consumiram a maioria do gás (KESSLER et al., 2011). Esse trabalho sugeriu que um grande vazamento de gás metano no mar pode promover uma resposta rápida metanotrófica levando à completa oxidação do metano para CO₂ em questão de meses (KESSLER et al., 2011).

No presente estudo não foi constatada a relação inversa entre metano e oxigênio provavelmente pela rápida volatilização do gás metano da água para o ambiente nas unidades experimentais. A diminuição do oxigênio observado depois de 24 horas, possivelmente esteve relacionada unicamente com a respiração dos copépodes. Provavelmente a implementação de um sistema que impeça a perda do gás para a atmosfera, simulando com maior veracidade um acidente de vazamento de longa duração, poderiam levar a uma deficiência de oxigênio e/ou um aumento na acidez da água produzindo um efeito negativo na biota aquática.

Um ensaio crônico realizado com soluções de gás natural e o copépode planctônico *Idyaea furcata* mostrou mortalidade completa depois de 9 dias de exposição ao poluente (KOSHELEVA et al., 2004). No mesmo estudo, foram realizados testes com gás condensado (mistura líquida de hidrocarbonetos) e entre vários grupos, os crustáceos planctônicos foram considerados os mais sensíveis a exposição a este poluente. Para o zooplâncton, foi encontrada uma CL₅₀ em um experimento de 96 horas de 5,5 mg L⁻¹ de gás metano sem aeração e de 1,75 mg L⁻¹ com aeração (UMORIN et al., 1991). Existem algumas evidências de hidratos de gás se acumular em organismos zooplânctônicos, podendo afetar a capacidade de migração e de se alimentar ativamente (NOVOSELOV et al., 1992). No presente estudo foi observado o incremento na mortalidade com o aumento do tempo de exposição, o que indica que provavelmente a realização de um ensaio com maior tempo de exposição ao gás metano dissolvido possa aumentar a mortalidade de *A. lilljeborgii*. Também deve ser considerado que o gás natural, o gás condensado e os hidratos de gás, diferentemente do gás metano, têm na sua composição parafinas, naftenos e compostos aromáticos em

quantidades baixas que podem exercer um efeito tóxico maior para a biota aquática (PATIN, 1999). A metodologia implementada no presente estudo mostrou bons resultados, no entanto, se faz necessário a realização de réplicas do ensaio para garantir a repetibilidade. Esta metodologia também pode ser testada com outros gases dissolvidos, como por exemplo, com gás natural, para poder avaliar os efeitos diretos deste poluente nos organismos aquáticos, sendo esta uma proposta interessante para futuras pesquisas.

Embora seja considerado que gases de baixo peso molecular dissolvidos na água do mar (metano e etano) não exercem um impacto tão significativo no ambiente marinho quanto outros compostos relacionados com a indústria de petróleo e gás (SACKED e BROOKS, 1975), o aumento nas concentrações naturais podem causar efeitos na sobrevivência dos organismos a longo prazo e efeitos negativos nas cadeias tróficas. Em contraste com os hidrocarbonetos oleosos (petróleo e derivados), os quais têm sido objetos de amplos e detalhados estudos ecotoxicológicos, o gás natural e seus componentes têm poucas análises ambientais, para o estabelecimento de políticas regulatórias. O pouco conhecimento da evolução de hidrocarbonetos gasosos introduzidos no ambiente natural e especialmente dos seus impactos em organismos aquáticos, populações e ecossistemas limitam a possibilidade do entendimento, evolução e prevenção dos efeitos ambientais de liberações (*blowout*) e vazamentos acidentais causados por atividades antrópicas de produção, transporte, processamento e uso do gás natural (PATIN, 1999).

3.2.5. Conclusões

Estudos com compostos gasosos são escassos e requerem uma logística complexa. O presente estudo conseguiu tanto desenvolver e aplicar uma metodologia com uma estrutura experimental de laboratório simples, quanto obter resultados ecotoxicológicos em curto prazo que podem ser utilizados para avaliar o impacto do aumento nas concentrações do gás metano nas comunidades marinhas.

Referências Bibliográficas

- ABNT. NBR 13373. Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica - método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005. 15 p.
- ABNT. NBR 15411. Ecotoxicologia aquática - determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, 2006a. 18 p. Parte 1: método utilizando bactérias recém-cultivadas.
- ABNT. NBR 15350. Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração - método de ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata: Echinoidea*). Rio de Janeiro, 2006b. 17 p.
- ARAÚJO, H. M. P. NASCIMENTO-VIEIRA, D. A.; NEUMANN-LEITÃO, S.; SCHWAMBORN, R.; LUCAS, A. P. O.; ALVES, HJ. P. H. 2008. Zooplankton community dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4): 751-762.
- BOLTOVSKOY, D. *South Atlantic Zooplankton*. Leiden: Backhuys, 1999. 1627p.
- CAVALCANTI, E.A.H.; NEUMANN-LEITÃO, S.; NASCIMENTO-VIEIRA, D. A. N. 2008. Mesozooplâncton do sistema estuarino de Barra das Jangadas, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3): 436-444.
- CHEN, F.H.; YAPA, P.D. 2004. Modeling gas separation from a bent deepwater oil and gas jet/plume. *Journal of Marine Systems*, 45(3-4): 189-203.
- DASANAYAKA, L. K.; YAPA, P. D. 2009. Role of plume dynamics phase in a deepwater oil and gas release model. *Journal of Hydro-environment Research*, 2(4): 243-253.
- DIAS, C. O.; ARAÚJO, A.D.; BONECKER, S.L.C. 2009. Seasonal variability of planktonic copepods (Copepoda: Crustacea) in a tropical estuarine region in Brazil. *Zoologia*, 26: 705-715.
- HEESCHEN, K.; COLLIER, R.; DE ANGELIS, M.; SUESS, E.; REHDER, G.; LINKE, P.; KLINKHAMMER, G. 2005. Methane sources, distributions, and fluxes from cold vent sites at Hydrate Ridge, Cascadia Margin. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(2): 1-19.
- JOHANSEN, O. 2003. Deep Spill—Field Study of a Simulated Oil and Gas Blowout in Deep Water. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(5-6): 433-443.

- JOHNSON, K.M.; HUGHES, J.J.E.; DONAGHAY P.L.; SIEBURTH J.M. 1990. Bottle-calibration static head space method for the determination of methane dissolved in seawater. *Analytical Chemistry*, 62: 2408–2412.
- KAMPBELL, D.H.; VANDEGRIFT. S.A. 1998. Analysis of dissolved methane, ethane, and ethylene in ground water by a standard gas chromatographic technique. *Journal of Chromatographic Science*, 36: 253–256.
- KESSLER, J.D.; VALENTINE, D.L.; REDMOND, M.C.; DU, M.; CHAN, E.W.; MENDES, S.D.; QUIROZ, E.W.; VILLANUEVA, C.J.; SHUSTA, S.S.; WERRA, L.M.; YVON-LEWIS, S.A.; WEBER. 2011. T.C. A Persistent Oxygen Anomaly Reveals the Fate of Spilled Methane in the Deep Gulf of Mexico. *Science*, 331: 312-315.
- KOSHELEVA, V.; MIGALOVSKY, I.P.; NOVIKOV, M.A.; GORBACHEVA, E.A.; LAPTEVA, A.M. On the pollution reactions of hydrobiontes of the environment at the oil-gas deposits exploration in the Barent sea. *PINRO, Murmansk*, 1994.
- KOSHELEVA, V. V.; NOVIKOV, N. A.; MIGALOVSKI, I. P.; GORBACHEVA, E. A.; LAPTEVA, A. N. Responses of marine organisms to environmental pollution during oil and gas development on the shelf of the Barents Sea. *PINRO, Murmansk*, 1997.
- LIBES, S. 2009. Gas solubility and Exchange across the Air sea interface. Em: *Introduction to marine biogeochemistry. Second Edition. Wiley. 147-168p.*
- LOMOND, J.S.; TONG, A.Z. 2011. Rapid analysis of dissolved methane, ethylene, acetylene and ethane using partition coefficients and Head-space-gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 49(6): 469-475.
- MARTINS, A.L.P.; LOPES, M.J.S.; MELO, O.T. 2006. Zooplâncton como bioindicador da qualidade ambiental no estuário do rio Anil, São Luís, Maranhão. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 19: 51-60.
- NEUMANN-LEITÃO, S. 1995. Resenha literária sobre o zooplâncton estuarino no Brasil. *Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco*, 23: 25-53.
- NIPPER, M.G.; PRÓSPERI, V.P.; ZAMBONI, A.J. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 646-652.
- NOVOSELOV, S.U.; BONDARENKO, I.V.; KUSMIN, A.U. 1992. Ecological problems of the oil and gas development on the shelves of the Barent and Kara seas. Em: *Report of NIR PINRO in 1991. Murmansk: PINRO*, 237-248.

- PATIN, S. Environmental Impact of the Offshore Oil and Gas Industry. East Northport, NY: EcoMonitor Publishing. 1999.
- RESGALLA Jr, C.; LAITANO, K.S. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Técnicas Facimar*, 6: 153-163.
- SACKETT, W.M.; BROOKS, J.M. Use of low molecular-weight hydrocarbons as indicators of marine pollution. Em: *NBS Marine Pollution Monitoring (petroleum)*. Proceedings of Symposium and workshop held at NBS, Gaithersburg, Maryland May 13-17. 172-173 pp., 1975.
- SANTOS, T. G.; GUSMÃO, L.M.O.; NEUMANN-LEITÃO, S.; CUNHA, A.C. 2009. Zooplâncton como indicador biológico da qualidade ambiental nos estuários dos rios Carrapicho e Botafogo, Itamaracá – PE. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(1): 41-56.
- SILVA, A. P.; NEUMANN-LEITÃO, S.; GUSMÃO, L. M. O.; SCHWAMBORN, R.; SILVA, T. A. 2004. Mesozooplankton of an impacted bay in Northeastern Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 47(3): 485-493.
- SNOW, N.H.; G.P. BULLOCK. 2010. Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2726–2735.
- UMORIN, P.P.; VINOGRADOV, G.A.; MAVRIN, A.S.; VERBITSKI, V.B.; BRUZNITSKI, A.A. 1991. Impact of the bottled gas on ichthyofauna and zooplankton organisms. Em: *Theses of the Second All-Union Conference on Fisheries Toxicology*. Vol 2. 222-224.
- VALENTINE, D. L.; KESSLER, J.D.; REDMOND, M.C.; MENDES, S.D.; HEINTZ, M.B.; FARWELL, C.; HU, L.; KINNAMAN, F.S.; YVON-LEWIS, S.; DU, M.; CHAN, E.W.; TIGREROS, F.G.; VILLANUEVA, C.J. 2010. Propane Respiration Jump-Starts Microbial Response to a Deep Oil Spill. *Science*, 330: 208-211.
- VAZ, C.E.; MAIA, J. L.; SANTOS, W.G. *Tecnologia da Indústria do Gás Natural*. São Paulo, Blucher. 2008.
- YAPA, P.D.; ZHENG, L.; CHEN, F.H. 2001. A Model for Deepwater Oil/Gas Blowouts. *Marine Pollution Bulletin*, 43(7): 234-241.

∞ CONSIDERAÇÕES FINAIS ∞

Este estudo conseguiu determinar efeitos tanto na estrutura da comunidade mesozooplancônica como nas populações de copépodes planctônicos relacionados com a presença de gás natural no ambiente marinho causado por possíveis vazamentos durante o processo de extração e transporte em plataforma.

Foi possível determinar variações na abundância e composição da comunidade mesozooplancônica durante esses vazamentos. As plumas de gás natural modificaram a abundância de dois grupos importantes do mesozoplâncton: Copepoda e Chaetognatha. O efeito foi caracterizado por baixas densidades antes e depois da pluma e altas densidades durante a pluma. Esta variação na abundância foi decorrente de um processo físico de deslocamento e acumulação de organismos sensíveis na coluna e superfície da água causado pela ascensão das bolhas de gás durante o tempo de duração da vazão (efeito de fonte). Os náuplios de Copepoda (estágio inicial de desenvolvimento) e Chaetognatha (reconhecidos como bons indicadores de massas de água) apresentaram o mesmo comportamento durante todos os experimentos em campo, podendo ser considerados como grupos sensíveis e possíveis traçadores de plumas de gás. Conjuntamente, foi observada uma mudança temporária na estrutura da comunidade mesozooplancônica pela presença de espécies ticolplancônicas (principalmente jovens de gastrópodes bentônicos) exclusivamente durante a liberação de gás, que estaria indicando o deslocamento de comunidades alóctonas dentro do ambiente pelágico. O grau do impacto ecológico que o deslocamento de espécies (autóctonas ou alóctonas) pudesse ter no ambiente marinho, seria dependente do tempo de exposição ao poluente, da composição química do poluente e da quantidade do poluente vertido ao mar.

Os copépodes planctônicos foram considerados então organismos que podem dar uma resposta mensurável para um evento de vazamento acidental no mar. O cultivo de copépodes planctônicos sob condições controladas pode ser uma ferramenta útil para determinar os efeitos químicos de poluentes gasosos dissolvidos na água do mar. Com o objetivo de padronizar dietas para manutenção de espécies potenciais para serem

usadas como organismos-teste foram realizados vários ensaios comparando a sobrevivência e reprodução de *Temora turbinata* e *Acartia lilljeborgii*. Estas duas espécies estuarino-costeiras são abundantes no norte e nordeste brasileiro, cumprindo um dos requerimentos para serem usadas como organismo-teste na região. Comparando os parâmetros de sobrevivência e reprodução das duas espécies foi determinado que *Acartia lilljeborgii* apresentou as maiores taxas de sobrevivência, produção de ovos por fêmea, taxas de eclosão e de produção total de náuplios em experimentos de 8 dias de duração. Resultados semelhantes na sobrevivência e reprodução de *Acartia lilljeborgii* foram obtidos quando a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* ($0,25-0,5 \mu\text{g C mL}^{-1}$) foi fornecida em baixas densidades e *Chatoceros gracilis* foi fornecida em densidades maiores ($1-2 \mu\text{g C mL}^{-1}$). A ressuspensão de *Chatoceros gracilis* é necessária para manter altas as taxas de sobrevivência dos copépodes. Realização de ensaios de dietas mistas em adultos e de micralgas de menor tamanho de partículas para os estágios iniciais de desenvolvimento são necessários para a padronização do cultivo no laboratório.

A espécie *Acartia lilljeborgii* é sugerida como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos. Esta espécie respondeu a testes de referência com sulfato de zinco com sensibilidade semelhante à registrada em outras espécies de copépodes planctônicos usados mais amplamente em ecotoxicologia.

Para determinar o efeito tóxico do gás metano em copepodes planctônicos foi desenvolvida uma metodologia robusta e simples para ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos com gases dissolvidos na água do mar. O organismo-teste foi *Acartia lilljeborgii* e a substância-teste foi o gás metano. A metodologia foi desenvolvida em três etapas básicas: Fortificação da água do mar com gás metano, aplicação do teste ecotoxicológico semi-estático e leitura das concentrações de gás metano dissolvido utilizando a técnica de head-space estático através de cromatografia gasosa.

Durante a realização do teste agudo semi-estático (96 horas) foi comprovada a influência de altas concentrações de gás metano dissolvido na

sobrevivência de *Acartia lilljeborgii*. A mortalidade dos indivíduos adultos de *A. lilljeborgii* foi significativamente maior na maior concentração de gás metano dissolvido na água ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) do que no controle e nas menores concentrações testadas. No entanto, não foi possível calcular a CL_{50} já que a sobrevivência da população se manteve acima de 50% até o final do ensaio. Também foi observado o incremento significativo na mortalidade com o aumento do tempo de exposição ao gás metano dissolvido, indicando que o efeito tóxico do gás só poderá ser observado com um tempo maior de exposição. O gás metano é o principal componente do gás natural, sendo este resultado um sinalizador inicial do efeito que este poluente pode ter nas comunidades de copépodes planctônicos.