

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

LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DO FITOPLÂNCTON COSTEIRO
AO ÓLEO**

Recife

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CAMPUS RECIFE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DO FITOPLÂNCTON COSTEIRO
AO ÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Oceanografia. Área da concentração: Oceanografia Biológica.

Orientador(a): Marius Nils Müller.

Coorientador: Gilvan Takeshi Yogui.

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Jannuzzi, Luiz Gustavo de Sales.

Avaliação da resposta fisiológica do fitoplâncton costeiro ao óleo / Luiz Gustavo de Sales Jannuzzi. - Recife, 2025.

107f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2025.

Orientação: Marius Nils Müller.

Coorientação: Gilvan Takeshi Yogui.

Inclui referências e anexos.

1. Derrame de óleo; 2. HPAs; 3. Dinoflagelados; 4. Microalgas; 5. Corais. I. Müller, Marius Nils. II. Yogui, Gilvan Takeshi. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DO FITOPLÂNCTON COSTEIRO
AO ÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Oceanografia. Área da concentração: Oceanografia Biológica.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marius Nils Müller (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fiamma Eugênia Lemos Abreu (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Yure Barbosa de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Eliete Zanardi-Lamardo (Membro suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Elizabeth Pereira dos Santos (Membro suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Sumário

1	RESUMO	8
2	INTRODUÇÃO.....	14
2.1	O fitoplâncton.....	14
2.2	Formação do óleo e impactos nos ecossistemas e organismos	14
2.3	O uso do fitoplâncton como um organismo modelo	16
2.4	Resistência e resiliência.....	17
2.5	<i>Durusdinium glynnii</i> e sua importância para os recifes de corais.....	19
2.6	<i>Isochrysis galbana</i>	21
2.7	Derrames de óleo no Brasil: O caso de 2019	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA	24
4.1	Esterilização da vidraria para cultivo.....	25
4.2	Cultivo fototrófico da espécie	26
4.3	Preparação do meio f/2 contaminado	28
4.4	Extração dos hidrocarbonetos dissolvidos na água, purificação do extrato orgânico e controle de qualidade	29
4.5	Parâmetros do sistema cromatográfico para análise de hidrocarbonetos	31
4.6	Experimentos de contaminação, recuperação e estresse.....	33
4.7	Parâmetros de análise do flow cam.....	35
4.8	Análise isotópica celular e razão C:N.....	36
4.9	Cálculo do tempo de geração	37
4.10	Análise estatística e apresentação dos dados	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Experimento 1	39
5.2	Experimento 2.....	42
5.3	Experimento 3.....	43
5.4	Assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e razão C:N.....	44
5.4.1	Experimento 1	44
5.4.1	Experimento 2	46
5.4.2	Experimento 3	47
6	DISCUSSÃO.....	48
6.1	Discussão metodológica	48

6.1.1	Precipitação de parafinas nas culturas fitoplanctônicas	49
6.1.2	Contaminação biológica nas culturas fitoplanctônicas	53
6.2	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	56
6.2.1	Experimento 1	58
6.2.2	Experimento 2	64
6.2.3	Experimento 3	66
6.2.4	Análise isotópica.....	67
6.3	DISCUSSÃO GERAL.....	74
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 RESUMO

Derrames de óleo são fontes pontuais que introduzem grandes quantidades de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nos ambientes marinhos, que possuem potencial mutagênico e carcinogênico, causando danos a estrutura celular e populacional dos produtores primários marinhos, o fitoplâncton. Espécies de fitoplâncton que vivem em ambientes oligotróficos tendem a ser menos resistentes do que as de ambientes eutróficos. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar e comparar a capacidade de tolerância de uma espécie de ambiente oligotrófico (*Durusdinium glynnii*) e uma espécie de ambiente eutrófico (*Isochrysis galbana*) durante e após contaminação por óleo, mediante 3 experimentos, um de contaminação por HPAs, um de recuperação e outro de estresse a salinidade. As microalgas foram cultivadas em 6 diluições da fração solúvel em água do óleo com monitoramento da densidade populacional e taxas de crescimento, além da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ das culturas. As culturas foram submetidas a condições fora do seu crescimento ótimo (i.e. salinidade 15) para avaliar a capacidade de tolerância a estressores pós contaminação por óleo. O aumento da concentração de HPAs causou uma diminuição da taxa de crescimento nas duas espécies. A diminuição de 50% na taxa de crescimento (EC_{50}) de *D. glynnii* foi registrado como $\text{EC}_{50} = 536,26 \text{ ng L}^{-1}$, enquanto uma estimativa do EC_{50} de *I. galbana* resultou em uma concentração de 669 ng L^{-1} . As assinaturas isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ das duas espécies foram menos enriquecidas e próximas a assinatura do óleo (-27.13 ‰), indicando um acúmulo dos compostos orgânicos do óleo nas células, sendo de forma ativa, devido as razões estáveis de C:N, visto que valores maiores de razões C:N indicam adsorção nas paredes celulares. *I. galbana* apresentou uma recuperação total das suas taxas de crescimento e das assinaturas isotópicas de ^{13}C após a contaminação em 7 gerações, apesar das assinaturas de ^{13}C se tornarem mais positivas do que as do tratamento controle, o que pode indicar atividade enzimática para biodegradação/biotransformação de HPAs. O aumento da concentração de HPAs não causou mudanças na aptidão competitiva de *I. galbana*, que permaneceu com uma alta tolerância a variação de salinidade. Os valores de EC_{50} obtidos neste trabalho fazem jus as afirmações de que microalgas que vivem em ambientes eutróficos são mais resistentes do que a de

ambientes oligotróficos. Dados deste e outro estudo com experimentos nas mesmas condições de cultivo (i.e. temperatura, salinidade e iluminação) indicam que as duas espécies possuem capacidade de recuperação aos impactos causados pelos HPAs em taxas diferentes, sendo *I. galbana* a espécie que possui a recuperação mais rápida. Os resultados apresentados fornecem uma contribuição significativa no entendimento da resistência e resiliência entre espécies de ambientes oligotróficos e eutróficos. A diminuição no crescimento de ambas pode sugerir vulnerabilidade dos dois ambientes a efeitos bottom-up na cadeia trófica local. Em um cenário global de crescente pressão sobre os oceanos, compreender como diferentes espécies respondem fisiologicamente ao óleo pode ser crucial para estratégias de conservação e para a preservação da biodiversidade marinha.

Palavras-chave: Derrame de óleo; HPAs; dinoflagelados; microalgas; corais.

ABSTRACT

Oil spills are point sources for large amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into marine environment. These compounds have mutagenic and carcinogenic potential, causing significant damage to the cellular and population structure of marine primary producers, such as phytoplankton. Phytoplankton species living in oligotrophic environments tend to be less resistant to abrupt changes of environmental conditions than those in eutrophic environments. This study evaluated and compared the tolerance of two species, one from an oligotrophic environment (*Durusdinium glynnii*) and one from a eutrophic environment (*Isochrysis galbana*) during and after oil contamination. To achieve this, 3 experiments were conducted: one of contamination by PAHs, one of recovery and one of salinity stress. The microalgae were grown in 6 dilutions of the water-soluble fraction of the oil and the population density, growth rates, as well as the $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signature of the cultures, were monitored. Cultures were exposed to conditions outside their optimal growth conditions (i.e. salinity 15) to assess their ability to tolerate stressors following oil contamination. Increasing the concentration of PAHs caused a decrease in the growth rate of both species. The 50% reduction in growth rate (EC_{50}) of *D. glynnii* was recorded as $\text{EC}_{50} = 536.26 \text{ ng L}^{-1}$, while an estimate of the EC_{50} of *I. galbana* resulted in a concentration of 669 ng L^{-1} . The $\delta^{13}\text{C}$ isotopic signatures of the two species were less enriched and closer to the oil signature (-27.13 ‰), indicating an accumulation of the organic carbon compounds of the oil in the cells, in an active metabolic way, indicated by concomitant stable cellular C:N ratios, since higher values of C:N ratios would indicate adsorption of oil compounds on the cell walls. *I. galbana* had a full recovery of its growth rates and ^{13}C isotopic signatures after contamination after 7 generations, although the ^{13}C signatures was more positive than those of the control treatment, which may indicate enzymatic activity for biodegradation/biotransformation of PAHs. The increase in the concentration of HPAs did not induce changes in the competitive fitness of *I. galbana*, which remained highly tolerant to salinity variation. The EC_{50} values obtained in this study support the assertion that microalgae living in eutrophic environments are more resistant than those living in oligotrophic environments. Results from this and another study with experiments under the same culture conditions (i.e. temperature, salinity and light intensity) indicate that the two species can recover

from the effects caused by PAHs, even at different rates, with *I. galbana* being the species that recovers at a higher rate. The results presented make a significant contribution to the understanding of resistance and resilience between species from oligotrophic and eutrophic environments. The decline in growth of both species may indicate the vulnerability of both environments to bottom-up effects in the local trophic chain. In a global scenario of increasing pressure on the oceans, understanding how different species respond physiologically to oil could be crucial for conservation strategies and the preservation of marine biodiversity.

Key-words: Oil spill; PAHs; dinoflagellates; microalgae; corals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema com detalhes dos três experimentos realizados neste trabalho. _____	25
Figura 2: Rampas de temperatura do forno do cromatógrafo para análise de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos _____	32
Figura 3: Perfil de HPAs e seus respectivos números de anéis nas FSAs utilizadas nos experimentos 1 de <i>D. glynnii</i> e <i>I. galbana</i> . _____	39
Figura 4: Curvas de crescimento no experimento 1 das diferentes diluições de FSA para <i>D. glynnii</i> . _____	40
Figura 5: Curvas de crescimento no experimento 1 das diferentes diluições de FSA para <i>I. galbana</i> . _____	40
Figura 6: Taxas de crescimento de <i>D. glynnii</i> e <i>I. galbana</i> em resposta ao aumento da concentração de HPAs. _____	41
Figura 7: Curvas de crescimento no experimento 2 dos diferentes tratamentos para <i>I. galbana</i> . _____	42
Figura 8: Taxas de crescimento de <i>I. galbana</i> no experimento 3. _____	43
Figura 9: Curvas de crescimento no experimento 3 dos diferentes tratamentos para <i>I. galbana</i> . _____	43
Figura 10: Taxas de crescimento de <i>I. galbana</i> no experimento 3 _____	44
Figura 11: Assinaturas isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$) de <i>D. glynnii</i> e <i>I. galbana</i> no experimento 1. _____	45
Figura 12: Valores da razão C:N para <i>D. glynnii</i> e <i>I. galbana</i> no experimento 1. _____	46
Figura 13: Gráficos com os valores da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N das culturas de <i>I. galbana</i> do experimento 2. _____	47
Figura 14: Gráficos da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N das culturas de <i>I. galbana</i> do experimento 3. _____	48
Figura 15: Perfil de n-alcenos e suas respectivas concentrações na FSA 100% utilizada nos experimentos. _____	51
Figura 16: densidade média de células no dia da inoculação em relação a concentração de FSA no experimento 1 de <i>I. galbana</i> . _____	62
Figura 17:Valores da razão C:N sem levar em consideração o tratamento E1-FSA-100% de <i>I. galbana</i> _____	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos, massas utilizadas nas soluções estoque e concentrações finais dos nutrientes no meio F/2 (Guillard, 1975). _____	27
Tabela 2: Programação do modo de monitoramento de íons selecionados, com o número de janelas, íons monitorados, íons m/z monitorados e o tempo de início de cada janela. _____	33
Tabela 3: Diluições da FSA e os volumes utilizados de meio de cultivo com e sem FSA para a preparação. _____	34
Tabela 4: Composição de HPAs no meio de cultivo utilizado como 100% da concentração de FSA. Estão listados na tabela os 16 HPAs tidos como prioritários, assim como suas concentrações no meio, número de anéis aromáticos e suas respectivas solubilidades em água _____	38
Tabela 5: Valores das assinaturas médias de $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N de <i>D. glynnii</i> , <i>I. galbana</i> e do óleo. _____	46
Tabela 6: Valores médios da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N nos diferentes tratamentos de <i>I. galbana</i> no experimento 2. _____	47
Tabela 7: Valores médios da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N nos diferentes tratamentos de <i>I. galbana</i> no experimento 3. _____	48
Tabela 8: densidade média de células no dia da inoculação e seus desvios nas diferentes diluições de FSA para o experimento 1 de <i>I. galbana</i> . _____	62

2 INTRODUÇÃO

2.1 O fitoplâncton

As microalgas fotossintetizantes, ou simplesmente o fitoplâncton (origem grega '*phyton*' e '*planktos*'), são seres unicelulares microscópicos que não possuem capacidade natatória suficiente para superar a força dos movimentos das massas de água, estando assim ao sabor das correntes (Chen; Zhang; Guan, 2017; Mai *et al.*, 2021). O oceano possui uma vasta diversidade de microalgas, com estimativas entre 4 e 5 mil espécies de fitoplâncton marinho descritas (Sournia, 1994; Tett; Barton, 1995) distribuídas em diversos filos, como Bacillariophyta, Haptophyta e Dinophyta. Apesar de representarem apenas 1% da biomassa fotossintética da Terra, esses organismos microscópicos são responsáveis por pelo menos 50% da produção primária global (Carvalho; Schulz; Eyre, 2017; Häder; Gao, 2015; Karlusich; Ibarbalz; Bowler, 2020), além de produzirem mais de 50% do oxigênio (O₂) atmosférico, com estimativas que alcançam os 80% (Witman, 2017). Além disso, o fitoplâncton participa dos ciclos biogeoquímicos do carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e silício (Si) como elemento chave na reciclagem dos nutrientes na alça microbiana (Reynolds, 2006). Por meio da fotossíntese, produzem a sua energia química necessária para realização de reações metabólicas, utilizando água e gás carbônico (CO₂), convertendo-os em moléculas orgânicas (e.g. glicose) e O₂ (Johnson, 2016), resultando assim no sequestro do carbono atmosférico (CO₂), em taxas de aproximadamente 1 mg C mg Chl a⁻¹ h⁻¹, que podem ser ainda maiores em ambientes com altas concentrações de nitrato, por exemplo, levando assim a taxas de assimilação de 6 mg C mg Chl a⁻¹ h⁻¹ (Palmer *et al.*, 2013). Em uma escala de tempo maior, estima-se que o fitoplâncton marinho fixe aproximadamente 50 Gt C ano⁻¹ (Falkowski *et al.*, 2000; Field *et al.*, 1998), que se torna disponível para o consumo de organismos dos níveis tróficos superiores, como o zooplâncton e peixes planctonófagos (Karlusich; Ibarbalz; Bowler, 2020).

2.2 Formação do óleo e impactos nos ecossistemas e organismos

Com o aumento populacional e a constante necessidade de obtenção de recursos, alguns ecossistemas marinhos acabam sendo impactados (e.g. descarga de esgotos, remoção de florestas ripárias, sobrepesca e degradação de recursos), assim como os organismos que os habitam (Arruda-Santos *et al.*,

2023; Bi *et al.*, 2023; Blowes *et al.*, 2019; Lobón-Cerviá; Mazzoni; Rezende, 2016; McCann, 2000). Os principais impactos antrópicos identificados que alteram a diversidade e a produtividade fitoplanctônica são as variações de temperatura associadas às mudanças climáticas (Lin *et al.*, 2023), acidificação oceânica (Monsalve; Rafael, 2014), modificação de habitat (Liashenko; Pedchenko; Susloparova, 2020), eutrofização (Lee *et al.*, 2023) e poluição (Lee *et al.*, 2023), seja ela por metais pesados (Ismail; El Zokm, 2023), microplásticos (Hitchcock, 2022) ou outros contaminantes, como o óleo.

Formado ao longo de milhões de anos na crosta terrestre, a partir da decomposição de matéria orgânica derivada principalmente do plâncton marinho e outros organismos microscópicos (Landais, 1997), o petróleo é composto principalmente por hidrocarbonetos, mas também pode conter enxofre, nitrogênio e oxigênio em baixas concentrações (Borazjani *et al.*, 2018). Cada óleo possui a sua assinatura geoquímica específica, servindo como uma “impressão digital” para identificar a bacia sedimentar na qual foi originado, mediante compostos presentes nos lipídios, ceras e no material polimérico das paredes celulares, que acabam sendo incorporados na matriz de querogênio durante a formação do petróleo após a perda de grupos funcionais (e.g. álcool (-OH) e ácido carboxílico (-COOH); Hsu *et al.*, 2003). Tais compostos são chamados de biomarcadores do petróleo. Além deles, os hidrocarbonetos (i.e. compostos formados por carbono e hidrogênio) compõem entre 50% a 98% do óleo, (Medeiros; Caruso Bicego, 2004). Os hidrocarbonetos alifáticos (e.g. n-alcenos, isoalcenos e cicloalcenos) são os mais abundantes no óleo, sendo caracterizados por uma estrutura linear ou ramificada de cadeia aberta (Macaya *et al.*, 2019). Alguns deles podem ser sintetizados por organismos vivos (e.g. *Rhizophora mangle*) ou encontrados no óleo (Neto; Wallner-Kersanach; Patchineelam, 2008; Veiga, 2003; Victório *et al.*, 2025). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos com dois ou mais anéis benzênicos condensados. Os HPAs são introduzidos no ambiente por fontes crônicas (i.e. fontes que lançam constantemente HPAs no ambiente) como a queima de combustíveis fósseis, efluentes domésticos e industriais (Arruda-Santos *et al.*, 2017; de Oliveira Alves *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2012; Gaurav *et al.*, 2021; Lakhani, 2012; Wang *et al.*, 2014), e fontes pontuais, como o derrame

de óleo, que libera grandes quantidades de HPAs no ambiente (Reddy; Quinn, 1999).

Os HPAs possuem alta capacidade de dispersão, além de serem potenciais agentes mutagênicos e carcinogênicos (Black; Maccubbin; Johnston, 1988; Hendricks *et al.*, 1985; Thuy; Loan; Phuong, 2018; Toth, 1980), causando alterações no DNA e câncer no pulmão em adultos e crianças (Sarigiannis *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2012). A agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos definiu 16 HPAs como prioritários devido ao seu risco à saúde humana e dos ambientes, persistência no ambiente e capacidade de bioacumulação (Bojes; Pope, 2007). Os HPAs dissolvidos na água podem causar inibição na fotossíntese de comunidades naturais fitoplanctônicas (Marwood *et al.*, 1999), aumentando a vulnerabilidade de espécies a misturas de HPAs (Oliveira Dos Anjos *et al.*, 2024; Softcheck, 2021) e a estressores ambientais (Müller *et al.*, 2021). Mas além dos impactos de misturas de HPAs, há também estudos que realizaram análises sobre os efeitos de um só composto sobre as microalgas. Por exemplo, o antraceno foi responsável por causar alterações na fluorescência de *Chlamydomonas reinhardtii* (Aksmann; Tukaj, 2008), enquanto fluoreno e fenantreno causaram até 75% de redução do crescimento em *Phaeodactylum tricorutum* (Kusk, 1981).

2.3 O uso do fitoplâncton como um organismo modelo

A descrição de processos biológicos permite a pesquisadores entender desde interações moleculares a dinâmica de ocupação das espécies de um ecossistema (Danish Ahmad *et al.*, 2024; Lamonica; Pagel; Schurr, 2021). Para isso, diversos métodos podem ser empregados (Astashov; Serov; Gudkov, 2023; Krishnamoorthy, 2003; Lejon; Samaey, 2016; Riccardi *et al.*, 2006). Dentre eles, o uso de espécies/organismos modelo, que são espécies escolhidas para realização de experimentos que possam descrever fenômenos biológicos aplicáveis a outras espécies (Ankeny; Leonelli, 2011), como por exemplo a bactéria *Escherichia coli*, o nemátodo *Caenorhabditis elegans* e a planta *Arabidopsis thaliana* (Kimmelman, 2014). Na teoria, todo organismo que serve de material experimental deveria ser considerado um organismo modelo. Porém, na prática, um organismo modelo precisa de alguns requisitos para ser considerado como tal e representar algum processo. Ankeny e Leonelli (2021)

citam alguns fatores que podem descrever um organismo, dividindo-os em características intrínsecas (e.g. facilidade de manutenção em laboratório, altas taxas de fertilidade, ciclo de vida curto e alta variabilidade genética natural) e características atribuídas pelos pesquisadores (e.g. capacidade de se adequar em experimentos de diferentes linhas de pesquisa, quantidade processos que o organismo pode auxiliar a descrever e ampla representação de outras espécies). O grau de utilização de um organismo modelo pode ser definido pelo número de características em que ele se encaixa. As microalgas marinhas são utilizadas para representar diversos processos, possuindo aplicações em estudos desde a genética até a ecologia e biogeoquímica (Irion; Nüsslein-Volhard, 2022; Pradhan; Ki, 2022). Por exemplo, Alfred C. Redfield, autor do modelo de Redfield utilizou a composição de carbono, nitrogênio e fósforo do fitoplâncton marinho para descrever a proporção desses mesmos elementos na água do mar, chegando a uma proporção de $C_{106}:N_{16}:P_1$ (Redfield; Ketchum; Richards, 1963). A proporção média entre esses elementos no oceano é de $C_{104}:N_{16}:P_1$ (Millero, 2013), fazendo com que o modelo proposto por ele seja uma boa aproximação das proporções encontradas nos oceanos, auxiliando os pesquisadores na descrição de processos biogeoquímicos marinhos. Um outro exemplo é a descrição da acumulação do carbono orgânico particulado (COP) presentes no óleo em células de *Durusdinium glynnii* (*D. glynnii*) quando submetidas a diferentes concentrações de HPAs da fração acomodada em água do óleo (FAA), que foi descrito por Müller *et al.*, (2021). Uma outra ideia seria descrever a capacidade de resistir, se adaptar e de se recuperar a contaminantes orgânicos e estressores ambientais, por exemplo

2.4 Resistência e resiliência

Resistência e resiliência são dois termos discutidos na ecologia, no entendimento de como organismos respondem a estressores ambientais em meios aquáticos e terrestres. A resistência se refere a capacidade de um sistema ou organismo não sofrer mudanças significativas durante um estresse em curto prazo (De Keersmaecker *et al.*, 2015). A capacidade de tolerar estressores é uma característica particular de cada célula, podendo ser influenciada pelo meio no qual vive. Por conta da dinâmica do ambiente estuarino e sua constante troca entre água doce e salgada, levando assim a mudanças de salinidade e

concentrações de nutrientes, espécies de fitoplâncton que vivem nele podem desenvolver adaptações específicas para tolerar mudanças diárias nos parâmetros físicos e químicos da água (Firdaus; Pin; Supriatna, 2020). Em contrapartida, espécies de fitoplâncton que vivem em ambientes estáveis (e.g. oceano aberto) em teoria podem ser mais sensíveis, fisiologicamente falando, devido à menor necessidade de adaptação a flutuações nas condições ambientais (Müller; Trull; Hallegraeff, 2015). Porém, essas espécies podem exibir mecanismos de resistência, como metabólitos secundários para evitar predação e adaptações para evitar a limitação de nutrientes. Assim, apesar das células que vivem nas duas condições possuírem adaptações, geralmente se assume que as que vivem no ambiente estuarino são mais resistentes devido à necessidade de adaptação a uma série de condições diárias. A avaliação da resistência de comunidades fitoplanctônicas e monoculturas é bastante comum de ser encontrada na literatura. Estudos envolvendo contaminantes emergentes como fármacos (e.g. aspirina, sulfametoxazol e diclofenaco) indicam que o nível de resistência varia com as espécies, causando redução na diversidade, riqueza e abundância (Akinyemi; Ojuawo, 2024; Duarte *et al.*, 2023).

A resiliência remete à capacidade das populações fitoplanctônicas de se recuperarem após perturbações no meio em que vivem, com base na velocidade e extensão da capacidade de recuperação (Xu; Yu; Guo, 2024). Alguns dos principais pontos para o sucesso da resiliência de uma população são as interações entre as comunidades (e.g. competição entre espécies), mecanismos de adaptação e as taxas de variação genética. A resiliência, diferente da resistência, depende da população. As comunidades fitoplanctônicas são conhecidas por serem mais resilientes do que resistentes, por conta dos seus baixos tempos de geração e rápido crescimento, levando assim a uma maior recombinação genômica, que faz com que mesmo com uma perturbação, as comunidades possam voltar a um estado de equilíbrio (Baert *et al.*, 2016; Pei *et al.*, 2021). Estudos indicam a forte capacidade de resiliência de *Chaetoceros gelidus* em condições de mudança de concentrações de CO₂ e intensidade de luz, por conta da sua alta plasticidade fisiológica (Biswas, 2022). Além disso, um outro exemplo se dá pela manutenção de culturas de simbiontes de corais por longo prazo em temperaturas altas, podendo assim criar uma situação de

evolução assistida. Isso torna as microalgas mais tolerantes a temperatura e faz com que células termotolerantes possam habitar os corais, diminuindo assim a possibilidade de branqueamento (van Oppen *et al.*, 2015). Porém, a resiliência pode diminuir por meio de efeitos potencializados pela junção de estressores ambientais de qualquer caráter (Carpenter; Pace; Wilkinson, 2022). Experimentos realizados por Michaels (1979) compararam duas espécies marinhas, uma alga verde (*Dunaliella tertiolecta*) e uma diatomácea (*Thalassiosira pseudonana*), frente a concentrações de bifenilas policloradas (PCBs), notando-se que as células de *D. tertiolecta* possuem uma maior resistência a esses compostos, que foi avaliada a partir do crescimento e da fotossíntese. Porém, quando submetidas a condições de estresse (e.g. baixa concentração de nutrientes) a capacidade de tolerância diminui, fazendo com que os efeitos gerados pela adição dos PCBs no meio de cultura fossem agravados.

2.5 *Durusdinium glynnii* e sua importância para os recifes de corais

O sucesso evolutivo dos corais tem sido atribuído à simbiose com pequenas células que se alojam nos seus tecidos (Muller-Parker; D'Elia; Cook, 2015; Stat; Carter; Hoegh-Guldberg, 2006) em forma de cisto vegetativo de cor marrom amarelada (Fay; Weber; Lipps, 2009; Stat; Carter; Hoegh-Guldberg, 2006). Evidências coletadas no Mar de Tétis afirmam que essa relação mutualística dos corais e simbiontes surgiu aproximadamente 240 milhões de anos antes do presente (AP), no período Triássico (Stanley; Swart, 1995). O fracionamento isotópico do carbono de 13 espécies de corais escleractíneos (i.e., corais verdadeiros, com capacidade de deposição calcárea) indica semelhança dos corais de águas rasas do Mar de Tétis com os corais construtores de recifes modernos. Do período Triássico até os dias atuais, essa associação foi crucial para o desenvolvimento e adaptação dos recifes, permitindo que os corais utilizassem os produtos fotossintéticos das zooxantelas (i.e. microalgas fotossintéticas que vivem em simbiose com os corais), que vivem em grandes densidades nos seus tecidos ($\sim 10^6 \text{ cm}^{-2}$) e produzem cerca de 90% dos requisitos nutricionais dos corais (Muscatine; Porter, 1977). Zooxantela é um apelido dado comumente para células da família *Symbiodiniaceae*, que é a mais conhecida família de endossimbiontes dinoflagelados (Stat; Carter; Hoegh-

Guldberg, 2006). O surgimento da família *Symbiodiniacea* é datado do período Jurássico, aproximadamente 160 milhões de anos AP (Bouckaert *et al.*, 2014; LaJeunesse *et al.*, 2018), com posterior desenvolvimento e sucesso no período Cretáceo (cerca de 100 milhões de anos AP), que coincide com um dos períodos de maior desenvolvimento e sucesso dos corais escleractíneos (Cretáceo Inferior) (Birkeland, 1997; LaJeunesse *et al.*, 2018). A família *Symbiodiniacea* é bastante diversa, com grande potencial de divergência genômica e diversificação (González-Pech *et al.*, 2021). LaJeunesse *et al.* (2018) realizou uma revisão sistemática desta família e separou o gênero *Symbiodinium* em nove clados distintos, criando nomenclaturas com letras (A-I). Essa divisão foi realizada por meio de aspectos ecológicos e genéticos das células. Posteriormente, os clados foram tendo suas nomenclaturas alteradas (e.g. *Cladocopium*, clado C e *Durusdinium*, clado D). Cada clado é composto por diferentes linhagens com características evolucionárias distintas (Rowan; Powers, 1991). Células dessa família podem viver em simbiose com diversos organismos, desde cnidários, foraminíferos, tridacnas, moluscos e esponjas (Carlos *et al.*, 1999), assumindo uma forma arredondada e imóvel denominada cocóide (Blank; Huss, 1989). Mas, além de estar em simbiose, espécies dessa família podem viver em vida livre, sendo encontradas em águas do Oceano Índico (Yang *et al.*, 2012), Atlântico Sul (Rabelo *et al.*, 2014), Caribe (LaJeunesse *et al.*, 2010) e Oceano Pacífico (Baker *et al.*, 2004; LaJeunesse *et al.*, 2004; Rowan, 1998). Quando em vida livre, possui uma mudança de forma celular, alterando entre a forma imóvel cocóide e uma forma com mobilidade, denominada mastigote (Granados-Cifuentes *et al.*, 2015; Yamashita; Koike, 2013; Zhou *et al.*, 2012). Estudos que focam em corais do Indo-Pacífico indicam que as comunidades das zooxantelas podem variar entre as espécies de corais, e que os clados mais prevalentes são *Cladocopium* e *Durusdinium* (Leveque *et al.*, 2019). Além disso, os clados possuem diferenças na tolerância fotofisiológica e térmica entre eles, podendo haver respostas variáveis nas mesmas condições de temperatura e incidência de luz (Rusnak; Rodriguez-Lanetty; Karsten, 2021). *Durusdinium glynnii* (*D. glynni*, clado D) é geralmente tido como uma espécie naturalmente termotolerante e com alta abundância em corais que vivem em ambientes com flutuações das condições ambientais, ou então após eventos de branqueamento em massa (Quigley *et al.*, 2022; Thinesh *et al.*, 2019). Corais que hospedam essa espécie possuem maior

termotolerância, apesar de possuírem menores taxas de deposição calcárea, ovos menores e diminuição da quantidade de lipídios armazenados (Berkelmans; van Oppen, 2006). Apesar de nos dias de hoje a termotolerância parecer mais vantajosa, corais com baixas taxas de crescimento podem ser considerados fracos competidores por espaço no recife, implicando assim em um maior tempo para atingir a maturidade reprodutiva da espécie (Randall *et al.*, 2020). Apesar disso, é vantajoso para os corais associar-se com zooxantelas, que conferem a eles aquisição de nutrientes, aumento das taxas de calcificação e fotoautotrofia como meio de nutrição (Z.T. *et al.*, 2022).

2.6 *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana é uma microalga da família *Isochrysidaceae* e filo Haptophyta (Parke, 1949). As células dessa espécie geralmente tem 4-6 µm de diâmetro, formato oval ou arredondado e possuem uma coloração marrom amarelada, devido à presença de pigmentos acessórios, como os carotenóides (Wang; Lan, 2018). Essa é uma espécie bem conhecida por indústrias de biorefinaria, devido à alta quantidade de lipídios armazenados para produção de biocombustível. Além disso, podem servir para extração de compostos antioxidantes em alimentos e suplementos alimentares, como o ácido docosahexanoico, fucoxantina e xantofilas (Sun; Wang; Liu, 2019). Indústrias do ramo da aquicultura também utilizam essa espécie como ração para os seus cultivos, devido ao seu benefício nutricional e ótima capacidade de crescimento, que leva a produções em massa dessa espécie (Bustamam *et al.*, 2022; Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020; Thu *et al.*, 2015), podendo servir como alimento para ostras, ameijoas, rotíferos, camarões, larvas de peixe, copépodes e outros organismos filtradores como esponjas e pepinos do mar (Bustamam *et al.*, 2022; Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2024; Madhu *et al.*, 2018). *Isochrysis galbana* pode habitar águas costeiras quentes e ricas em nutrientes, em condições de variação de salinidade, podendo habitar estuários e áreas adjacentes marinhas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Alkhamis; Qin, 2013). Por ser uma microalga de fácil manutenção em laboratório, pode ser cultivada em modo fototrófico, heterotrófico e mixotrófico, além de aceitar diversos tipos de meio de cultura e uma alta variação de salinidade, com tolerância entre 5 e 60 (Alkhamis; Qin, 2013; Boussiba *et al.*,

1988; Camacho-Rodríguez *et al.*, 2021; Mishra; Prasad; Mishra, 2019). A reprodução dessa espécie é por meio de fissão binária, onde uma célula se divide em duas células geneticamente idênticas. A eficiência reprodutiva pode ser influenciada por fatores como a intensidade de luz, salinidade e composição de nutrientes na água (Hotos; Bekiari, 2023).

2.7 Derrames de óleo no Brasil: O caso de 2019

Derrames de óleo ocasionados por atividades humanas podem causar efeitos devastadores em ecossistemas marinhos, na biodiversidade e em comunidades costeiras. O Brasil possui um litoral extenso (7637 km) que abriga grandes cidades, várias áreas de conservação e comunidades de pescadores artesanais. No Brasil, os primeiros registros dos principais derrames de óleo aconteceram em meados dos anos 1960 a 70, coincidindo com o período de desenvolvimento industrial do país (Zacharias *et al.*, 2024). No total, desde 1960 até os dias atuais, houveram 40 eventos principais de derrame de óleo no Brasil. No início a principal causa eram acidentes com navios petroleiros e posteriormente casos de rompimento de tubulação e acidentes na transferência do óleo se tornaram mais comuns (Zacharias *et al.*, 2024). Em 1996, após um derrame de óleo na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, foi instaurada a lei do óleo (lei Nº 9.966), que estabelece medidas preventivas, regulatórias e monitoramento da poluição no território nacional. Além disso, esse desastre foi um grande precursor da criação de leis nacionais de proteção marinha para os ambientes (Ortiz Neto; Costa, 2007; Zacharias *et al.*, 2024).

Décadas depois, no ano de 2019, outro desastre de grandes proporções trouxe à tona a necessidade de um reforço nas políticas de proteção ambiental. No dia 30 de agosto de 2019, o início do aparecimento de pelotas de óleo nas praias de Tambaba e Jacumã, no município de Conde, na Paraíba, foi documentado. Cerca de duas semanas depois, seis estados brasileiros possuíam registros de óleo em suas praias, levando mais três semanas para atingir todos os estados do Nordeste. O desastre foi nomeado o maior em extensão no Atlântico sudoeste, chegando a atingir 3000 km de costa, com um total entre 5 a 12,500 toneladas de óleo (Silva *et al.*, 2022; Zacharias *et al.*, 2024). Como as manchas de óleo depositadas nas praias eram uma fonte de poluição visual, afastando assim os turistas, os próprios residentes e comerciantes locais, junto a organizações não

governamentais, iniciaram mutirões de limpeza das praias, contando com doações de equipamentos de proteção individual, reflexo da lentidão de resposta do governo a chegada das manchas de óleo no litoral brasileiro. Além do esforço braçal nas praias, cientistas trabalhavam em modelos de dispersão para tentar entender a proveniência do óleo (Lemos *et al.*, 2024). Com o tempo, foi nomeado um poluidor suspeito, o *Bouboulina*, um navio tanque grego que transportava óleo da Venezuela para a Malásia (Escobar, 2019). O óleo derramado chegou ao Brasil por meio do ramo sul da corrente Sul Equatorial, que se bifurca na costa brasileira e acabou distribuindo o óleo nas direções norte e sul (Zacharias *et al.*, 2021). Análises dos biomarcadores do petróleo foram realizadas, indicando que, além do óleo derramado pelo navio, ainda havia pequenas pelotas de outro óleo que não era relacionado com o evento de 2019, provavelmente advindo de derrames não descritos ou outras fontes (Santos *et al.*, 2023), que atingiram 44 áreas de proteção ambiental marinhas do país (Nunes *et al.*, 2023). O óleo que chegou ao Brasil possuía um aspecto mais pastoso, com aparência sólida e densa, e era visivelmente limpo devido ao seu transporte em subsuperfície (de Oliveira *et al.*, 2020; Lourenço *et al.*, 2020). Ele causou diversos impactos ambientais e socioeconômicos. Por exemplo, houve uma redução de cerca de 50% no consumo de pescado, impactando diretamente a economia de comunidades de pescadores artesanais. Cerca de 870 mil pessoas que vivem de pesca e turismo foram impactadas (Araújo; Ramalho; Melo, 2020; Magris; Giarrizzo, 2020). Diversos ambientes foram danificados e impactados, assim como houve mudança na estrutura de comunidades bem estabelecidas e possíveis mudanças nas teias tróficas locais, e isso tem sido bem documentado ao longo dos anos (Bontempo Filho *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2023; Gusmao *et al.*, 2021; Magris; Giarrizzo, 2020; Müller *et al.*, 2024; Soares *et al.*, 2021; Viana *et al.*, 2022).

Assim, neste trabalho, foi realizada uma avaliação das capacidades de tolerância a contaminação por HPAs de duas espécies modelo: uma de ambiente oligotrófico (*D. glynnii*) e uma de ambiente eutrófico (*I. galbana*).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar a capacidade de tolerância de uma espécie de ambiente oligotrófico (*Durusdinium glynnii*) e uma espécie de ambiente eutrófico (*Isochrysis galbana*) durante e após contaminação por óleo.

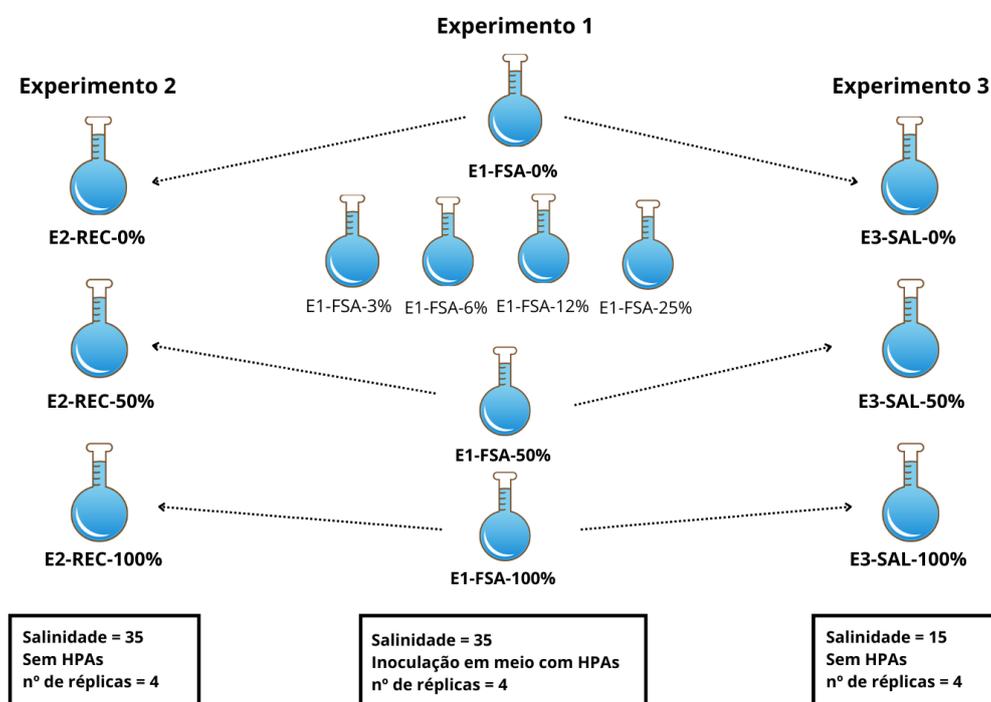
3.2 Objetivos específicos

- Determinar e comparar a concentração de HPAs que induz uma redução de 50% (ErC50) da taxa de crescimento em *Isochrysis galbana*. e *Durusdinium glynnii*;
- Determinar o tempo (i.e. gerações) de recuperação dos impactos causados pelo óleo em ambas as espécies;
- Determinar e comparar a tolerância das duas espécies a estresse ambiental sob condições de contaminação por óleo.

4 METODOLOGIA

Para atingir os objetivos supracitados, o trabalho foi dividido em quatro experimentos para cada espécie de microalga. O experimento 1 (Exp. 1) foi o de contaminação, onde as microalgas foram submetidas a um gradiente de concentrações dos compostos presentes na fração solúvel do óleo na água (FSA). O experimento 2 (Exp. 2) foi realizado para avaliar a capacidade de recuperação das microalgas, sendo executado simultaneamente com o experimento 3 (Exp. 3) de avaliação da capacidade de tolerância a estressores logo após a contaminação por HPAs. Os tratamentos foram nomeados com códigos que incluem o número do experimento (E1, E2 ou E3), assim como a legenda do experimento (e.g. FSA, REC e SAL) e a diluição na qual as células está/estavam inseridas (0%, 50%; Fig. 1). Apesar do código das amostras expressarem valores de diluição (e.g. 50% e 100%), é importante ressaltar que não há HPAs nos meios de cultivo dos experimentos 2 e 3, e essa nomenclatura se dá por que a cultura E2-REC-50% foi originada a partir da cultura E1-FSA-50%, por exemplo, sendo o mesmo válido para o tratamento de 100%.

Figura 1: Esquema com detalhes dos três experimentos realizados neste trabalho. Abaixo dos balões estão os códigos das amostras, compostos pelo número do experimento (e.g. E1), legenda do experimento (e.g. FSA) e a diluição da cultura (e.g. 0%). As setas indicam as culturas do experimento 1 que serviram como inóculo para as culturas do experimento 2 e 3, e os retângulos embaixo indicam número de réplicas, as concentrações de salinidade de cada experimento e se há ou não HPAs nos meios de cultura.



Fonte: o autor (2025)

4.1 Esterilização da vidraria para cultivo

Para que não houvesse contaminação biológica nos cultivos, as vidrarias passaram por um rigoroso processo de limpeza e esterilização. Primeiro, foi realizada uma lavagem com água da torneira e microdetergente Extran MA 01 alcalino para remoção de gorduras, óleos e contaminantes biológicos. Em seguida houve a imersão das vidrarias em um banho de água sanitária (Clorito, Grupo sabará, Brasil) diluído a 20% com água destilada por 24h, para desinfecção, por conta da sua propriedade oxidativa e amplo espectro de eficácia contra microrganismos (Fast *et al.*, 2017). As vidrarias foram retiradas do banho e enxaguadas com água destilada a fim de retirar qualquer resíduo da água sanitária. Após isso, houve uma etapa de lavagem com uma solução de 1,2 M de ácido clorídrico (HCl) para remoção dos resquícios de biofilmes de microalgas que se incrustam nas paredes das vidrarias. Após isso, houve um enxágue de no mínimo cinco vezes com água destilada. Já secas, as vidrarias foram

embaladas de forma que o seu interior não entrasse em contato com o exterior. Feito isso, as vidrarias foram autoclavadas (Modelo AV- 18, marca Phoenix, Brasil) por 20 minutos em uma temperatura de aproximadamente 120 °C e em uma pressão de 1,2 bar (1,18 atm).

4.2 Cultivo fototrófico da espécie

Para manutenção das microalgas e realização dos experimentos, foi montado um sistema de estantes com lâmpadas frias do tipo diodo emissor de luz (LED, 9W, 6000 K) posicionadas na parte de trás da estante e fixadas nas paredes. Os experimentos foram realizados na sala de cultivo do Laboratório de Fitoplâncton, localizado no Museu de Oceanografia Prof. Petrônio Alves Coelho – UFPE. A sala de realização do experimento possui fluxo de pessoas controlado, preservando assim a integridade dos experimentos e diminuindo as trocas de calor. O fluxo fotônico utilizado foi de 115 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mensurado com o auxílio de um lux\u00f4metro, tendo seu valor convertido utilizando uma constante para o tipo de lâmpada, com valor de 0,018 (l\u00e2mpada LED 6000 K). O fotoper\u00edodo utilizado foi de 12:12 h (claro:escuro). A temperatura da sala foi mantida constante em 25 ± 1 °C utilizando um ar condicionado do tipo split. Para fornecer os nutrientes necess\u00e1rios para o crescimento das esp\u00e9cies, foi utilizado um meio de cultura semi-definido preparado com \u00e1gua do mar natural enriquecida de acordo com o meio F/2 descrito por Guillard (1975), com os respectivos macronutrientes, metais tra\u00e7o, vitaminas e as suas concentra\u00e7\u00f5es elucidadas na Tabela 1. Para evitar a limita\u00e7\u00e3o de nutrientes, as culturas foram mantidas sempre em crescimento exponencial, sendo regularmente dilu\u00eddas com meio de cultura rec\u00e9m preparado, evitando assim limita\u00e7\u00f5es e altera\u00e7\u00f5es fisiol\u00f3gicas associadas.

Tabela 1: Compostos, massas utilizadas nas soluções estoque e concentrações finais dos nutrientes no meio F/2 (Guillard, 1975).

	Composto	Concentração da solução estoque (g 100 mL⁻¹)	Concentração final (µM)
Macronutrientes	NaNO ₃	7,50	882,40
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,50	36,23
Metais traço	Na ₂ EDTA ⁺	4,36/900 mL	11,7
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	3,15/900 mL	11,7
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,98	0,03
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,20	0,07
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,00	0,04
	MnCl ₂ · 7H ₂ O	18,0	0,91
	Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0,63	0,02
Vitaminas	Tiamina HCl	0,10	0,29
	Biotina	5 x 10 ⁻⁴	2,05 x 10 ⁻³
	Cobalamina	5 x 10 ⁻⁴	3,69 x 10 ⁻⁴

Fonte: Adaptado de Guillard; Ryther, (1962).

Para preparar o meio de cultivo, em um litro de água do mar, adicionou-se 1 ml das soluções estoque de NaNO₃ e NaH₂PO₄ · H₂O, 0,5 ml da solução contendo os metais traços e 0,5 ml da solução contendo as vitaminas. Além disso, foi adicionado 2 ml de uma solução tampão (Tris(hidroximetil)aminometano, CAS: 77-86-1), que tem como função manter o pH na faixa entre 7 e 9. Vale ressaltar que o composto que contém silicato não foi adicionado, visto que este é um nutriente não essencial para o crescimento das duas espécies. A esterilização do meio de cultivo foi realizada mediante um método físico (filtração). Para isso, o meio foi pré-filtrado utilizando filtros com

0,7 µm de retenção nominal (GF/F, Whatman), eliminando assim partículas e organismos > 0,7 µm. Após isso, a água foi novamente filtrada em um filtro de politetrafluoretileno (PTFE ou Teflon) hidrofílico de porosidade 0,22 µm (responsável pela remoção de bactérias) com o auxílio de uma bomba a vácuo. É comum a esterilização de meios de cultivo utilizando métodos físicos como o aquecimento e pressurização em autoclaves. Porém, este tipo de esterilização acarreta em mudanças na composição do carbono inorgânico dissolvido (CID) na água do mar, fazendo com que haja a diminuição do crescimento dos organismos cultivados (Andersson *et al.*, 2018). É importante salientar que os nutrientes foram esterilizados duas vezes por filtração estéril, visto que as soluções estoque dos compostos são submetidas à filtração em filtros de seringa de 0,22 µm antes de serem misturadas com a água do mar que será filtrada. A água do mar utilizada no meio de cultivo foi coletada em expedições oceanográficas (fevereiro de 2024, a bordo do N/Oc. Ciências do Mar IV) em regiões próximas à quebra da plataforma continental. Ela vem tendo os seus parâmetros (i.e. salinidade e pH_{NBS}) monitorados e ajustados desde então. Caso houvesse mudança nos parâmetros, antes de se realizar o enriquecimento com o meio F/2, era realizado o ajuste dos valores. A salinidade e o pH_{NBS} da água do mar foram mantidos em 35 e 8,0-8,1 para *D. glynnii* e *I. galbana*, respectivamente. Caso necessário, o pH_{NBS} da água era ajustado com a adição ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos 0,1 M. Em torno de duas semanas antes da realização dos experimentos, as espécies foram transferidas para recipientes maiores, garantindo assim um maior volume das culturas que serviriam como a cultura inóculo nas diferentes réplicas.

4.3 Preparação do meio f/2 contaminado

A norma 15469 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), publicada em 2021, especifica a metodologia de preparação da fração acomodada em água do óleo (FAA) e da fração solúvel em água do óleo (FSA). Essas técnicas de preparo são diferenciadas apenas pela etapa de filtração da solução, que ocorre apenas no preparo da FSA (ABNT, 2021). Para o preparo da solução, foi utilizada uma proporção de 1:9, sendo uma parte de óleo e 9 partes de água do mar. No caso deste trabalho, aproximadamente 200 g de óleo para 1,8 litros de água do mar foram utilizados. As pelotas de óleo foram fatiadas para que a área superficial de contato do óleo com a água fosse maior durante o

procedimento de preparação da FSA. O sistema de agitação foi montado em béqueres de 2 litros previamente limpos e muflados. Após montado e realizada a adição da água e do óleo, o sistema foi mantido sob agitação constante em uma temperatura de 25 ± 1 °C no escuro, em um equipamento do tipo *jar test* (Quimis, modelo Q-305D26), também conhecido como ensaio de floculação ou teste de reatores estáticos. O número de rotações por minuto foi mantido em 50, de forma que o vórtice formado não atingisse um tamanho maior que 25% da coluna de água do recipiente. Após 24h de agitação, o equipamento foi desligado e o sistema foi mantido em repouso durante 1 h para que a retirada apenas da fração aquosa se tornasse mais fácil. Com a solução em repouso, as pelotas de óleo foram retiradas cuidadosamente, restando assim apenas a fração líquida e as partículas menores. Posteriormente, a solução foi submetida à filtração por meio de um sistema de filtração com bomba a vácuo isenta de óleo (Tecnal, modelo TE-0581). A primeira filtração foi realizada em filtros do tipo GF/F (Whatman, microfibras de vidro, 0,7 µm de retenção nominal, 47 mm de diâmetro da membrana). A segunda filtração foi realizada em membranas de PTFE com 0,22 µm de porosidade. Em cada experimento foram preparados 4 litros de FSA, divididos em 2 béqueres de 2 litros. O conteúdo dos dois béqueres foi misturado em um único recipiente de 4 litros, sendo que 1 litro dessa solução foi reservado para extração e análise de compostos orgânicos.

4.4 Extração dos hidrocarbonetos dissolvidos na água, purificação do extrato orgânico e controle de qualidade

A vidraria utilizada na análise dos compostos orgânicos foi limpa de acordo com o protocolo descrito por (Moura; Yogui, 2012). O material foi imerso em uma solução de 5% de microdetergente (Extran MA 01 alcalino) por 24 horas. Após isso, foi feito um primeiro enxágue com água da torneira e depois com água destilada. Vidrarias comuns foram secas na estufa durante 24 h em temperaturas de 60 °C, enquanto vidrarias volumétricas foram secas em temperatura ambiente, evitando assim dilatação do material. Depois de secas, as vidrarias comuns foram embaladas em papel alumínio e mufladas a 450 °C durante 4 horas. Antes de ser usada na extração dos compostos orgânicos do óleo, a vidraria foi lavada duas vezes com três solventes orgânicos: metanol, diclorometano e n-hexano (nesta ordem).

Para realizar a extração dos hidrocarbonetos dissolvidos ou dispersos na água do mar, foi utilizado um método descrito por (Arruda-Santos *et al.*, 2017). Um total de 20 mL de n-hexano (grau pesticida) foram adicionados em um litro de água do mar dentro de uma garrafa âmbar, junto com 100 µL dos padrões internos (PI) para HPAs (fluoreno-D₁₀ e benzo(a)antraceno-D₁₂) (AccuStandard, 1000 ng mL⁻¹). Já para os hidrocarbonetos alifáticos foi adicionado 100 µL da solução de padrão interno contendo 1-hexadeceno ([C₁₆H₃₂] = 800 µg mL⁻¹) e 1-eicoseno ([C₂₀H₄₀] = 700 µg mL⁻¹). Após isso, a extração foi feita por meio de uma intensa agitação manual de cerca de 2 minutos, seguido de um repouso de 5 minutos para que a fração água fosse separada do solvente, gerando assim um extrato hexânico. Tal extrato foi separado da água do mar por um sistema de separação líquido-líquido (funil de separação), sendo reservado em um balão de fundo chato. Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi adicionado ao extrato para a remoção de traços de água. Após a separação, o extrato foi concentrado em cerca de 1 mL utilizando um sistema de evaporação rotativa a vácuo para a remoção do solvente. Para eliminação de possíveis interferentes que pudessem prejudicar a análise cromatográfica, foi realizada a purificação do extrato mediante cromatografia por adsorção em coluna, utilizando uma coluna cromatográfica de vidro previamente lavada sequencialmente com metanol, diclorometano e n-hexano. A fase estacionária foi composta por sílica gel e alumina (ambas 5% desativadas) imersas em n-hexano. Na₂SO₄ foi adicionado no topo da coluna para remoção de resíduos de água da amostra. A coluna cromatográfica foi eluída com 10 ml de n-hexano (para recolhimento da fração com os hidrocarbonetos alifáticos) seguido por 15 ml de uma solução contendo n-hexano e diclorometano (7:3, v:v) (para recolhimento da fração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos). As duas frações do extrato foram novamente concentradas seguindo o método supracitado. A concentração final dos extratos foi feita em um fluxo suave de nitrogênio (FlexiVap, Glas-Col, modelo 109AYH-2412). Por fim, foram adicionados 100 µL de soluções contendo padrões internos cromatográficos (= padrões de recuperação) de HPAs (AccuStandard, 1000 ng mL⁻¹) e hidrocarbonetos alifáticos (1-tetradeceno ([C₁₄H₂₈] = 700 µg mL⁻¹). A recuperação média dos padrões internos cromatográficos foi de 72,5 ± 14,24%, que é considerada aceitável segundo Lauenstein; Cantillo (1998).

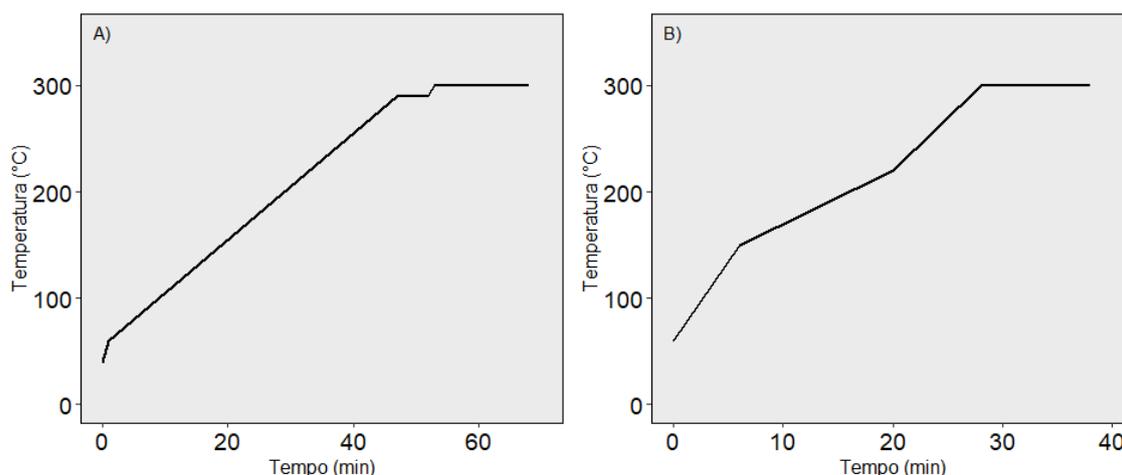
4.5 Parâmetros do sistema cromatográfico para análise de hidrocarbonetos

A análise dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada em um sistema de cromatografia a gás (7820A GC System, Agilent Technologies, Estados Unidos) equipado com um detector de ionização em chama (*flame ionization detector*, FID) e uma coluna cromatográfica modelo DB-5ms (Agilent J&W, Estados Unidos) cujas dimensões são 25 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura da fase estacionária de fenilmetilarilenopolisiloxano. Ao todo, 1 µl do extrato foi injetado em modo de divisão de fluxo (*split* 3:1) a partir de um amostrador automático. A temperatura do injetor foi programada para 300 °C e pressão de 13,029 psi. O gás de arraste utilizado foi o hélio (grau de pureza: 99,999%), com um fluxo constante de 1,4 ml min⁻¹ na coluna. Os gases de sustentação da chama do detector foram o hidrogênio (grau de pureza: 99,999%) e o ar sintético (grau de pureza: 99,999%), com fluxos de 40 ml min⁻¹ e 400 ml min⁻¹, respectivamente. A temperatura do detector foi mantida em 320 °C, e o gás auxiliar utilizado foi o nitrogênio (grau de pureza: 99,999%), mantido sob um fluxo constante de 25 ml min⁻¹. A programação de temperatura do forno (Fig. 1a) se deu da seguinte forma: temperatura inicial de 40 °C, aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 60 °C, aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 290 °C (mantido isotérmico por 5 minutos) e seguido por um aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C (temperatura mantida por 15 min), totalizando um tempo de corrida de 68 minutos.

A análise dos hidrocarbonetos aromáticos foi realizada no mesmo cromatógrafo a gás (7820A GC System, Agilent Technologies, Estados Unidos) acoplado a um espectômetro de massas (Agilent Technologies 5975 series MSD). O forno do cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar modelo HP-5ms com 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária (fenilmetilarilenopolisiloxano). Seguindo o método descrito por Santos (2017), 1 µl do extrato foi injetado por meio de um amostrador automático. A injeção foi feita sem divisão de fluxo (*splitless*) e a temperatura do injetor foi mantida em 300 °C. A pressão do gás de arraste na entrada na coluna foi 8,2 psi. O gás de arraste utilizado foi o hélio (grau de pureza: 99,999%), com um fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹ dentro da coluna capilar. O fluxo do gás de arraste na purga do septo foi de 0,7 ml min⁻¹, enquanto o fluxo do mesmo gás na purga do divisor foi de 20 mL min⁻¹. Esta foi aberta

depois de 2 minutos do início da corrida, tempo mais do que suficiente para passar um volume do gás de arraste correspondente a 1,5 vezes o volume do liner (Agilent 5181-3316). A programação da rampa de temperatura do forno (Fig. 1b) foi definida da seguinte forma: temperatura inicial de 60 °C, aquecimento de 15 °C min⁻¹ até 150 °C, seguido de um aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 220 °C, tendo por fim um aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C (mantida por 10 minutos), totalizando um tempo de corrida de 38 minutos.

Figura 2: Rampas de temperatura do forno do cromatógrafo para análise de hidrocarbonetos alifáticos (a) e aromáticos (b).



Fonte: o autor (2025)

A interface entre o cromatógrafo a gás e o espectrômetro de massas foi mantida a 300 °C, enquanto a fonte de íons (do tipo ionização por elétrons) permaneceu a 230 °C. A energia de elétrons da fonte de íons foi de 70 eV, e a corrente de emissão do filamento foi de 34,6 µA. A temperatura do analisador de massas (do tipo quadrupolo) foi mantida em 150 °C e ele foi operado no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, *selected ion monitoring*). Quatro m/z relevantes no espectro de massas de cada analito foi monitorado durante a corrida, sendo um quantitativo e três qualitativos. No total, 112 íons m/z foram monitorados durante a análise dos HPAs, sendo divididos em 10 janelas conforme a eluição dos analitos na coluna capilar do cromatógrafo. O tempo de permanência escaneando cada m/z foi de 10 milissegundos (Tabela 2).

Tabela 2: Programação do modo de monitoramento de íons selecionados, com o número de janelas, íons monitorados, íons m/z monitorados e o tempo de início de cada janela.

Janela	Nº de íons monitorados	Íons m/z monitorados	Tempo de início (min)
1	12	108, 126, 127, 128, 129, 134, 136, 137, 139, 141, 142, 143	5
2	13	141, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 160, 162, 163, 164, 170	9.2
3	12	155, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 174, 175, 176, 177, 184	12
4	12	165, 169, 176, 177, 178, 179, 180, 184, 186, 188, 189, 194	13.6
5	11	179, 191, 192, 193, 194, 200, 201, 202, 203, 206, 208	17.3
6	12	200, 201, 202, 203, 205, 215, 216, 219, 220, 229, 230, 234	20.9
7	14	226, 227, 228, 229, 230, 236, 238, 239, 240, 241, 242, 244, 256, 257	24
8	10	241, 242, 250, 251, 252, 253, 255, 256, 257, 270	27
9	10	250, 251, 252, 253, 255, 260, 263, 264, 265, 270	27.8
10	6	274, 275, 276, 277, 278, 279	29.2

Fonte: o autor (2025)

4.6 Experimentos de contaminação, recuperação e estresse

Os experimentos 1, 2 e 3 foram realizados em quadruplicatas. No exp. 1, as microalgas foram inoculadas em balões volumétricos de borossilicato de 50 mL, em sete diluições com diferentes concentrações de HPAs, de forma que o volume final fosse sempre de 50 mL (Tabela 3).

Tabela 3: Diluições da FSA e os volumes utilizados de meio de cultivo com e sem FSA para a preparação.

Amostra	Meio f/2 (mL)	Meio com FSA (mL)
0 %	50	0
3%	48.5	1.5
6%	47	3
12%	44	6
25%	37.5	12.5
50 %	25	25
100 %	0	50

Fonte: O autor (2025)

Antes da inoculação, a densidade populacional da cultura inóculo foi determinada, a fim de realizar-se a padronização do número de células inicial em cada réplica. Para isso, foi calculado o volume de inóculo necessário para que houvesse uma densidade inicial de 400 células ml⁻¹ em cada cultura, por meio da expressão:

$$V_i = \frac{N_F * V_F}{N_i} \quad (1)$$

Onde V_i é o volume em ml a ser adicionado do inóculo, N_F é a densidade populacional final desejada em cada cultura (nesse caso, 400 células ml⁻¹), V_F é o volume final da cultura experimental (50 ml) e N_i é a densidade populacional do inóculo.

Antes de se realizar o monitoramento do número de células, as culturas foram mantidas durante 4 dias no laboratório com homogeneização diária, fazendo assim com que as células se aclimatassem com o novo ambiente no qual foram inseridas, a chamada *Lag phase*. Após isso, a densidade populacional foi monitorada mediante contagem diária de células, durante 5 a 7

dias, dependendo do crescimento e densidade populacional. Para realizar a contagem, as culturas eram homogeneizadas e cerca de 2 mL eram retirados, sendo posteriormente fixados com uma solução de lugol 2%. Após fixadas, as células foram contadas com o auxílio de um analisador de partículas em fluxo do tipo *FlowCam* (Modelo VS2 com seringa, Estados Unidos), equipado com uma célula de fluxo do tipo FC 80-7FV (80 μm x 700 μm x 0,16 cm). Após a contagem, os dados foram filtrados no próprio equipamento (Software *Visual Spreadsheet*), eliminando assim possíveis partículas que modificassem a densidade populacional. Obtendo o número de células em cada dia de contagem, pode-se calcular a taxa de crescimento por meio de um método de regressão exponencial (Oliveira, 2007). No experimento 2, as células foram transferidas do meio de cultivo contaminado para um meio de cultivo não contaminado. Os tratamentos utilizados como inóculo para o experimento 2 foram os tratamentos E1-FSA-0%, E1-FSA-50% e E1-FSA-100%. No exp. 3, as espécies foram transferidas para meios de cultivo com valores de salinidade não utilizadas durante o seu crescimento em condições ótimas. Tanto *D. glynnii* quanto *I. galbana*, espécies marinhas, foram submetidas a concentrações de salinidade de 15..

4.7 Parâmetros de análise do flow cam

O flowcam é um equipamento que combina técnicas de fotografia, microscopia, citometria de fluxo e detecção de fluorescência de forma integrada por meio de seus componentes óticos (e.g. objetivas e espelhos), eletrônicos (e.g. câmera e laser) e de fluidos (e.g. seringa e célula de fluxo), tornando a análise e processamento das propriedades de partículas mais simples e rápida, assim como a identificação das mesmas (Owen *et al.*, 2022). Neste estudo, foi utilizado um flowcam modelo VS2 equipado com seringa de 1ml (C70 *syringe*), câmera (Sony SX90) e uma objetiva de 10x. Amostras de monocultura fixadas com lugol 2% foram analisadas sem concentração, diluição ou pré-filtração. O flowcam foi operado no modo *autoimage*. As imagens do fluido em movimento foram capturadas em um intervalo definido de 13 frames por segundo (FPS). Um volume de cerca de 0,600 ml de amostra foi analisado em um tempo máximo de 3 minutos e um fluxo de 0,200 ml min⁻¹. O processamento das imagens foi realizado de modo semiautomático no software *Visual Spreadsheet* (versão 3.2.3). O máximo possível de partículas de sujeira ou não pertencentes ao objetivo do estudo foram selecionadas, fazendo com que o software identificasse

as propriedades morfológicas daquelas partículas e filtrasse as imagens tomando como base os valores das partículas selecionadas, retirando todas as similares do grupo de imagens. Após isso, as imagens retiradas foram conferidas, garantindo assim que nenhuma célula fosse removida do conjunto de dados.

4.8 Análise isotópica celular e razão C:N

Para realização da análise da composição isotópica celular e da razão elementar C:N, inicialmente, as culturas foram filtradas com o auxílio de uma bomba à vácuo em filtros de microfibras de vidro com porosidade de 0,6 µm (UNIFIL, modelo GF-3, 25mm). A pressão da bomba foi mantida em aproximadamente 200 mbar, evitando o rompimento das células. Caso o filtro estivesse com pouco material, as culturas continuavam sendo filtradas.

O material necessário (i.e. filtros e tubos de ensaio) para a análise foi previamente muflado a 450 °C durante 4 horas para retirada do carbono orgânico. Os filtros com biomassa foram colocados na estufa a 60 °C durante 24 h. Finalizado esse procedimento, foi feita a descarbonatação dos filtros, utilizando o método proposto por Lorrain *et al.* (2003), que utiliza vapores de ácido clorídrico concentrado (12 M) durante 4 h em um dessecador. Após a descarbonatação, os filtros foram levados à estufa por 24 h a 60 °C, a fim de retirar o excesso do ácido. Seguindo o método proposto por Yogui; Schwamborn, (2019), o filtro de 25 mm foi partido ao meio, e cada metade foi embalada em um disco de estanho (Elemental Microanalysis, Inglaterra). Já embalados, a composição elementar e isotópica dos filtros foi feita por meio de um analisador elementar (EuroVector, modelo EA3000 Single) acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage). A temperatura da fornalha de combustão das amostras no analisador elementar foi mantida em 980 °C. Um reator com 18 mm de diâmetro foi preenchido da base para o topo com óxido de cobalto envelopado com prata (20 mm), cobre reduzido (70 mm) e óxido de cromo (55 mm). O hélio (pureza: 99,999 %) foi utilizado como gás de arraste, sendo mantido em um fluxo constante de 93 mL min⁻¹. Os gases gerados na combustão foram separados em uma coluna cromatográfica empacotada, sendo transferidos em seguida para o espectrômetro de massas de razão isotópica. Foram feitas análises de branco de filtro, branco de disco e do material de referência certificado, que nesse caso foi a microalga *Spirulina*. A

razão elementar entre carbono e nitrogênio foi calculada de acordo com o método descrito por Hedges e Stern (1984), seguindo a equação:

$$\frac{C}{N} = \frac{(CO)}{(NT)} * 1,167 \quad (2)$$

Onde CO é a porcentagem de carbono orgânico na amostra e NT é a porcentagem de nitrogênio orgânico na amostra. A constante tem como função corrigir os percentuais de carbono e nitrogênio da amostra para uma base estequiométrica, utilizando a massa molar do carbono e do nitrogênio.

Os resultados da assinatura isotópica foram expressos na notação δ , sendo calculados pela diferença da razão isotópica entre a amostra e o padrão de referência internacional, como descrito por Fry (2006):

$$\delta E = \left[\left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} \right) - 1 \right] * 1000 \quad (3)$$

Onde δE é o isótopo do elemento expresso, $R_{amostra}$ é a razão entre as quantidades do isótopo pesado e leve na amostra e $R_{padrão}$ é a razão entre as quantidades do isótopo pesado e o leve no padrão de referência internacional (Vienna Peedee Belemnite (VPDB) para o $\delta^{13}C$ e o ar atmosférico para o $\delta^{15}N$).

4.9 Cálculo do tempo de geração

Foi realizado o cálculo do tempo de geração (G_2), também chamado de tempo de duplicação, que corresponde ao tempo necessário para a cultura duplicar totalmente a sua densidade, formando assim uma nova geração (Oliveira, 2007; Wood; Everroad; Wingard, 2005). O G_2 pode ser calculado da seguinte forma:

$$G_2 = \frac{0,6931}{r} \quad (4)$$

Onde r equivale a taxa de crescimento exponencial intrínseca da cultura.

4.10 Análise estatística e apresentação dos dados

Foi utilizado um teste de significância de regressão linear para determinar se a relação entre dois parâmetros foi significativa ou não. O teste foi realizado no

software GraphPad, e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Os resultados com uma regressão significativa foram apresentados com a equação e a linha de tendência da regressão linear, assim como o intervalo de confiança de 95%. Caso a regressão não seja significativa, apenas os valores dos dados são apresentados no gráfico.

5 RESULTADOS

A análise de HPAs nas FSAs utilizadas para as duas espécies gerou um somatório total de $536,26 \text{ ng L}^{-1}$ e $263,76 \text{ ng L}^{-1}$ dos 16 HPAs tidos como prioritários para a FSA utilizada no experimento 1 de *D. glynnii* e *I. galbana*, respectivamente. Na tabela abaixo (Tabela 4), estão descritos os 16 HPAs prioritários, assim como seus respectivos números de anéis, concentrações no primeiro experimento das duas espécies e a solubilidade em água de cada um.

Tabela 4: Composição de HPAs no meio de cultivo utilizado como 100% da concentração de FSA. Estão listados na tabela os 16 HPAs tidos como prioritários, assim como suas concentrações no meio, número de anéis aromáticos e suas respectivas solubilidades em água. nd = Não detectado e <LQ = detectado em concentrações menores que o limite de quantificação do equipamento.

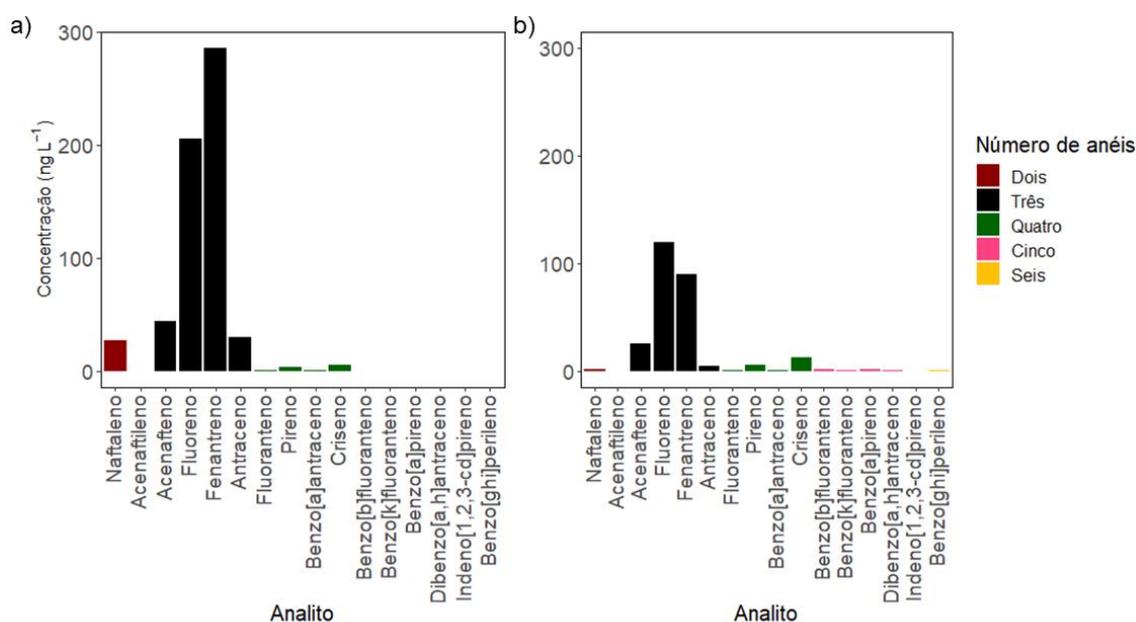
Analito	Nº de anéis	FSA <i>D. glynnii</i> concentração (ng L^{-1})	FSA <i>I. galbana</i> concentração (ng L^{-1})	Solubilidade em água a 25°C (mg L^{-1})
Naftaleno	Dois	26,78	2,23	31,6
Acenaftileno	Três	nd	nd	16
Acenafteno	Três	43,83	25,45	4,5
Fluoreno	Três	205,31	120,07	1,8
Fenantreno	Três	285,84	89,78	13
Antraceno	Três	29,83	4,57	0,07
Fluoranteno	Quatro	1,09	<LQ	0,24
Pireno	Quatro	3,55	5,39	0,14
Benzo[a]antraceno	Quatro	<LQ	<LQ	0,01
Criseno	Quatro	5,81	13,12	0,003
Benzo[b]fluoranteno	Cinco	nd	1,71	<0,001
Benzo[k]fluoranteno	Cinco	nd	<LQ	<0,001
Benzo[a]pireno	Cinco	nd	1,44	<0,001
Dibenzo[a,h]antraceno	Cinco	nd	<LQ	<0,001
Indeno[1,2,3-cd]pireno	Seis	nd	Nd	<0,001
Benzo[ghi]perileno	Seis	nd	<LQ	<0,001
Total		536,26	263,76	

Fonte: o autor (2025)

Os compostos predominantes e com concentrações mais representativas nas amostras foram os mais leves, com três anéis aromáticos (Figura 3), como

o acenafteno, fluoreno e fenantreno. Na FSA utilizada no cultivo de *D. glynnii*, o fenantreno foi o analito com maior concentração, com valor de 285,84 ngL⁻¹ representando 53,30% da concentração total dos 16 HPAs prioritários na amostra. Já para a FSA utilizada no cultivo de *I. galbana*, o composto com maior concentração foi o fluoreno, com 120,07 ng L⁻¹, representando 45,52% da concentração total. As concentrações dos HPAs e suas frações alquiladas são apresentadas no anexo 1.

Figura 3: Perfil de HPAs e seus respectivos números de anéis nas FSAs utilizadas nos experimentos 1 de *D. glynnii* (a) e *I. galbana* (b).

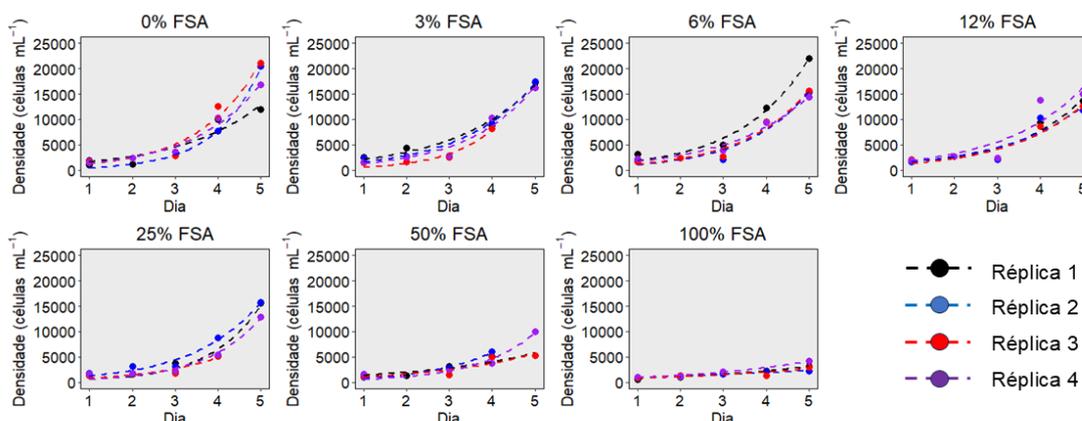


Fonte: o autor (2025)

5.1 Experimento 1

Durante o experimento 1 de *D. glynnii*, as réplicas apresentaram crescimentos semelhantes, e se mantiveram em crescimento exponencial durante o tempo de amostragem, representado pela Figura 4, apresentada abaixo.

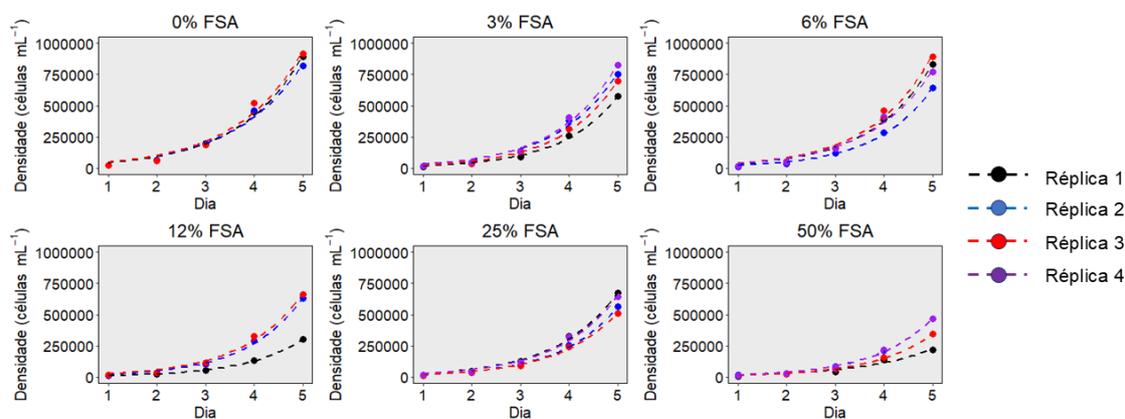
Figura 4: Curvas de crescimento no experimento 1 das diferentes diluições de FSA para *D. glynnii*.



Fonte: o autor (2025)

Assim como no experimento com *D. glynnii*, as curvas de crescimento de *I. galbana* não destoaram entre as réplicas (Figura 5), e as culturas também se mantiveram no crescimento exponencial durante o período de amostragem do experimento 1.

Figura 5: Curvas de crescimento no experimento 1 das diferentes diluições de FSA para *I. galbana*.



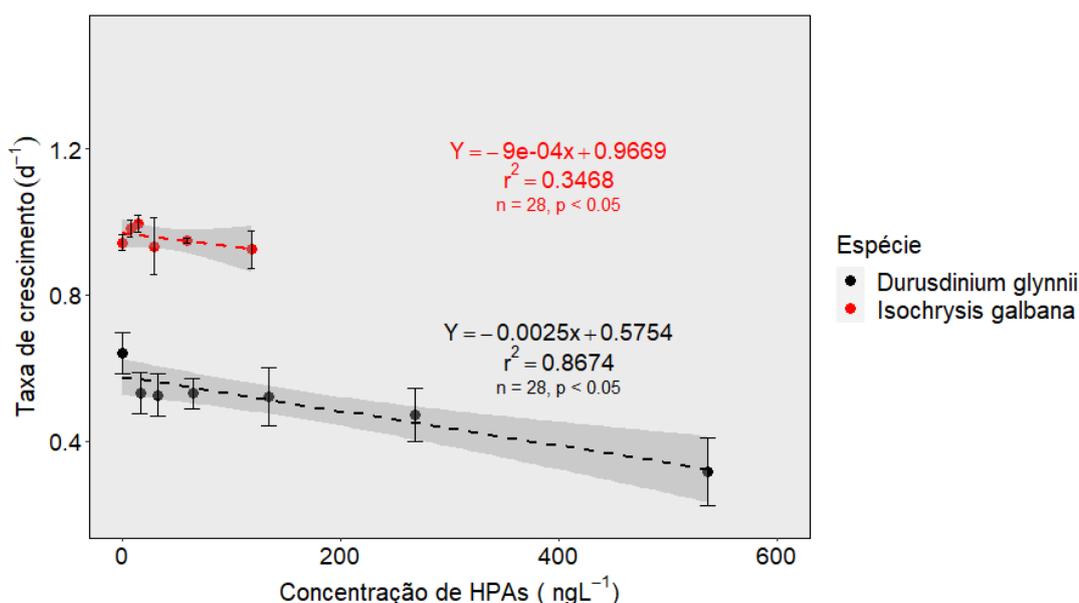
Fonte: o autor (2025)

A concentração total de HPAs no exp. 1 de *D. glynnii* causou um efeito negativo significativo no crescimento, confirmado pelo teste de regressão linear ($p < 0,05$), com uma redução da taxa de crescimento de $0,640 \pm 0,06d^{-1}$ para $0,315 \pm 0,09 d^{-1}$ (Figura 6), caracterizando uma redução de 50,80% do crescimento nas culturas afetadas. Assim, a concentração de HPAs que diminui

a taxa de crescimento de *D. glynnii* em 50% (ErC₅₀) é de aproximadamente 536,26 ngL⁻¹.

O aumento da concentração de HPAs não causou um efeito negativo significativo ($p > 0.05$) nas taxas de crescimento de *I. galbana* (Figura 6). A taxa de crescimento média no tratamento controle (E1-FSA-0%) foi de $0,942 \pm 0.02d^{-1}$, enquanto a taxa de crescimento média no tratamento E1-FSA-50% foi de $0,924 \pm 0,05d^{-1}$. Os valores das taxas de crescimento nas diluições de E1-FSA-3%, 6% e 25% foram maiores que as do controle (E1-FSA-0%), com valores de $0.980 \pm 0.02d^{-1}$, $0.993 \pm 0,02d^{-1}$ e $0,948 \pm 0,01d^{-1}$, respectivamente. A cultura inoculada no tratamento E1-FSA-100% FSA apresentou precipitação orgânica de partículas com tamanho suficiente para entupir a célula de fluxo do flowcam ($> 100 \mu m$), fazendo com que sua quantificação fosse pausada. A precipitação foi acompanhada de uma aparente ausência/lentidão no crescimento, visto que as outras culturas rapidamente apresentaram coloração advinda do crescimento das microalgas. Entretanto, as culturas não foram descartadas, e serviram de inóculo para os tratamentos E2-REC-100% e E3-SAL-100%.

Figura 6: Taxas de crescimento de *D. glynnii* e *I. galbana* em resposta ao aumento da concentração de HPAs. A cor vermelha indica os valores de crescimento de *I. galbana*, enquanto a preta indica o crescimento de *D. glynnii*. As linhas tracejadas vermelha e preta indicam as regressões lineares de crescimento das espécies, enquanto o sombreado cinza representa o intervalo de confiança de 95%.

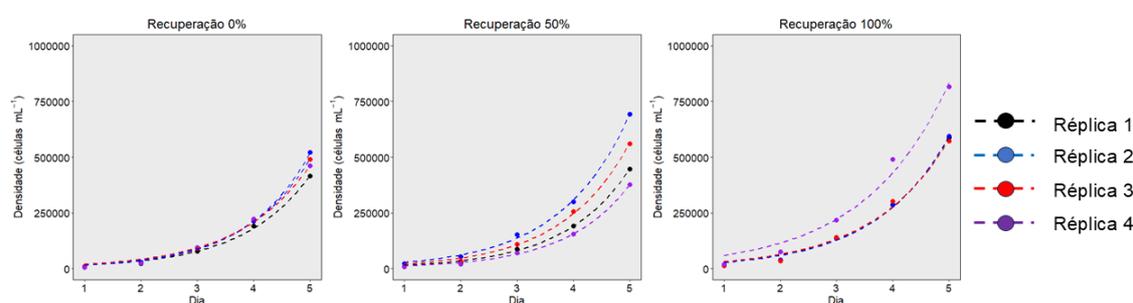


Fonte: o autor (2025)

5.2 Experimento 2

Os experimentos 2 e 3 foram realizados apenas com a espécie *I. galbana*, pois as cepas de *D. glynnii* sofreram contaminação biológica (discutido no tópico 6.1.2). Apesar da concentração de FSA não surtir efeito nas células de *I. galbana* (i.e. ausência diminuição no crescimento), os tratamentos E2-REC-50% e E2-REC-100% foram submetidos a meio de cultura não contaminado após o exp. 1, mesmo com a não quantificação do tratamento E1-FSA-100%, no experimento anterior. As culturas e suas réplicas possuíram curvas de crescimento semelhantes, indicando que não há diferença no crescimento resultante da concentração de FSA em que foram submetidas anteriormente.

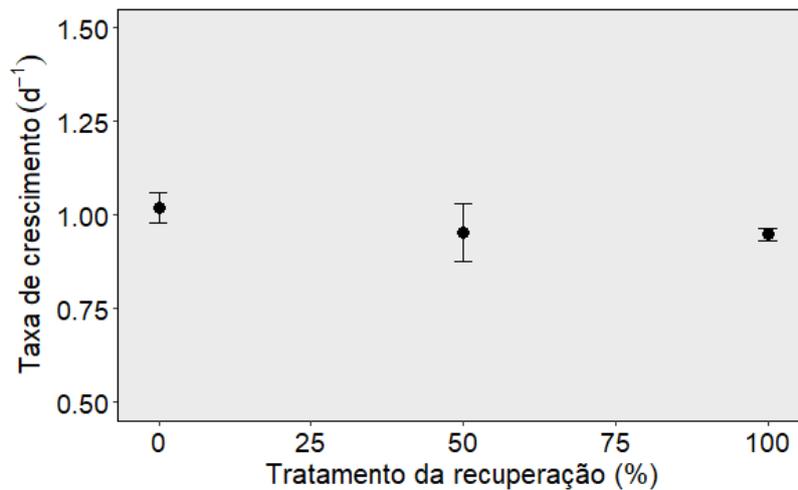
Figura 7: Curvas de crescimento no experimento 2 dos diferentes tratamentos para *I. galbana*.



Fonte: o autor (2025)

Não houve diferença significativa no crescimento entre os tratamentos, confirmado pelo teste de regressão linear (Figura 8; $p > 0,05$) no experimento 2, no qual as células foram reinoculadas em meio não contaminado. O valor da taxa de crescimento no controle (E2-REC-0%) foi $1,020 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$, enquanto nos tratamentos E2-REC-50% e E2-REC-100%, as taxas foram $0,994 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ e $0,9737 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, indicando assim que não houveram efeitos prolongados dos HPAs nas células.

Figura 8: Taxas de crescimento de *I. galbana* no experimento 2.

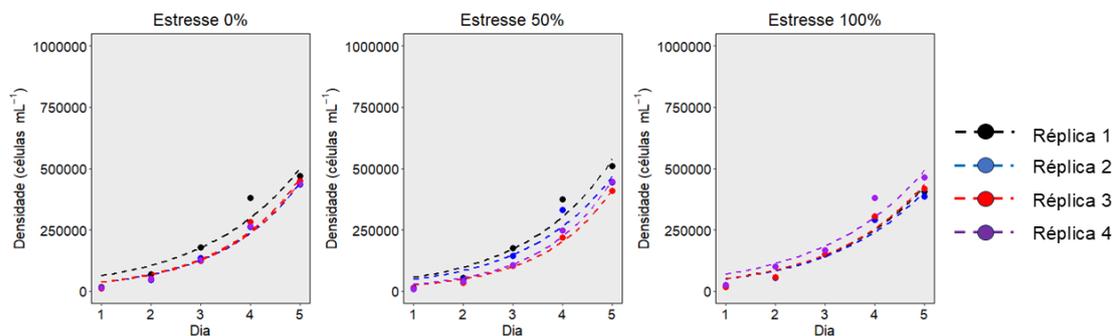


Fonte: o autor (2025)

5.3 Experimento 3

As células inoculadas em um meio de cultivo contendo um parâmetro estressor ($S = 15$) possuíram curvas de crescimento similares e com menor inclinação em relação aos outros experimentos (Figura 9).

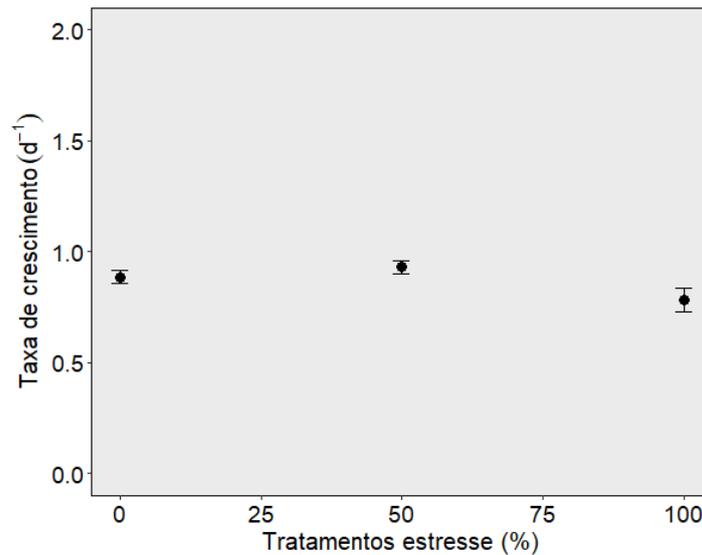
Figura 9: Curvas de crescimento no experimento 3 dos diferentes tratamentos para *I. galbana*.



Fonte: o autor (2025)

Apesar da salinidade ser um potencial estressor nessas concentrações para a espécie, o crescimento se manteve em valores similares com os do experimento 2, quando as células foram submetidas a salinidade 35. A regressão linear do crescimento foi não significativa (Figura 10), não havendo dessa forma diferença no crescimento dos tratamentos. A maior taxa de crescimento média foi a do tratamento E3-SAL-50%, com valor de $0,931 \pm 0,03d^{-1}$, enquanto os tratamentos E3-SAL-0% e E3-SAL-100% tiveram médias de $0,886 \pm 0,03d^{-1}$ e $0,783 \pm 0,05d^{-1}$, respectivamente.

Figura 10: Taxas de crescimento de *I. galbana* no experimento 3



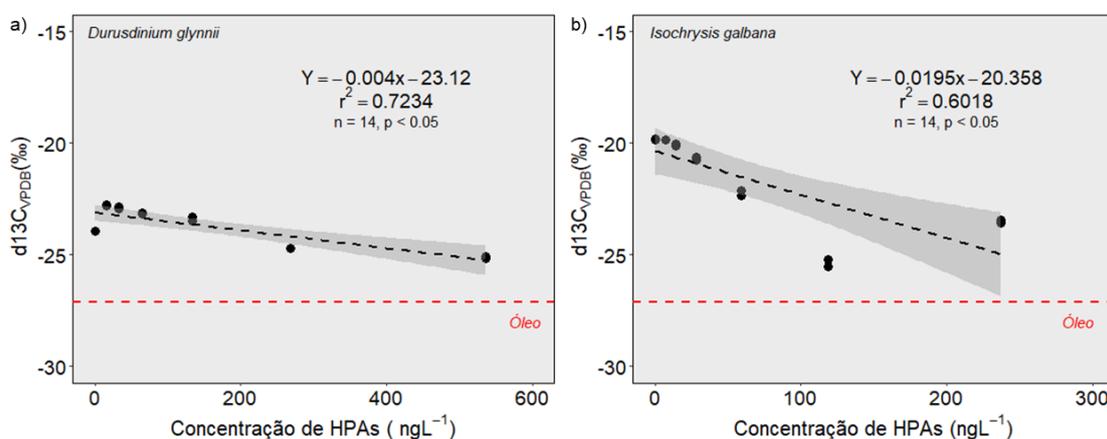
Fonte: o autor (2025)

5.4 Assinatura isotópica de $\delta^{13}C$ e razão C:N

5.4.1 Experimento 1

O resultado da análise isotópica indicou um empobrecimento na assinatura do $\delta^{13}C$ das duas espécies, quando comparado com o tratamento controle. Os valores da assinatura das duas partes do filtro de cada tratamento estão ilustrados na figura abaixo (Figura 11). Em resumo, pode-se notar que não houve uma discrepância entre as duas assinaturas de cada tratamento, indicada pela sobreposição dos pontos no gráfico. As regressões lineares entre o $\delta^{13}C$ e a porcentagem de FSA das duas espécies foram significantes ($p < 0.05$), resultando em mudança significativa na assinatura isotópica das espécies, que se tornam mais empobrecidas, aproximando-se dos valores da assinatura do óleo ($-27,13 \text{ ‰}$). Os valores médios da assinatura do $\delta^{13}C$ e da razão C:N das duas espécies no experimento 1 estão descritos na tabela 5.

Figura 11: Assinaturas isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$) de *D. glynnii* (a) e *I. galbana* (b). A linha preta tracejada representa a regressão linear da assinatura média de $\delta^{13}\text{C}$ nas culturas. A linha vermelha tracejada representa a assinatura isotópica média de $\delta^{13}\text{C}$ do óleo utilizado na preparação das FSAs.



Fonte: o autor (2025)

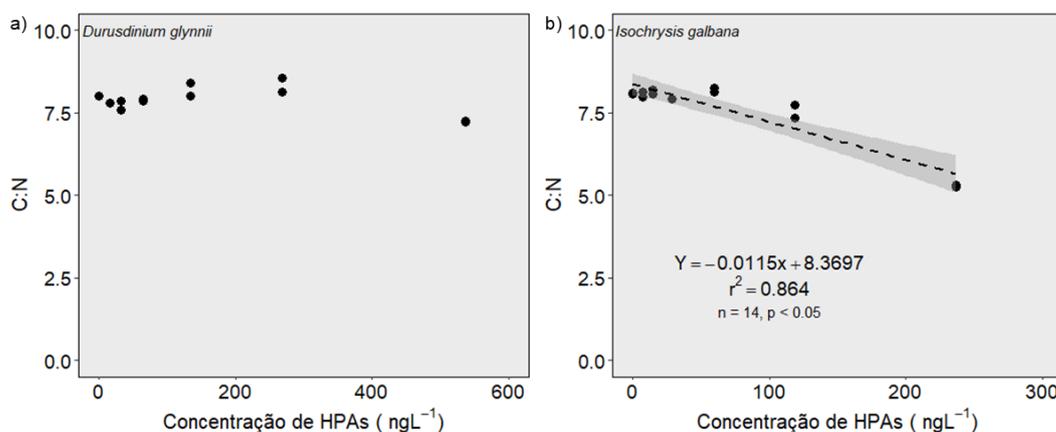
A assinatura média das duas espécies diminuiu com o aumento da concentração da FSA. No caso de *D. glynnii*, a assinatura no tratamento controle (E1-FSA-0%) foi de -23,94‰, enquanto a assinatura no tratamento E1-FSA-100% foi de -25,17‰. Os valores da razão C:N de *D. glynnii* se mantiveram similares durante o exp. 1, não havendo uma diminuição ou aumento significativo, levando em conta o teste de regressão da razão C:N média em relação a diluição da FSA. Os dados de C:N de *D. glynnii* são apresentados na Figura 12, junto com a curva de *I. galbana*. A assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ de *I. galbana* teve uma diminuição gradativa da diluição controle até o tratamento com máxima concentração de HPAs (Figura 11), com um valor médio de -19.83‰ no tratamento E1-FSA-0% e -25,37‰ no tratamento E1-FSA-50%. O tratamento E1-FSA-100% possuiu um valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ foi mais enriquecido, chegando a -23,53‰. Entre as diluições de E-FSA-0% e E1-FSA-50%, os valores médios de C:N permaneceram similares, variando entre 8,14 e 7,54. Porém, o tratamento E1-FSA-100% possuiu um valor médio de 5,28, fazendo com que o teste de regressão do C:N de *I. galbana* tivesse uma diferença significativa. A reta da regressão dos valores de C:N estão ilustrados na Figura 12.

Tabela 5: Valores das assinaturas médias de $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N de *D. glynnii*, *I. galbana* e do óleo para o experimento 1.

Espécie	Diluição FSA (%)	(C:N)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)
<i>Durusdinium glynnii</i>	0	8,00	-23,94
	3	7,79	-22,80
	6	7,71	-22,91
	12	7,88	-23,14
	25	8,21	-23,40
	50	8,33	-24,71
	100	7,23	-25,12
<i>Isochrysis galbana</i>	0	8,08	-19,83
	3	8,05	-19,84
	6	8,14	-20,08
	12	7,90	-20,68
	25	8,20	-22,23
	50	7,54	-25,37
	100	5,28	-23,53
Óleo			-27,13

Fonte: o autor (2025)

Figura 12: Valores da razão C:N para *D. glynnii* (a) e *I. galbana* (b). A linha tracejada preta representa a regressão linear entre a razão C:N e a concentração de HPAs, e o sombreado cinza representa o intervalo de confiança de 95%.



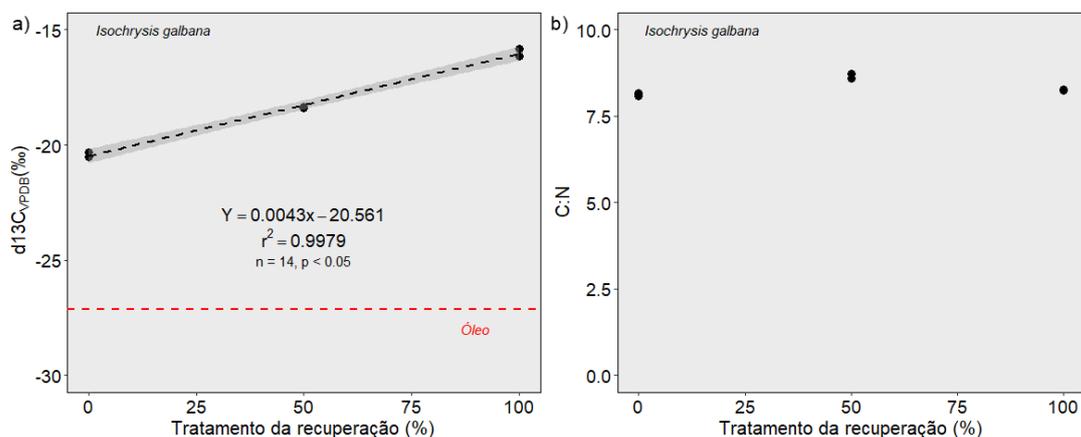
Fonte: o autor (2025)

5.4.1 Experimento 2

Após a contaminação, no final do experimento 2, foi realizada outra análise isotópica nas culturas de *I. galbana*. Passados 7 dias após o fim do experimento 1, a mudança na assinatura do $\delta^{13}\text{C}$ sofreu alterações, passando a ter agora valores mais enriquecidos e menos próximos a assinatura do óleo. O aumento da assinatura isotópica foi significativo ($p < 0,05$), e os valores das duas assinaturas de cada filtro não destoaram muito (Figura 13a). Os valores médios

de $\delta^{13}\text{C}$ para os tratamentos E2-REC-0%, E2-REC-50% e E2-REC-100% foram de -20,42 ‰, -18,37‰ e -15,98‰, respectivamente. Assim, pode-se notar que há um enriquecimento no valor de $\delta^{13}\text{C}$ em todas as culturas. Os valores médios da razão C:N se mantiveram entre 8,14 e 8,65, sendo o maior valor encontrado no tratamento E2-REC-50%, e o menor no E2-REC-0% (Figura 13b). A regressão entre a razão C:N e o tratamento não foi significativa ($p > 0,05$). Os valores médios da razão C:N e da assinatura do $\delta^{13}\text{C}$ estão descritos na tabela 6

Figura 13: Gráficos com os valores da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ das culturas de *I. galbana* do experimento 2 (a) e da razão C:N das das culturas (b). A linha tracejada preta representa a regressão linear entre a assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e a concentração de HPAs, A linha vermelha tracejada representa a assinatura isotópica média de $\delta^{13}\text{C}$ do óleo utilizado na preparação das FSAs, e o sombreado cinza representa o intervalo de confiança de 95%.



Fonte: o autor (2025)

Tabela 6: Valores médios da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N nos diferentes tratamentos de *I. galbana* no experimento 2.

Tratamento	(C/N) _a	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)
E2-REC-0%	8,14	-20,42
E2-REC-50%	8,65	-18,37
E2-REC-100%	8,27	-15,98

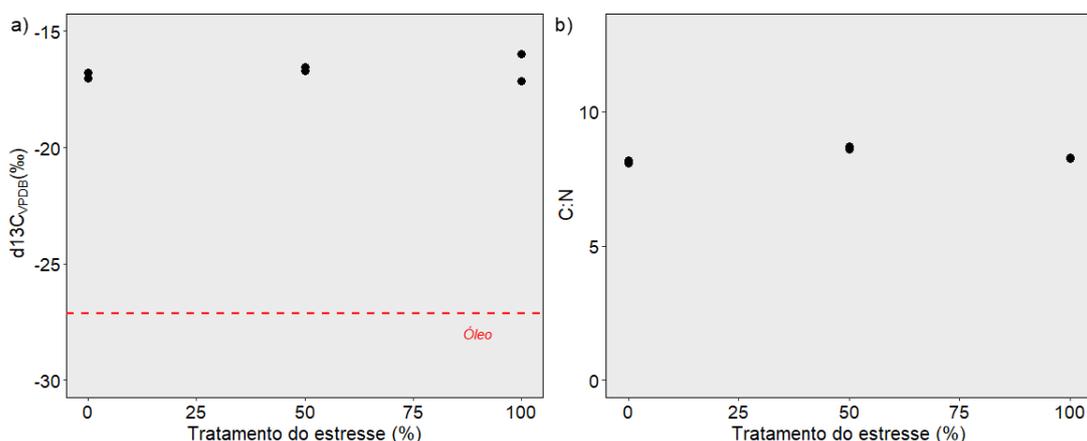
Fonte: o autor (2025).

5.4.2 Experimento 3

No experimento 3, os tratamentos E3-SAL-0% e E3-SAL-50% de *I. galbana* tiveram valores da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ próximos. As duas assinaturas do filtro do tratamento E3-SAL-100% tiveram valores um pouco diferentes (Figura 14a). A primeira análise resultou em uma assinatura de -15,97 ‰, enquanto a segunda análise gerou uma assinatura de -17,13‰. Em relação as médias das assinaturas, houve um leve enriquecimento com o aumento da

concentração do tratamento. Porém, esse aumento não foi significativo quando aplicado o teste da regressão ($p > 0.05$). Os valores médios da assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ para os tratamentos de E3-SAL-0%, 50% e 100% foram de $-16,91\text{‰}$, $-16,64\text{‰}$ e $-16,55\text{‰}$, respectivamente. A regressão dos valores médios da razão C:N também não foi significativa, visto que a razão se manteve com valores similares entre os tratamentos (Figura 14b). O maior valor da razão C:N foi de 8,55 no tratamento de 100%, enquanto o menor foi de 8,37 para o tratamento de 50%. O tratamento de 0% teve uma razão C:N intermediária, com valor de 8,43 (Tabela 7). Os dados detalhados com os valores das duas análises em cada filtro estão descritos na tabela no material suplementar.

Figura 14: Gráficos da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ das culturas de *I. galbana* do experimento 3 (a) e da razão C:N das das culturas (b). A linha vermelha tracejada representa a assinatura isotópica média de $\delta^{13}\text{C}$ do óleo utilizado na preparação das FSAs.



Fonte: o autor (2025)

Tabela 7: Valores médios da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ e da razão C:N nos diferentes tratamentos de *I. galbana* no experimento 3.

Tratamento	(C/N) _a	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)
E2-SAL-0%	8,43	-16,91
E2-SAL-50%	8,37	-16,64
E2-SAL-100	8,55	-16,55

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão metodológica

Em experimentos de laboratório, seja com culturas fitoplanctônicas ou não, obstáculos podem ser contornados por alterações metodológicas ou realização de pequenos experimentos para elucidação do causador dos empecilhos. Quando se trata de experimentos suscetíveis à contaminação

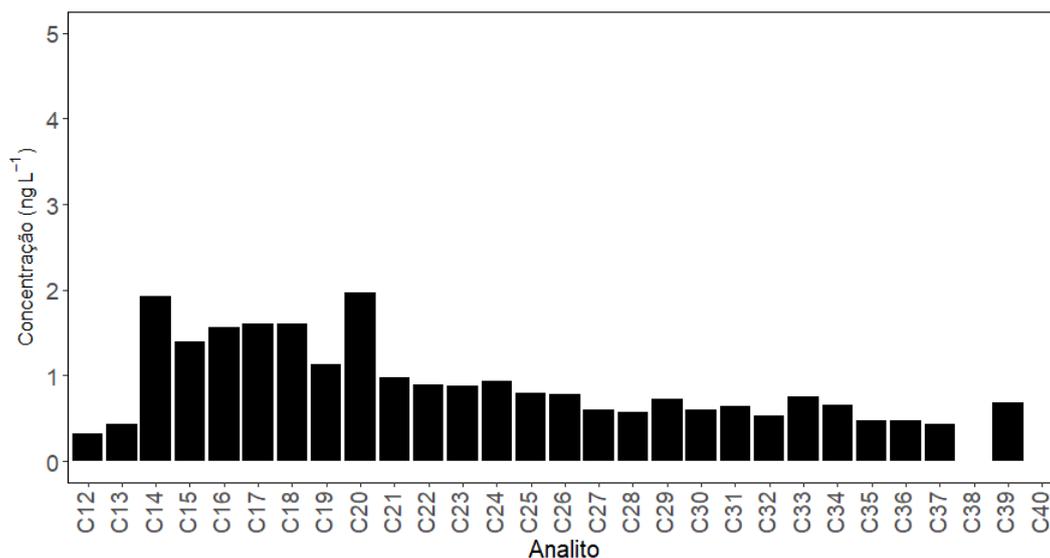
biológica e química, muitas vezes o verdadeiro problema reside em detalhes sutis que são esquecidos ou não cumpridos durante a realização do protocolo. Porém, obstáculos inesperados são capazes de causar benefícios futuros em experimentos por meio de mudanças metodológicas. Diante disso, há a necessidade da flexibilização metodológica na ciência, a capacidade de pequenas adaptações em métodos já consolidados, permitindo assim a realização de experimentos mais eficazes e confiáveis, gerando melhores resultados. Durante a realização dos experimentos deste estudo, houveram alguns imprevistos que fizeram com que novas etapas fossem adicionadas no método utilizado. Nesta primeira parte, serão discutidos os obstáculos encontrados durante a realização do estudo, as implicações de cada um para os experimentos e as estratégias adotadas para contorná-los.

6.1.1 Precipitação de parafinas nas culturas fitoplanctônicas

Durante o início dos experimentos, no laboratório de cultivo do Museu de Oceanografia da UFPE, houveram danos no sistema de climatização da sala de cultivo, o que acabou temporariamente impossibilitando a realização dos mesmos. Diante disso, as cepas de microalgas foram transferidas para uma câmara de germinação a 25 °C, porém de tamanho insuficiente para a realização dos experimentos propostos. Assim, a câmara teve como função apenas a manutenção das culturas. Com o passar do tempo, as cepas das espécies foram transferidas para o Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LPAVI), na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde as culturas eram mantidas em temperaturas em torno de 20 ± 2 °C. No geral, os fatores limitantes da produtividade fitoplanctônica são a disponibilidade de nutrientes, quantidade de radiação luminosa e temperatura (Cunha; Calijuri, 2011; Fernández-González *et al.*, 2022). Assim, o primeiro impacto dessa mudança de temperatura se daria no metabolismo dos indivíduos, visto que há uma diminuição dos processos metabólicos de espécies de fitoplâncton tropical com a diminuição da temperatura (Soulié *et al.*, 2022). Porém, como as culturas submetidas à contaminação são comparadas com o controle, não haveria problema na realização do experimento, pois todos os tratamentos ainda estariam sob as mesmas condições de cultivo. Com o andar do experimento na UFRPE, percebeu-se a precipitação de partículas brancas e de aparência dura. Análises

visuais não constataram a presença de microorganismos além das microalgas, fazendo com que a suspeita fosse direcionada a precipitação de parafinas nas culturas. As parafinas presentes no óleo, que são precipitadas em forma de macro cristais, consistem de compostos com cadeias carbônicas longas variando entre 15 e 75 átomos de carbono (Kök; Varfolomeev; Nurgaliev, 2018). Cada óleo possui um perfil específico de compostos (e.g. proporção de aromáticos, alifáticos e asfaltenos), fazendo com que suas propriedades (i.e. densidade) sejam diferentes (Correa Pabón; Souza Filho, 2019; Douglas *et al.*, 2016). Dentre essas propriedades, pode-se citar o ponto de névoa (*cloud point* ou *wax appearance temperature*), que é a temperatura na qual os cristais de parafina começam a precipitar, fazendo com que o fluido tenha um aspecto de névoa (Lois; Keating; Gupta, 2003; Verma; Sharma; Dwivedi, 2016). Quando há uma diminuição na temperatura, hidrocarbonetos mais pesados podem precipitar em forma de cristais de parafina (Lira-Galeana; Hammami, 2000), processo bem documentado e estudado na indústria petrolífera, por conta do entupimento de tubulações, filtros de combustível e injetores de equipamentos (Jones, 2015; Kiyangi *et al.*, 2022; Lira-Galeana; Hammami, 2000). A concentração de cristais de parafinas precipitados aparentemente apresentou uma relação direta com a diluição, fazendo com que a turbidez da água aumentasse com o aumento da concentração da FSA nos tratamentos. A presença desses cristais impossibilitou a continuidade do experimento por dois motivos. O primeiro é que a passagem da amostra pela célula de fluxo do flowcam causaria seu entupimento (tamanho máximo 100 μm , ou 0,01 cm) e danos ao equipamento, impossibilitando assim a realização da análise de outras amostras. O segundo motivo é que há um aumento na turbidez porque o fluido passa a ter um aspecto de névoa, diminuindo assim a penetração da luz e conseqüentemente reduzindo de maneira desigual as taxas fotossintéticas das culturas, assim como a produção de biomassa (Cloern, 1987; Ge *et al.*, 2020; Nunes *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019). A fração dos hidrocarbonetos alifáticos foi analisada no tratamento E1-FSA-100% de *D. glynnii*, e o seu resultado está representado na Figura 15. As concentrações individuais e a total dos n-alcanos estão representados em uma tabela no Anexo 1.

Figura 15: Perfil de n-alcenos e suas respectivas concentrações na FSA 100% utilizada nos experimentos.



Fonte: o autor (2025)

A análise da fração dos hidrocarbonetos alifáticos gerou uma concentração total de 24.36 ng L⁻¹. Dentre os 29 compostos analisados, apenas dois não foram detectados na amostra, o octatriacontano (C₃₈) e o tetracontano (C₄₀). Pode-se notar no perfil apresentado (Figura 15) que compostos que possuem cadeias carbônicas menores apresentaram uma maior contribuição para a concentração total dos alifáticos na amostra, sendo o eicosano (C₂₀) e o tetradecano (C₁₄) os compostos com maiores concentrações, com 1.97 ng L⁻¹ e 1,93 ng L⁻¹, respectivamente. Isso é reflexo da menor solubilidade em água de compostos com menor cadeia carbônica (i.e. mais leves) em relação a compostos com cadeia carbônica maior (i.e. mais pesados). No anexo 1 há uma tabela com as solubilidades dos compostos discutidos neste trabalho.

Apesar da concentração total dos n-alcenos ser baixa comparado a concentrações encontradas em tubulações e ambientes estuarinos (Colombo *et al.*, 1989; Kiyingi *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024), é importante ressaltar que a solubilidade desses compostos é muito menor do que a dos HPAs, por exemplo. Compostos com cadeias que contém 18 moléculas de carbono ou mais, geralmente possuem solubilidade muito baixa, com valores menores que 0.01 mg L⁻¹ a 25 °C (Kiyingi *et al.*, 2022; Tarantino *et al.*, 2016), enquanto alguns HPAs possuem valores de solubilidade em torno de 31 mg L⁻¹, como o naftaleno

(Pearlman; Yalkowsky; Banerjee, 1984). Ademais, a temperatura na qual os experimentos foram realizados é menor do que temperaturas descritas para pontos de névoa de outros óleos, que podem chegar a 37,4 °C (Tarantino *et al.*, 2016). O perfil de n-alcenos no óleo utilizado nos experimentos também é rico n-alcenos com mais de 20 carbonos, que são mais comumente precipitados (Kiyingi *et al.*, 2022; Lourenço *et al.*, 2020).

Para evitar a precipitação das parafinas, foi realizado um experimento em uma câmara de germinação, no qual a FSA concentrada foi submetida à temperaturas acima e abaixo de 25 °C. Todos os dias eram realizadas análises visuais para determinação se havia ou não precipitação que pudesse atrapalhar o andamento do experimento. O resultado foi que, a partir da temperatura de 25 °C o meio de cultivo com a FSA era totalmente translúcido, fazendo com que o experimento pudesse ser realizado em temperaturas iguais ou superiores a 25 °C. Apesar do aumento da temperatura ajudar a solubilizar os compostos, o uso de um óleo que não foi devidamente armazenado logo após a coleta pode ter também feito com que a precipitação cessasse. Durante as primeiras tentativas de realizar o experimento 1 (incluindo o da precipitação de parafinas), o óleo utilizado estava armazenado em um freezer desde a coleta, em 2019, mas em pouca quantidade. Como a quantidade necessária de óleo para o preparo de 2 litros de FSA é relativamente alta (190-200g), e diversos testes foram necessários, houve a necessidade da obtenção de uma nova remessa de óleo, que estava armazenada em um barril de ferro em uma área aberta. As partes superficiais foram descartadas, e apenas o óleo que se encontrava no meio foi coletado. Este óleo aparentemente estava menos degradado. Porém, devido ao mau armazenamento, pode-se inferir que o óleo já se encontrava em processo de degradação, o que pode ser reflexo das baixas concentrações de n-alcenos na FSA, quando comparadas a amostras ambientais (Hassaan *et al.*, 2023). Para tentar confirmar isso, uma razão que indica degradação proposta por Colombo *et al.* (1989) foi utilizada, e a razão das concentrações de octadecano (C₁₈) e fitano foi calculada. A concentração de C₁₈ foi de 1,60 ng L⁻¹, enquanto a de fitano foi de 1,17 ng L⁻¹, gerando assim uma razão de 1.3. Uma razão maior que 1 indica um óleo que foi aportado recentemente, enquanto uma razão com valor menor que 1 indica um óleo degradado. Apesar da razão ser maior que 1, o valor

se aproxima do limite entre o óleo recente e o óleo degradado, podendo ser reflexo de processos de degradação ao longo do tempo. Talvez a escolha de coletar apenas o óleo localizado no meio do barril tenha ajudado a obter um óleo com menor degradação. Para experimentos futuros, é necessário a criação de um protocolo de armazenamento de óleo, afim de diminuir a degradação, possibilitando a preparação de FSAs com maior concentração de HPAs.

6.1.2 Contaminação biológica nas culturas fitoplanctônicas

Durante o cultivo de microalgas, podem ocorrer contaminações químicas e biológicas, seja por organismos predadores das microalgas ou algum tipo de patógeno (Lincoln; Gabridge, 1998). Durante os experimentos com *D. glynnii*, notou-se a presença de um filme branco de aspecto flexível depositado no fundo dos balões no qual se encontravam as culturas. Assim como nas parafinas, as partículas eram muito grandes para que se pudesse alíquotar uma amostra e realizar a análise no Flowcam. Foram realizadas análises visuais utilizando microscopia e constatou-se a presença de um protozoário ciliado cuja espécie não foi identificada. A principal característica do organismo era a presença de cílios distribuídos aparentemente de maneira uniforme pelo corpo, com destaque para o alongamento do cílio localizado na parte caudal do organismo. Levando em consideração a magnificação da ocular do microscópio e a objetiva usada, o tamanho máximo do organismo era de 20µm. Protozoários podem secretar compostos produzidos no meio extracelular para facilitar a aderência em superfícies ou a formação de complexos biofilmes com populações ou comunidades de protozoários (Diaz Villanueva *et al.*, 2011). Quando visualizado no microscópio, o biofilme era composto por vários destes organismos vivos e agregados (imagens apresentadas no material suplementar). A presença deste protozoário nas culturas certamente gerou um impacto no crescimento, visto que estes organismos poderiam estar se alimentando das células de *D. glynnii*. A princípio, esperava-se que o organismo pudesse estar associado com o óleo. Porém, a presença deles nas amostras controle anulava esta hipótese, a não ser que houvesse algum tipo de contaminação cruzada. Foi realizado um experimento para determinar a origem deste organismo, isto é, em qual etapa da preparação da FSA e inoculação das células ele poderia estar sendo inserido nos experimentos. Para isso, foram utilizadas 4 amostras contendo diferentes

soluções para que, por eliminação, pudesse ser determinado em qual etapa estava ocorrendo a contaminação. Assim, o experimento foi realizado com 4 balões que possuíam diferentes conteúdos. O balão 1 foi preenchido apenas com FSA, o balão 2 com água do mar enriquecida com F/2, o balão 3 continha água do mar com células de *D. glynnii*, e o balão 4 continha tudo o que foi citado nos balões 2, 3 e 4. Com o passar dos dias, os biofilmes se formaram nos balões 2 e 4, levando assim a conclusão de que os organismos eram transferidos das soluções estoque de nutrientes para as culturas, visto que a presença dos biofilmes foi constatada apenas nos balões 2 e 4. Não se sabe de qual das quatro soluções estoque dos nutrientes o protozoário foi transferido, e nem como ele foi inserido nas soluções, visto que há um rigoroso protocolo de esterilização no momento da preparação das soluções estoque e durante o enriquecimento da água do mar. Uma hipótese é que os protozoários poderiam estar na forma de cistos (i.e. estágio da vida de um protozoário que os permite sobreviverem em condições desfavoráveis ou até extremas (Radchenko *et al.*, 1997), e quando inoculados novamente em água salgada, os organismos voltariam a suas atividades fisiológicas normais. Porém, isso não seria possível devido a etapa de filtração com filtros de 0,22 µm de porosidade, visto que geralmente os cistos de protozoários conhecidos variam entre 10 e 50 µm, e o menor conhecido até hoje possui entre 3 e 5 µm (Chin *et al.*, 2011; Shyrobokov *et al.*, 2020; Tunçyürek *et al.*, 2013). Desse modo, não se sabe como o protozoário poderia se manter nas culturas mesmo após rigorosos protocolos de filtração do meio de cultivo. Após descobrir a origem, foi realizado um rigoroso processo de limpeza com extran, HCl 12M e posterior autoclavagem das vidrarias das soluções estoque. Após isso, o experimento 1 com *D. glynnii* teve continuidade normalmente, sem reparações destes organismos. A introdução de protozoários e outros organismos indesejados em culturas de microalgas pode ocorrer por meio de equipamentos e vidrarias mal esterilizadas, cepas de microalgas ou meio de cultivos sujos, que podem conter os organismos vivos ou em forma de cistos (Bagatini *et al.*, 2013; El-Tohamy *et al.*, 2024; He *et al.*, 2022). Os protozoários são organismos que desenvolvem-se bem em ambientes ricos em carbono orgânico dissolvido e compostos nitrogenados (Bagatini *et al.*, 2013). Assim, com o constante crescimento das microalgas e sua morte e decomposição, cria-se um ambiente favorável ao crescimento dos protozoários, com disponibilidade de

alimento, condições “ambientais” controladas e ausência de predadores que possam realizar o controle populacional desses organismos.(Stone, 1990). Uma vez inseridos nas culturas, a dinâmica de crescimento das microalgas pode ser alterada, causando assim a diminuição das taxas de crescimento das culturas, além da predação direta (He *et al.*, 2022), visto que os protozoários são um dos principais consumidores do fitoplâncton, podendo consumir até metade da produção fitoplanctônica nos ambientes marinhos (Tillmann, 2004). Desta forma, em um laboratório de cultivo, necessita-se de rigorosos protocolos de esterilização e inoculação, além da realização do controle de qualidade do meio de cultivo utilizado e o monitoramento regular das cepas de microalgas.

A ideia original deste trabalho era comparar duas espécies de ambientes distintos (e.g. eutrófico e oligotrófico) utilizando duas microalgas do mesmo filo, como os Dinophyta. Essa comparação iria ser realizada utilizando as microalgas *D. glynnii* e *Karlodinium* sp. Porém, no início dos exp. 2 e 3 com *D. glynnii*, houve uma suspeita de contaminação das culturas com bactérias. Isso também afetou as culturas de *Karlodinium* sp., que tiveram o seu crescimento mais reduzido por conta da sua menor resistência, refletida pela maior dificuldade de cultivo e manutenção de espécies deste gênero em laboratório (Adolf; Bachvaroff; Place, 2009; Place *et al.*, 2012). A presença de bactérias em culturas de microalgas pode ser constatada de diversas formas, utilizando por exemplo técnicas moleculares (Lee *et al.*, 2022; Na *et al.*, 2024), assim como bioinformática e sequenciamento (Wang *et al.*, 2022). Após a inoculação das microalgas para realização do experimento, notou-se uma ausência de crescimento, um aumento na turbidez e uma coloração mais esbranquiçada, além de um forte odor similar ao de decomposição, que foi percebido ao abrir os recipientes de cultivo para realização do descarte das culturas. Uma outra forma de iniciar a investigação da presença de bactérias é a percepção de mudança na coloração e no odor das culturas, havendo um nítido incremento na turbidez e um cheiro indesejado, causado muitas vezes pelos produtos metabólicos das bactérias, que podem incluir gases contendo enxofre e outras substâncias orgânicas voláteis (Paluszak *et al.*, 2024; Thorn; Greenman, 2012). Apesar da ausência de análises bacteriológicas, foi utilizado um antibiótico de amplo espectro, a tetraciclina, visando assim controlar o crescimento das bactérias nas cultuas. A tetraciclina geralmente é usada em baixas concentrações (Agostini *et al.*, 2019), evitando

assim a inibição do crescimento das microalgas no meio de cultivo (Amangelsin *et al.*, 2023). Tomando como exemplo a cultura de *Karlodinium* sp., houve a inoculação das microalgas em um meio com concentração de 0,1 mg L⁻¹ de tetraciclina. Durante o primeiro dia, a cultura apresentou coloração normal. No segundo dia, constatou-se a presença de um leve precipitado e a coloração da água tinha um aspecto roseado. No terceiro dia a cultura toda (50 mL) foi transferida para uma garrafa com 1 litro de água do mar enriquecida com meio F/2, garantindo assim uma boa diluição do antibiótico. Porém, o monitoramento do crescimento de *Karlodinium* sp. constatou que as microalgas não estavam mais se replicando, causando assim a morte da cultura. Devido a isso, os experimentos que seriam realizados com *Karlodinium* sp foram realizados com *I. galbana*.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Dentre os 16 HPAs listados como prioritários (Bojes; Pope, 2007), apenas nove foram detectados na FSA de *D. glynnii*, sendo um deles com concentração abaixo do limite de quantificação. Já na FSA de *I. galbana*, 14 dos 16 HPAs foram detectados, sendo que cinco apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação. A concentração de HPAs na FSA do exp.1 de *D. glynnii* foi duas vezes maior do que a concentração na FSA na qual *I. galbana* cresceu. Isso pode ter ocorrido por conta do motivo já mencionado na discussão metodológica. A diferença da concentração de HPAs na FSA pode estar relacionada com a forma e o tempo de armazenamento do óleo. Jannuzzi (2023) e Müller *et al.*, (2021) utilizaram o mesmo óleo em seus experimentos com *D. glynnii* e obtiveram perfis parecidos, com predominância do fenantreno e fluoreno, mas com concentrações totais dos 16 HPAs diferentes. Müller *et al.*, (2021) utilizou um método de fração acomodada do óleo em água (FAA) para obter a sua mistura de HPAs, resultando em uma concentração total dos 16 HPAs prioritários de 2315 ng L⁻¹. O método é diferenciado por apenas uma etapa, a de filtração, que é realizada apenas no método da FSA, que pode acabar diminuindo a concentração de HPAs. Jannuzzi (2023) utilizou o mesmo método deste trabalho e obteve uma concentração total dos 16 HPAs prioritários de 1704,75 ng L⁻¹. As soluções de FSA deste trabalho foram preparadas cerca de dois anos após o trabalho de Jannuzzi (2023) e elas reduziram pela metade em relação ao

trabalho citado. Assim, há possivelmente uma degradação com o passar do tempo, mesmo o óleo sendo armazenado em baixas temperaturas. Isso teria resultado nas concentrações de HPAs menores nos experimentos desta dissertação. Uma forma de contornar isso seria aumentar a massa de óleo utilizada na preparação da FSA ou aumentar a área de contato do óleo com a água durante a sua preparação, o que faria a concentração de HPAs ser maior na solução de FSA. Apesar disso, as concentrações encontradas nas duas soluções de FSA deste trabalho representam concentrações encontradas no ambiente, seja em locais com derramamento de óleo, ou locais com fontes crônicas. Por exemplo, concentrações de HPAs de 58 ng L⁻¹ foram mensuradas em áreas sem derramamento de óleo na China (Wu *et al.*, 2011), enquanto níveis tipicamente abaixo de 10 ng L⁻¹ foram detectados nas praias de Pernambuco mais de um ano após o derramamento do óleo (Moreira *et al.*, 2024). Tais concentrações são pelo menos 10 vezes menores do que a obtida neste trabalho. Locais com derrame de óleo apresentaram concentrações de HPAs menores que 1000 ng L⁻¹, como por exemplo nos arredores do navio petroleiro *Exxon Valdez*, que naufragou em 1989 no Alasca (Neff; Stubblefield, 1995). Porém, as concentrações obtidas nesse experimento são mais baixas quando comparadas com a maioria das concentrações encontradas em áreas de derrame de óleo, que podem chegar a 115.000 ng L⁻¹ (Boehm; Murray; Cook, 2016; González *et al.*, 2006; Reddy; Quinn, 1999)..

Como o fenantreno e o fluoreno juntos compuseram 91% e 79% das concentrações totais nas FSAs de *D. glynnii* e *I. galbana*, respectivamente, a discussão terá um foco maior no efeito desses dois compostos sobre as microalgas, sem ignorar os efeitos da mistura de HPAs. O fenantreno em individual não possui um risco elevado para seres humanos, mas pode ser tóxico para peixes e algas (Moody *et al.*, 2001), podendo exercer papéis antagônicos dependendo da concentração (Xue, 2014). Por exemplo, experimentos realizados apenas com fenantreno indicaram que em baixas concentrações (2-10 mg L⁻¹) ele pode aumentar as taxas fotossintéticas, densidades celulares e o peso seco da microalga *Chlorella vulgaris* (Asghari *et al.*, 2020). Ele também aumentou o conteúdo de pigmentos carotenóides de *Heterosigma akashiwo*, *Skeletonema costatum* e *Alexandrium tamarense* (Yun, 2007). Porém, quando

em concentrações maiores (e.g. 50 mg L⁻¹), os impactos variam desde inibição fotossintética, mudanças na estrutura celular, degradação de carotenóides e produção de espécies reativas de oxigênio. Assim como o fenantreno, o fluoreno em concentrações menores (< 25 mg L⁻¹), pode favorecer o crescimento e o aumento de biomassa. Porém, com concentrações acima da supracitada, pode causar estresse oxidativo, redução do conteúdo de clorofila e danos estruturais nas células (Asghari *et al.*, 2020). Em uma revisão realizada por Othman *et al.*, (2023) a partir de 12 valores de EC₅₀ do fluoreno, a concentração de impacto média do fluoreno para as microalgas foi de 76.800 ng L⁻¹. Os valores de EC₅₀ do fenantreno para microalgas descritos na literatura variam entre 20.800µg L⁻¹ a 945.000 ng L⁻¹, sendo que a concentração de impacto média calculada foi de 24.300 ng L⁻¹ (Ben Othman *et al.*, 2023; Echeveste; Agustí; Dachs, 2010; Hutchinson *et al.*, 1980). As concentrações médias de impacto supracitadas do fluoreno são 382 vezes superiores às maiores concentrações registradas na FSA deste estudo, enquanto as do fenantreno ultrapassam em 83 vezes os valores máximos observados.

6.2.1 Experimento 1

Como as microalgas estavam crescendo em ambiente controlado e com as condições necessárias para o crescimento, os efeitos causados no crescimento são atribuídos a mistura de HPAs e suas diferentes concentrações no meio de cultivo das espécies.

6.2.1.1 *Durusdinium glynnii*

Mesmo em concentrações baixas, o aumento da concentração da mistura de HPAs causou uma redução gradativa significativa no crescimento de *D. glynnii*, gerando um EC₅₀ de 536,26 ng L⁻¹, que é menor do que outros descritos na literatura. Jannuzzi (2023), utilizando o mesmo óleo, obteve um valor de EC₅₀ de 1704,75 ng L⁻¹, concentração cerca de três vezes menor do que o deste trabalho. Além disso, esse valor foi menor quando em comparação ao descrito por Müller *et al.*, (2021), chegando a um EC₅₀ de aproximadamente 2.800 ng L⁻¹. Jannuzzi (2023) cogitou a possibilidade de essa diferença de valores ser resultado da presença de compostos com maior peso molecular, como o benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e o benzo[a]pireno, visto que HPAs com maior peso molecular e conseqüentemente uma menor solubilidade,

possuem maior toxicidade para as microalgas (Ben Othman *et al.*, 2023). Este mesmo autor ranqueou 9 dos 16 HPAs prioritários com base na sua concentração média de impacto no fitoplâncton, chegando à seguinte sequência (da maior para a menor toxicidade): benzo[a]pireno, antraceno, benzo(a)antraceno, pireno, fluoranteno, fenantreno, fluoreno, acenafteno e naftaleno. Na composição da FSA utilizada no experimento de *D. glynnii*, o método analítico não foi capaz de detectar compostos com 5 ou 6 anéis aromáticos, o que não quer dizer que eles não estejam presentes na FSA. Assim, atualmente, não se sabe ainda o motivo dessa diferença entre os valores de EC₅₀. Uma hipótese a ser levantada é a de que o uso de água do mar coletada em diferentes locais cause uma diferença no crescimento, resultando assim em diferentes valores de EC₅₀. O meio de cultivo F/2 é um meio de cultivo semidefinido (Guillard, 1975; Oliveira, 2007), ou seja, possui as concentrações de nutrientes do enriquecimento bem definidas, mas há uma incerteza sobre a composição desses nutrientes na água do mar utilizada.

Mesmo em baixas concentrações, os HPAs podem causar efeitos como a diminuição da capacidade fotossintetizante, alterações genéticas, alteração na divisão celular e produção de espécies reativas de oxigênio (Pérez, P.; Fernández; Beiras, 2010; Roseth *et al.*, 1996; Subashchandrabose *et al.*, 2017). Assim, um desses efeitos, ou até mesmo mais de um efeito combinado pode atuar na diminuição da taxa de crescimento, levando assim a um menor valor de EC₅₀.

6.2.1.2 Isochrysis galbana

Como não foi possível quantificar o tratamento E1-FSA-100%, os resultados com as diluições de 0% até 50% não tiveram uma diminuição significativa no crescimento. Porém, devido a ausência/lentidão no crescimento, pode-se inferir que houve sim uma diferença no crescimento, que será discutida mais adiante. Alguns estudos realizaram experimentos para testar efeitos isolados dos HPAs em *I. galbana* (e.g. Othman *et al.*, 2012), encontrando valores de EC₅₀ de 255.000 ng L⁻¹ e 144.000 ng L⁻¹ para benzo[a]antraceno e fluoranteno, respectivamente. Já para naftaleno, pireno e fenantreno, a concentração na qual houve uma diferença significativa em relação ao controle foi 2.220.000 ng L⁻¹ (Pérez, Patricia; Fernández; Beiras, 2010). Essas concentrações são muito

maiores do que a concentração total na qual *I. galbana* foi submetida neste trabalho (263,76 ng L⁻¹). Porém, as concentrações supracitadas são relacionadas a efeitos de um único composto, e não considera efeitos aditivos e sinérgicos de misturas de HPAs. Quando o crescimento de *I. galbana* é relacionado com uma mistura de HPAs, o EC₅₀ pode ser alterado. Por exemplo, Silva (2023) obteve um EC₅₀ de 669 ng L⁻¹, valor quase 3 vezes maior que o deste estudo. O autor mostrou que o crescimento de *I. galbana* segue um efeito hormese (i.e. comportamento estimulado por baixas concentrações de um composto, mas inibido por altas concentrações). Só a partir da concentração de 669 ng L⁻¹ é que efeitos significativos surgiram em relação ao controle. Esse tipo de efeito é descrito em outros estudos semelhantes, utilizando outras espécies de microalgas (Asghari *et al.*, 2018, 2020; Ben Othman *et al.*, 2018; El-Sheekh *et al.*, 2000).

Durante o experimento com *I. galbana*, não foi possível quantificar a densidade populacional do tratamento de FSA 100% por conta de um precipitado branco que acabou entupindo o equipamento. Esse precipitado tornou-se visível a olho nu no segundo dia de contagem. Além das células, no primeiro dia foram identificadas partículas no software do flowcam. Uma hipótese é de que essas partículas tenham surgido a partir da morte das células, devido ao choque da transição de um meio não contaminado para outro contaminado. Já é conhecido que, em casos extremos, a concentração de HPAs pode desencadear o início do processo de morte celular programada (i.e. apoptose), que também pode ser desencadeada por outros fatores além dos HPAs, como nutrientes, iluminação e regulação osmótica (Bidle, 2016; Subashchandrabose *et al.*, 2017). Assim, para testar a influência direta dos HPAs na morte das células durante a transição de meios de cultura, foi calculado o número teórico de células no dia da inoculação, utilizando a equação do crescimento exponencial (Equação 5; Krebs; Eggleston, 1940; Monod, 1949), até os dias atuais (Jones *et al.*, 2023; Rohim *et al.*, 2020; Ughy *et al.*, 2023). Nessa equação, a taxa de adição de células no meio é proporcional ao número de células anterior, caracterizando um crescimento exponencial, que se dá em uma determinada taxa, chamada taxa intrínseca de crescimento, ou simplesmente *r* (Oliveira, 2007). Sabe-se que os experimentos de *I. galbana* foram teoricamente iniciados com uma densidade celular de 1000

células mL⁻¹. Com a equação de crescimento exponencial (Equação 5), pode-se calcular o número teórico de células no dia da inoculação. Na equação, N_(t) é o número de células no tempo t, N₀ o número de células no dia do inóculo e r é a taxa de crescimento.

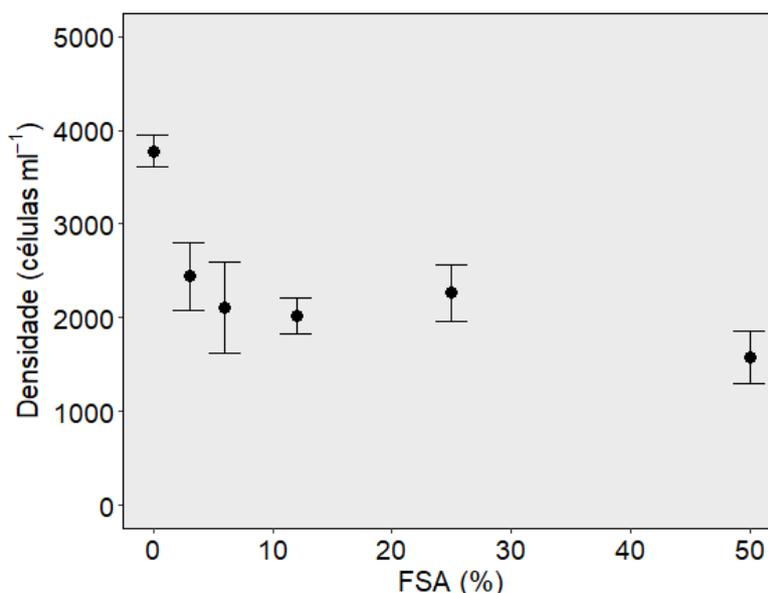
$$N_{(t)} = N_0 * e^{rt} \quad (5)$$

Rearranjando esta equação, podemos encontrar o valor de N₀:

$$N_0 = \frac{N_{(t)}}{e^{rt}} \quad (6)$$

Assim, com a taxa de crescimento das culturas e o número de células no dia 1, obteve-se que a densidade populacional teórica no dia do inóculo caiu de 3777 ± 172 células mL⁻¹ para 1578 ± 275 células mL⁻¹. Apesar de haver uma redução na densidade teórica de células no dia do inóculo (Figura 16), essa diminuição não é significativa quando o teste de regressão é aplicado (p > 0.05). Caso a regressão fosse significativa, utilizando a equação da regressão linear, seria possível calcular esse valor para a amostra de 100% FSA. Dessa forma, não se pode afirmar se há um impacto direto dos HPAs nas células durante a transferência da cultura inóculo para a cultura experimental. Os valores detalhados e os seus respectivos desvios estão descritos na tabela 8.

Figura 16: densidade média de células no dia da inoculação em relação a concentração de FSA no experimento 1 de *I. galbana*.



Fonte: o autor (2025)

Os valores obtidos ficaram acima do valor teórico calculado no dia da inoculação (1000 células mL⁻¹). Isso pode ocorrer por diversas causas, desde erros de cálculo na inoculação, medições imprecisas da densidade populacional nas culturas inóculo, má homogeneização na hora da transferência das células, ou até mesmo erros de pipetagem, caso o equipamento não esteja calibrado ou o usuário utilize de forma errada. Assim, para os experimentos futuros, afim de evitar isso, as células serão inoculadas e a densidade populacional será quantificada no mesmo dia.

Tabela 8: densidade média de células no dia da inoculação e seus desvios nas diferentes diluições de FSA para o experimento 1 de *I. galbana*.

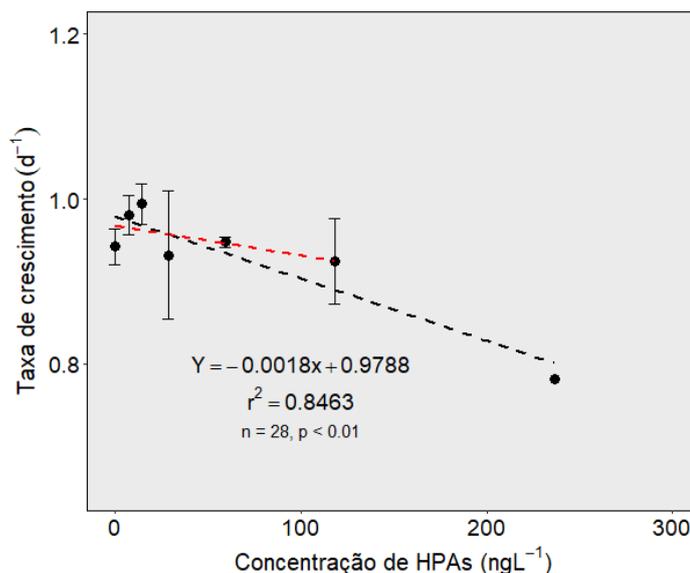
FSA (%)	Densidade de células (Células mL ⁻¹)
0	3777 ± 172
3	2442 ± 363
6	2112 ± 486
12	2022 ± 191
25	2263 ± 296
50	1578 ± 275

Como a densidade populacional do tratamento E1-FSA-100% não foi quantificada, não foi possível calcular a taxa de crescimento. Porém, utilizando as estimativas acima, podemos calcular a taxa de crescimento máxima teórica que essa cultura poderia atingir, por meio da equação do crescimento exponencial (Monod, 1949; Oliveira, 2007). Para obter o N_0 do E1-FSA-100% (no dia da inoculação), pode-se utilizar a média dos valores de células no dia inicial, que nesse caso seria $N_0 = 2366$. O valor de $N_{(t)}$ (no dia de amostragem) foi obtido a partir de uma relação da densidade das culturas dos outros tratamentos e suas colorações. No terceiro dia do experimento, já era possível observar a coloração resultante do crescimento celular. No tratamento E1-FSA-100%, entretanto, essa coloração não era visível até o quinto dia do experimento. Dessa forma, a média das densidades populacionais dos tratamentos E1-FSA-0% a E1-FSA-50% no terceiro dia foi considerada como $N_{(t)máx}$, representando o valor máximo da concentração celular que poderia ser alcançado no tratamento E1-FSA-100% no quinto dia. Esse valor foi de 117.582 células mL^{-1} . Rearranjando a equação do crescimento exponencial (Equação 5) para encontrarmos o valor de r (Equação 7), obtemos que:

$$r = \frac{\ln(N_{(t)}) - \ln(N_0)}{\Delta t} \quad (7)$$

Realizando a aplicação do valor médio da densidade das outras culturas como $N_{(t=5)} = 117.582$ células mL^{-1} no tratamento de E1-FSA-100%, obtêm-se um valor da taxa de crescimento intrínseca (r) teórica máxima de $0,781 d^{-1}$. Esse valor foi plotado na Figura 16 junto com os resultados do exp. 1 de *I. galbana*. Pode-se notar claramente a sua influência nos resultados, visto que o menor valor da taxa de crescimento no tratamento E1-FSA-100% faz com que haja uma diminuição significativa no crescimento de *I. galbana* (Figura 17, linha tracejada preta). A linha tracejada vermelha representa a regressão linear originalmente calculada, que não apresentou uma diminuição significativa ($p > 0.05$). Esse valor de crescimento ($0,781 d^{-1}$) representa uma diminuição de 17% no crescimento em relação ao tratamento controle. Ademais, o crescimento pode ser ainda menor, visto que $0,781 d^{-1}$ representa a taxa máxima de crescimento estimada para o tratamento de 100%, o que explicaria o crescimento tão lento das microalgas durante esse experimento.

Figura 17: Regressões lineares da taxa de crescimento de *I. galbana* com o valor de E1-FSA-100% máximo (linha tracejada preta) e sem o valor de E1-FSA-100% (linha tracejada vermelha).



Fonte: o autor (2025)

Como a regressão entre a taxa de crescimento e a concentração de HPAs é significativa e possui um alto coeficiente de determinação (r^2), pode-se estimar um EC_{50} teórico, utilizando a equação da regressão linear apresentada na figura 12, estima-se que o valor de EC_{50} seria de aproximadamente 636 ng L^{-1} , valor próximo ao descrito por Silva, (2023), de 669 ng L^{-1} .

6.2.2 Experimento 2

Como já foi discutido, os experimentos 2 e 3 foram realizados apenas com *I. galbana*, devido à contaminação biológica nas culturas de *D. glynnii*. Inicialmente, acreditava-se que o tratamento E1-FSA-100% não havia crescido, e as células estavam mortas. O experimento 2 foi realizado a partir de inóculos dos tratamentos de FSA E1-FSA-0%, 50% e 100% provenientes do experimento 1. Durante o monitoramento da densidade populacional no exp. 2, percebeu-se que as células oriundas do tratamento de 100% do experimento 1 estavam vivas e crescendo bem, indicando assim que uma parte delas sobreviveu e estava crescendo lentamente no exp. 1. Como não houve diferença no crescimento ocasionado pelo aumento da concentração de HPAs no tratamento E1-FSA-50% no experimento 1, já se esperava que os valores do crescimento no exp. 2 não apresentassem uma variação significativa. Em contrapartida, pode-se levar em conta um outro cenário, no qual o valor máximo da taxa de crescimento é

levado em consideração e há uma diferença significativa dos HPAs no crescimento. Assim, como houve uma diferença de crescimento no exp. 1 e não houve diferença de crescimento no exp. 2, pode-se inferir espécie *I. galbana* possui uma boa capacidade de recuperação aos danos causados pelos HPAs. Para determinar o número de gerações do tratamento de 100% no exp. 2 foi utilizada a equação do tempo de geração (G_2), já descrita na metodologia (Oliveira, 2007; Wood; Everroad; Wingard, 2005). No experimento 1, ao longo dos 5 dias, o tempo de geração foi de $0,88 \text{ d}^{-1}$. Considerando um dia (24 h) como $G_2 = 1.0 \text{ d}^{-1}$, pode-se afirmar que durante o experimento 1, o tratamento E1-FSA-100% com uma taxa máxima de crescimento de $0,781 \text{ d}^{-1}$ realizou uma duplicação completa da sua densidade em cerca de 21h. Já que o experimento durou 5 dias, ou 120 horas, durante o exp. 1, o tratamento E1-FSA-100% realizou cerca de cinco duplicações da sua densidade, totalizando cinco gerações. Aplicando o mesmo raciocínio para o exp. 2, pode-se estimar um total de sete gerações ao longo dos cinco dias de experimento, com uma duplicação populacional completa a cada 17 h ($G_2 = 0,73 \text{ d}^{-1}$). Dessa forma, *I. galbana* levaria em torno de sete gerações para se recuperar dos impactos causados pelo óleo no crescimento. Um ciclo completo de diminuição do crescimento e recuperação populacional levaria em torno de 12 gerações. Isso não leva em consideração os dias da fase *lag*, onde quase não há divisão celular quando os meios de cultura são diferentes (Collos, 1986). Organismos fitoplanctônicos possuem um tempo de geração em escala de dias ou semanas, que é menor quando comparado a outros organismos, como as plantas, que podem ter escalas de tempo de geração na ordem de 100 anos (Dokulil; Teubner, 2024). O menor tempo de geração associado a maiores taxas de crescimento proporciona a esses organismos uma recombinação genômica maior, fazendo com que eles se adaptem mais facilmente a estressores ambientais (Baert *et al.*, 2016; Pei *et al.*, 2021; Sjöqvist, 2022). A baixa concentração de HPAs no meio de cultura pode ter diminuído o choque das células entre um meio contaminado e outro não contaminado, favorecendo assim a recuperação de *I. galbana*. A ausência de diferenças significativas no número de células inicial de cada tratamento pode corroborar essa afirmação. Quando submetidas a mudanças bruscas de concentrações de HPAs, espécies de fitoplâncton podem diminuir a sua capacidade de recuperação, como observado no trabalho de Müller *et al.*,(2021).

Nele, a aptidão competitiva de *D. glynnii* estava comprometida mesmo após 8 gerações, por conta dos impactos gerados pelos HPAs. No experimento descrito em Jannuzzi (2023), com os dados de crescimento descritos pelo autor, pode-se notar que as culturas em recuperação apresentavam um tempo de geração alto (cerca de 47 h) e as culturas de *D. glynnii* não haviam se recuperado totalmente após 3 gerações. Estudos destacam a capacidade de adaptação de *I. galbana* a estresses hidrodinâmicos como velocidade superficial de gases na água e velocidade de borbulhamento no meio de cultura (Falinski, 2009), além de fluxos de CO₂ (Mohamed Abdoul-Latif *et al.*, 2024). O menor tamanho de célula de *I. galbana* (Wang; Lan, 2018) pode conferir a essa espécie taxas de crescimento maiores em comparação a espécies com células maiores. Isso porque o tamanho das células pode ser relacionado ao seu crescimento. Células menores possuem uma absorção mais eficiente dos nutrientes, além de taxas metabólicas maiores. Isso faz com que seu crescimento aumente (Baho *et al.*, 2020; Hillebrand *et al.*, 2022) e leve a menores tempos de geração e maior adaptação.

6.2.3 Experimento 3

Assim como no experimento 2, uma diferença não significativa dos valores de crescimento no experimento 3 já era esperada, por conta da ausência do impacto dos HPAs nas culturas no exp. 1. Caso houvesse uma diferença no crescimento, seria possível afirmar que os HPAs podem interferir na capacidade de tolerância de *I. galbana* a estressores ambientais (no caso, a salinidade), diminuindo assim a aptidão competitiva da espécie. Isso já foi descrito anteriormente para a espécie *D. glynnii* (Müller *et al.* (2021). O mais interessante aqui é a pequena diferença nos valores de crescimento entre os experimentos 2 e 3. Mesmo com uma salinidade bem abaixo das condições ótimas para a espécie, *I. galbana* conseguiu se reproduzir muito bem, apresentando um tempo de geração médio de $0,80 \pm 0,07 \text{ d}^{-1}$ nos três tratamentos do experimento 3. Isso representa mais de uma duplicação por dia ou, mais precisamente, uma duplicação completa a cada 19 h, levando assim a uma média de seis gerações ao longo de todo o experimento 3, para todos os tratamentos. Outros estudos apontam que *I. galbana* é resistente a variações de salinidade, sendo capaz de sobreviver em salinidades entre 5 e 60 (Alkhamis; Qin, 2013; Boussiba *et al.*, 1988; Camacho-Rodríguez *et al.*, 2021; Mishra; Prasad; Mishra, 2019). Outros

trabalhos descrevem a capacidade de tolerância dessa espécie, que pode elevar a atividade de enzimas antioxidantes (e.g. peroxidase e superóxido dismutase) para suportar efeitos da contaminação por cromo (Jin *et al.*, 2020). *I. galbana* também apresenta tolerância a outros estressores como temperatura, nutrientes, fármacos e compostos poliméricos presentes nos microplásticos (Roopnarain; Gray; Sym, 2014; Xiao *et al.*, 2023; Yuan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

6.2.4 Análise isotópica

O valor de $\delta^{13}\text{C}$ no óleo foi de $-27,15\text{‰}$, uma assinatura isotópica que está de acordo com o valor obtido por Müller *et al.* (2021) para o mesmo óleo ($-26,89\text{‰}$). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ em diferentes óleos são comumente empobrecidos em ^{13}C , variando entre $-27,6$ e $-34,6\text{‰}$ (Becker; Hirner, 1998; Yeh; Epstein, 1981). Tal variação é diretamente influenciada pela bacia sedimentar de origem, processos de fracionamento isotópico na biossíntese da matéria orgânica precursora e variáveis ambientais durante o processo de diagênese (Becker; Hirner, 1998; Clayton, 1991; Hayes, 1993; Whiticar, 2020; Yeh; Epstein, 1981). No fitoplâncton, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ é influenciado por processos como bioacumulação de compostos orgânicos, assimilação e liberação de CO_2 (Bentaleb *et al.*, 1996; Laws *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2021; Relitti *et al.*, 2020; Tuerena *et al.*, 2019).

6.2.4.1 Experimento 1

6.2.4.1.1 *D. glynnii*

Neste trabalho, pode-se notar uma mudança na assinatura isotópica induzida pela concentração de HPAs no meio de cultivo, que fez com que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ em *D. glynnii* se tornassem mais empobrecidos em ^{13}C , aproximando-se do valor encontrado no óleo utilizado. Um fato interessante nessas análises foi o valor da assinatura do $\delta^{13}\text{C}$ no controle (E1-FSA-0%) de *D. glynnii*. Diferente do valor descrito por Müller *et al.* (2021) ($-12,27\text{‰}$), o valor do $\delta^{13}\text{C}$ no tratamento E1-FSA-0% (controle) deste trabalho foi de $-23,94\text{‰}$, não condizendo com dados publicados na literatura (Kirkels *et al.*, 2022; Müller *et al.*, 2021; Raven; Suggett; Giordano, 2020). Para *D. glynnii*, esperava-se uma assinatura na faixa entre -10 e -16‰ , conforme descrito para plantas e algas com fotossíntese do tipo C4 (e.g. cana de açúcar, arroz e alguns dinoflagelados; Chartrand; Mester, 2019; Jahren *et al.*, 2006; Raven; Suggett; Giordano, 2020),

que é diferente da faixa encontrada em plantas e algas que realizam fotossíntese do tipo C3 (-20 a -37‰) (Kirkels *et al.*, 2022; Kohn, 2010; Wang *et al.*, 2024). Isso acontece porque as diferentes vias metabólicas fotossintéticas fracionam os isótopos de carbono de formas diferentes, gerando assim diferentes assinaturas isotópicas (Berry, 1989; Kirkels *et al.*, 2022; Vogel, 2012). Alguns fatores podem ocasionar na variação da assinatura do $\delta^{13}\text{C}$. Por exemplo, o $\delta^{13}\text{C}$ em *D. glynnii* pode ser menor em condições de pouca iluminação (associada a maiores profundidades) devido às menores taxas de fixação de carbono, fazendo com que o $\delta^{13}\text{C}$ se aproxime dos valores tipicamente encontrados nas plantas C3 (Wall *et al.*, 2020). Além disso, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *D. glynnii* podem ser influenciados pelas propriedades dos tecidos coralíneos e as fontes de carbono disponibilizadas para a célula (Stanley; Swart, 1995). Porém, como nenhuma dessas condições supracitadas se encaixam nas condições dos experimentos realizados neste trabalho, não se sabe ainda o motivo da diminuição da assinatura isotópica do ^{13}C no controle, e experimentos adicionais são necessários. Os outros tratamentos seguem uma diminuição dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas células de *D. glynnii*, revelando um possível acúmulo dos compostos presentes no óleo utilizado no experimento. Isso já havia sido observado nos experimentos conduzidos por Müller *et al.* (2021). Um acúmulo desses compostos nas células pode causar danos tanto às células das microalgas quanto aos corais em que elas habitam. Mudanças no crescimento/taxas fotossintéticas das células em simbiose causam uma diminuição dos benefícios nutricionais aos corais, impactando assim no desenvolvimento e consequentemente na sobrevivência dos organismos coralíneos (Wall *et al.*, 2020). Além disso, assinaturas isotópicas dos corais que se alimentaram de células com acúmulo de fenantreno podem refletir a presença desses compostos em sua assinatura isotópica (Ashok *et al.*, 2020), indicando assim que, se a microalga não possui uma capacidade de recuperação/desintoxicação rápida, esses efeitos podem ser levados para os níveis tróficos superiores, assim como descrito por (Silva, 2023).

A razão C:N das culturas se manteve estável, em um valor de aproximadamente 8, indicando assim que o carbono presente no óleo foi incorporado de forma ativa pelas células. Caso esses compostos fossem acumulados de forma passiva,

haveria um aumento na razão C:N, visto que o óleo possui uma concentração muito maior de carbono em relação a de nitrogênio (Jones, 2015; Müller *et al.*, 2021; Speight, 2016).

6.2.4.1.2 *I. galbana*

Assim como em *D. glynnii*, houve uma tendência de diminuição significativa da assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ nas culturas de *I. galbana*, confirmada pelo teste de regressão linear. A assinatura da cultura controle (E1-FSA-0%) foi de -19,83 ‰, valor similar a espécies que realizam fotossíntese do tipo C3 (Kirkels *et al.*, 2022). Trabalhos descreverem a principal via fotossintética dessa microalga como C4 (González-Olalla *et al.*, 2021). Porém, através da assinatura isotópica e atividades enzimáticas, Descolas-Gros e Fontugne (1985) descrevem a principal via metabólica desta espécie como C3, fazendo assim com que não haja uma conclusão sobre o assunto. É possível que algumas espécies possuam as características principais de uma via metabólica, mas sejam capazes de alternar para outra (Allakhverdiev, 2020; Raven; Glidewell, 1978), como a alga *Hydrodictyon africanum*. Uma das vantagens de microalgas realizarem fotossíntese do tipo C4 é a capacidade de manter altas taxas fotossintéticas, mesmo em temperaturas elevadas, condições que as vias metabólicas fotossintéticas do tipo C3 podem ser prejudicadas devido a fotorrespiração (Osborne; Beerling, 2006; Ubeda, 2018). Assim, as taxas fotossintéticas em ambientes com muita iluminação e com altas temperaturas seria mantida, fazendo com que as espécies tenham uma vantagem competitiva em relação as outras com fotossíntese do tipo C3. Isso também é descrito para ambientes oligotróficos, já que as espécies possuem flexibilidade no uso da fonte de carbono, podendo utilizar tanto CO_2 como bicarbonato (HCO_3^- ; Roberts *et al.*, 2007; Sage, 2004). Assim, a capacidade de tolerância de *I. galbana* a diversos estressores e condições ambientais pode ser um indício do reflexo das características da fotossíntese C4, apesar que, apenas essa característica não confere a célula uma boa resistência, necessitando assim de outros fatores (Pei *et al.*, 2021). O valor da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ para *I. galbana* descrito na literatura pode variar significativamente de acordo com vários fatores (Brutemark *et al.*, 2009; Descolas-Gros; Fontugne, 1985; Klein Breteler *et al.*, 2002; Leboulanger *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2021; Wong; Sackett, 1978). Por exemplo, células cultivadas em meios de cultura artificiais enriquecidos com diferentes

fontes de carbono apresentaram assinaturas isotópicas muito distintas (Wong; Sackett, 1978). Em um meio de cultivo enriquecido com HCO_3^- como fonte de carbono principal, as culturas de *I. galbana* apresentaram uma assinatura isotópica de -35,5 ‰, enquanto as células cultivadas com CO_2 como principal fonte de carbono tiveram uma assinatura de -26.4 ‰. Por outro lado, quando cultivada em um regime de fotoperiodicidade de 14:10h entre claro:escuro, com meio de cultivo F/2 e temperatura de 20 °C, a assinatura isotópica média das culturas de *I. galbana* foi de -15.7 ‰ (Park *et al.*, 2021). A configuração do fotoperíodo pode influenciar de maneira severa na assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$, assim como descrito por Leboulanger *et al.* (1995), que obteve 3 assinaturas isotópicas distintas de acordo com o fotoperíodo. No primeiro cenário, a iluminação era constante, enquanto no segundo havia um fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro) e o terceiro cenário, um fotoperíodo de 2:2h. No cenário de iluminação constante, a assinatura isotópica foi a mais negativa ($\sim -27\text{‰}$), e um aumento foi registrado nos cenários com fotoperíodo de 2:2h ($\sim -25,5\text{‰}$) e de 12:12h ($\sim -25\text{‰}$). Assim, o autor justifica que essa diferença pode ser causada pelo efeito dos ciclos entre claro e escuro na biossíntese da enzima carboxilase (responsável pela formação de novas ligações de carbono utilizando HCO_3^- e CO_2 ; Valle, 2017), e pela incapacidade de fixação do carbono da enzima RuBisCO (Leboulanger *et al.*, 1995; Mortain-Bertrand, 1988). Além das condições de cultivo, há também influência do tamanho das células na assinatura isotópica das espécies (Burkhardt; Riebesell; Zondervan, 1999b, 1999a; Korb *et al.*, 1996). Em resumo, espécies fitoplanctônicas com células menores e rápido crescimento, como no caso de *I. galbana* podem utilizar o CO_2 do meio de forma muito rápida, alterando assim o fracionamento isotópico, resultando em valores da assinatura de $\delta^{13}\text{C}$ maiores (Brutemark *et al.*, 2009; Burkhardt; Riebesell; Zondervan, 1999a). Dessa forma, existem diversos registros de assinaturas isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ para *I. galbana*, variando entre os valores descritos para as vias fotossintéticas C3 e C4 (Kirkels *et al.*, 2022). O valor da assinatura do $\delta^{13}\text{C}$ do tratamento controle (E1-FSA-0%) se encaixa na faixa descrita na literatura para esta espécie (-15,7 ‰ a -35,5 ‰; Park *et al.*, 2021; Wong; Sackett, 1978). A assinatura isotópica no tratamento E1-FSA-50% foi a mais baixa, com um valor de -25,37 ‰, ficando mais próximo da assinatura do óleo do que *D. glynnii*, apesar da pouca diferença. Assim, é possível que haja uma acumulação dos

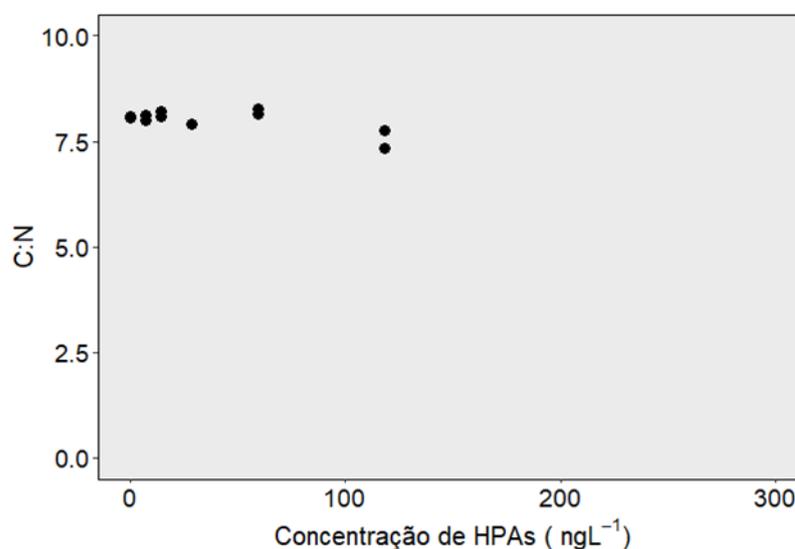
compostos do óleo nas células de *I. galbana*, levando em consideração a mudança na assinatura. Estudos descrevem a acumulação de HPAs como o benzo(a)pireno em *I. galbana* e sua transferência aos níveis tróficos superiores, impactando organismos como o mexilhão *Mytilus edulis*, causando uma acumulação nos tecidos do organismo e alterações na atividade enzimática (Okay *et al.*, 2000).

O valor da assinatura isotópica no tratamento E1-FSA-100% foi maior do que o do tratamento E1-FSA-50%, contradizendo assim outros trabalhos que descrevem a diminuição da assinatura isotópica de acordo com a acumulação dos compostos presentes no óleo (Jannuzzi, 2023; Müller *et al.*, 2021). Levando em consideração a baixa taxa de crescimento máxima do tratamento de 100%, essa assinatura isotópica pode estar superestimada. A taxa de crescimento pode exercer influência na composição química do fitoplâncton marinho (Goldman; McCarthy; Peavey, 1979), e culturas com maiores taxas de crescimento possuíram uma composição química parecida com a descrita por Redfield (1934), de C₁₀₆:N₁₆:P₁. Como os tratamentos de 3% a 50% FSA não tiveram diferença significativa, e altas taxas de crescimento, conseguiram assimilar rapidamente os compostos do óleo presentes na água. Por outro lado, com um crescimento menor, o tratamento E1-FSA-100% possui um maior tempo de geração, resultando em menores duplicações da densidade das culturas. Assim, células com assinaturas isotópicas maiores, similares as das condições iniciais podem exercer uma influência na assinatura final do tratamento E1-FSA-100%, elevando assim o valor de $\delta^{13}\text{C}$, e tornando-o mais próximo do valor original no momento da inoculação (0% FSA). Apesar do cálculo do tempo de geração do tratamento de 100% ter resultado em um número de gerações de 5 no exp. 1, deve-se lembrar que essa taxa de crescimento é a máxima que as culturas poderiam ter, e que esse valor pode estar superestimado.

Associado a isso, o tratamento de 100% apresentou uma razão C:N diferente das outras, com um valor médio de 5,28, enquanto os outros tratamentos tiveram valores similares, de aproximadamente 8. Incluindo a razão C:N de E1-FSA-100% no conjunto amostral, obtém-se uma diminuição significativa da razão. Porém, como este valor destoa dos outros, e não condiz com a razão descrita para o fitoplâncton marinho (~6,64; Redfield; Ketchum;

Richards (1963), o valor foi retirado do conjunto amostral. Retirando a razão C:N do conjunto amostral, a regressão passa a ser não significativa (Figura 18), assim como a de *D. glynnii*, indicando assim uma acumulação ativa do carbono orgânico presente no óleo (Müller *et al.*, 2021).

Figura 18: Valores da razão C:N sem levar em consideração o tratamento E1-FSA-100% de *I. galbana*



Fonte: o autor (2025)

Análises da razão C:N de células de *I. galbana* indicaram que durante o crescimento exponencial, quando as taxas de crescimento são intermediárias/altas ($0,58 \text{ d}^{-1}$), há uma diminuição gradual da razão C:N ao longo dos dias (Pérez-Morales; A.; Camalich, 2015), com valores iniciais e finais de aproximadamente 10 e 3, respectivamente, em um experimento realizado em 5 dias. Essa diminuição da razão C:N associada a taxas de crescimento altas pode estar relacionada com o aumento na proporção de proteínas (Ríos *et al.*, 1998), que contém uma média de 16% de nitrogênio em sua composição.

6.2.4.2 Experimento 2

Com a reinoculação das células em meio de cultivo não contaminado, houve uma recuperação das taxas de crescimento na cultura E2-REC-100%. Associado a isso, após 7 gerações dos tratamentos E2-REC050% e E2-REC-100% (tempo de geração igual para os dois no exp. 2), foi possível notar um aumento significativo na assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$. Porém, os valores não foram tão similares ao controle ($-20,42\text{‰}$), sendo $\delta^{13}\text{C}_{50\%} = -18,37\text{‰}$ e $\delta^{13}\text{C}_{100\%}$

= -15,98 ‰. Esses valores se tornaram mais enriquecidos, indicando assim um menor fracionamento isotópico nas culturas (Descolas-Gros; Fontugne, 1985). Possa ser que as microalgas conseguiram biodegradar e/ou biotransformar esses compostos, fazendo com que o valor da assinatura isotópica delas fosse mais positivo, se afastando do valor do óleo. Células de microalgas possuem capacidade de degradação e biotransformação de compostos emergentes (e.g. fármacos, pesticidas e os per/polifluoroalquil; Mehariya *et al.*, 2024), realizando assim a transformação de uma molécula complexa em uma mais simples, por meio de reações catabólicas ou metabólicas, que podem ser no meio intracelular e/ou extracelular (Tiwari *et al.*, 2017; Touliabah *et al.*, 2022; Xiong *et al.*, 2016). As microalgas podem biodegradar também compostos orgânicos como hidrocarbonetos, compostos organometálicos, herbicidas e corantes, transformando-os em moléculas menores e atóxicas. (Touliabah *et al.*, 2022). Diversos trabalhos apontam a capacidade de espécies de microalgas de biodegradar e biotransformar HPAs (Cerniglia; Baalen; Gibson, 1980; Cerniglia; Gibson; Van Baalen, 1980; Dell' Anno *et al.*, 2021; Ghosal *et al.*, 2016; Lei; Wong; Tam, 2002; Patel; J.I.; Tiwari, 2014; Semple; Cain; Schmidt, 1999; Warshawsky *et al.*, 1995) e as suas formas de realizar isto. A transformação de compostos orgânicos tóxicos em moléculas atóxicas (e.g. CO₂) pode se dar por meio de reações enzimáticas de oxi-redução, onde enzimas como carboxilases e hidroxilases adicionam um grupo hidroxila, aumentando assim a solubilidade dos compostos (Mona; Kaushik; Kaushik, 2011; Pflugmacher; Sandermann, 1998; Satpati *et al.*, 2023; Touliabah *et al.*, 2022; Xiong; Kurade; Jeon, 2018). A atividade enzimática nas células causa mudanças nas assinaturas isotópicas (Burkhardt; Riebesell; Zondervan, 1999a), e um aumento na atividade da enzima β-carboxilase resulta em uma diminuição do fracionamento isotópico, levando assim a assinaturas maiores, podendo chegar a -14,9 ‰ em espécies de diatomácea (Descolas-Gros; Fontugne, 1985; Descolas-Gros; Fontugne, 1990). Assim, baseado nas informações acima, talvez fosse possível que um aumento na assinatura isotópica seja resultado de um incremento na atividade enzimática das células, afim de transformar esses compostos em atóxicos. O valor da assinatura no tratamento controle pode dar suporte a essa inferência, visto que apenas os valores das culturas que tiveram contato com compostos orgânicos presentes no óleo que sofreram uma alteração nas assinaturas para

mais positiva, enquanto a assinatura do controle se manteve similar a assinatura no experimento 1. Entretanto, isso são só hipóteses baseadas na literatura, e para confirmar isso, uma série de análises e experimentos são necessários. A razão C:N se manteve similar ao experimento 1, com valores ainda constantes, que se mantiveram em aproximadamente 8. Talvez, a mesma explicação utilizada no experimento 1 possa se aplicar aqui.

6.2.4.2.1 Experimento 3

Quando inoculadas em meio de cultivo com uma salinidade menor que 2x as que são habitualmente cultivadas, as microalgas possuíram uma assinatura isotópica mais positiva, com valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos tratamentos de E3-SAL-0%, 50% e 100% de -16,91 ‰, -16,64 ‰ e -16,55 ‰, respectivamente. Um detalhe importante é que o experimento 3 ocorreu simultaneamente com o 2. Assim, as células saíram diretamente de um meio contaminado com HPAs para um meio não contaminado, mas com estresse de salinidade. Relacionando o experimento 3 com o 2, as assinaturas isotópicas dos tratamentos E3-SAL-50% e E3-SAL-100% foram similares. Porém, a assinatura do controle apresenta agora um valor parecido com a dos outros tratamentos previamente contaminados. Talvez possa ser um efeito da salinidade, visto que as assinaturas isotópicas podem ser alteradas com variações de salinidade, e cada espécie reage de uma forma, não havendo assim uma relação linear entre essas variáveis (Leboulanger *et al.*, 1995). Como os valores da assinatura isotópica dos tratamentos E3-SAL-50% e E3-SAL-100% são parecidas com o do experimento 2 (Figura 13), e eles foram realizados de forma simultânea, talvez os mesmos fatores discutidos no experimento anterior possam ser aplicados aqui, já que não houve uma diferença significativa no crescimento, e os parâmetros mensurados neste trabalho para as duas culturas se comportam de maneira similar.

6.3 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi discutida a tolerância de uma espécie de microalga que habita ambientes oligotróficos (*D. glynnii*), e outra que habita ambientes eutróficos (*I. galbana*). No geral, pode-se notar uma maior capacidade de resistência de *I. galbana* em relação a *D. glynnii*, baseado nos valores de EC_{50} das duas espécies, o que entra em concordância com a afirmação de que espécies de fitoplâncton costeiras são mais resistentes do que as espécies

oceânicas (Firdaus; Pin; Supriatna, 2020; Müller; Trull; Hallegraeff, 2015). Uma comparação mais “justa” é necessária, devido a diferença na concentração e composição dos perfis de HPAs nos quais as espécies foram submetidas. Nas condições controle, *I. galbana* possui uma taxa de crescimento quase o dobro da de *D. glynnii*, o que pode ser reflexo da relação crescimento e tamanho celular já discutida anteriormente (Brutemark *et al.*, 2009). Como o experimento 2 não foram realizados com *D. glynnii*, os resultados do crescimento de *I. galbana* foram relacionados com os dados descritos em Jannuzzi (2023), visto que foi utilizado o mesmo óleo e as mesmas condições de cultivo. Utilizando o valor máximo teórico da taxa de crescimento proposto no exp. 1 de *I. galbana*, o experimento 2 demonstrou que essa espécie possui uma rápida capacidade de recuperação, e que em 7 gerações não há mais impactos resultantes dos HPAs, enquanto no experimento realizado por Jannuzzi (2023), culturas de *D. glynnii* possuíam um crescimento muito baixo na recuperação, e em 3 gerações foram capazes de se recuperar parcialmente. As duas espécies apresentaram mudanças na assinatura isotópica do $\delta^{13}\text{C}$, resultante da possível acumulação dos compostos do óleo nas células, assim como descrito por Müller *et al.* (2021). Após 7 gerações, *I. galbana* teve o seu valor da assinatura isotópica mais positivo, indicando uma possível biodegradação ou biotransformação dos compostos do óleo. No experimento realizado por Jannuzzi (2023), as células de *D. glynnii* ainda possuíam assinaturas isotópicas próximas as descritas pro óleo, mas um pouco mais positivas quando comparadas ao primeiro experimento, indicando que mesmo lentamente há uma capacidade de recuperação. Assim, pode-se dizer que as duas espécies possuem uma capacidade de recuperação dos impactos causados pelo óleo. Porém, as taxas de recuperação são diferentes, que podem ser reflexo das diferentes concentrações de HPAs e das fisiologias distintas das duas espécies.

Os resultados obtidos e inferências realizadas neste trabalho não podem ser aplicadas diretamente no ambiente, devido a sua complexidade e alta variabilidade genômica do fitoplâncton marinho (Chimetto *et al.*, 2009; LaJeunesse *et al.*, 2010, 2018). Porém, entender as respostas fisiológicas dessas espécies permite-nos afirmar que, em um derrame de óleo, a composição química das microalgas pode mudar (Fiori *et al.*, 2016; Overton *et al.*, 2020), e o

impacto no crescimento de *D. glynnii* por substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas pode acabar desbalanceando a relação entre os corais e as zooxantelas, causando branqueamento, e conseqüentemente um efeito cascata para os ecossistemas recifais (Müller *et al.*, 2021). Além disso, o aporte de HPAs no ambiente pode alterar a estrutura da comunidade fitoplanctônica, além de causar diminuição de taxas fotossintéticas, o que altera a produção primária marinha (Ben Othman *et al.*, 2018, 2023; Echeveste; Agustí; Dachs, 2011), causando assim um efeitos bottom-up na cadeia alimentar, induzido pela toxicidade dos HPAs, que acaba desbalanceando o ecossistema (Li *et al.*, 2020).

7 CONCLUSÃO

A presença de compostos orgânicos mutagênicos/carcinogênicos no meio de cultivo ocasiona em diferenças no crescimento do dinoflagelado *D. glynnii* e da haptófita *I. galbana*, associado a mudanças nas assinaturas isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ das células, sendo reflexo de uma possível bioacumulação dos compostos. Uma maior capacidade de tolerância a esses compostos foi conferida a *I. galbana*, baseado no valor de EC_{50} das duas espécies. As espécies possuem uma capacidade de recuperação dos impactos causados pelos HPAs, mesmo que em taxas diferentes. *I. galbana* mostrou-se com uma maior capacidade de recuperação, com uma total normalização das taxas de crescimento e assinaturas isotópicas em 7 gerações populacionais. Dessa forma, conclui-se que dentre essas duas espécies, *I. galbana* possui uma maior capacidade de tolerância e recuperação aos impactos dos HPAs nas condições criadas neste trabalho, sendo reflexo das afirmações que microalgas que vivem em ambientes oligotróficos são mais sensíveis a variações ambientais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLF, Jason E.; BACHVAROFF, Tsvetan R.; PLACE, Allen R. ENVIRONMENTAL MODULATION OF KARLOTOXIN LEVELS IN STRAINS OF THE COSMOPOLITAN DINOFLAGELLATE, KARLODINIUM VENEFICUM (DINOPHYCEAE)(1). **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 176–192, 2009.

AGOSTINI, Vanessa Ochi *et al.* A review on the effects of antimicrobials use in cultures of planktonic organisms: a procedure for ecological experiments. **Latin american journal of aquatic research**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 394–415, 2019.

AKINYEMI; OJUAWO. The effects of Cefixime and Aspirin on phytoplankton community structure and dynamics: A Mesocosm approach. **Journal of Applied Science, Information and Computing**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 8–16, 2024.

AKSMANN, Anna; TUKAJ, Zbigniew. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: a fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain. **Chemosphere**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 26–32, 2008.

ALKHAMIS, Yousef; QIN, Jian G. Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 983465, 2013.

ALLAKHVERDIEV, Suleyman I. Optimising photosynthesis for environmental fitness. **Functional plant biology: FPB**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. iii–vii, 2020.

AMANGELSIN, Yernar *et al.* The Impact of Tetracycline Pollution on the Aquatic Environment and Removal Strategies. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 440, 2023.

ANDERSSON, MGI *et al.* Effects of sterilization on composition and bacterial utilization of dissolved organic carbon from lakes. **Aquatic Microbial Ecology**, [s. l.], v. 82, 2018.

ANKENY, Rachel A.; LEONELLI, Sabina. **Model Organisms**. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. (Elements in the Philosophy of Biology). Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/elements/model-organisms/F895B26EAC0373BCA5A138835AC73AEA>. Acesso em: 27 fev. 2024.

ANKENY, Rachel A.; LEONELLI, Sabina. What's so Special About Model Organisms?. **Studies in History and Philosophy of Science Part A**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 313–323, 2011.

ARAÚJO, Maria Elisabeth de; RAMALHO, Cristiano Wellington Noberto; MELO, Paulo Wanderley de. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 36, p. e00230319, 2020.

ARRUDA-SANTOS, Roxanny Helen de *et al.* Sewage contamination assessment in an urbanized tropical estuary in Northeast Brazil using elemental, isotopic and

molecular proxies. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, [s. l.], v. 317, p. 120726, 2023.

ARRUDA-SANTOS, Roxanny *et al.* Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 624, p. 935–944, 2017.

ASGHARI, S. *et al.* Effects of phenanthrene on growth parameters and antioxidant systems in the green microalga *Chlorella vulgaris*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 3405–3411, 2018.

ASGHARI, S. *et al.* Potential of the green microalga *Chlorella vulgaris* to fight against fluorene contamination: evaluation of antioxidant systems and identification of intermediate biodegradation compounds. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 411–419, 2020.

ASHOK, Ananya *et al.* Accumulation of ¹³C-labelled phenanthrene in phytoplankton and transfer to corals resolved using cavity ring-down spectroscopy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 196, p. 110511, 2020.

ASTASHEV, Maxim; SEROV, Dmitriy; GUDKOV, Sergey. Application of Spectral Methods of Analysis for Description of Ultradian Biorhythms at the Levels of Physiological Systems, Cells and Molecules (Review). **Mathematics**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 3307, 2023.

BAERT, Jan M. *et al.* Biodiversity increases functional and compositional resistance, but decreases resilience in phytoplankton communities. **Ecology**, [s. l.], v. 97, n. 12, p. 3433–3440, 2016.

BAGATINI, Inessa Lacativa *et al.* Protozooplankton and its relationship with environmental conditions in 13 water bodies of the Mogi-Guaçu basin - SP, Brazil. **Biota Neotropica**, [s. l.], v. 13, p. 152–163, 2013.

BAHO, Didier L. *et al.* Phytoplankton size- and abundance-based resilience assessments reveal nutrient rather than water level effects. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 746, p. 141110, 2020.

BAKER, Andrew C. *et al.* Coral reefs: corals' adaptive response to climate change. **Nature**, [s. l.], v. 430, n. 7001, p. 741, 2004.

BECKER, S.; HIRNER, A. V. Characterisation of Crude Oils by Carbon and Sulphur Isotope Ratio Measurements as a Tool for Pollution Control. **Isotopes in Environmental and Health Studies**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 255–264, 1998.

BEN OTHMAN, Hiba *et al.* Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on marine and freshwater microalgae – A review. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 441, p. 129869, 2023.

BEN OTHMAN, Hiba *et al.* Structural and functional responses of coastal marine phytoplankton communities to PAH mixtures. **Chemosphere**, [s. l.], v. 209, p. 908–919, 2018.

BENTALEB, I. *et al.* Organic carbon isotopic composition of phytoplankton and sea-surface pCO₂ reconstructions in the Southern Indian Ocean during the last 50,000 yr. **Organic Geochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 4, International Meeting on Organic Geochemistry, p. 399–410, 1996.

BERKELMANS, Ray; VAN OPPEN, Madeleine J.H. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a ‘nugget of hope’ for coral reefs in an era of climate change. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 273, n. 1599, p. 2305–2312, 2006.

BERRY, J. A. Studies of Mechanisms Affecting the Fractionation of Carbon Isotopes in Photosynthesis. *In*: , 1989, New York, NY. (P. W. Rundel, J. R. Ehleringer, & K. A. Nagy, Org.) **Stable Isotopes in Ecological Research**. New York, NY: Springer, 1989. p. 82–94.

BI, Mo *et al.* The impact of economics and urbanisation on marine fisheries sustainability in West Africa. **Chemistry and Ecology**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1053–1070, 2023.

BIDLE, Kay D. Programmed Cell Death in Unicellular Phytoplankton. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 13, p. R594–R607, 2016.

BIRKELAND, Charles. **Life and Death of Coral Reefs**. 1997^a edição. New York: Springer, 1997.

BISWAS, Haimanti. A story of resilience: Arctic diatom *Chaetoceros gelidus* exhibited high physiological plasticity to changing CO₂ and light levels. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, p. 1028544, 2022.

BLACK, John J.; MACCUBBIN, Alexander E.; JOHNSTON, Carl J. Carcinogenicity of benzo[a]pyrene in rainbow trout resulting from embryo microinjection. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 297–308, 1988.

BLANK, Rudolf J.; HUSS, Volker A. R. DNA divergency and speciation in *Symbiodinium* (Dinophyceae). **Plant Systematics and Evolution**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 153–163, 1989.

BLOWES, Shane A. *et al.* The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 366, n. 6463, p. 339–345, 2019.

BOEHM, Paul D.; MURRAY, Karen J.; COOK, Linda L. Distribution and Attenuation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Gulf of Mexico Seawater from the Deepwater Horizon Oil Accident. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 584–592, 2016.

BOJES, Heidi K.; POPE, Peter G. Characterization of EPA’s 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated

contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 288–295, 2007.

BONTEMPO FILHO, Eduardo B. *et al.* Temporal monitoring of contamination in three sandy beaches from the 2019 oil spill near Cabo de Santo Agostinho, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 94, p. e20210513, 2022.

BORAZJANI, S. *et al.* Composition changes of hydrocarbons during secondary petroleum migration. **The APPEA Journal**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 784, 2018.

BOUCKAERT, Remco *et al.* BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLOS Computational Biology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.

BOUSSIBA, Sammy *et al.* Outdoor cultivation of the marine microalga *Isochrysis galbana* in open reactors. **Aquaculture**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 247–253, 1988.

BRUTEMARK, Andreas *et al.* Carbon isotope signature variability among cultured microalgae: Influence of species, nutrients and growth. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s. l.], v. 372, n. 1, p. 98–105, 2009.

BURKHARDT, Steffen; RIEBESELL, Ulf; ZONDERVAN, Ingrid. Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 63, n. 22, p. 3729–3741, 1999a.

BURKHARDT, Steffen; RIEBESELL, Ulf; ZONDERVAN, Ingrid. Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton in response to daylength, growth rate, and CO₂ availability. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 184, p. 31–41, 1999b.

BUSTAMAM, Muhammad Safwan Ahamad *et al.* The Immunostimulant Effects of *Isochrysis galbana* Supplemented Diet on the Spleen of Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis spp.*) Evaluated by Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics. **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 2022, p. 1–22, 2022.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. *et al.* A new culture medium based on genetic algorithms for *Isochrysis galbana* production relevant to hatcheries. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 3647–3656, 2021.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. *et al.* Use of continuous culture to develop an economical medium for the mass production of *Isochrysis galbana* for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 851–863, 2020.

CARLOS, Alvin A. *et al.* Phylogenetic Position of Symbiodinium (dinophyceae) Isolates from Tridacnids (bivalvia), Cardiids (bivalvia), a Sponge (porifera), a Soft Coral (anthozoa), and a Free-Living Strain. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1054–1062, 1999.

CARPENTER, Stephen R.; PACE, Michael L.; WILKINSON, Grace M. DOC, grazers, and resilience of phytoplankton to enrichment. **Limnology and Oceanography Letters**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 466–474, 2022.

CARVALHO, Matheus C.; SCHULZ, Kai G.; EYRE, Bradley D. Respiration of new and old carbon in the surface ocean: Implications for estimates of global oceanic gross primary productivity. **Global Biogeochemical Cycles**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 975–984, 2017.

CERNIGLIA, C.; BAALEN, C.; GIBSON, David. Metabolism of Naphthalene by the Cyanobacterium *Oscillatoria* sp., Strain JCM. **Microbiology-sgm**, [s. l.], v. 116, p. 485–494, 1980.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T.; VAN BAALEN, C. Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. **Microbiology**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 495–500, 1980.

CHARTRAND, Michelle M. G.; MESTER, Zoltan. Carbon isotope measurements of foods containing sugar: A survey. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 300, p. 125106, 2019.

CHEN, Wenzhong; ZHANG, Tinglu; GUAN, Lei. Radiation Transfer in the Ocean and Ocean Color. *In*: REFERENCE MODULE IN EARTH SYSTEMS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES. [S. l.: s. n.], 2017.

CHIMETTO, L.A. *et al.* Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanths (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 106, n. 6, p. 1818–1826, 2009.

CHIN, L. K. *et al.* Protozoon classifications based on size, shape and refractive index using on-chip immersion refractometer. **2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference**, Beijing, China, p. 771–774, 2011.

CLAYTON, C. J. Effect of maturity on carbon isotope ratios of oils and condensates. **Organic Geochemistry**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 887–899, 1991.

CLOERN, James E. Turbidity as a control on phytoplankton biomass and productivity in estuaries. **Continental Shelf Research**, [s. l.], v. 7, n. 11, Dynamics of Turbid Coastal Environments, p. 1367–1381, 1987.

COLLOS, Yves. Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 193–206, 1986.

COLOMBO, Juan C. *et al.* Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 888–894, 1989.

CORREA PABÓN, Rosa Elvira; SOUZA FILHO, Carlos Roberto de. Crude oil spectral signatures and empirical models to derive API gravity. **Fuel**, [s. l.], v. 237, p. 1119–1131, 2019.

COSTA, Gisely Karla de Almeida *et al.* Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and histological changes in *Anomalocardia brasiliensis* and *Crassostrea rhizophorae* from Pernambuco, Brazil after the 2019 oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 192, p. 115066, 2023.

CUNHA, Davi Gasparini F.; CALIJURI, Maria do Carmo. Limiting factors for phytoplankton growth in subtropical reservoirs: the effect of light and nutrient availability in different longitudinal compartments. **Lake and Reservoir Management**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 162–172, 2011.

DA S. MOREIRA, Thayane Cristina *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater after the mysterious oil spill of 2019 on the Pernambuco coast, northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 203, p. 116395, 2024.

DANISH AHMAD, Ansari Vikhar *et al.* Computational biology approach to predict molecular mechanism in cancer. **Oral Oncology Reports**, [s. l.], v. 12, p. 100651, 2024.

DE KEERSMAECKER, Wanda *et al.* A model quantifying global vegetation resistance and resilience to short-term climate anomalies and their relationship with vegetation cover. **Global Ecology and Biogeography**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 539–548, 2015.

DE OLIVEIRA, Olívia M. C. *et al.* Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 160, p. 111597, 2020.

DE OLIVEIRA ALVES, Nilmara *et al.* Biomass burning in the Amazon region: Aerosol source apportionment and associated health risk assessment. **Atmospheric Environment**, [s. l.], v. 120, p. 277–285, 2015.

DELL'ANNO, Filippo *et al.* Bacteria, Fungi and Microalgae for the Bioremediation of Marine Sediments Contaminated by Petroleum Hydrocarbons in the Omics Era. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1695, 2021.

DESCOLAS-GROS, C.; FONTUGNE, M. R. Carbon fixation in marine phytoplankton: carboxylase activities and stable carbon-isotope ratios; physiological and paleoclimatological aspects. **Marine Biology**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 1–6, 1985.

DESCOLAS-GROS, C.; FONTUNGNE, M. Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton during photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 207–218, 1990.

DIAZ VILLANUEVA, Veronica *et al.* Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. **Biofouling**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 59–71, 2011.

DING, Junnan *et al.* Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in a rural Chinese home through biomass fuelled cooking. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 169, Interactions Between Indoor and Outdoor Air Pollution - Trends and Scientific Challenges, p. 160–166, 2012.

DOKULIL, Martin T.; TEUBNER, Katrin. Long-term adjustment of phytoplankton structure to environmental traits at timescales during lifetime development and over generations. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 851, n. 4, p. 823–847, 2024.

DOUGLAS, Gregory S. *et al.* 17 - Advantages of quantitative chemical fingerprinting in oil spill identification and allocation of mixed hydrocarbon contaminants. *In*: STOUT, Scott A.; WANG, Zhendi (org.). **Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2016. p. 789–847. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128038321000179>. Acesso em: 18 set. 2024.

DUARTE, Joyce Auxiliadora Paiva *et al.* Emerging contaminants in the aquatic environment: phytoplankton structure in the presence of sulfamethoxazole and diclofenac. **Environmental Science and Pollution Research International**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 46604–46617, 2023.

ECHEVESTE, Pedro; AGUSTÍ, Susana; DACHS, Jordi. Cell size dependence of additive versus synergetic effects of UV radiation and PAHs on oceanic phytoplankton. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, [s. l.], v. 159, n. 5, p. 1307–1316, 2011.

ECHEVESTE, Pedro; AGUSTÍ, Susana; DACHS, Jordi. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 299–307, 2010.

EL-SHEEKH, Mostafa *et al.* Comparative Studies on the Green Algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with Respect to Oil Pollution in the River Nile. **Water Air and Soil Pollution**, [s. l.], v. 124, p. 187–204, 2000.

EL-TOHAMY, Wael S. *et al.* Protozoan communities serve as a strong indicator of water quality in the Nile River. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 16382, 2024.

ESCOBAR, Herton. Mystery oil spill threatens marine sanctuary in Brazil. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 366, n. 6466, p. 672, 2019.

ESEN, Fatma; EVCI, Yildiz M.; TASDEMIR, Yucel. Evaluation and application of a passive air sampler for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, [s. l.], v. 52, n. 10, p. 1022–1029, 2017.

FALINSKI, K. Effects Of Different Aeration Conditions On Isochrysis Galbana (T-Iso) Ccmp 1324 In A Bench-Scale Photobioreactor. *In*: , 2009. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Effects-Of->

Different-Aeration-Conditions-On-Galbana-Falinski/9e38c19c81c61aec2262b34cd203826985a1c385. Acesso em: 12 fev. 2025.

FALKOWSKI, P. *et al.* The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 290, n. 5490, p. 291–296, 2000.

FAST, Olive *et al.* Limited sterile processing capabilities for safe surgery in low-income and middle-income countries: experience in the Republic of Congo, Madagascar and Benin. **BMJ Global Health**, [s. l.], v. 2, n. Suppl 4, p. e000428, 2017.

FAY, S. A.; WEBER, M. X.; LIPPS, J. H. The distribution of Symbiodinium diversity within individual host foraminifera. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 717–726, 2009.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Cristina *et al.* Phytoplankton responses to changing temperature and nutrient availability are consistent across the tropical and subtropical Atlantic. **Communications Biology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–13, 2022.

FIELD, C. B. *et al.* Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 281, n. 5374, p. 237–240, 1998.

FIORI, Emanuela *et al.* A new approach to assess the effects of oil spills on phytoplankton community during the “Serious Game” experiment (MEDESS-4MS Project). **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, [s. l.], v. 133, Physical, chemical and biological observations and modelling of oil spills in the Mediterranean Sea, p. 76–87, 2016.

FIRDAUS, F; PIN, T G; SUPRIATNA. Distribution of phytoplankton using remote sensing in Cimandiri Estuary, Sukabumi, West Java. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 481, n. 1, p. 012066, 2020.

FRY, Brian. Isotope Notation and Measurement. *In*: FRY, Brian (org.). **Stable Isotope Ecology**. New York, NY: Springer, 2006. p. 21–39. Disponível em: https://doi.org/10.1007/0-387-33745-8_2. Acesso em: 13 fev. 2025.

GALINDO, A. *et al.* Antioxidant capacity and lipid composition of *Brachionus plicatilis* and *Artemia* enriched with a mixture of different post-processing formats of *Navicula salinicola* and *Isochrysis galbana* and lipid emulsions. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 1751–1765, 2024.

GAURAV, Gajendra Kumar *et al.* Review on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) migration from wastewater. **Journal of Contaminant Hydrology**, [s. l.], v. 236, p. 103715, 2021.

GE, Jianzhong *et al.* Influence of suspended sediment front on nutrients and phytoplankton dynamics off the Changjiang Estuary: A FVCOM-ERSEM coupled model experiment. **Journal of Marine Systems**, [s. l.], v. 204, p. 103292, 2020.

GHOSAL, Debajyoti *et al.* Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01369/full>. Acesso em: 14 fev. 2025.

GOLDMAN, Joel C.; MCCARTHY, James J.; PEAHEY, Dwight G. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. **Nature**, [s. l.], v. 279, n. 5710, p. 210–215, 1979.

GONZÁLEZ, J. J. *et al.* Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the *Prestige* oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 53, n. 5, The Prestige Oil Spill: A Scientific Response, p. 250–259, 2006.

GONZÁLEZ-OLALLA, Juan Manuel *et al.* Regulation of Phagotrophy by Prey, Low Nutrients, and Low Light in the Mixotrophic Haptophyte *Isochrysis galbana*. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 981–993, 2021.

GONZÁLEZ-PECH, Raúl A. *et al.* Comparison of 15 dinoflagellate genomes reveals extensive sequence and structural divergence in family Symbiodiniaceae and genus Symbiodinium. **BMC Biology**, [s. l.], v. 19, p. 73, 2021.

GRANADOS-CIFUENTES, Camila *et al.* Genetic diversity of free-living Symbiodinium in the Caribbean: the importance of habitats and seasons. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 927–939, 2015.

GUILLARD, Robert R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *In*: SMITH, Walter L.; CHANLEY, Matoira H. (org.). **Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport**. Boston, MA: Springer US, 1975. p. 29–60. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3. Acesso em: 8 jan. 2025.

GUILLARD, R. R.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 229–239, 1962.

GUSMAO, Joao Bosco *et al.* The barnacle *Chthamalus bisinuatus* is the only sessile invertebrate colonizing oil patches on beachrocks one year after a massive oil spill on the Northeastern Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 173, p. 112952, 2021.

HÄDER, Donat-P.; GAO, Kunshan. Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. **Frontiers in Environmental Science**, [s. l.], v. 3, 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/environmental-science/articles/10.3389/fenvs.2015.00014/full>. Acesso em: 18 jan. 2025.

HASSAAN, Mohamed A. *et al.* *n*-Alkanes and PAHs baseline distributions and sources in the sediments of the Nile Delta coast of the southeastern Mediterranean. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 194, p. 115262, 2023.

HAYES, J.M. Factors controlling ^{13}C contents of sedimentary organic compounds: Principles and evidence. **Marine Geology**, [s. l.], v. 113, n. 1–2, p. 111–125, 1993.

HE, Qing *et al.* Critical assessment of protozoa contamination and control measures in mass culture of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 359, p. 127460, 2022.

HEDGES, John I.; STERN, Jeffrey H. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 657–663, 1984.

HENDRICKS, J. D. *et al.* Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 839–851, 1985.

HILLEBRAND, Helmut *et al.* Cell size as driver and sentinel of phytoplankton community structure and functioning. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 276–293, 2022.

HITCHCOCK, James N. Microplastics can alter phytoplankton community composition. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 819, p. 153074, 2022.

HOTOS, George N.; BEKIARI, Vlasoula. Absorption Spectra as Predictors of Algal Biomass and Pigment Content of the Cultured Microalgae *Amphidinium carterae*, *Isochrysis galbana*, *Nephroselmis* sp., and *Anabaena* sp. **International Journal of Plant Biology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 879–895, 2023.

HSU, Chang *et al.* Biomarker Analysis in Petroleum Exploration. *In*: [S. l.: s. n.], 2003. p. 223–245.

HUTCHINSON, T. C. *et al.* The Correlation of the Toxicity to Algae of Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons with their Physical-Chemical Properties. *In*: AFGHAN, B. K. *et al.* (org.). **Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boston, MA: Springer US, 1980. p. 577–586. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3617-4_45. Acesso em: 11 fev. 2025.

IRION, Uwe; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Developmental genetics with model organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 119, n. 30, p. e2122148119, 2022.

ISMAIL, M. M.; EL ZOKM, G. M. Evaluation of the response of phytoplankton communities to heavy metal stresses using multi-statistical approaches, Alexandria coast, Egypt. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 13595–13608, 2023.

JAHREN, A Hope *et al.* An isotopic method for quantifying sweeteners derived from corn and sugar cane². **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1380–1384, 2006.

JANNUZZI, Luiz Gustavo de Sales. **Avaliação fisiológica da zooxantela *Durusdinium glynnii* à contaminação por petróleo cru.** [S. l.], 2023. bachelorThesis. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/49312>. Acesso em: 11 fev. 2025.

JIN, Meng *et al.* Physiological and morphological responses and tolerance mechanisms of *Isochrysis galbana* to Cr(VI) stress. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 302, p. 122860, 2020.

JOHNSON, Matthew P. Photosynthesis. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 255–273, 2016.

JONES, Eric W. *et al.* First-passage-time statistics of growing microbial populations carry an imprint of initial conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 21340, 2023.

JONES, David S. J. Introduction to Crude Oil and Petroleum Processing. *In*: TREESE, Steven A.; PUJADÓ, Peter R.; JONES, David S. J. (org.). **Handbook of Petroleum Processing**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 3–51. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-14529-7_24. Acesso em: 18 set. 2024.

KARLUSICH, Juan José Pierella; IBARBALZ, Federico M.; BOWLER, Chris. Phytoplankton in the Tara Ocean. **Annual Review of Marine Science**, [s. l.], v. 12, n. Volume 12, 2020, p. 233–265, 2020.

KIMMELMAN, Barbara A. 7. Organisms and Interests in Scientific Research: R. A. Emerson's Claims for the Unique Contributions of Agricultural Genetics. *In*: CLARKE, Adela E.; FUJIMURA, Joan H. (org.). **The Right Tools for the Job: At Work in Twentieth-Century Life Sciences**. [S. l.]: Princeton University Press, 2014. p. 198–232. Disponível em: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9781400863136.198/html?rsrltid=AfmBOoqNckBm21CV6A0bVXWok24_JoXguWeoo5K59uch7JgTwfp5ZOb. Acesso em: 25 jan. 2025.

KIRKELS, Frédérique M. S. A. *et al.* Carbon isotopic ratios of modern C₃ and C₄ vegetation on the Indian peninsula and changes along the plant–soil–river continuum – implications for vegetation reconstructions. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 19, n. 17, p. 4107–4127, 2022.

KIYINGI, Wyclif *et al.* Crude oil wax: A review on formation, experimentation, prediction, and remediation techniques. **Petroleum Science**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 2343–2357, 2022.

KLEIN BRETELER, Wcm *et al.* Stable carbon isotope fractionation in the marine copepod *Temora longicornis*: unexpectedly low $\delta^{13}\text{C}$ value of faecal pellets. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 240, p. 195–204, 2002.

KOHN, Matthew J. Carbon isotope compositions of terrestrial C₃ plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 46, p. 19691–19695, 2010.

KÖK, Mustafa Verşan; VARFOLOMEEV, Mikhail A.; NURGALIEV, Danis K. Wax appearance temperature (WAT) determinations of different origin crude oils by differential scanning calorimetry. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s. l.], v. 168, p. 542–545, 2018.

KORB, R E *et al.* Effects of cell size and specific growth rate on stable carbon isotope discrimination by two species of marine diatom. **MAR ECOL-PROG SER**, [s. l.], v. 143, n. 1–3, p. 283–288, 1996.

KREBS, Hans Adolf; EGGLESTON, Leonard Victor. The oxidation of pyruvate in pigeon breast muscle. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 442–459, 1940.

KRISHNAMOORTHY, G. Fluorescence spectroscopy in molecular description of biological processes. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 147–159, 2003.

KUSK, K. O. Effects of Hydrocarbons on Respiration, Photosynthesis and Growth of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. [s. l.], v. 24, n. 8, p. 413–418, 1981.

LAJEUNESSE, T. C. *et al.* Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 284, p. 147–161, 2004.

LAJEUNESSE, Todd C. *et al.* Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host–symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. **Journal of Biogeography**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 785–800, 2010.

LAJEUNESSE, Todd C. *et al.* Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. **Current Biology**, [s. l.], v. 28, n. 16, p. 2570-2580.e6, 2018.

LAKHANI, Anita. Source apportionment of particle bound polycyclic aromatic hydrocarbons at an industrial location in Agra, India. **TheScientificWorldJournal**, [s. l.], v. 2012, p. 781291, 2012.

LAMONICA, Dominique; PAGEL, Jörn; SCHURR, Frank M. Predicting the dynamics of establishing tree populations: A framework for statistical inference and lessons for data collection. **Methods in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1721–1733, 2021.

LANDAIS, Patrick. *Petroleum Geochemistry and Geology*, Second Edition Edited by John M. Hunt, W. H. Freeman, et al. 1996. ISBN 0-7167-2441-3. 743 pp. **Energy & Fuels**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1314–1314, 1997.

LAUENSTEIN, G. G.; CANTILLO, Adriana Y. Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: 1993-1996 update. [s. l.], Disponível em: <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/22776>. Acesso em: 8 jan. 2025.

LAWS, Edward A. *et al.* Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth rate and [CO₂]_{aq}: Theoretical considerations and experimental results. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1131–1138, 1995.

LEBOULANGER, C. *et al.* Interspecific variability and environmental influence on particulate organic carbon $\delta^{13}\text{C}$ in cultured marine phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 2079–2091, 1995.

LEE, Chung Hyeon *et al.* Impacts of nutrient and marine plastic debris influx on the microalgal community (phytoplankton and periphyton) in Korean temperate coastal waters: Mesocosm study. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 2309–2322, 2023.

LEE, Jinyeop *et al.* Molecular detection of bacterial contamination in plasma using magnetic-based enrichment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, p. 9151, 2022.

LEI, A. P.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Removal of pyrene by different microalgal species. **Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research**, [s. l.], v. 46, n. 11–12, p. 195–201, 2002.

LEJON, Annelies; SAMAEY, Giovanni. Stochastic Modeling and Simulation Methods for Biological Processes: Overview. *In*: STOCHASTIC MODELING AND SIMULATION METHODS FOR BIOLOGICAL PROCESSES, 2016, Cham. (Liesbet Geris & David Gomez-Cabrero, Org.) **Anais [...]**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 75–124. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-21296-8_4. Acesso em: 25 jan. 2025.

LEMOS, Angelo *et al.* Ship Route Oil Spill Modeling: A Case Study of the Northeast Brazil Event, 2019. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 14, p. 865, 2024.

LEVEQUE, Sébastien *et al.* Searching for phylogenetic patterns of Symbiodiniaceae community structure among Indo-Pacific Merulinidae corals. **PeerJ**, [s. l.], v. 7, p. e7669, 2019.

LI, Yanran *et al.* Bottom-up and top-down effects on phytoplankton communities in two freshwater lakes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. e0231357, 2020.

LIASHENKO, O. A.; PEDCHENKO, A. P.; SUSLOPAROVA, O. N. The monitoring of the phytoplankton condition in the Luga Bay of the Gulf of Finland under natural and anthropogenic impacts. *In*: , 2020. **Trudy VNIRO**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 149–163. Disponível em: http://www.vniro.ru/files/trydi_vniro/archive/tv_2020_t_179_article_9.pdf. Acesso em: 18 jan. 2025.

LIMA, Bárbara Alves de *et al.* Pollution profile by n-alkanes in sediment and surface water of the Paranaguá Estuarine Complex. **Caderno Pedagógico**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. e3638–e3638, 2024.

LIN, Yuanyuan *et al.* Environmental DNA metabarcoding revealed the impacts of anthropogenic activities on phytoplankton diversity in Dianchi Lake and its three inflow rivers. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e10088, 2023.

LINCOLN, C. K.; GABRIDGE, M. G. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. **Methods in Cell Biology**, [s. l.], v. 57, p. 49–65, 1998.

LIRA-GALEANA, C.; HAMMAMI, A. Chapter 21 Wax Precipitation from Petroleum Fluids: A Review. *In*: YEN, Teh Fu; CHILINGARIAN, George V. (org.). **Developments in Petroleum Science**. [S. l.]: Elsevier, 2000. (Asphaltenes and Asphalts, 2). v. 40, p. 557–608. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376736109702924>. Acesso em: 11 set. 2024.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; MAZZONI, R.; REZENDE, C. F. Effects of riparian forest removal on the trophic dynamics of a Neotropical stream fish assemblage. **Journal of Fish Biology**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 50–64, 2016.

LOIS, E.; KEATING, E. L.; GUPTA, A. K. Fuels. *In*: MEYERS, Robert A. (org.). **Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2003. p. 275–314. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122274105002684>. Acesso em: 18 set. 2024.

LORRAIN, Anne *et al.* Decarbonation and preservation method for the analysis of organic C and N contents and stable isotope ratios of low-carbonated suspended particulate material. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 491, n. 2, p. 125–133, 2003.

LOURENÇO, Rafael André *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 156, p. 111219, 2020.

MACAYA, Constanza C. *et al.* Bioremediation of Petroleum. [s. l.], p. B9780128096338208108, 2019.

MADHU, K. *et al.* Marine Microalgae: Culture and their Industrial Applications. *In*: MARINE MICROALGAE, 2018. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Marine-Microalgae%3A-Culture-and-their-Industrial-Madhu-Madhu/8feeb87ae55abc2c4e0715e083c605f93bf2f980>. Acesso em: 29 jan. 2025.

MAGRIS, Rafael Almeida; GIARRIZZO, Tommaso. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 153, p. 110961, 2020.

MAI, Guangming *et al.* Acutely Rising Temperature Reduces Photosynthetic Capacity of Phytoplankton Assemblages in Tropical Oceans: A Large-Scale Investigation. *In*: ACUTELY RISING TEMPERATURE REDUCES PHOTOSYNTHETIC CAPACITY OF PHYTOPLANKTON ASSEMBLAGES IN TROPICAL OCEANS, 2021. **Frontiers in Marine Science**. [S. l.: s. n.], 2021. p.

710697. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.710697/full>. Acesso em:
18 jan. 2025.

MARWOOD, C. A. *et al.* Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 322–327, 1999.

MCCANN, Kevin Shear. The diversity–stability debate. **Nature**, [s. l.], v. 405, n. 6783, p. 228–233, 2000.

MEDEIROS, Patricia Matheus; CARUSO BÍCEGO, Márcia. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP—Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 761–769, 2004.

MEHARIYA, Sanjeet *et al.* Microalgae: A potential bioagent for treatment of emerging contaminants from domestic wastewater. **Chemosphere**, [s. l.], v. 351, p. 141245, 2024.

MICHAELS, Robert. **Polychlorinated Biphenyl Toxicity to Two Phytoplankters as a Function of Environmental Conditions**. 1979. [s. l.], 1979.

MILLERO, Frank J. **Chemical oceanography**. 4th eded. Boca Raton: Taylor & Francis, 2013.

MISHRA, Neha; PRASAD, Sheo Mohan; MISHRA, Neetu. Influence of High Light Intensity and Nitrate Deprivation on Growth and Biochemical Composition of the Marine Microalgae *Isochrysis galbana*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 62, p. e19180398, 2019.

MOHAMED ABDOUL-LATIF, Fatouma *et al.* Production of Fucoxanthin from Microalgae *Isochrysis galbana* of Djibouti: Optimization, Correlation with Antioxidant Potential, and Bioinformatics Approaches. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 358, 2024.

MONA, Sharma; KAUSHIK, Anubha; KAUSHIK, C. P. Biosorption of reactive dye by waste biomass of *Nostoc linckia*. **Ecological Engineering**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1589–1594, 2011.

MONOD, Jacques. THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. Volume 3, 1949, p. 371–394, 1949.

MONSALVE, B.; RAFAEL, J. Primary producers and future ocean scenarios: effect of environmental change on biomolecular composition of phytoplankton and transference to higher trophic levels. *In*: PRIMARY PRODUCERS AND FUTURE OCEAN SCENARIOS, 2014. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Primary-producers-and-future-ocean-scenarios-%3A-of-Monsalve->

Rafael/af08755c6a75738d175e705c05c131e61d5f637b. Acesso em: 18 jan. 2025.

MOODY, J. D. *et al.* Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 1476–1483, 2001.

MORTAIN-BERTRAND, A. Photosynthetic metabolism of an antarctic diatom and its physiological responses to fluctuations in light. **Polar Biology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 53–60, 1988.

MOURA, Jéssica Alessandra da Silva; YOGUI, Gilvan Takeshi. Limpeza e preparação de vidrarias para análise de compostos orgânicos. **LIMPEZA E PREPARAÇÃO DE VIDRARIAS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**, [s. l.], v. 1, p. 6, 2012.

MÜLLER, Marius Nils *et al.* Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 289, p. 117938, 2021.

MÜLLER, Marius Nils *et al.* Finding the needle in a haystack: Evaluation of ecotoxicological effects along the continental shelf break during the Brazilian mysterious oil spill. **Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)**, [s. l.], v. 357, p. 124422, 2024.

MÜLLER, Marius; TRULL, TW; HALLEGRAEFF, Gustaaf. Differing responses of three Southern Ocean *Emiliana huxleyi* ecotypes to changing seawater carbonate chemistry. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 531, 2015.

MULLER-PARKER, Gisèle; D'ELIA, Christopher F.; COOK, Clayton B. Interactions Between Corals and Their Symbiotic Algae. *In*: BIRKELAND, Charles (org.). **Coral Reefs in the Anthropocene**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 99–116. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5_5. Acesso em: 12 jul. 2023.

MUSCATINE, L.; PORTER, James W. Reef Corals: Mutualistic Symbioses Adapted to Nutrient-Poor Environments. **BioScience**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 454–460, 1977.

NA, Byungjoon *et al.* Verification of a method using magnetic bead enrichment and nucleic acid extraction to improve the molecular detection of bacterial contamination in blood components. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e02760-23,

NEFF, J. M.; STUBBLEFIELD, W. A. Chemical and Toxicological Evaluation of Water Quality Following the Exxon Valdez Oil Spill. [s. l.], 1995. Disponível em: <https://asmedigitalcollection.asme.org/astm-ebooks/book/1888/chapter/27858256/Chemical-and-Toxicological-Evaluation-of-Water>. Acesso em: 11 fev. 2025.

NETO, José; WALLNER-KERSANACH, Monica; PATCHINEELAM, Soraya. **Poluição Marinha**. [S. l.: s. n.], 2008.

NUNES, Beatriz *et al.* Marine Protected Areas Affected by the most extensive Oil Spill on the Southwestern Atlantic coast. **Ocean and Coastal Research**, [s. l.], v. 71, p. e23028, 2023.

NUNES, Patrícia *et al.* Responses of Phytoplanktonic Chlorophyll-a Composition to Inorganic Turbidity Caused by Mine Tailings. **Frontiers in Environmental Science**, [s. l.], v. 9, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/environmental-science/articles/10.3389/fenvs.2021.605838/full>. Acesso em: 18 set. 2024.

OKAY, O. S. *et al.* The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 103–113, 2000.

OLIVEIRA, Sérgio Lourenço. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – RiMa Editora. *In*: 2007. Disponível em: <https://editorarima.com.br/produto/cultivo-de-microalgas-marinhas-principios-e-aplicacoes/>. Acesso em: 12 fev. 2025.

OLIVEIRA DOS ANJOS, Talles Bruno *et al.* Differences in phytoplankton population vulnerability in response to chemical activity of mixtures. **Environmental Science. Processes & Impacts**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 2062–2075, 2024.

ORTIZ NETO, José Benedito; COSTA, Armando João Dalla. A Petrobrás e a exploração de petróleo offshore no Brasil: um approach evolucionário. **Revista Brasileira de Economia**, [s. l.], v. 61, p. 95–109, 2007.

OSBORNE, Colin P; BEERLING, David J. Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 361, n. 1465, p. 173–194, 2006.

OTHMAN, Hiba Ben *et al.* Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: Does cell size really matter? **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 243, p. 204–211, 2012.

OVERTON, Edward B. *et al.* Spilled Oil Composition and the Natural Carbon Cycle: The True Drivers of Environmental Fate and Effects of Oil Spills. *In*: MURAWSKI, Steven A. *et al.* (org.). **Scenarios and Responses to Future Deep Oil Spills: Fighting the Next War**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 33–56. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-12963-7_3. Acesso em: 14 fev. 2025.

OWEN, Bianca M. *et al.* Reporting of methods for automated devices: A systematic review and recommendation for studies using FlowCam for phytoplankton. **Limnology and Oceanography: Methods**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 400–427, 2022.

PALMER, Molly A. *et al.* Light and nutrient control of photosynthesis in natural phytoplankton populations from the Chukchi and Beaufort seas, Arctic Ocean. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 2185–2205, 2013.

PALUSZAK, Zbigniew *et al.* Deodorizing bacterial consortium: community analysis of biofilms and leachate water collected from an air biofiltration system in a piggery. **Environmental Science and Pollution Research International**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 18993–19001, 2024.

PARK, Jun Young *et al.* Trophic Enrichment Factors of Carbon and Nitrogen Isotopic Ratios ($\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) in Four Marine Ciliates. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.721157/full>. Acesso em: 13 fev. 2025.

PARKE, Mary. Studies on Marine Flagellates. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 255–286, 1949.

PATEL, Miral; J.I., Nirmal; TIWARI, K.K. Chronic toxic effect of Acenaphthene on diverse microalgae and cyanobacteria: *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Desmodesmus subspicatus* Chodat and *Scytonema* sp. [s. l.], 2014.

PEARLMAN, Robert S.; YALKOWSKY, Samuel H.; BANERJEE, Sujit. Water Solubilities of Polynuclear Aromatic and Heteroaromatic Compounds. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 555–562, 1984.

PEI, Haiyan *et al.* Resilience and resistance: powers help phytoplankton to keep spatial heterogeneity during long-term intermittent water diversion. *In*: RESILIENCE AND RESISTANCE, 2021. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-999849/v1>. Acesso em: 27 jan. 2025.

PÉREZ, P.; FERNÁNDEZ, E.; BEIRAS, R. Fuel toxicity on *Isochrysis galbana* and a coastal phytoplankton assemblage: Growth rate vs. variable fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 254–261, 2010.

PÉREZ, Patricia; FERNÁNDEZ, Emilio; BEIRAS, Ricardo. Use of Fast Repetition Rate Fluorometry on Detection and Assessment of PAH Toxicity on Microalgae. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s. l.], v. 209, n. 1, p. 345–356, 2010.

PÉREZ-MORALES, Alfredo; A., Martínez-López; CAMALICH, Jaime. Dry weight, carbon, C/N ratio, hydrogen, and chlorophyll variation during exponential growth of selected microalgae species used in aquaculture. **CICIMAR Oceánides**, [s. l.], v. 30, p. 33–43, 2015.

PFLUGMACHER, Stephan; SANDERMANN, Heinrich. Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 123–128, 1998.

PLACE, Allen R. *et al.* *Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite. **Harmful Algae**, [s. l.], v. 14, Harmful Algae--The requirement for species-specific information, p. 179–195, 2012.

PRADHAN, Biswajita; KI, Jang-Seu. Phytoplankton Toxins and Their Potential Therapeutic Applications: A Journey toward the Quest for Potent Pharmaceuticals. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 271, 2022.

QUIGLEY, Kate M. *et al.* Symbioses are restructured by repeated mass coral bleaching. **Science Advances**, [s. l.], v. 8, n. 49, p. eabq8349, 2022.

RABELO, Emanuelle Fontenele *et al.* Symbiodinium diversity associated with zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) in Northeastern Brazil. [s. l.], 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/63578>. Acesso em: 30 jan. 2025.

RADCHENKO, A. I. *et al.* [The localization and functional significance of arylsulfatases in parasitic sarcosporidian protozoa in the tissue-cyst life cycle phase]. **Tsitologiya**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 435–441, 1997.

RANDALL, Carly J. *et al.* Sexual production of corals for reef restoration in the Anthropocene. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 635, p. 203–232, 2020.

RAVEN, J. A.; GLIDEWELL, S. M. C⁴ characteristics of photosynthesis in the C₃ alga *Hydrodictyon africanum*. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 185–197, 1978.

RAVEN, John A.; SUGGETT, David J.; GIORDANO, Mario. Inorganic carbon concentrating mechanisms in free-living and symbiotic dinoflagellates and chromerids. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 1377–1397, 2020.

REDDY, Christopher M; QUINN, James G. GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the *North Cape* oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 126–135, 1999.

REDFIELD, Alfred C. **On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton**. [S. l.]: University Press of Liverpool, 1934.

REDFIELD, A. C.; KETCHUM, B. H.; RICHARDS, F. A. The influence of organisms on the composition of sea-water. *In*: , 1963. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 1963. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-influence-of-organisms-on-the-composition-of-Redfield-Ketchum/6dd84bd0edba9c92d03c57d6bea2d4e07093ea80>. Acesso em: 16 fev. 2025.

RELITTI, Federica *et al.* Stable Carbon Isotopes of Phytoplankton as a Tool to Monitor Anthropogenic CO₂ Submarine Leakages. **Water**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 3573, 2020.

REYNOLDS, C. S. (org.). Phytoplankton. *In*: **The Ecology of Phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. (Ecology, Biodiversity and Conservation). p. 1–37. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/ecology-of-phytoplankton/phytoplankton/0D22F4D109C2CF50A358358D5C424E14>. Acesso em: 18 jan. 2025.

RICCARDI, Demian *et al.* Development of effective quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) methods for complex biological

processes. **The Journal of Physical Chemistry. B**, [s. l.], v. 110, n. 13, p. 6458–6469, 2006.

RÍOS, A. F. *et al.* Chemical composition of phytoplankton and Particulate Organic Matter in the Ría de Vigo (NW Spain). **Scientia Marina**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 257–271, 1998.

ROBERTS, Karen *et al.* C3 and C4 Pathways of Photosynthetic Carbon Assimilation in Marine Diatoms Are under Genetic, Not Environmental, Control. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 230–235, 2007.

ROHIM, Rabiatul Adawiyah Abdul *et al.* Modeling the Growth of Bacteria *Streptococcus sobrinus* Using Exponential Regression. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, [s. l.], v. 20, p. e5380, 2020.

ROOPNARAIN, A.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 156, p. 408–411, 2014.

ROSETH, Svein *et al.* Comparison of acute toxicity of process chemicals used in the oil refinery industry, tested with the diatom *Chaetoceros Gracilis*, the flagellate *Isochrysis Galbana*, and the zebra fish, *Brachydanio Rerio*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1211–1217, 1996.

ROWAN, Rob. Review—Diversity and Ecology of Zooxanthellae on Coral Reefs. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 407–417, 1998.

ROWAN, R.; POWERS, D. A. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 251, n. 4999, p. 1348–1351, 1991.

RUSSNAK, Vanessa; RODRIGUEZ-LANETTY, Mauricio; KARSTEN, Ulf. Photophysiological Tolerance and Thermal Plasticity of Genetically Different Symbiodiniaceae Endosymbiont Species of Cnidaria. *In:* , 2021. **Frontiers in Marine Science**. [S. l.: s. n.], 2021. p. 657348. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.657348/full>. Acesso em: 28 jan. 2025.

SAGE, Rowan F. The evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist**, [s. l.], v. 161, n. 2, p. 341–370, 2004.

SANTOS, Ignes *et al.* Biomarkers Profile of the Mysterious 2019 Oil Spill on the Northeast Coast of Brazil and Discrimination from Unreported Events. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 34, 2023.

SANTOS, Roxanny Helen de Arruda. **Origem e distribuição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas águas e sedimentos do estuário do Rio Goiana (PE/PB-Brasil)**. [S. l.], 2017. masterThesis. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/25160>. Acesso em: 8 jan. 2025.

SARIGIANNIS, Dimosthenis A. *et al.* Lung cancer risk from PAHs emitted from biomass combustion. **Environmental Research**, [s. l.], v. 137, p. 147–156, 2015.

SATPATI, Gour Gopal *et al.* Microalgae mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Strategies, advancement and regulations. **Chemosphere**, [s. l.], v. 344, p. 140337, 2023.

SEMPLE, Kirk T.; CAIN, Ronald B.; SCHMIDT, Stefan. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 291–300, 1999.

SHYROBOKOV, Volodymyr *et al.* Morphological, physiological and genetic characteristics of protozoa of genus *Acanthamoeba*, isolated from different deposit of bentonite in Ukraine. **Annals of Parasitology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 69–75, 2020.

SILVA, Alef Jonathan da. Avaliação dos efeitos da contaminação por derramamento de óleo no Atlântico Sudoeste Tropical por meio do uso de organismos planctônicos. [s. l.], 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/18964>. Acesso em: 11 fev. 2025.

SILVA, Felipe *et al.* Oil Spill and Socioeconomic Vulnerability in Marine Protected Areas. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 9, p. 859697, 2022.

SJÖQVIST, Conny. Evolution of Phytoplankton as Estimated from Genetic Diversity. **Journal of Marine Science and Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 456, 2022.

SOARES, Emerson *et al.* Oil impact on the environment and aquatic organisms on the coasts of the states of Alagoas and Sergipe, Brazil -A preliminary evaluation. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 171, p. 112723, 2021.

SOFTCHECK, Katherina A. Marine Algal Sensitivity to Source and Weathered Oils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 2742–2754, 2021.

SOULIÉ, Tanguy *et al.* Metabolic responses of plankton to warming during different productive seasons in coastal Mediterranean waters revealed by in situ mesocosm experiments. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 9001, 2022.

SOURNIA, Alain. Pelagic biogeography and fronts. **Progress in Oceanography**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 109–120, 1994.

SPEIGHT, James G. Feedstock Composition. *In: HANDBOOK OF PETROLEUM REFINING*. [S. l.]: CRC Press, 2016.

STANLEY, George D.; SWART, Peter K. Evolution of the Coral-Zooxanthellae Symbiosis During the Triassic: A Geochemical Approach. **Paleobiology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 179–199, 1995.

STAT, Michael; CARTER, Dee; HOEGH-GULDBERG, Ove. The evolutionary history of Symbiodinium and scleractinian hosts—Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 23–43, 2006.

STONE, L. Phytoplankton-bacteria-protozoan interactions: a qualitative model portraying indirect effects. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 64, p. 137–145, 1990.

SUBASHCHANDRABOSE, Suresh R. *et al.* Interactive effects of PAHs and heavy metal mixtures on oxidative stress in *Chlorella* sp. MM3 as determined by artificial neural network and genetic algorithm. **Algal Research**, [s. l.], v. 21, p. 203–212, 2017.

SUN, Zheng; WANG, Xiaofei; LIU, Jin. Screening of *Isochrysis* strains for simultaneous production of docosahexaenoic acid and fucoxanthin. **Algal Research**, [s. l.], v. 41, p. 101545, 2019.

TARANTINO, G. B. *et al.* CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF WAXY CRUDE OIL FLOW. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 33, p. 1063–1071, 2016.

TÉCNICAS, Associação Brasileira de Normas. **ABNT NBR 15469 - Ecotoxicologia — Coleta, preservação e preparo de amostras**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Abnt, 2021.

TEIXEIRA, Elba Calesso *et al.* DNA-damage effect of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban area, evaluated in lung fibroblast cultures. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 162, p. 430–438, 2012.

TETT, P.; BARTON, E.D. Why are there about 5000 species of phytoplankton in the sea?. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1693–1704, 1995.

THINESH, T. *et al.* Differential bleaching and recovery pattern of southeast Indian coral reef to 2016 global mass bleaching event: Occurrence of stress-tolerant symbiont *Durusdinium* (Clade D) in corals of Palk Bay. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 145, p. 287–294, 2019.

THORN, Robin Michael Statham; GREENMAN, John. Microbial volatile compounds in health and disease conditions. **Journal of Breath Research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 024001, 2012.

THU, Ngo Thi Hoai *et al.* Study on biological characteristics of a newly isolated Vietnamese strain of microalga *Isochrysis galbana* Parke for utilizing as live aquaculture feed. **Russian Journal of Marine Biology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 203–211, 2015.

THUY, Hoang Thi Thanh; LOAN, Tu Thi Cam; PHUONG, Trinh Hong. The potential accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in phytoplankton and bivalves in Can Gio coastal wetland, Vietnam. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 17240–17249, 2018.

TILLMANN, Urban. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 156–168, 2004.

TIWARI, Bhagyashree *et al.* Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 224, p. 1–12, 2017.

TOTH, B. Tumorigenesis by benzo(a)pyrene administered intracolonicly. **Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 77–82, 1980.

TOULIABAH, Hussein El-Sayed *et al.* A Review of Microalgae- and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 1141, 2022.

TUERENA, Robyn E. *et al.* Isotopic fractionation of carbon during uptake by phytoplankton across the South Atlantic subtropical convergence. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 16, n. 18, p. 3621–3635, 2019.

TUNÇYÜREK, Özüm *et al.* A ciliated foregut cyst in a gallbladder: the smallest recorded. **Japanese Journal of Radiology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 412–418, 2013.

UBEDA, Joao. **What Is The Advantage Of C4 Photosynthesis?**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.sciencing.com/advantage-photosynthesis-5268918/>. Acesso em: 13 fev. 2025.

UGHY, Bettina *et al.* Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1430, 2023.

VALLE, Mikel. Pyruvate Carboxylase, Structure and Function. **Sub-Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 83, p. 291–322, 2017.

VAN OPPEN, Madeleine J. H. *et al.* Building coral reef resilience through assisted evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 8, p. 2307–2313, 2015.

VEIGA, Isa Guimarães. AVALIAÇÃO DA ORIGEM DOS HIDROCARBONETOS EM SEDIMENTOS SUPERFICIAIS DE MANGUEZAIS DA REGIÃO NORTE DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS / BAHIA. [s. l.], 2003.

VERMA, Puneet; SHARMA, M. P.; DWIVEDI, Gaurav. Impact of alcohol on biodiesel production and properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 56, p. 319–333, 2016.

VIANA, Marina G. *et al.* Marine fish and benthic biota before the 2019 oil spill: A baseline dataset for monitoring programs and impact assessments at Rio Grande Norte state, Northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 94, p. e20210536, 2022.

VICTÓRIO, Cristiane Pimentel *et al.* Epicuticular wax of red mangrove leaves from an urban bay: Chemical composition and micromorphology. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 119, p. 104942, 2025.

VOGEL, J. C. **Fractionation of the Carbon Isotopes During Photosynthesis: Submitted to the Session of 19 April, 1980.** [S. l.]: Springer Science & Business Media, 2012.

WALL, Christopher B. *et al.* Divergent symbiont communities determine the physiology and nutrition of a reef coral across a light-availability gradient. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 945–958, 2020.

WANG, Caiyan *et al.* CleanSeq: A Pipeline for Contamination Detection, Cleanup, and Mutation Verifications from Microbial Genome Sequencing Data. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 6209, 2022.

WANG, Xiang *et al.* Establishing the global isoscape of leaf carbon in C3 plants through the integrations of remote sensing, carbon, geographic, and physiological information. **Remote Sensing of Environment**, [s. l.], v. 302, p. 113987, 2024.

WANG, Jia *et al.* PAHs in PM2.5 in Zhengzhou: concentration, carcinogenic risk analysis, and source apportionment. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 186, n. 11, p. 7461–7473, 2014.

WANG, Yihe *et al.* Phytoplankton Blooms off a High Turbidity Estuary: A Case Study in the Changjiang River Estuary. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, [s. l.], v. 124, n. 11, p. 8036–8059, 2019.

WANG, Chinchin; LAN, Christopher Q. Effects of shear stress on microalgae – A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 986–1002, 2018.

WARSHAWSKY, D. *et al.* Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 131–148, 1995.

WHITICAR, Michael J. Carbon Isotopes in Petroleum Science. *In*: SORKHABI, Rasoul (org.). **Encyclopedia of Petroleum Geoscience**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–19. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-02330-4_310-1. Acesso em: 13 fev. 2025.

WITMAN, Sarah. World's Biggest Oxygen Producers Living in Swirling Ocean Waters. **Eos**, [s. l.], 2017.

WONG, William W.; SACKETT, William M. Fractionation of stable carbon isotopes by marine phytoplankton. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 1809–1815, 1978.

WOOD, A.; EVERROAD, R.C.; WINGARD, L.M. Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. *In*: [S. l.: s. n.], 2005. p. 269–285.

WU, Yu-Ling *et al.* Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 63, n. 5, 6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, p. 459–463, 2011.

XIAO, Xinfeng *et al.* The Growth Inhibition of Polyethylene Nanoplastics on the Bait-Microalgae *Isochrysis galbana* Based on the Transcriptome Analysis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1108, 2023.

XIONG, Jiu-Qiang *et al.* Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 205, p. 183–190, 2016.

XIONG, Jiu-Qiang; KURADE, Mayur B.; JEON, Byong-Hun. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water?. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 30–44, 2018.

XU, Qingfeng; YU, Ruyue; GUO, Lili. Evaluation of forest ecosystem resilience to drought considering lagged effects of drought. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. e70281, 2024.

XUE, T. Study on the Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Photosynthesis in Red Tide Microalgae. **Periodical of Ocean University of China**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Study-on-the-Effects-of-Polycyclic-Aromatic-on-the-Xue/28c07c6ee67d454b944503aea51b41b9f083c751>. Acesso em: 10 fev. 2025.

YAMASHITA, Hiroshi; KOIKE, Kazuhiko. Genetic identity of free-living Symbiodinium obtained over a broad latitudinal range in the Japanese coast. **Phycological Research**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 68–80, 2013.

YANG, Sung-Yin *et al.* Diversity and Distribution of Symbiodinium Associated with Seven Common Coral Species in the Chagos Archipelago, Central Indian Ocean. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e35836, 2012.

YEH, Hsueh-Wen; EPSTEIN, Samuel. Hydrogen and carbon isotopes of petroleum and related organic matter. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 753–762, 1981.

YOGUI, Gilvan T; SCHWAMBORN, Ralf. Composição Isotópica do Material Orgânico Particulado e do Zooplâncton na Bacia de Sergipe e Sul de Alagoas. *In: AMBIENTE PELÁGICO DA BACIA DE SERGIPE-ALAGOAS*. São Cristóvão: Editora UFS, 2019. p. 502–555.

YUAN, Guangze *et al.* The heat-tolerance evaluation of an *Isochrysis zhangjiangensis* mutant generated by atmospheric and room temperature plasmas. **AMB Express**, [s. l.], v. 9, p. 68, 2019.

YUN, W. The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Carotenoid Content of Three Species of Red Tide Microalgae and Its Response to UV-B Radiation. **Periodical of Ocean University of China**, [s. l.], 2007. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Effects-of-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbons-on-Yun/6996dc6732ed040991b94f4064e921af7ca39f1a>. Acesso em: 10 fev. 2025.

ZACHARIAS, Daniel Constantino *et al.* Mysterious oil spill on the Brazilian coast – Part 2: A probabilistic approach to fill gaps of uncertainties. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 173, p. 113085, 2021.

ZACHARIAS, Daniel Constantino *et al.* Offshore oil spills in Brazil: An extensive review and further development. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 205, p. 116663, 2024.

ZHANG, Yingqi *et al.* Effects of florfenicol on growth, photosynthesis and antioxidant system of the non-target organism *Isochrysis galbana*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, [s. l.], v. 233, p. 108764, 2020.

ZHOU, Guowei *et al.* Genetic diversity of potentially free-living *Symbiodinium* in the Xisha Islands, South China Sea: Implications for the resilience of coral reefs. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 152–160, 2012.

Z.T., Richards *et al.* Environmental DNA for Biodiversity Monitoring of Coral Reefs. *In*: [S. l.: s. n.], 2022. p. 203–224.

ANEXO 1

Tabela A1: Concentrações individuais e total dos hidrocarbonetos alifáticos presentes na FSA 100%.

Analito	Conc. (ng L ⁻¹)
Octano (C ₈ H ₁₈)	0.56
Nonano (C ₉ H ₂₀)	0.11
Decano (C ₁₀ H ₂₂)	< LQ
Undecano (C ₁₁ H ₂₄)	< LQ
Dodecano (C ₁₂ H ₂₆)	0.32
Tridecano (C ₁₃ H ₂₈)	0.43
Tetradecano (C ₁₄ H ₃₀)	1.93
Pentadecano (C ₁₅ H ₃₂)	1.40
Hexadecano (C ₁₆ H ₃₄)	1.57
Heptadecano (C ₁₇ H ₃₆)	1.60
Octadecano (C ₁₈ H ₃₈)	1.60
Nonadecano (C ₁₉ H ₄₀)	1.13
Eicosano (C ₂₀ H ₄₂)	1.97
Henicosano (C ₂₁ H ₄₄)	0.98
Docosano (C ₂₂ H ₄₆)	0.90
Tricosano (C ₂₃ H ₄₈)	0.88
Tetracosano (C ₂₄ H ₅₀)	0.93
Pentacosano (C ₂₅ H ₅₂)	0.80
Hexacosano (C ₂₆ H ₅₄)	0.78
Heptacosano (C ₂₇ H ₅₆)	0.60
Octacosano (C ₂₈ H ₅₈)	0.57
Nonacosano (C ₂₉ H ₆₀)	0.73
Triacotano (C ₃₀ H ₆₂)	0.60
Hentriacotano (C ₃₁ H ₆₄)	0.64
Dotriacotano (C ₃₂ H ₆₆)	0.53
Tritriacotano (C ₃₃ H ₆₈)	0.76
Tetratriacotano (C ₃₄ H ₇₀)	0.65
Pentatriacotano (C ₃₅ H ₇₂)	0.47
Hexatriacotano (C ₃₆ H ₇₄)	0.47
Heptatriacotano (C ₃₇ H ₇₆)	0.43
Octatriacotano (C ₃₈ H ₇₈)	nd
Nonatriacotano (C ₃₉ H ₈₀)	0.69
Tetracontano (C ₄₀ H ₈₂)	nd
Pristano (C ₁₉ H ₄₀)	0.64
Fitano (C ₂₀ H ₄₂)	1.17
Total	26.84

Tabela A2: Registro CAS e valores de solubilidade em água dos n-alcenos e dos HPAs identificados na FSA nos experimentos

	Registro CAS	Analito	Solubilidade em água a 25°C (mg)
Hidrocarbonetos alifáticos	111-65-9	Octano (C ₈ H ₁₈)	0.3
	111-84-2	Nonano (C ₉ H ₂₀)	~0.10
	124-18-5	Decano (C ₁₀ H ₂₂)	~0.10
	112-42-5	Undecano (C ₁₁ H ₂₄)	~0.10
	112-40-3	Dodecano (C ₁₂ H ₂₆)	~0.10
	629-50-5	Tridecano (C ₁₃ H ₂₈)	~0.10
	629-59-4	Tetradecano (C ₁₄ H ₃₀)	~0.10
	629-62-9	Pentadecano (C ₁₅ H ₃₂)	< 0.10
	544-76-3	Hexadecano (C ₁₆ H ₃₄)	< 0.10
	629-78-7	Heptadecano (C ₁₇ H ₃₆)	< 0.10
	593-45-3	Octadecano (C ₁₈ H ₃₈)	< 0.10
	629-92-5	Nonadecano (C ₁₉ H ₄₀)	< 0.10
	112-95-8	Eicosano (C ₂₀ H ₄₂)	< 0.10
	629-94-7	Henicosano (C ₂₁ H ₄₄)	< 0.10
	629-97-0	Docosano (C ₂₂ H ₄₆)	< 0.10
	638-67-5	Tricosano (C ₂₃ H ₄₈)	< 0.10
	646-31-1	Tetracosano (C ₂₄ H ₅₀)	< 0.10
	629-99-2	Pentacosano (C ₂₅ H ₅₂)	< 0.10
	630-01-3	Hexacosano (C ₂₆ H ₅₄)	< 0.10
	593-49-7	Heptacosano (C ₂₇ H ₅₆)	< 0.10
	630-02-4	Octacosano (C ₂₈ H ₅₈)	< 0.10
	630-03-5	Nonacosano (C ₂₉ H ₆₀)	< 0.10
	638-68-6	Triacotano (C ₃₀ H ₆₂)	< 0.10
	630-04-6	Hentriacotano (C ₃₁ H ₆₄)	< 0.10
	544-85-4	Dotriacotano (C ₃₂ H ₆₆)	< 0.10
	630-05-7	Tritriacotano (C ₃₃ H ₆₈)	< 0.10
	14167-59-0	Tetratriacotano (C ₃₄ H ₇₀)	< 0.10
	630-07-9	Pentatriacotano (C ₃₅ H ₇₂)	< 0.10
	630-06-8	Hexatriacotano (C ₃₆ H ₇₄)	< 0.10
	7194-84-5	Heptatriacotano (C ₃₇ H ₇₆)	< 0.10
	7194-85-6	Octatriacotano (C ₃₈ H ₇₈)	< 0.10
	7194-86-7	Nonatriacotano (C ₃₉ H ₈₀)	< 0.10
	4181-95-7	Tetracotano (C ₄₀ H ₈₂)	< 0.10
1921-70-6	Pristano (C ₁₉ H ₄₀)	< 0.10	
638-36-8	Fitano (C ₂₀ H ₄₂)	< 0.10	
HPAs	91-20-3	Naftaleno (C ₁₀ H ₈)	31.60
	208-96-8	Acenafileno (C ₁₂ H ₈)	16.00
	83-32-9	Acenafeno (C ₁₂ H ₁₀)	4.50
	86-73-7	Fluoreno (C ₁₃ H ₁₀)	1.80
	85-01-8	Fenantreno (C ₁₄ H ₁₀)	13.00
	120-12-7	Antraceno (C ₁₄ H ₁₀)	0.07

	206-44-0	Fluoranteno (C ₁₆ H ₁₀)	0.24
	129-00-0	Pireno (C ₁₆ H ₁₀)	0.14
	56-55-3	Benzo[a]antraceno (C ₁₈ H ₁₂)	0.01
	218-01-9	Criseno (C ₁₈ H ₁₂)	0.003
	205-99-2	Benzo[b]fluoranteno (C ₂₀ H ₁₂)	<0.001
	207-08-9	Benzo[k]fluoranteno (C ₂₀ H ₁₂)	<0.001
	50-32-8	Benzo[a]pireno (C ₂₀ H ₁₂)	<0.001
	193-39-5	Indeno[1,2,3-cd]pireno (C ₂₂ H ₁₂)	<0.001
	53-70-3	Dibenzo[a,h]antraceno (C ₂₂ H ₁₄)	<0.001
	191-24-2	Benzo[ghi]perileno (C ₂₂ H ₁₂)	<0.001

Tabela A3: Concentrações dos HPAs totais nas FSAs 100% de *D. glynnii* e *I. galbana*

Analito	Concentração (ng L ⁻¹)	
	FSA <i>D. glynnii</i>	FSA <i>I. galbana</i>
Naftaleno	5.53	2.23
C1-Naftalenos	1039.47	611.89
C2-Naftalenos	2640.70	2059.07
C3-Naftalenos	1446.61	966.16
C4-Naftalenos	233.87	124.52
Acenaftileno	nd	nd
Acenafteno	45.70	25.45
Fluoreno	201.93	120.07
C1-Fluorenos	465.39	199.00
C2-Fluorenos	220.87	89.30
C3-Fluorenos	83.13	74.69
Fenantreno	282.62	89.78
Antraceno	19.04	4.57
C1-Fenantrenos + C1-Antracenos	271.70	95.29
C2-Fenantrenos + C2-Antracenos	83.28	117.83
C3-Fenantrenos + C3-Antracenos	36.68	70.34
C4-Fenantrenos + C4-Antracenos	13.94	27.59
Fluoranteno	< 1,00	< 1,00
Pireno	3.41	5.39
C1-Fluorantenos + C1-Pirenos	7.47	14.69
C2-Fluorantenos + C2-Pirenos	10.62	20.38
C3-Fluorantenos + C3-Pirenos	10.93	20.65
Benzo[a]antraceno	< 1,00	< 1,00
Criseno	5.03	13.12
C1-Benzo[a]antracenos + C1-Crisenos	9.57	21.27
C2-Benzo[a]antracenos + C2-Crisenos	10.87	22.54

C3-Benzo[a]antracenos + C3-Crisenos	6.59	13.61
Benzo[b]fluoranteno	nd	1.71
Benzo[k]fluoranteno	< 1,00	< 1,00
Benzo[a]pireno	nd	1.44
Dibenzo[a,h]antraceno	nd	< 1,00
Indeno[1,2,3-cd]pireno	nd	nd
Benzo[ghi]perileno	nd	< 1,00
Total (16 HPAs)	563.26	263.76
Total (33 HPAs)	7154.95	4812.58

Tabela A4: Dados de assinatura isotópica do ^{13}C e das razões C:N para todas os tratamentos das duas espécies.

Espécie	Tratamento	(C/N) _a	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)
<i>Durisdinium glynnii</i>	E1-FSA-0%	2.07	-23.95
	E1-FSA-0%	8.00	-23.94
	E1-FSA-3%	7.79	-22.78
	E1-FSA-3%	1.98	-22.82
	E1-FSA-6%	7.57	-22.86
	E1-FSA-6%	7.84	-22.96
	E1-FSA-12%	7.85	-23.11
	E1-FSA-12%	7.91	-23.18
	E1-FSA-25%	8.40	-23.51
	E1-FSA-25%	8.02	-23.29
	E1-FSA-50%	8.12	-24.70
	E1-FSA-50%	8.54	-24.73
	E1-FSA-100%	7.24	-25.17
	E1-FSA-100%	7.22	-25.07
<i>Isochrysis galbana</i>	E1-FSA-0%	8.06	-19.80
	E1-FSA-0%	8.10	-19.87
	E1-FSA-3%	7.98	-19.83
	E1-FSA-3%	8.12	-19.85
	E1-FSA-6%	8.20	-20.05
	E1-FSA-6%	8.07	-20.11
	E1-FSA-12%	7.90	-20.74
	E1-FSA-12%		-20.61
	E1-FSA-25%	8.26	-22.13
	E1-FSA-25%	8.14	-22.33
	E1-FSA-50%	7.75	-25.52
	E1-FSA-50%	7.33	-25.22
	E1-FSA-100%	5.31	-23.46
	E1-FSA-100%	5.25	-23.60
E1-REC-0%	8.09	-20.32	
E1-REC-0%	8.18	-20.51	
E1-REC-50%	8.59	-18.35	
E1-REC-50%	8.72	-18.40	

E1-REC-100%	8.29	-16.15
E1-REC-100%	8.25	-15.81
E1-SAL-0%	8.15	-16.78
E1-SAL-0%	8.71	-17.05
E1-SAL-50%	8.09	-16.56
E1-SAL-50%	8.66	-16.71
E1-SAL-100%	8.44	-15.97
E1-SAL-100%	8.66	-17.13

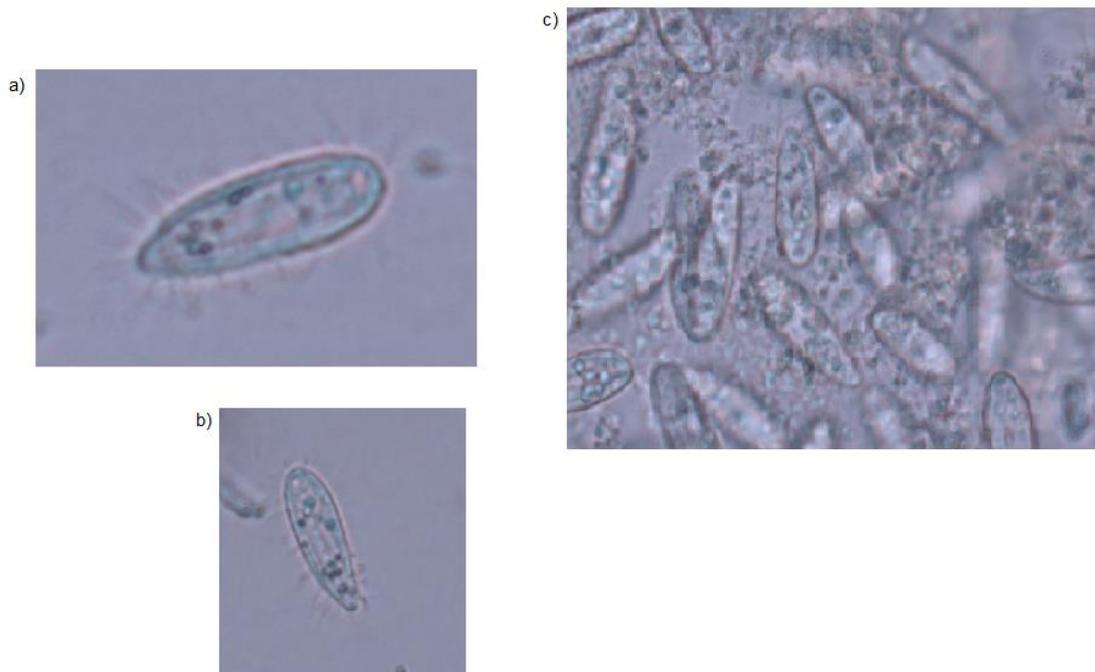


Figura A1: Espécie de ciliado desconhecida presente nas culturas de microalgas. a) e b): foto individual. c) aglomerado de ciliados no biofilme