

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Rafael Rodrigues de Paiva

**EFEITOS DA CIANOBACTÉRIA TÓXICA *Cylindrospermopsis raciborskii* NA
ALIMENTAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE UM COPÉPODO
CALANÓIDE NEOTROPICAL**

Juiz de Fora

2014

Rafael Rodrigues de Paiva

**Efeitos da cianobactéria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* na alimentação,
sobrevivência e reprodução de um copépodo calanóide neotropical**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Orientadora: Maria Carolina Silva Soares

Coorientador: Kemal Ali Ger

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Paiva, Rafael Rodrigues de .
Efeitos da cianobactéria tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* na alimentação, sobrevivência e reprodução de um copépodo calanóide neotropical / Rafael Rodrigues de Paiva. -- 2014.
60 f. : il.

Orientadora: Maria Carolina Silva Soares

Coorientador: Kemal Ali Ger

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2014.

1. Ecologia. 2. Cianobactérias. 3. Copépodos. I. Soares, Maria Carolina Silva, orient. II. Ger, Kemal Ali, coorient. III. Título.

**“EFEITOS DA CIANOBACTÉRIA TÓXICA CYLINDROSPERMOPSIS
RACIBORSKII NA ALIMENTAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE
UM COPÉPODO CALANÓIDE NEOTROPICAL ”**

Rafael Rodrigues de Paiva

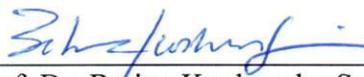
Orientador: Dra. Maria Carolina Silva Soares

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovado em 27 de março de 2014.



Prof. Dra. Maria Carolina Silva Soares
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Betina Kozlowsky Suzuki
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Prof. Dr. Roberto da Gama Alves
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

*À Drielly, por ser a energia que alimenta
a minha vontade de continuar e por ser a
melhor irmã que eu poderia desejar.*

AGRADECIMENTOS

A Ciência me trouxe a argumentação e a capacidade de planejar. A Espiritualidade me trouxe o equilíbrio e a segurança. Não teria conseguido começar e terminar este projeto sem o sinergismo das duas. Obrigado ao meu Deus por ter me guiado a isto e por ter colocado em minha vida situações e pessoas que me fortalecem incondicionalmente.

Meus agradecimentos a CAPES pela bolsa que me foi concedida. À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Eterno agradecimento aos meus pais, Hamilton e Maria do Carmo, pelo amor incondicional e por terem suportado todos os desafios com tanto caráter e força. Vocês são meus maiores exemplos de vida! Esta conquista é nossa!

Agradeço à Drielly por ser minha irmã de sangue e alma. Ao meu irmão Vinícius por sempre ter sido tão companheiro. À Júlia por estar sempre ao nosso lado. À Manuela, minha muito amada sobrinha. Aos meus avôs, obrigado pelas orações e proteção. Ao meu avô João por ter sido o plantador da semente “ciência” na minha cabeça. À toda minha família.

Meu grande agradecimento à Carol. Orientadora no seu sentido mais abrangedor. Obrigado pelo exemplo de competência e sintonia com a vida. Foi uma alegria diária ter convivido com você nestes quase seis anos! Obrigado ao Ali por ter sido um coorientador tão encorajador e sempre disponível. Obrigado por ter me recebido em Natal e pelas inúmeras discussões que deram embasamento para esta dissertação. Ao Fábio por ter me acolhido no LEA e por ter disponibilizado boa parcela da estrutura que construiu minha vida científica. Obrigado por todas as oportunidades que me foram dadas ao longo destes seis anos de LEA!

Muito obrigado aos membros e ex-membros do Laboratório de Ecologia Aquática (LEA-UFJF) por todo o apoio científico e pela amizade: Anderson, Caique, Felipe P., Felipe R., Fernanda, Gladson, Guilherme, Iollanda, Lucas, Lúcia, Luciana, Maíra, Malafaia, Marcela, Mariana C., Mariana M., Michele L., Michele S., Michaela, Natália, Nathan, Rafael A., Raquel, Simone, Tábatha, Yonara. Por ter participado diretamente deste projeto, obrigado Amélia, Luciana Rangel e Marcela!

Meu agradecimento à Iollanda por ter enxergado os copépodos com tanto cuidado e competência. E por ter aceitado esta rotina corrida que algumas vezes incluiu chegar ao

laboratório às 06h da manhã e sair às 10h da noite. Este trabalho teve uma imensurável contribuição sua!

Many thanks to Prof. Robert Wallace for being my undergraduate research advisor in Ripon College and for sharing so many ideas and discussions that contributed to my career as a scientist.

Agradeço aos membros da banca, professores Betina Suzuki, Roberto da Gama, Isabel Rocha e Luciana Vidal por terem aceitado participar da minha defesa e pelas excelentes contribuições.

Minha gratidão às pessoas que fizeram com que todo o período do mestrado fosse tão agradável e tranquilo. Daniel, pelas sempre boas discussões e pelos mochilões. Mariana, pelas conversas sem sentido e pela musicalidade. Bárbara, pelas longas conversas sobre séries e pela ótima parceria. Juliana, pela criatividade e pelo constante apoio. Erick e Danielle, pelos festivais gastronômicos pós-aula e pela companhia durante tanto tempo. David, Fellipe e Gabriel, pelas boas lembranças de festas e pelas boas risadas.

Ao José Carlos e ao Márcio Malafaia por terem sido sempre solícitos às inúmeras dúvidas referentes ao mestrado.

Agradeço ao professor Armando Vieira da Universidade Federal de São Carlos por ter cedido gentilmente as cepas de *Chlamydomonas chlorastera* e *Cryptomonas obovata* utilizadas neste trabalho.

Agradeço à equipe do Laboratório de Microbiologia Aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte por ter me acolhido tão bem durante minha ida a Natal.

RESUMO

Florações de cianobactérias podem causar efeitos negativos na qualidade da água e em comunidades biológicas. Dentre estas comunidades, copépodos calanóides possuem uma grande importância, sendo o grupo planctônico dominante em muitos ambientes de água doce. Apesar da importância destes copépodos para a dinâmica planctônica nestes sistemas, estudos sobre a interação entre estes animais e cianobactérias são ainda escassos. No presente estudo, os efeitos da cianobactéria invasiva e tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju (1972) no copépodo calanóide tropical *Notodiaptomus iheringi* (Wright 1935) foram avaliados. Alimentação (taxas de remoção e seleção alimentar), sobrevivência (curvas de Kaplan-Meier, probabilidades de sobrevivência e *Hazard ratio*) e reprodução (% fêmeas com ovos e produção de ovos) deste copépodo foram estudadas usando dietas monoespecíficas e mistas de *C. raciborskii* e algas nutritivas (*Chlamydomonas chlorastera* ou *Cryptomonas obovata*). O aumento na proporção de *C. raciborskii* (> 50%) esteve relacionado a baixas taxas de alimentação, embora nenhuma diferença entre as taxas de remoção na cianobactéria e na alga nutritiva dentro de cada tratamento tenha sido encontrada. Efeitos negativos (25 ou 75% de *C. raciborskii*) ou neutros (50% de *C. raciborskii*) na sobrevivência foram detectados nos tratamentos. Por outro lado, a reprodução em *N. iheringi* foi afetada pela presença de *C. raciborskii*, independente da proporção desta cianobactéria. Características da espécie *C. raciborskii* tais como toxicidade (e.g. saxitoxinas) e baixos valores nutricionais (e.g. ausência de PUFA) juntamente com não aclimação prévia em *N. iheringi* à *C. raciborskii* podem explicar os diferentes resultados encontrados. Em geral, copépodos *N. iheringi* podem se alimentar e sobreviver em dietas com *C. raciborskii*. Porém, dietas de *C. raciborskii* não suportam a reprodução destes animais. Este é o primeiro estudo que avalia o efeito de *C. raciborskii* na sobrevivência e reprodução de copépodos calanóides. Os resultados deste trabalho podem contribuir para o entendimento do comportamento alimentar assim como a dinâmica populacional de copépodos calanóides na presença da cianobactéria *C. raciborskii*.

Palavras-chave: Interações planctônicas. *Notodiaptomus iheringi*. Saxitoxinas.

ABSTRACT

EFFECTS OF THE TOXIC CYANOBACTERIUM *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII* ON FEEDING, SURVIVAL AND REPRODUCTION OF A NEOTROPICAL CALANOID COPEPOD

Cyanobacterial blooms can cause negative impacts on water quality and biological communities. Among these biological communities, calanoid copepods have a great importance, being the dominant planktonic group in many freshwater systems. Despite the importance of calanoid copepods to plankton dynamics in freshwater systems, studies on the interaction between these animals and cyanobacteria are still scarce. Here the effects of the invasive and toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju (1972) on the tropical calanoid copepod *Notodiaptomus iheringi* (Wright 1935) were evaluated. Feeding (clearance rates and selective feeding), survival (Kaplan-Meier curves, survival probabilities and hazard ratios) and reproduction (% females with eggs and egg production) of this copepod were studied using single and mixed diets of *C. raciborskii* and nutritious algae (*Chlamydomonas chlorastera* or *Cryptomonas obovata*). The increase on *C. raciborskii* proportion (> 50%) was related to lower feeding rates although no differences between the clearance rates on the cyanobacterium and nutritious algae within each treatment were found. Negative (25 or 75% of *C. raciborskii*) or neutral (50% of *C. raciborskii*) effects on survival were detected throughout the treatments. On the other hand, the reproduction in *N. iheringi* was strongly affected by the presence of *C. raciborskii*, independently of the proportion of this cyanobacterium. Features of the species *C. raciborskii* such as toxicity (e.g. saxitoxins) and low nutritional values (e.g. absence of PUFA) along with non-previous acclimation in *N. iheringi* to *C. raciborskii* might explain the different outcomes found in the present study. Overall, *N. iheringi* copepods can feed and survive in diets with *C. raciborskii*. However, *C. raciborskii* diets cannot support reproduction of these animals. This is the first study that evaluates the effects of *C. raciborskii* on survival and reproduction of calanoid copepods. The outcomes found in this work might contribute to the understanding of the feeding interactions as well as the population dynamics of calanoid copepods in the presence of the cyanobacterium *C. raciborskii*.

Keywords: *Notodiaptomus iheringi*. Plankton interactions. Saxitoxins.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO 1.....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1.3 RESULTADOS.....	22
1.4 DISCUSSÃO.....	26
CAPÍTULO 2.....	30
2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.3 RESULTADOS.....	37
2.4 DISCUSSÃO.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Introdução geral

INTRODUÇÃO GERAL

Cianobactérias (algas azuis) constituem um grupo de micro-organismos fotossintetizantes que são considerados os primeiros produtores de oxigênio na superfície terrestre (SCHOPF, 2000). O surgimento destes micro-organismos durante a Era Pré-Cambriano provocou uma mudança drástica na biosfera anóxica, permitindo então o surgimento de vidas terrestres de animais e vegetais (SCHOPF, 2000).

Quando em condições favoráveis, algumas espécies de cianobactérias aquáticas podem formar florações (Fig. 1), que são caracterizadas como valores de densidade e biomassa acima das médias normalmente encontradas no ambiente estudado (OLIVER & GANF, 2000). O aumento na incidência de florações de cianobactérias nas últimas décadas vem ocasionando diversos problemas ambientais tais como deterioração da qualidade da água, toxicidade e alterações nas cadeias tróficas (CODD, 1995; PAERL & HUISMAN, 2009; PAERL & OTTEN, 2013). Este aumento tem sido reconhecido como sendo consequente principalmente de processos de eutrofização e mais recentemente, de possíveis alterações climáticas (PAERL & PAUL, 2012; PAERL & OTTEN, 2013). Além disto, características fisiológicas das cianobactérias tais como habilidade de assimilar nutrientes, estabilidade da coluna d'água e baixa pressão por herbivoria são apontados como fatores importantes na formação de florações (SOARES et al., 2009a; PAERL & PAUL, 2012).

A pressão por herbivoria pode ser exercida principalmente pela comunidade zooplânctônica (SMAYDA, 2008). Zooplâncton é um termo que abrange grupos de animais aquáticos que não tem capacidade fotossintética e que vivem dispersos na coluna d'água apresentando pouca capacidade de locomoção (KALFF, 2001). Constitui-se principalmente de microcrustáceos (cladóceros e copépodos) e de rotíferos (KALFF, 2001) e dentre estes organismos, os cladóceros e copépodos contribuem significativamente na pressão de herbivoria sobre o fitoplâncton (SOMMER et al., 2001).

Os microcrustáceos copépodos (Sub-classe Copepoda) são considerados o grupo dominante em biomassa entre os organismos planctônicos e provavelmente a subclasse de metazoário mais numerosa do planeta (VERITY & SMETACEK, 1996; MEUHLIN, 1998; TURNER, 2004; SOUSA et al., 2008). Esta sub-classe possui cinco ordens, sendo Calanoida uma ordem constituída por cerca de 2300 espécies que são em sua maioria animais planctônicos. Estes animais possuem o corpo dividido em duas partes separadas por uma articulação (metasoma ou cefalotórax e urosoma ou abdômen) e possuem uma antena longa que pode atingir o final do urosoma (WILLIAMSON & REID, 2001).

Estes animais, principalmente os de pequeno tamanho (~1mm de largura), são importantes por serem os principais consumidores de fitoplâncton e de componentes das alças microbianas (bacterioplâncton e protistas heterotróficos) e servirem como presas para peixes e outros animais carnívoros (TURNER, 2004). Desta forma, copépodos calanóides constituem um grupo importante na ciclagem de nutrientes e fluxo de energia em sistemas aquáticos.

Estudos que envolvem a interação de componentes da comunidade zooplancônica e cianobactérias são de extrema importância, uma vez que o conhecimento destas interações é determinante para caracterizar a estrutura e função de comunidades planctônicas assim como indicar estratégias de controle de florações de cianobactérias (WILSON et al., 2006).



Figura 1: Florações de cianobactérias no Reservatório do Funil (RJ). (Fonte: Arquivo pessoal).

CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju

Cylindrospermopsis raciborskii é uma espécie de cianobactéria filamentosa que pertence à ordem Nostocales (Fig. 2). Morfologicamente, este gênero possui filamentos isopolares e solitários, podendo apresentar forma reta, cilíndrica, espiralada ou estreitamento nas extremidades (KORMÁKOVÁ, 1998). Estes organismos são capazes de fixar nitrogênio através de células diferenciadas chamadas heterócitos e possuem ainda células de resistência (acinetos) (PADISÁK, 1997). Esta espécie é potencialmente produtora de duas importantes toxinas: cilindrospermopsina e saxitoxinas (CHORUS & BARTRAM, 1999), sendo que no Brasil, há apenas registro de produção de saxitoxinas (LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002). Efeitos negativos de cepas de *C. raciborskii* produtoras de saxitoxinas já foram relatadas em camundongos e cladóceros (FERRÃO-FILHO et al., 2010; ZAGATTO & FERRÃO-FILHO, 2013).

A cianobactéria *C. raciborskii* possui uma alta plasticidade fenotípica (BONILLA et al., 2012) e um elevado poder invasivo (PADISÁK, 1997), com ocorrência já evidenciada em diversos sistemas em regiões temperadas (SINHA et al., 2012; KARADZIC et al., 2013), subtropicais (VIDAL & KRUK, 2008; RECKNAGEL et al., 2014) e tropicais (SOARES et al., 2009a; FIGUEREDO et al., 2013). No Brasil, *Cylindrospermopsis* é um dos três gêneros mais comuns formadores de florações, com dominância principalmente durante períodos secos e em sistemas onde há uma mistura na coluna d'água (SOARES et al., 2013).



Figura 2: Filamento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*. (Fonte: Arquivo pessoal).

Copépodo *Notodiaptomus iheringi* (Wright 1935)

Na América do Sul, *Notodiaptomus* Kiefer 1936 é o gênero mais diversificado dentro da família Diaptomidae, com cerca de 39 espécies reportadas (PREVIATTELLI, 2006) (Fig. 3). A espécie *Notodiaptomus iheringi* é amplamente distribuída, ocorrendo principalmente entre as latitudes 5°S a 25°S (MATSUMURA-TUNDISI, 1986).

Em um estudo conduzido em laboratório, foram encontradas taxas de ingestão significativas deste copépodo em pequenas colônias de cianobactérias presentes no plâncton de um reservatório brasileiro. Em contrapartida, este animal não consumiu colônias de uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (PANOSSO et al., 2003). Em outro estudo analisando o conteúdo estomacal de populações de *N. iheringi* de um reservatório brasileiro, foram encontradas quantidades significativas de clorófitas e crisófitas, indicando que estes dois grupos de algas constituem a principal fonte de alimento deste copépodo no sistema aquático estudado (RIETZLER et al., 2002).

JUSTIFICATIVA

Apesar da crescente expansão de florações de *C. raciborskii* e da grande importância de copépodos calanóides em sistemas aquáticos, poucos estudos foram publicados até momento relacionando estes dois organismos. Em dois estudos laboratoriais sobre o comportamento alimentar destes animais, foram encontradas taxas de consumo significativas em dietas monoespecíficas de *C. raciborskii* para os copépodos calanóides *Pseudodiaptomus hessei* (KÂ et al., 2012) e *Boeckella* sp. (HONG et al., 2013).

Conhecer o comportamento alimentar assim como alterações no *fitness* (sobrevivência e reprodução) destes animais na presença desta cianobactéria é de extrema importância, uma vez que estas variações podem elucidar a dinâmica de copépodos calanóides em ambientes com ocorrência de *C. raciborskii*. O entendimento desta dinâmica, por sua vez, será importante para determinar estratégias de controle de florações assim como entender o efeito destas em ecossistemas aquáticos.

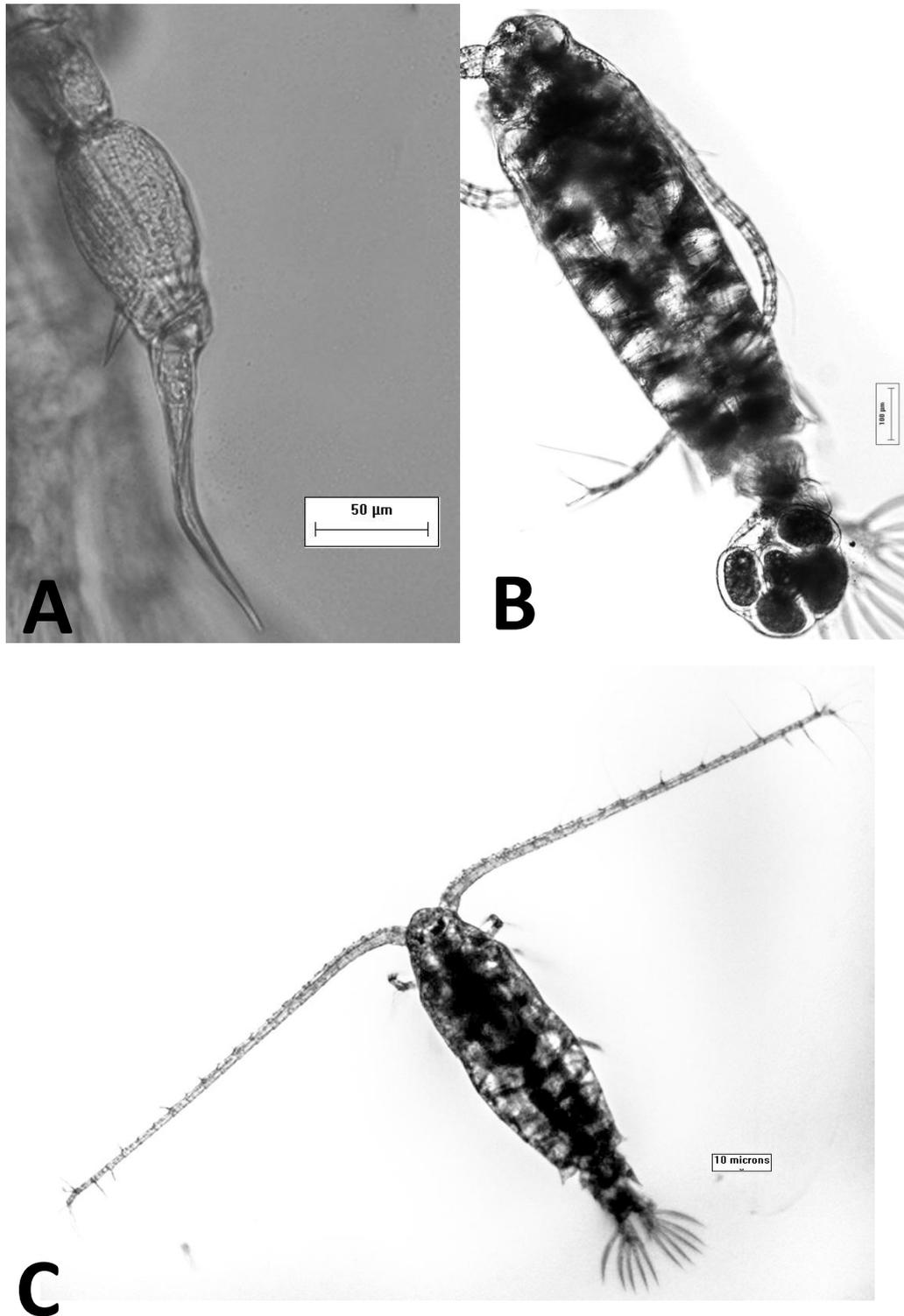


Figura 3: Copépodo calanóide *Notodiptomus iheringi*: A) Detalhe da quinta pata de um macho adulto; B) Fêmea adulta com ovissaco e C) Fêmea adulta vista dorsalmente. (Fonte: Arquivo pessoal).

OBJETIVOS

Visando conhecer o comportamento alimentar assim como alterações no *fitness* (sobrevivência e reprodução) de copépodos calanóides na presença da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, o presente trabalho teve como objetivos:

- (1) Quantificar as taxas de remoção e seleção alimentar do copépodo calanóide neotropical *Notodiaptomus iheringi* quando alimentados com dietas monoespecíficas e mistas da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* e uma alga nutritiva, *Chlamydomonas chlorastera* (CAPÍTULO 1).
- (2) Avaliar a sobrevivência (curvas K-M, probabilidade de sobrevivência e *Hazard ratios*) e reprodução (porcentagem de fêmeas ovadas e taxas de produção de ovos) do copépodo *N. iheringi* quando alimentados com dietas monoespecíficas e mistas da cianobactéria *C. raciborskii* e uma alga nutritiva, *Cryptomonas obovata* (CAPÍTULO 2).

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

QUAL O EFEITO DA CIANOBACTÉRIA *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII* NA SELEÇÃO ALIMENTAR PELO COPÉPODO *NOTODIAPTOMUS IHERINGI*?

1.1 INTRODUÇÃO

A expansão na ocorrência de florações de cianobactérias em sistemas aquáticos ocasiona diversos problemas ambientais como deterioração da qualidade da água, toxicidade e alterações nas cadeias tróficas (CHORUS & BARTRAM, 1999; PAERL & OTTEN, 2013). Este aumento tem sido associado principalmente aos processos de eutrofização artificial e mais recentemente, às possíveis alterações climáticas (PAERL & HUISMAN, 2009).

Além disto, a pressão por herbivoria pela comunidade zooplanctônica é também reconhecida como importante no estabelecimento destas florações (SMAYDA, 2008). Apesar de algumas características das cianobactérias tais como filamentos de maior tamanho e toxicidade serem apontadas como inibidoras desta pressão por herbivoria (BERNARDI E GIUSSIANI, 1990), alguns estudos mostram um controle significativo pelo zooplâncton (BOON et al., 1994; BOUVY et al., 2001; KÂ et al. 2012) e coexistência destes organismos com cianobactérias tóxicas (GER et al., 2010a; b).

Dentre as espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas conhecidas encontra-se a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju. Esta cianobactéria filamentosa forma florações e possui alta capacidade invasiva além de grande plasticidade fenotípica (BONILLA et al., 2012). A ocorrência destes organismos já foi evidenciada em diversos sistemas em regiões temperadas (SINHA et al., 2012; KARADZIC et al., 2013), subtropicais (VIDAL & KRUK, 2008; RECKNAGEL et al., 2014) e tropicais (SOARES et al., 2009a; FIGUEREDO et al., 2013), sendo o gênero *Cylindrospermopsis* um dos principais formadores de florações no Brasil (SOARES et al., 2013). Esta cianobactéria é potencialmente produtora das cianotoxinas cilindrospermopsina e saxitoxinas (CHORUS & BARTRAM, 1999), com efeitos tóxicos desta última toxina relatados para camundongos e na comunidade zooplanctônica (FERRÃO-FILHO et al., 2010; ZAGATTO & FERRÃO-FILHO, 2013).

A comunidade zooplanctônica em ambientes de água doce em regiões tropicais é dominada em diversos casos pelos copépodos calanóides (SOUSA et al., 2008). Estudos mostram que esses animais são capazes de manusear e selecionar o alimento (DeMOTT & MOXTER, 1991), reconhecer sinais de toxicidade (GER et al., 2011), assim como apresentar um maior consumo de uma alga mais nutritiva em detrimento da cianobactéria (GER et al.,

2011). Estas características apresentadas pelos copépodos calanóides podem explicar a coexistência destes animais e cianobactérias tóxicas em sistemas aquáticos. Apesar da importância destes organismos para dinâmica planctônica em sistemas de água doce, estudos sobre a interação entre copépodos e cianobactérias ainda são escassos (PANOSSO et al., 2003; WILSON et al., 2006).

Esta escassez é ainda maior para estudos sobre a interação entre copépodos calanóides e a cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, com apenas dois trabalhos publicados, conduzidos em condições laboratoriais (KÂ et al., 2012; HONG et al., 2013). O maior conhecimento da interação entre estes organismos e cianobactérias (e.g. *C. raciborskii*) é de extrema importância, uma vez que será determinante para caracterizar a estrutura e função de comunidades planctônicas assim como indicar estratégias de controle de florações de cianobactérias (WILSON et al., 2006).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi quantificar as taxas de remoção e seleção alimentar do copépodo calanóide neotropical *Notodiaptomus iheringi* Wright quando alimentados com suspensões monoespecíficas e mistas da cianobactéria *C. raciborskii* e uma alga nutritiva, *Chlamydomonas chlorastera*. O gênero *Notodiaptomus* possui uma distribuição ampla, com as mais altas abundâncias e riqueza de espécies dentre os calanóides de água doce neotropical (SANTOS-SILVA et al., 1999). Há registro da ocorrência de *Notodiaptomus iheringi* coexistindo com cianobactérias em ambientes de água doce e o efeito nocivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* nas taxas de consumo por este copépodo já foi evidenciado (PANOSSO et al., 2003).

A partir dos resultados deste estudo, espera-se entender também o comportamento de copépodos calanóides em dietas compostas pela cianobactéria tóxica *C. raciborskii*. Baseado em características comportamentais dos copépodos, espera-se que estes animais apresentem taxas de remoção menores e uma seleção negativa pela cianobactéria *C. raciborskii* e um maior consumo da alga mais nutritiva, *C. chlorastera*.

1.2 MATERIAL & MÉTODOS

Organismos

Uma cepa da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszýnska) Seenayya et Subba Raju referência LETC CYRF01 foi obtida do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. De acordo com análises prévias, esta cepa é produtora de saxitoxinas (concentração de 0.95 pg cél⁻¹) (a 25° C, intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12 horas)

(Miranda, Marcela. Comunicação pessoal). A cepa utilizada no presente estudo possui uma menor concentração de saxitoxinas quando comparada a outras cepas, tais como os dinoflagelados *Alexandrium* spp. (5.22 a 16.12 pg cél⁻¹) (COLIN & DAM, 2002) e *Alexandrium lusitanicum* (1.25 a 1.56 pg cél⁻¹) (DUTZ, 1998).

A alga verde flagelada *Chlamydomonas chlorastera* Ettl Referência N^o 009 foi obtida da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce, Universidade Federal de São Carlos, Brasil. No presente estudo, *C. chlorastera* foi considerada como o alimento nutritivo baseado no seu alto valor nutricional para organismos zooplantônicos (DeMOTT & MOXTER, 1991).

Culturas destas duas microalgas foram mantidas em sistema *batch* a 25°C em intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12 horas. Estas culturas foram mantidas em 300 mL de meio WC modificado (LÜRLING & BEEKMAN, 1999) em fase exponencial de crescimento.

Sob estas condições, os filamentos de *C. raciborskii* apresentaram comprimento médio (\pm 1DP) de 41.9 (\pm 14.2) μm e largura média (\pm 1DP) de 3.0 (\pm 0.4) μm (n=20). A população de *C. chlorastera* apresentou dominância de organismos unicelulares com um diâmetro médio (\pm 1DP) de 10.2 (\pm 2.9) μm (n=20).

As concentrações de carbono das suspensões alimentares foram determinadas a partir dos valores do biovolume individual para cada microalga de acordo com a fórmula $C = a.V.b$, onde C = concentração de carbono (mg C L⁻¹), a=0.1204, V= biovolume da microalga (μm^3) e b=1.051 (ROCHA & DUNCAN, 1985).

Amostras de populações do copépodo *Notodiaptomus iheringi* Wright (comprimento do prossomo \pm 1DP = ♀ 1.14 \pm 0.13 mm e ♂ 1.11 \pm 0.11 mm) foram coletadas do Lago dos Manacás (*campus* Universidade Federal de Juiz de Fora) através de arrastos verticais com o auxílio de uma rede de plâncton com malha 68 μm . Durante dois períodos de monitoramento do Lago dos Manacás (1999-2000 e 2008-2012), nenhuma ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi reportada.

As amostras zooplantônicas foram acondicionadas em frascos com capacidade de 5L preenchidos com água do lago e conduzidas para o laboratório em no máximo 30 minutos após a coleta. Em laboratório, adultos com apêndices intactos e que nadavam ativamente foram isolados e rinsados sob microscópio binocular. Todos os animais isolados foram colocados em béqueres de 5L preenchidos com meio WC modificado e alimentados com *Cryptomonas obovata* Czosnowski (taxa de \sim 0.5 mgC L⁻¹ dia⁻¹). Estes béqueres foram

mantidos a 25 °C, em intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em fotoperíodo de 12:12 horas. Após dois dias de adaptação às condições laboratoriais, os adultos foram capturados e usados para a realização dos experimentos.

Suspensões mono específicas e mistas

Experimentos curtos foram realizados com o objetivo de avaliar a taxa de remoção por copépodos em suspensões mono específicas e mistas de *C. chlorastera* (Chla) e *C. raciborskii* (Cyli).

Estas taxas de remoção foram determinadas com o auxílio do fluorímetro PHYTO-PAM (LÜRLING & VERSCHOOR, 2003). Este fluorímetro permite a separação entre cianobactérias (*C. raciborskii*) e alga verde (*C. chlorastera*), usando diferentes comprimentos de onda. Espectros de referência específicos para as cepas de *C. raciborskii* e *C. chlorastera* foram usados.

As taxas de remoção foram calculadas de acordo com a diferença entre as concentrações das clorofilas final e inicial dos tratamentos e controles (sem adição de copépodos). Ao final do experimento, todas as suspensões foram filtradas em GF/C (Whatman) e o valor da concentração da clorofila final foi diminuído pelo valor da clorofila dissolvida nos filtrados.

As taxas de remoção foram determinadas a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{TR} = (b - a) \times \frac{V}{N} \quad \text{onde} \quad (1)$$

$$a = \frac{[\ln(Ac_t) - \ln(Ac_0)]}{\Delta t} \quad \text{e} \quad (2)$$

$$b = \frac{[\ln(At_t) - \ln(At_0)]}{\Delta t} \quad (3)$$

onde Ac_0 = concentração inicial de alga no controle; Ac_t = concentração final de alga no controle; At_0 = concentração inicial de alga no tratamento; At_t = concentração final de alga no tratamento; Δt = tempo de duração do experimento (h); V = volume (mL); e N = número de copépodos inoculados.

Antes do início dos experimentos, os copépodos foram mantidos em meio WC modificado e sem alimento durante 24 horas. Após este período, três animais foram incubados em cada poço da placa de cultivo multicelular preenchidos com 2.5 mL da suspensão

alimentar específica. Três ou quatro réplicas foram avaliadas para cada tratamento. Estas placas foram mantidas em uma sala escura, a 25 °C, durante 2.5 – 3 horas.

Para o experimento monoespecífico, a faixa da concentração alimentar total analisada foi ~ 0.125, 0.25, 0.375, 0.5 e 1 mgC L⁻¹. Uma concentração alimentar ótima foi determinada de acordo com o resultado do experimento monoespecífico para *C. chlorastera* e esta concentração foi usada para realizar os experimentos mistos.

Para os experimentos mistos, suspensões com diferentes proporções de *C. chlorastera* e *C. raciborskii* a uma concentração total de ~ 0.5 mgC L⁻¹ foram avaliadas. As proporções foram:

- a) 100% Chla
- b) 75% Chla : 25% Cyli
- c) 50% Chla : 50% Cyli
- d) 25% Chla : 75% Cyli
- e) 100% Cyli

Adicionalmente às taxas de remoção, coeficientes de seleção alimentar foram determinados de acordo com MANLY (1972) e CHESSON (1978):

$$I_i = \frac{1}{r_i \times n_i} \quad (4)$$

onde I_i = razão de Ivlev; r_i = taxa de remoção na alga i / taxa de remoção em ambas as algas; n_i = % de i no experimento misto.

$$\alpha_{\text{Chla}} = \frac{1}{I_{\text{Chla}} (I_{\text{Chla}} + I_{\text{Cyli}})} \quad \text{e} \quad (5)$$

$$\alpha_{\text{Cyli}} = \frac{1}{I_{\text{Cyli}} (I_{\text{Cyli}} + I_{\text{Chla}})} \quad (6)$$

onde α_{Chla} = seleção para Chla; α_{Cyli} = seleção para Cyli; I_{Chla} = razão de Ivlev para Chla e I_{Cyli} = razão de Ivlev para Cyli.

Experimentos com duração superior a cinco horas podem ocasionar resultados errados para os coeficientes de seleção alimentar (MANLY, 1972). Este problema não seria encontrado no presente estudo, uma vez que a duração do experimento nunca excedeu três horas.

Análise dos dados

Resultados dos experimentos monoespecíficos e mistos foram analisados através de uma combinação de regressões fatoriais ANOVA no programa estatístico R (versão 3.0.2). As suposições de normalidade e homogeneidade das variâncias foram testadas para todos os dados. Quando estas suposições não foram encontradas, os dados foram transformados pela raiz quadrada. Taxas de remoção (Total, *C. chlorastera* e *C. raciborskii*) e coeficiente de seleção alimentar foram as variáveis respostas. Concentração alimentar (0.125, 0.25, 0.375, 0.5 e 1 mg C L⁻¹) e tipo alimentar (*C. chlorastera* e *C. raciborskii*) foram as variáveis independentes para os experimentos monoespecíficos e proporção de *C. raciborskii* e tipo alimentar (*C. chlorastera* e *C. raciborskii*), para os experimentos mistos. As diferenças entre as médias foram determinadas com um teste de comparação post-hoc Tukey ($p < 0.05$).

1.3 RESULTADOS

Os copépodos *Notodiaptomus iheringi* removeram *Chlamydomonas chlorastera* e *Cylindrospermopsis raciborskii* em todos os tratamentos do experimento monoespecífico. O consumo foi maior nos tratamentos com *C. chlorastera* ($F_{1,20} = 81.58$; $p < 0.001$), com taxas de remoção variando de três (concentração 0.375 mgC L⁻¹; $TR_{Chla} = 0.23 \pm 0.1$ mL copéporo⁻¹ h⁻¹ e $TR_{Cyli} = 0.09 \pm 0.04$ mL copéporo⁻¹ h⁻¹) a 32 vezes (concentração 1 mgC L⁻¹; $TR_{Chla} = 0.24 \pm 0.06$ mL copéporo⁻¹ h⁻¹ e $TR_{Cyli} = 0.01 \pm 0.004$ mL copéporo⁻¹ h⁻¹) a mais nesta alga quando comparadas à *C. raciborskii*. Houve diferença nas taxas de remoção entre as diferentes concentrações alimentares avaliadas ($F_{4,20} = 3.37$; $p = 0.029$) com o estabelecimento de dois grupos estatisticamente homogêneos: (i) 0.125, 0.25, 0.375 e 1 mgC L⁻¹ e (ii) 0.125, 0.375, 0.5. e 1 mgC L⁻¹. Nenhum efeito da interação tipo alimentar x concentração alimentar foi encontrado ($F_{4,20} = 1$; $p = 0.4288$).

O consumo de *C. chlorastera* cresceu juntamente com o aumento da concentração de alimento disponível até atingir o máximo na concentração de 0.5 mgC L⁻¹. Por outro lado, o consumo de *C. raciborskii* foi reduzido ao longo das concentrações alimentares avaliadas. Os valores das taxas de remoção apresentaram um aumento na concentração de 0.5 mgC L⁻¹, mas em geral estas taxas foram constantes ao longo dos tratamentos (Fig. 1.1).

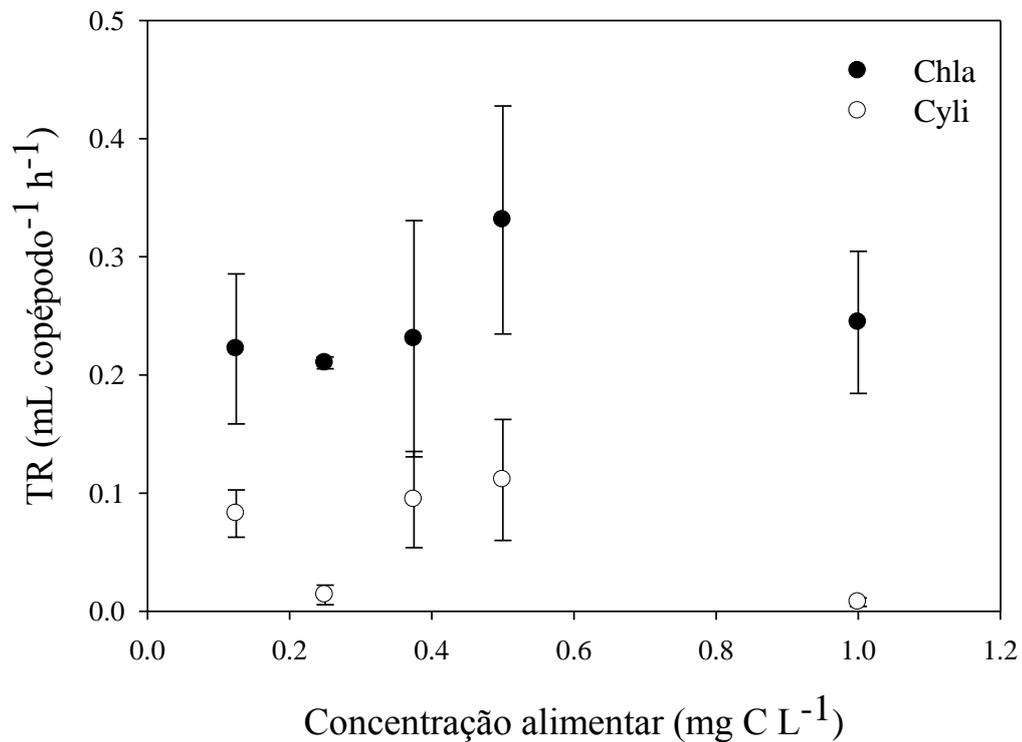


Figura 1.1: Taxas de remoção (mL copépodo⁻¹ h⁻¹) pelo copépodo *Notodiaptomus iheringi* em cada tipo alimentar, *Chlamydomonas chlorastera* (Chla) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli), em cinco concentrações alimentares diferentes (0.125, 0.25, 0.375, 0.5 e 1 mgC L⁻¹). Cada barra representa a média de três réplicas e o erro das mesmas representa o desvio padrão.

As diferentes porcentagens de *C. raciborskii* na dieta mista resultaram em efeitos significativos nas taxas de remoção total ($F_{4, 15} = 24.1$; $p < 0.001$). As taxas de remoção total nos experimentos mistos foram menores quando a proporção de *C. raciborskii* na suspensão alimentar foi maior ou igual a 50%. Quando a contribuição desta cianobactéria foi menor ou igual a 25%, nenhuma diminuição na remoção foi verificada quando comparada ao tratamento com 100% de *C. chlorastera* (Fig. 1.2). Dois grupos estatisticamente distintos foram formados: (i) 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii* e 100% *C. chlorastera*; (ii) 100% *C. raciborskii*; 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii* e 50% *C. chlorastera* : 50% *C. raciborskii*.

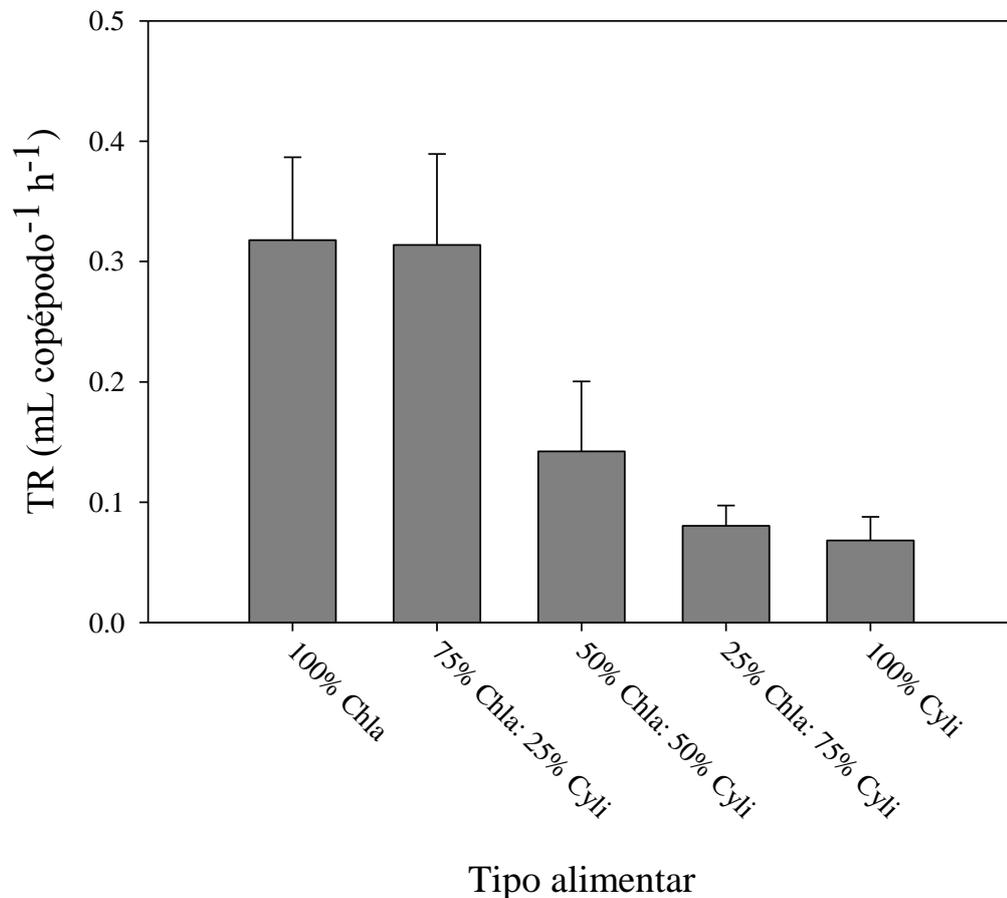


Figura 1.2: Taxas de remoção totais (mL copépodo⁻¹ h⁻¹) pelo copépodo *Notodiaptomus iheringi* nos tratamentos com diferentes contribuições de *Chlamydomonas chlorastera* (Chla) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli) em uma concentração final total de 0.5 mgC L⁻¹. Cada barra representa a média de quatro réplicas e o erro das mesmas representa o desvio padrão.

A proporção de *C. raciborskii* foi determinante para as taxas de remoção em *C. raciborskii* e *C. chlorastera* dentro de cada tratamento misto ($F_{2, 18} = 24.27$; $p < 0.001$). O aumento na proporção desta cianobactéria ocasionou uma diminuição nas taxas de remoção (Fig. 1.3). Não houve diferença significativa entre as taxas de remoção em *C. chlorastera* e *C. raciborskii* dentro de cada tratamento misto ($F_{1, 18} = 0.02$; $p = 0.9$). Três grupos foram formados após a análise de post-hoc Tukey: maiores taxas para (i) 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii*, seguidos por (ii) 50% *C. chlorastera* : 50% *C. raciborskii* e menores taxas para (iii) 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii*. Finalmente, nenhum efeito da interação proporção de *C. raciborskii* x tipo alimentar foi encontrado ($F_{2, 18} = 2.43$; $p = 0.116$).

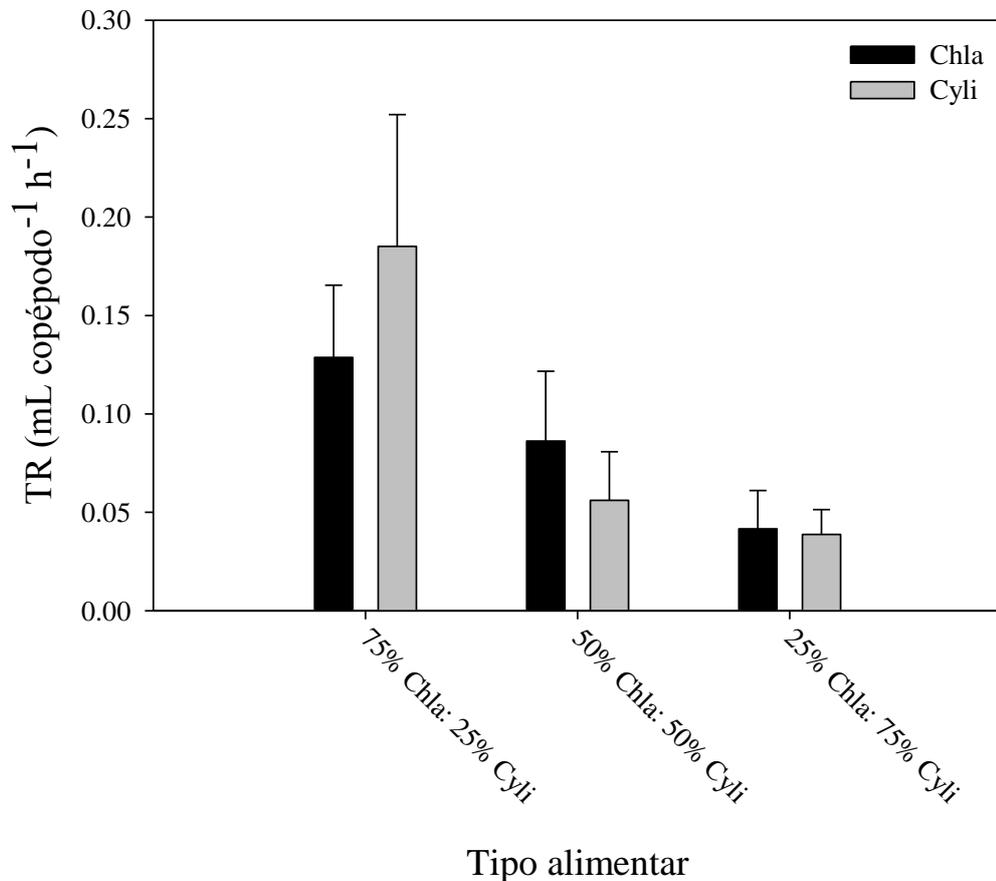


Figura 1.3: Taxas de remoção em *Chlamydomonas chlorastera* (Chla) e *Cylinndrospermopsis raciborskii* (Cyli) (mL copepod⁻¹ h⁻¹) pelo copépodo *Notodiaptomus iheringi* nos tratamentos com diferentes contribuições de Cyli em uma suspensão alimentar com concentração total de 0.5 mgC L⁻¹. Cada barra representa a média de quatro réplicas e o erro das mesmas representa o desvio padrão.

O efeito da interação proporção de *C. raciborskii* x tipo alimentar foi determinante para a seleção alimentar pelo copépodo *N. iheringi* ($F_{2, 18} = 234.24$; $p < 0.001$). Houve uma seleção positiva para *C. chlorastera* e negativa para *C. raciborskii* no tratamento 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii* (α Chla = 0.81 ± 0.05 ; α Cyli = 0.19 ± 0.05). Por outro lado, a seleção foi negativa para *C. chlorastera* e positiva para *C. raciborskii* no tratamento 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii* (α Chla = 0.20 ± 0.07 ; α Cyli = 0.80 ± 0.07). Finalmente, a diferença na seleção por *C. chlorastera* e *C. raciborskii* no tratamento 50% *C. chlorastera* : 50% *C. raciborskii* foi significativa mas pequena (α Chla = 0.60 ± 0.06 ; α Cyli = 0.40 ± 0.06) (Fig.1.4). O teste *pos-hoc* Tukey mostrou que estes coeficientes de seleção alimentar foram diferentes em todos os tratamentos mistos, exceto para os tratamentos 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii* e 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii*, nos quais os coeficientes de

seleção em *C. chlorastera* no tratamento 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii* foram similares aos coeficientes em *C. raciborskii* no tratamento 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii*. Estes coeficientes também foram similares em *C. chlorastera* no tratamento 75% *C. chlorastera* : 25% *C. raciborskii* e em *C. raciborskii* no tratamento 25% *C. chlorastera* : 75% *C. raciborskii*.

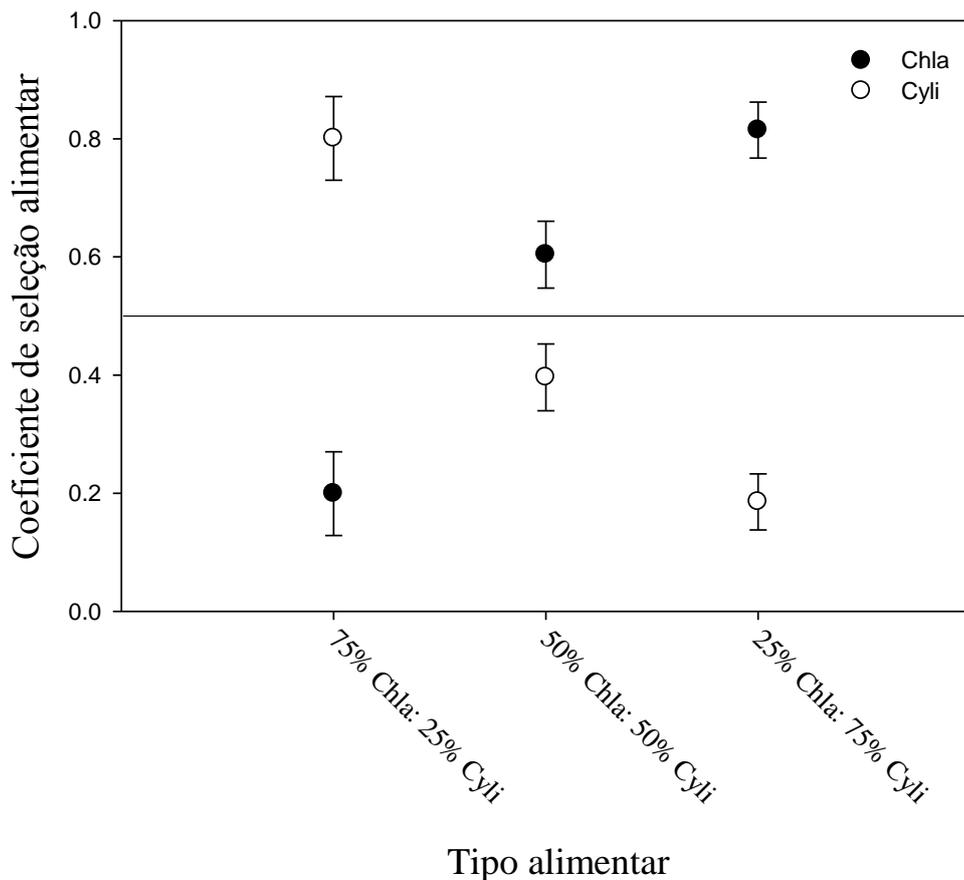


Figura 1.4: Coeficientes de seleção alimentar (α) para o copépodo *Notodiaptomus iheringi* nos tratamentos com diferentes contribuições de *Chlamydomonas chlorastera* (Chla) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli) em uma suspensão alimentar com concentração total de 0.5 mgC L^{-1} . Cada ponto representa a média de quatro réplicas e o erro das mesmas representa o desvio padrão. $\alpha > 0.5$ representa uma seleção positiva, $\alpha < 0.5$, seleção negativa e $\alpha = 0.5$, não seleção. Linha horizontal representa a limiar do valor $\alpha = 0.5$.

1.4 DISCUSSÃO

Em geral, o aumento na concentração da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* esteve relacionado a uma diminuição nas taxas de remoção total pelo copépodo *Notodiaptomus iheringi*. Porém, contrariando a hipótese do estudo, nenhuma diferença entre

as taxas de remoção em *C. raciborskii* e *Chlamydomonas chlorastera* dentro de cada tratamento misto foi evidenciada. A seleção alimentar foi sempre positiva para o tipo alimentar que estava em menor concentração no tratamento (*C. raciborskii* ou *C. chlorastera*) e quase nula quando estas dividiam a mesma porcentagem na concentração total de alimento.

O consumo de *C. raciborskii* por *N. iheringi* neste presente estudo está de acordo com outros trabalhos conduzidos com espécies de copépodos calanóides e esta cianobactéria. Em um experimento realizado com o copépodo *Pseudodiaptomus hessei* alimentado com suspensões monoespecíficas de *C. raciborskii* (concentração alimentar: $\sim 3.1 \text{ mgC L}^{-1}$), os autores encontraram taxas de remoção em torno de $0.03 \text{ mL copépodo}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (KÂ et al., 2012). Por outro lado, um estudo realizado com o copépodo de maior comprimento *Boeckella* sp. relatou taxas de remoção superiores em suspensões monoespecíficas de *C. raciborskii* a uma concentração total de 1 mgC L^{-1} (Taxas de remoção: $\sim 0.3 \text{ mL copépodo}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (HONG et al., 2013). O consumo de *C. raciborskii* por calanóides também foi sugerido a partir de análises estatísticas da dinâmica planctônica em um estudo conduzido em reservatórios tropicais (BOUVY et al., 2001).

Outros estudos já foram conduzidos avaliando a taxa de remoção de outros grupos zooplanctônicos em dietas monoespecíficas da mesma cepa de *C. raciborskii* utilizada neste estudo (referência LETC CYRF01). Estas taxas de remoção foram de duas (concentração de alimento: 1 mgC L^{-1}) a 60 vezes (concentração de alimento: 0.5 mgC L^{-1}) menores para a espécie de rotífero *Brachionus calicyflorus* em dietas monoespecíficas de *C. raciborskii* (SOARES et al., 2010). Em contrapartida, as taxas de remoção em concentrações similares às usadas neste estudo foram superiores para cladóceros. Estas taxas foram de duas a quatro vezes maiores para o cladóceros *Daphnia magna* em dietas monoespecíficas de *C. raciborskii* (SOARES et al., 2009b; PANOSSO & LÜRLING, 2010) . Além disto, a diminuição da remoção total por este cladóceros aconteceu apenas quando a proporção da cianobactéria esteve acima de 75% na concentração total de alimento (SOARES et al., 2009b). As menores taxas de consumo em copépodos e rotíferos em dietas com *C. raciborskii* podem indicar que estes animais, de fato, são menos eficientes em controlar florações de cianobactérias quando comparados ao grupo dos cladóceros (BOON et al., 1994).

A diminuição nas taxas de remoção totais por *N. iheringi* a partir do aumento da proporção de *C. raciborskii* na dieta indica que alguma característica desta cianobactéria pode estar relacionada ao aumento na rejeição de alimentos pelo copépodo. O tamanho dos filamentos de *C. raciborskii* não parece ter sido determinante para a inibição destas taxas, uma vez que copépodos são capazes de manusear, cortar filamentos e conseqüentemente

consumir cianobactérias filamentosas (WORK & HAVENS, 1993; BURNS & HEGARTY, 1994; KÂ et al., 2012; HONG et al., 2013). Por outro lado, os copépodos possuem uma baixa tolerância à toxicidade apresentada por cianobactérias (DeMOTT & MOXTER, 1991) e alguns estudos apontam inclusive um maior consumo de cepas de *C. raciborskii* não tóxicas em detrimento de cepas tóxicas da mesma espécie de cianobactéria (HONG et al., 2013). O efeito neurotoxicológico das saxitoxinas produzidas pela cepa de *C. raciborskii* usada neste estudo já foi apontada em cladóceros, com a diminuição da atividade natatória destes animais (FERRÃO-FILHO et al., 2007). A mesma inibição na capacidade de nadar pode ter ocorrido para o copépodo *N. iheringi*, uma vez que alguns animais estavam paralisados ao final do experimento (dados não apresentados).

Apesar dos valores das taxas de remoção terem sido mais baixos com o aumento na proporção de *C. raciborskii*, nenhuma diferença entre os valores de consumo de *C. raciborskii* e *C. chlorastera* dentro de cada tratamento foi evidenciado. A *Teoria do Forrageamento Ótimo* prediz que a seleção alimentar contra um tipo de qualidade nutricional menor tende a ser mais forte quando um alimento mais nutritivo é abundante e mais fraca quando é escasso (LEHMAN, 1976). Baseado nestas presunções, era esperado que a seleção fosse negativa para *C. raciborskii* quando a mesma estivesse em concentrações baixas (i.e. 25%) e positiva em concentrações altas (i.e. 75%). Porém, a seleção foi sempre positiva para o tipo alimentar que estava em menor concentração, independente do tipo alimentar.

Este comportamento de uma mudança de uma seleção positiva em baixas concentrações para uma alga tóxica em direção a uma negativa em altas concentrações já foi evidenciado em copépodos marinhos alimentados com o dinoflagelado tóxico *Dinophysis* spp. (KOZLOWSKY-SUZUKI et al., 2006).

A diminuição do consumo alimentar por algum fator inibitório pode ocasionar um comportamento não seletivo pela qualidade nutricional em copépodos (DeMOTT & MOXTER, 1991). Características da cepa de *C. raciborskii* utilizada no presente trabalho (e.g. toxicidade) podem ter levado a uma seleção em copépodos mais baseada na quantidade do tipo alimentar do que na qualidade.

Além disto, a exposição prévia a uma determinada cianobactéria pode resultar em um menor consumo destas e um conseqüente aumento na ingestão de alimentos mais nutritivos (GER et al., 2011). Ao longo dos seis anos de monitoramento do Lago dos Manacás (local onde o copépodo *N. iheringi* foi coletado), nenhuma ocorrência da cianobactéria *C. raciborskii* foi reportada. Esta não adaptação prévia dos copépodos usados no experimento à

C. raciborskii poderia explicar esta seletividade fraca pela qualidade alimentar em copépodos assim como o consumo similar nesta cianobactéria e na alga nutritiva *C. chlorastera*.

Em suma, o aumento na concentração de *C. raciborskii* ocasionou uma diminuição nas taxas de remoção total pelos copépodos. Apesar disto, a diferença no consumo desta cianobactéria e da alga nutritiva nos tratamentos esteve mais relacionada à quantidade do tipo alimentar do que à qualidade. Esta fraca relação da seleção alimentar com a qualidade nutricional pode ter sido ocasionada por diversos fatores tais como efeito inibitório por cianotoxinas e não adaptação prévia destes animais à *C. raciborskii*. Apesar de nenhuma diferença entre o consumo de *C. raciborskii* e *C. chlorastera* ter sido evidenciada dentro de cada tratamento, novos estudos deverão ser conduzidos no sentido de se avaliar o efeito desta cianobactéria no *fitness* de *N. iheringi* (e.g. sobrevivência e reprodução). Este foi o primeiro estudo a identificar uma fraca influência da qualidade nutricional na seleção alimentar entre *C. raciborskii* e uma alga mais nutritiva por um copépodo calanóide. Finalmente, este estudo poderá auxiliar no entendimento do comportamento de copépodos calanóides quando alimentados com cianobactérias filamentosas e tóxicas e conseqüentemente, servir como uma informação adicional sobre o controle de florações de cianobactérias em ambientes de água doce.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE UM COPÉPODO NEOTROPICAL SÃO AFETADAS PELA CIANOBACTÉRIA *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII*

2.1 INTRODUÇÃO

Por conta da crescente expansão de florações de cianobactérias em ecossistemas aquáticos continentais (PAERL & HUISMAN, 2009; PAERL & OTTEN, 2013), o estudo dos efeitos destas em organismos zooplanctônicos é de extrema importância (WILSON et al., 2006). Dentre os organismos zooplanctônicos, os copépodos são o grupo dominante em biomassa e provavelmente a subclasse de metazoário mais numerosa do planeta (VERITY & SMETACEK, 1996; MEUHLIN, 1998; TURNER, 2004; SOUSA et al., 2008). Estes animais, principalmente os de pequeno tamanho (~1mm de largura), são importantes por serem os principais consumidores de fitoplâncton e de componentes das alças microbianas (bacterioplâncton e protistas heterotróficos) e servirem como presas para peixes e outros animais carnívoros (TURNER, 2004).

A sobrevivência e reprodução de copépodos em dietas contendo cianobactérias são afetadas por diversos fatores tais como deficiência nutricional (SCHIMIDT & JÓNASDÓTTIR, 1997), toxicidade (GER et al., 2010b) e redução nas taxas de ingestão (KOSKI et al., 1999). Apesar destes fatores inibitórios, alguns estudos mostram altas taxas de consumo, sobrevivência e produção de ovos em copépodos calanóides alimentados com cianobactérias (BURNS & XU, 1990; XU & BURNS, 1991; KOSKI et al., 2002), principalmente em dietas mistas com outro tipo de alimento (SCHIMIDT & JÓNASDÓTTIR, 1997).

Copépodos calanóides apresentam reprodução sexuada obrigatória. Os espermatóforos produzidos pelos machos são transferidos para os receptáculos seminais das fêmeas. Após a fertilização, os ovos são formados e depositados em um ovissaco. Dependendo da espécie, este ovissaco pode ser carregado ventralmente pela fêmea (e.g. *Notodiptomus iheringi*) ou liberado diretamente na água (WILLIAMSON & REID, 2001).

Dentre os principais cianobactérias formadores de florações, encontra-se a espécie filamentosa *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju. Esta espécie é potencialmente tóxica, podendo produzir cilindrospermopsina e saxitoxina (CHORUS & BARTRAM, 1999) além de possuir uma alta capacidade invasora e grande plasticidade fenotípica (BONILLA et al., 2012). Este organismo já foi reportado em diversos sistemas em regiões tropicais (SOARES et al., 2009a; FIGUEREDO et al., 2013), sendo o

gênero *Cylindrospermopsis* um dos principais formadores de florações no Brasil (SOARES et al., 2013).

O efeito deletério de cepas de *C. raciborskii* produtora de saxitoxinas já foi reportado em camundongos e na comunidade zooplanctônica (e.g. FERRÃO-FILHO et al., 2010; COSTA et al., 2013; ZAGATTO & FERRÃO-FILHO, 2013). Para a comunidade zooplanctônica, já foram observados crescimento populacional positivo para o rotífero *Brachionus calyciflorus* em dietas com contribuição de 50% e 75% de *C. raciborskii* (SOARES et al., 2010) e inibição do crescimento do cladóceros *Daphnia magna* em dietas com mais de 75% *C. raciborskii* (SOARES et al., 2009b).

Apesar da importância de copépodos calanóides em ecossistemas aquáticos e da crescente expansão na ocorrência de *C. raciborskii*, nenhum estudo avaliando a sobrevivência e reprodução destes animais alimentados com esta cianobactéria foi ainda publicado. No Capítulo 1 desta dissertação, foi reportada uma diminuição nas taxas de remoção total pelos copépodo calanóide *Notodiaptomus iheringi* Wright a partir do aumento na concentração de *C. raciborskii* nas dietas mistas. Apesar disto, a seleção alimentar apresentada pelos copépodos esteve mais relacionada com a quantidade dos itens alimentares do que com a qualidade nutricional dos mesmos. Uma vez que estes animais consomem esta cianobactéria, um estudo adicional avaliando a sobrevivência e reprodução de *N. iheringi* é necessário para o entendimento do comportamento deste copépodo em dietas com *C. raciborskii*.

O objetivo deste estudo foi avaliar a sobrevivência (curvas K-M, probabilidade de sobrevivência e *Hazard ratios*) e reprodução (porcentagem de fêmeas ovadas e taxas de produção de ovos) do copépodo calanóide neotropical *Notodiaptomus iheringi* quando alimentados com suspensões mono específicas e mistas da cianobactéria *C. raciborskii* e uma alga nutritiva, *Cryptomonas obovata*. O gênero *Notodiaptomus* apresenta uma ampla distribuição geográfica e possui as mais altas abundâncias e riqueza de espécies dentre os calanóides de água doce neotropical (SANTOS-SILVA et al., 1999). Há ocorrência de *Notodiaptomus iheringi* coexistindo com cianobactérias em ambientes de água doce e o efeito nocivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* nas taxas de consumo por este copépodo já foi evidenciado (PANOSSO et al., 2003).

Com os resultados encontrados neste estudo, espera-se contribuir com um maior conhecimento sobre o efeito da cianobactéria tóxica *C. raciborskii* no *fitness* de copépodos calanóides. Uma vez que o consumo de *C. raciborskii* pelo copépodo *N. iheringi* aumenta a partir da diminuição da proporção desta cianobactéria em dietas mistas, espera-se encontrar

taxas maiores de sobrevivência e reprodução em dietas com menores proporções de *C. raciborskii*.

2.2 MATERIAL & MÉTODOS

Organismos

A cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszýnska), Seenayya et Subba Raju (cepa LETC CYRF01) foi obtida do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. De acordo com análises prévias, esta cepa é produtora de saxitoxinas (concentração de 0.95 pg cél⁻¹) (a 25° C, intensidade luminosa de 35 µmol quanta m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12:12 horas) (*informação pessoal Marcela Miranda*). A cepa utilizada no presente estudo possui uma menor concentração de saxitoxinas quando comparada a outras cepas, tais como os dinoflagelados *Alexandrium* spp. (5.22 a 16.12 pg cél⁻¹) (COLIN & DAM, 2002) e *Alexandrium lusitanicum* (1.25 a 1.56 pg cél⁻¹) (DUTZ, 1998).

A alga *Cryptomonas obovata* Czosnowski foi obtida da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce, Universidade Federal de São Carlos, Brasil. No presente trabalho, esta alga foi considerada como sendo o alimento nutritivo para os copépodos, principalmente por possuir concentrações significantes de ácidos graxos essenciais como o ácido eicosapentaenoico (WEERS & GULATI, 1997).

Culturas destas duas microalgas foram cultivadas em sistema *batch* a 25° C em intensidade luminosa de 35 µmol quanta m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 12:12 horas. Estas culturas foram mantidas em 300 mL de meio WC modificado (LÜRLING & BEEKMAN, 1999) em fase exponencial de crescimento.

Sob estas condições ambientais controladas, os filamentos de *C. raciborskii* apresentaram um comprimento médio (\pm 1DP) de 41.9 (\pm 14.2) µm e largura média (\pm 1DP) de 3.0 (\pm 0.4) µm (n=20). A população de *C. obovata* apresentou dominância de organismos unicelulares com um comprimento médio (\pm 1DP) de 18.3 (\pm 2.4) µm e largura média (\pm 1DP) de 12.9 (\pm 2.5) µm (n=20).

Para a determinação das concentrações de carbono das suspensões alimentares, o biovolume individual de cada microalga foi calculado. A partir destes valores, a concentração de carbono foi estimada de acordo com a fórmula $C = a.V.b$, onde C = concentração de carbono (mg C.L⁻¹), a=0.1204, V= biovolume da microalga (µm³) e b=1.051 (ROCHA & DUNCAN, 1985).

Populações do copépodo calanóide *Notodiaptomus iheringi* (largura do prossomo \pm 1DP = ♀ 1.14 ± 0.13 mm e ♂ 1.11 ± 0.11 mm) foram coletadas no Lago dos Manacás (*campus* Universidade Federal de Juiz de Fora) através de arrastos verticais com o auxílio de uma rede de plâncton de abertura de malha de 68 μ m. Durante dois períodos de monitoramento neste lago (1999-2000 e 2008-2012), nenhuma ocorrência de *C. raciborskii* foi reportada.

Após a coleta, as amostras dos copépodos foram acondicionadas em frascos com capacidade de 5L preenchidos com água do lago e retornaram para o laboratório em no máximo 30 minutos. Em laboratório, adultos com apêndices intactos e que nadavam ativamente foram isolados e rinsados sob microscópio binocular. Todos os animais isolados foram colocados em béqueres de 5L preenchidos com meio WC modificado sem adição de NO_3 e PO_4 e alimentados com *Chamydomonas chlorastera* (taxa de $0.5 \text{ mgC L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Estes béqueres foram mantidos a 25°C , em intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e em fotoperíodo de 12:12 horas. Após 24 horas de adaptação às condições laboratoriais, os adultos foram capturados com o auxílio de uma pipeta e usados para a execução dos dois experimentos.

Experimento de sobrevivência

Experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* nas taxas de sobrevivência de fêmeas de *Notodiaptomus iheringi* ao longo de doze dias. Dois blocos de experimento foram realizados: (i) dietas mistas da cianobactéria *C. raciborskii* e da alga nutritiva *C. obovata* a uma concentração total de $\sim 0.5 \text{ mgC L}^{-1}$ e (ii) dietas com diferentes concentrações de *C. obovata* comparáveis com a quantidade desta alga nas dietas mistas. A inclusão do item (ii) foi realizada com o objetivo de avaliar se as diferentes concentrações de apenas *C. obovata* são capazes de suportar a sobrevivência dos copépodos.

- (i) **Dietas mistas:** *Diferentes proporções de C. raciborskii e C. obovata* –
Concentração total: $\sim 0.5 \text{ mgC L}^{-1}$:
- a) 100% *C. obovata*
 - b) 75% *C. obovata* : 25% *C. raciborskii*
 - c) 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii*
 - d) 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii*
 - e) 100% *C. raciborskii*

- f) Sem alimento (meio WC modificado sem adição de NO_3 e PO_4)
- (ii) **Controle nutritivo:** Somente *C. obovata* em diferentes concentrações correspondentes aos tratamentos com dietas mistas
- g) 100% *C. obovata* ($\sim 0.5 \text{ mgC L}^{-1}$)
- h) 75% *C. obovata* ($\sim 0.375 \text{ mgC L}^{-1}$)
- i) 50% *C. obovata* ($\sim 0.25 \text{ mgC L}^{-1}$)
- j) 25% *C. obovata* ($\sim 0.125 \text{ mgC L}^{-1}$)

Dez fêmeas com apêndices intactos e que nadavam ativamente foram adicionadas em cada réplica contendo 250 mL de meio WC modificado sem adição de NO_3 e PO_4 juntamente com a dieta alimentar específica. Quatro réplicas foram avaliadas para cada tratamento especificado acima. Diariamente, 80% do meio eram renovados, com adição de nova dieta alimentar. Todo o experimento foi conduzido a uma temperatura controlada de 25°C .

A sobrevivência foi monitorada diariamente com o auxílio de um microscópio estereoscópio. O animal foi considerado morto quando não foi detectado nenhum movimento dos apêndices ou estruturas intracorporais mesmo após estímulo.

As curvas de sobrevivência não atendem à suposição de normalidade uma vez que existem dados de censo dentro desta análise. Estes dados de censo ocorrem quando o evento de interesse (e.g. morte do copépodo) acontece após o período de monitoramento. Por conta disto, análises paramétricas não podem ser aplicadas. Para a análise dos dados de sobrevivência, dois métodos estatísticos foram, portanto aplicados: curvas de Kaplan-Meier – K-M (KAPLAN & MEIER, 1958) e modelos de regressão de Cox (COX, 1972). As curvas de K-M foram usadas para descrever a sobrevivência de copépodos ao longo dos doze dias de experimento para os dois blocos de experimento: (i) suspensões mistas de *C. obovata* e *C. raciborskii* juntamente com o controle sem alimento e (ii) controle nutritivo com apenas *C. obovata*. Nestas curvas, o tempo de duração do experimento é dividido em intervalos e os limites entre eles são estabelecidos de acordo com a ocorrência de eventos. Ao final desta análise, também foram geradas as probabilidades de sobrevivência dos copépodos no dia 12 (último dia de experimento). A partir de uma combinação de regressões fatoriais ANOVA no programa estatístico R (versão 3.0.2), diferenças entre as probabilidades de sobrevivência entre as dietas mistas, controles nutritivos e dietas mistas x controle nutritivo foram avaliadas. Probabilidade de sobrevivência foi a variável resposta. Proporção de *C. obovata* e

presença/ausência de *C. raciborskii* foram as variáveis independentes. As diferenças entre as médias foram determinadas com um teste de comparação post-hoc Tukey ($P < 0.05$).

Os modelos de regressão de Cox descrevem o efeito de diversas variáveis independentes no tempo necessário para que determinado evento aconteça (e.g. morte do copépodo). Estes modelos geram valores para a *Hazard ratio* (HR). HR determina a probabilidade de algum indivíduo que ainda não apresentou determinado evento, apresentá-lo neste momento. HRs foram calculados para os nove diferentes tratamentos avaliados neste estudo, tendo como variáveis a porcentagem de *C. obovata* e *C. raciborskii* nas suspensões. Os valores de $HR = 1$ indicam que a variável independente (% Cryp e % Cyli) não possui nenhum efeito na variável dependente (morte de copépodos). Em contrapartida, $HR > 1$ indicam que um aumento na variável independente está relacionado ao aumento na probabilidade da ocorrência do evento de interesse (morte de copépodos). Por outro lado, $HR < 1$ indicam o inverso, o aumento da variável independente está associado à diminuição na probabilidade de ocorrência deste evento. O resultado da multiplicação do coeficiente β pelo número de pontos de aumento ao longo dos tratamentos determina o HR para cada variável independente específica. Tanto as análises de K-M quanto os modelos de regressão de Cox foram realizadas no programa estatístico R (versão 3.0.2) com a utilização do pacote *RcmdrPlugin.survival* (FOX & CARVALHO, 2012).

Experimento de reprodução

A porcentagem de fêmeas de *N. iheringi* com ovos (%), assim como produção de ovos (ovos fêmea⁻¹ dia⁻¹), foram avaliadas nos diferentes blocos de tratamento *i* e *ii* especificados no item *Experimento de sobrevivência*.

Cerca de 50 machos e 50 fêmeas com apêndices intactos e que nadavam ativamente foram acondicionados separadamente em béqueres de 5L preenchidos com meio WC modificado sem adição de NO₃ e PO₄ e a dieta alimentar específica (tratamento *i* e *ii*) durante cinco dias.

Após o período de acondicionamento, dez fêmeas sem ovos e sem espermatóforos e cinco machos foram adicionados no mesmo béquer contendo a dieta alimentar específica e 250 mL de meio WC modificado sem adição de NO₃ e PO₄ por 48h. Três réplicas foram avaliadas para cada tratamento especificado acima. Diariamente 80% do meio eram renovados, com adição de nova suspensão alimentar. O meio retirado dos béqueres foi filtrado diariamente em rede de 68 μ m com o objetivo de verificar se houve presença de ovos isolados ou náuplios. Todo o experimento foi conduzido a uma temperatura controlada de 25°C.

Após este período, as fêmeas foram colocadas em placas de Petri e levadas ao microscópio estereoscópio. O número de fêmeas ovadas assim como a quantidade de ovos nos ovissacos das fêmeas foram reportados.

A taxa de produção de ovos (ovos fêmea⁻¹ dia⁻¹) foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{TPO} = \frac{E}{(I \times F)} \quad (1)$$

Onde TPO = Taxa de produção de ovos; E = número total de ovos produzidos após 48h de incubação; I = período de incubação em dias e F = número de fêmeas incubadas.

Resultados dos experimentos de dietas mistas e apenas *C. obovata* foram analisados através de uma combinação de regressões fatoriais ANOVA no programa estatístico R (versão 3.0.2). Diferenças entre as dietas mistas, controles nutritivos e dietas mistas x controle nutritivo foram avaliadas. Taxa de produção de ovos e porcentagem de fêmeas com ovos foram as variáveis respostas. Proporção de *C. obovata* e presença/ausência de *C. raciborskii* foram as variáveis independentes. As diferenças entre as médias foram determinadas com um teste de comparação post-hoc Tukey ($p < 0.05$).

2.3 RESULTADOS

Sobrevivência

Características da cepa de *C. raciborskii* (e.g. produção de saxitoxinas) não causaram um efeito agudo no copépodo *Notodiaptomus iheringi* uma vez que estes animais sobreviveram um período mais longo em suspensões com 100% *C. raciborskii* do que em tratamentos sem a adição de alimento (Fig. 2.1A e 2.2A). Nos seis primeiros dias de experimento, a sobrevivência foi menor no tratamento 100% *Cyli* quando comparada ao tratamento sem alimento. Porém, os copépodos morreram dentro de nove dias para tratamentos sem adição de alimento e dentro de 11 dias para 100% *C. raciborskii*. Em todo o restante dos tratamentos, foram reportados animais vivos ao final do experimento (Fig. 2.1 e 2.2).

A probabilidade de sobrevivência do copépodo no dia 12 (final do experimento) variou de 0 (100% *C. raciborskii* e sem alimento) a 0.85 ± 0.06 (100% *C. obovata*) (Fig. 2.3).

Estas probabilidades foram significativamente diferentes entre os tratamentos com dietas mistas ($F_{4,15} = 194.3$; $p < 0.001$), com o estabelecimento de quatro grupos: (1) 100% *C. obovata*; 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii*; (2) 75% *C. obovata* : 25% *C. raciborskii*; 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii*; (3) 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii* e (4) 100% *C. raciborskii*. Nas dietas com apenas *C. obovata* em diferentes proporções, a sobrevivência também foi diferente ($F_{3,12} = 7.89$; $p < 0.01$) com a formação de três grupos estatisticamente distintos: (1) 100% *C. obovata*; 75% *C. obovata*; (2) 75% *C. obovata*; 50% *C. obovata*, 25% *C. obovata* e (3) 25% *C. obovata*. A comparação entre dietas mistas e seus controles com apenas *C. obovata* indicou que a sobrevivência foi influenciada pela presença de *C. raciborskii* ($F_{1,18} = 26.83$; $p < 0.001$), proporção de *C. obovata* ($F_{2,18} = 8$; $p < 0.01$) e interação presença de *C. raciborskii* x proporção de *C. obovata* ($F_{2,18} = 16.96$; $p < 0.01$). Os tratamentos com dietas mistas apresentaram taxas de sobrevivência menores do que seus respectivos controles com apenas *C. obovata*, exceto para a dieta 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii* que apresentou taxas semelhantes ao seu controle 50% *C. obovata*.

O modelo de regressão de Cox indicou efeitos positivos das proporções de *C. obovata* (teste Wald = 9.4, $df=1$, $p < 0.01$) e negativo das de *C. raciborskii* (teste Wald = 42.72, $df=1$, $p < 0.001$) em dietas mistas na sobrevivência de *N. iheringi*. Por outro lado, as diferentes proporções de *C. obovata* no controle nutritivo não ocasionaram nenhum efeito significativo na sobrevivência dos copépodos (teste Wald = 2.6, $df=1$, $p=0.103$). Os valores de HR para as proporções de *C. obovata* e *C. raciborskii* em dietas mistas foram de 0.985 e 1.031, respectivamente. Para estas dietas mistas, o aumento na proporção de *C. obovata* ocasionou uma pequena diminuição na probabilidade de morte de 1 para 0.985 (25% *C. obovata*), 0.969 (50% *C. obovata*), 0.954 (75% *C. obovata*) e 0.94 (100% *C. obovata*). Por outro lado, o aumento na proporção de *C. raciborskii* esteve relacionado a um pequeno aumento na mortalidade dos copépodos. A probabilidade de morte aumentou de 1 para 1.031 (25% *C. raciborskii*), 1.064 (50% *C. raciborskii*), 1.098 (75% *C. raciborskii*) e 1.132 (100% *C. raciborskii*).

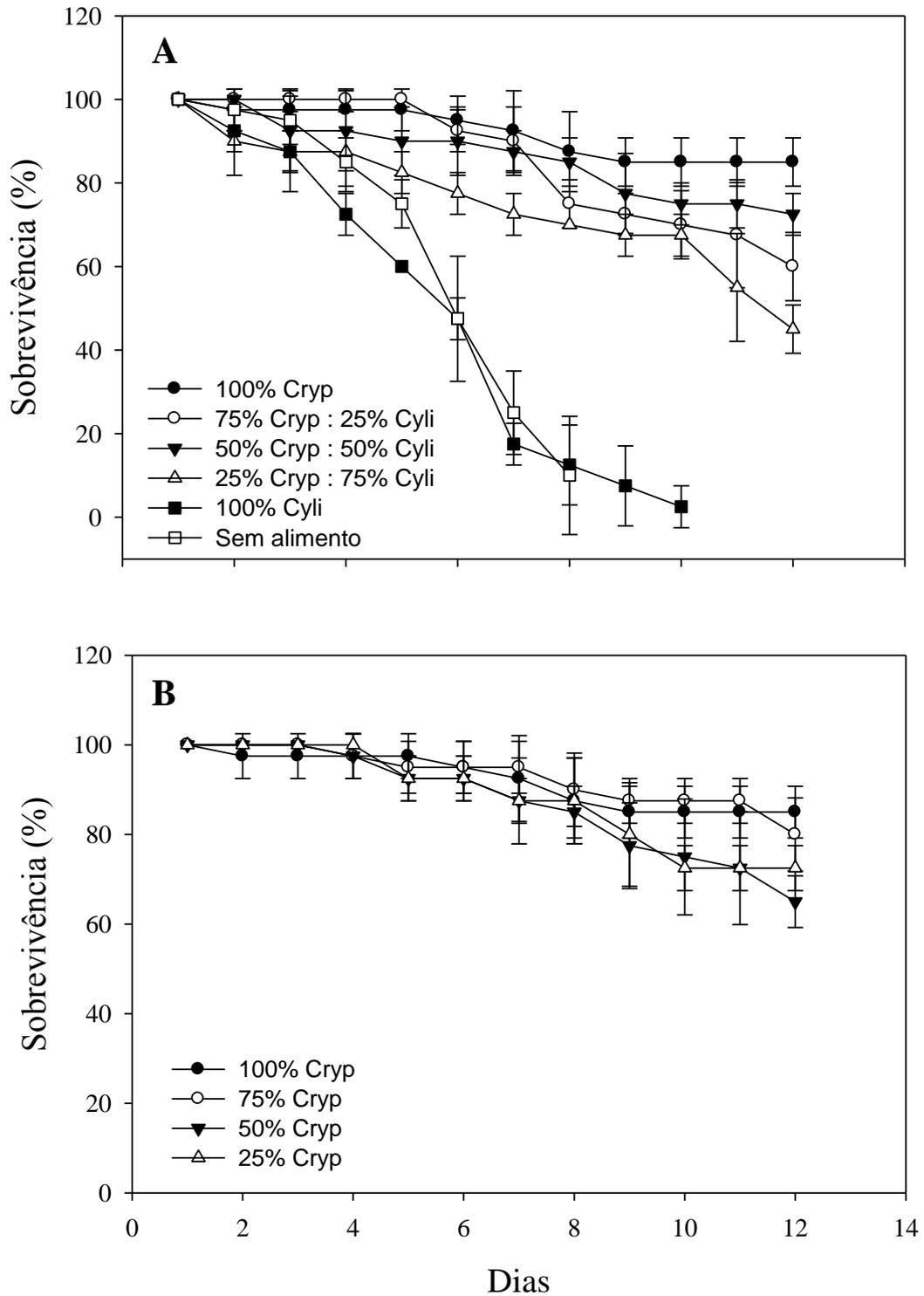


Figura 2.1: Sobrevivência do *Notodiptomus iheringi* em suspensões mistas de (A) *Cryptomonas obovata* (Cryp) : *Cylandrospermopsis raciborskii* (Cyli) e controle sem alimento e (B) apenas Cryp (controle nutritivo). Cada linha representa a média de quatro réplicas (± 1 DP).

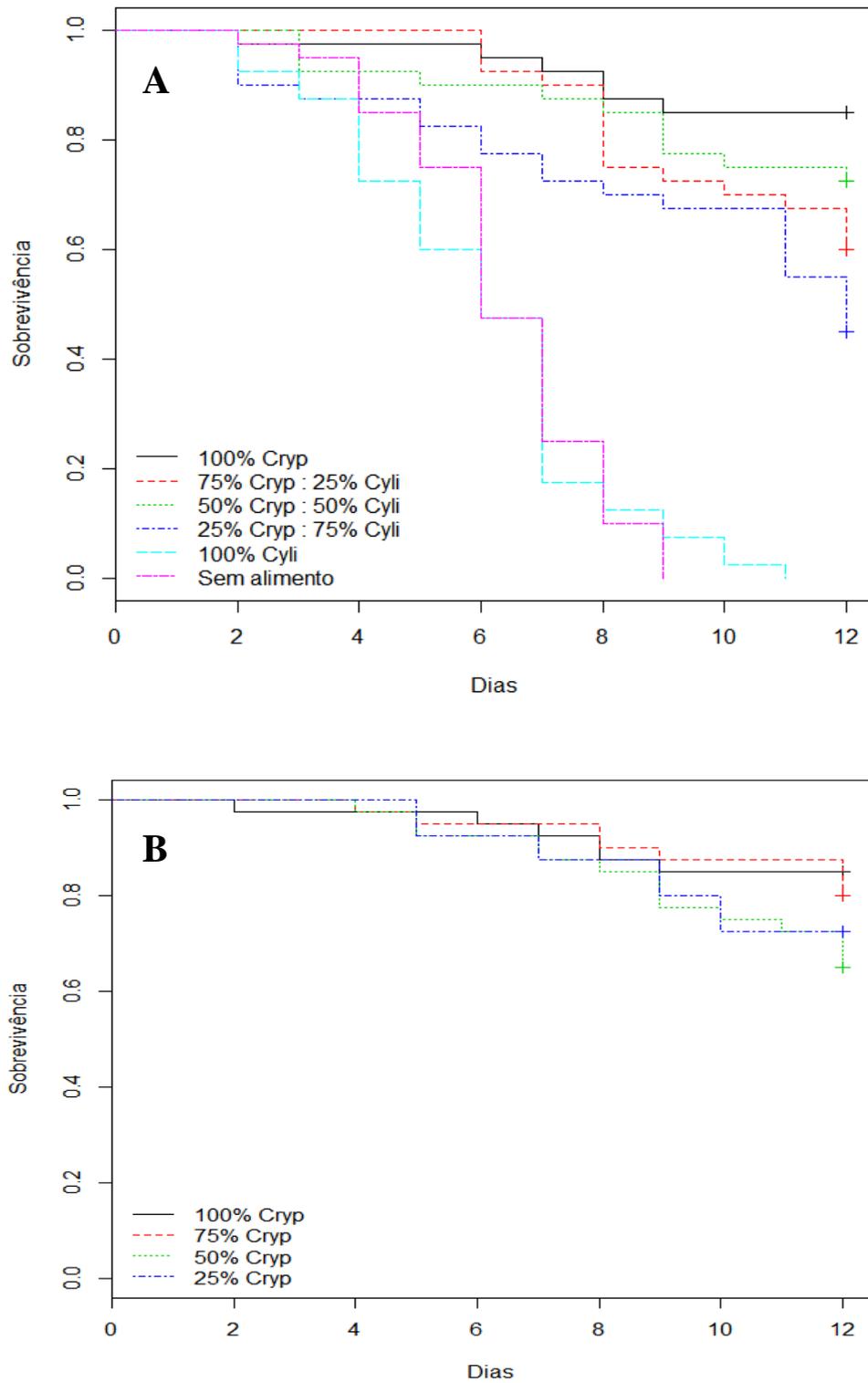


Figura 2.2: Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevivência do *Notodiptomus iheringi* em suspensões mistas de (A) *Cryptomonas obovata* (Cryp) : *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli) e controle sem alimento e (B) apenas Cryp (controle nutritivo). Cada linha representa a média de quatro réplicas.

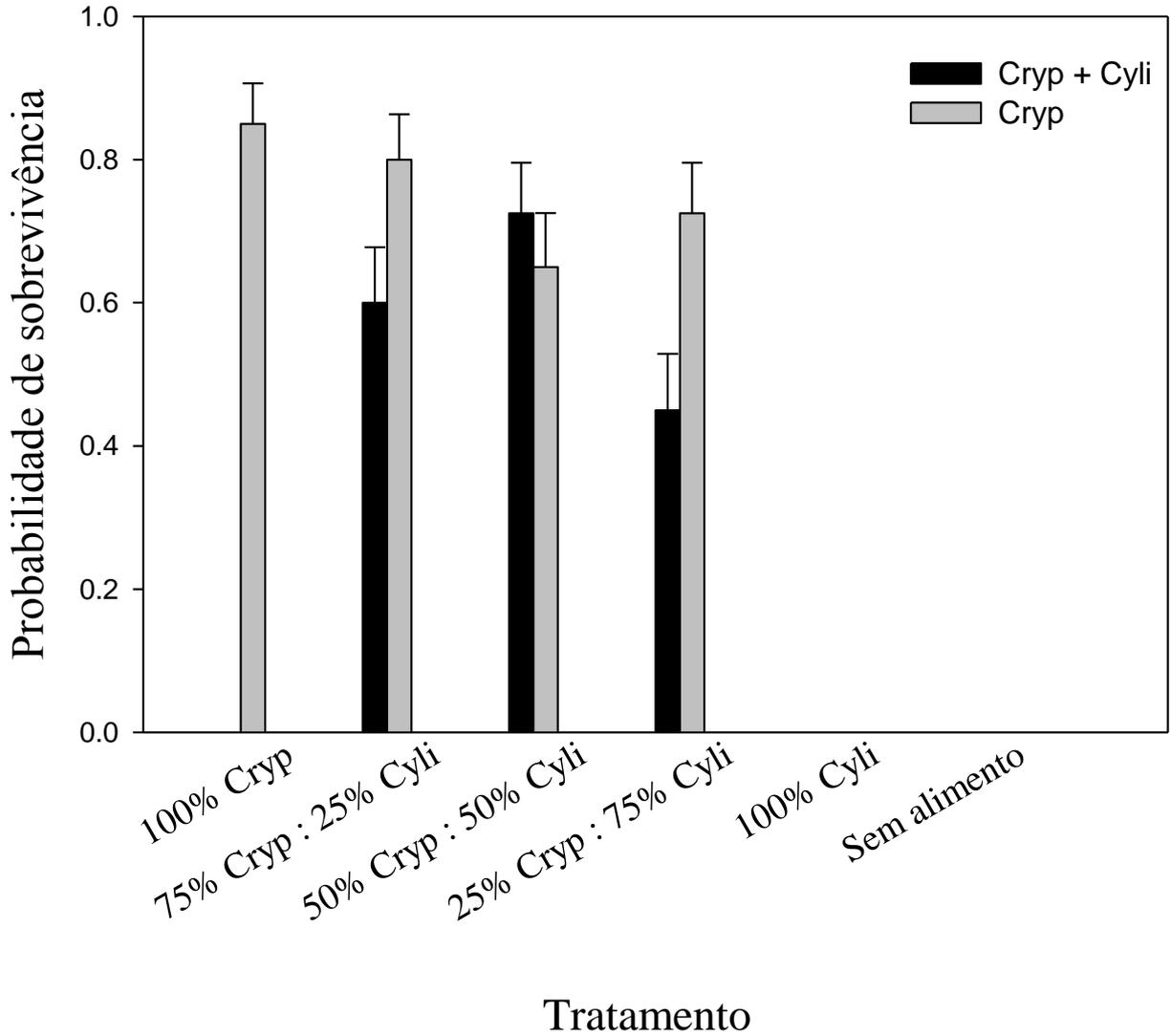


Figura 2.3: Probabilidade de sobrevivência no dia 12 para o copéudo *Notodiaptomus iheringi* alimentado com *Cryptomonas obovata* (Cryp) : *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli), apenas Cryp (controle nutritivo) e controle sem alimento. Barras indicam 95% dos intervalos de confiança para 4 réplicas. Tratamentos 100% Cyli e Sem alimento: probabilidade de sobrevivência = 0.

Reprodução

A porcentagem de fêmeas com ovos nos tratamentos variou de 0 (sem alimento, 100% *C. raciborskii* e 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii*) a $43 \pm 12\%$ (100% *C. obovata*) (Fig. 2.4). As porcentagens foram significativamente diferentes entre os tratamentos de dietas mistas ($F_{4,10} = 18.28$; $p < 0.001$), com maior número de fêmea com ovos no tratamento (1) 100% *C. obovata* e (2) menor para 100% *C. raciborskii*; 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii*; 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii*; 75% *C. obovata* : 25% *C. raciborskii*. Para as dietas com apenas *C. obovata* em diferentes proporções, a taxa de produção também foi similar para todos os tratamentos ($F_{3,18} = 2.83$; $p = 0.106$). Finalmente, o número de fêmeas com ovos nas dietas mistas e seus controles com apenas *C. obovata* foi influenciado tanto pela presença de *C. raciborskii* ($F_{1,12} = 22.88$; $p < 0.001$) quanto pela proporção de *C. obovata* ($F_{2,12} = 5.55$; $p < 0.01$). Dietas com *C. raciborskii* ou proporção de *C. obovata* de 25% apresentaram porcentagem de fêmeas com ovos.

As taxas de produção de ovos variaram de nenhum (sem alimento, 100% *C. raciborskii* e 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii*) a 1.55 ± 0.68 ovos fêmea⁻¹ dia⁻¹ (75% *C. obovata*) (Fig. 2.5). Estas taxas foram significativamente diferentes entre os tratamentos com dietas mistas ($F_{4,10} = 21.16$; $p < 0.001$), com a distinção de dois grupos: (1) maiores valores para o tratamento 100% *C. obovata* e (2) menores valores para 100% *C. raciborskii*, 25% *C. obovata* : 75% *C. raciborskii*; 50% *C. obovata* : 50% *C. raciborskii*; 75% *C. obovata* : 25% *C. raciborskii*. Entre as dietas com apenas *C. obovata* em diferentes proporções, a taxa de produção também foi diferente ($F_{3,8} = 4.62$; $p < 0.01$) com determinação de dois grupos: (1) 100% *C. obovata*; 75% *C. obovata* e 50% *C. obovata* e (2) 100% *C. obovata*; 50% *C. obovata* e 25% *C. obovata*. A comparação entre as dietas mistas e seus controles com apenas *C. obovata* indicou que tanto a presença de *C. raciborskii* ($F_{1,12} = 39.28$; $p < 0.001$) quanto a proporção de *C. obovata* ($F_{2,12} = 9.05$; $p < 0.01$) influenciaram na produção de ovos. Dietas com *C. raciborskii* ou proporção de *C. obovata* de 25% apresentaram taxas de produção de ovos menores.

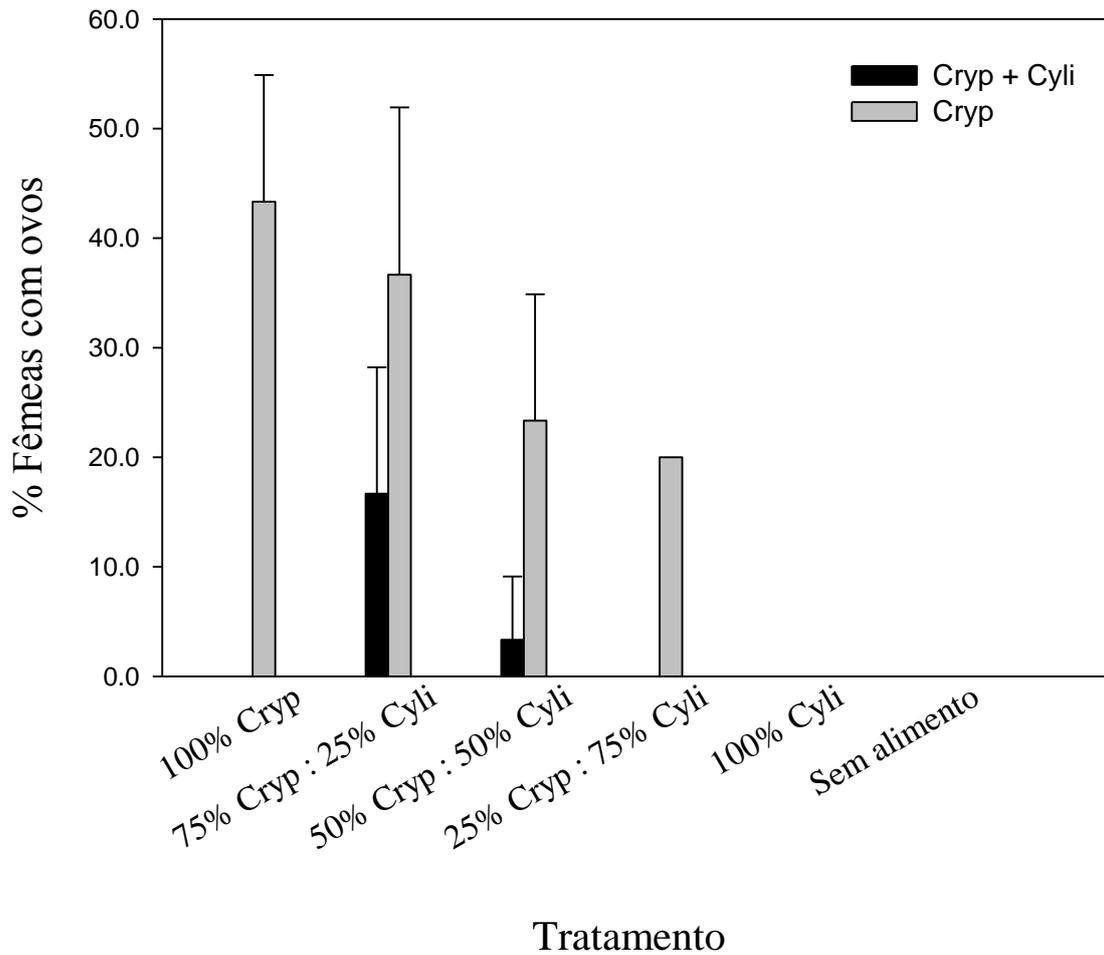


Figura 2.4: Porcentagem de fêmeas de *Notodiaptomus iheringi* com ovos em dietas de *Cryptomonas obovata* (Cryp) : *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli), apenas Cryp (controle nutritivo) e controle sem alimento. Barras indicam 95% dos intervalos de confiança para três réplicas. Tratamentos 25% Cryp : 75% Cyli, 100% Cyli e sem alimento: produção de ovos = 0.

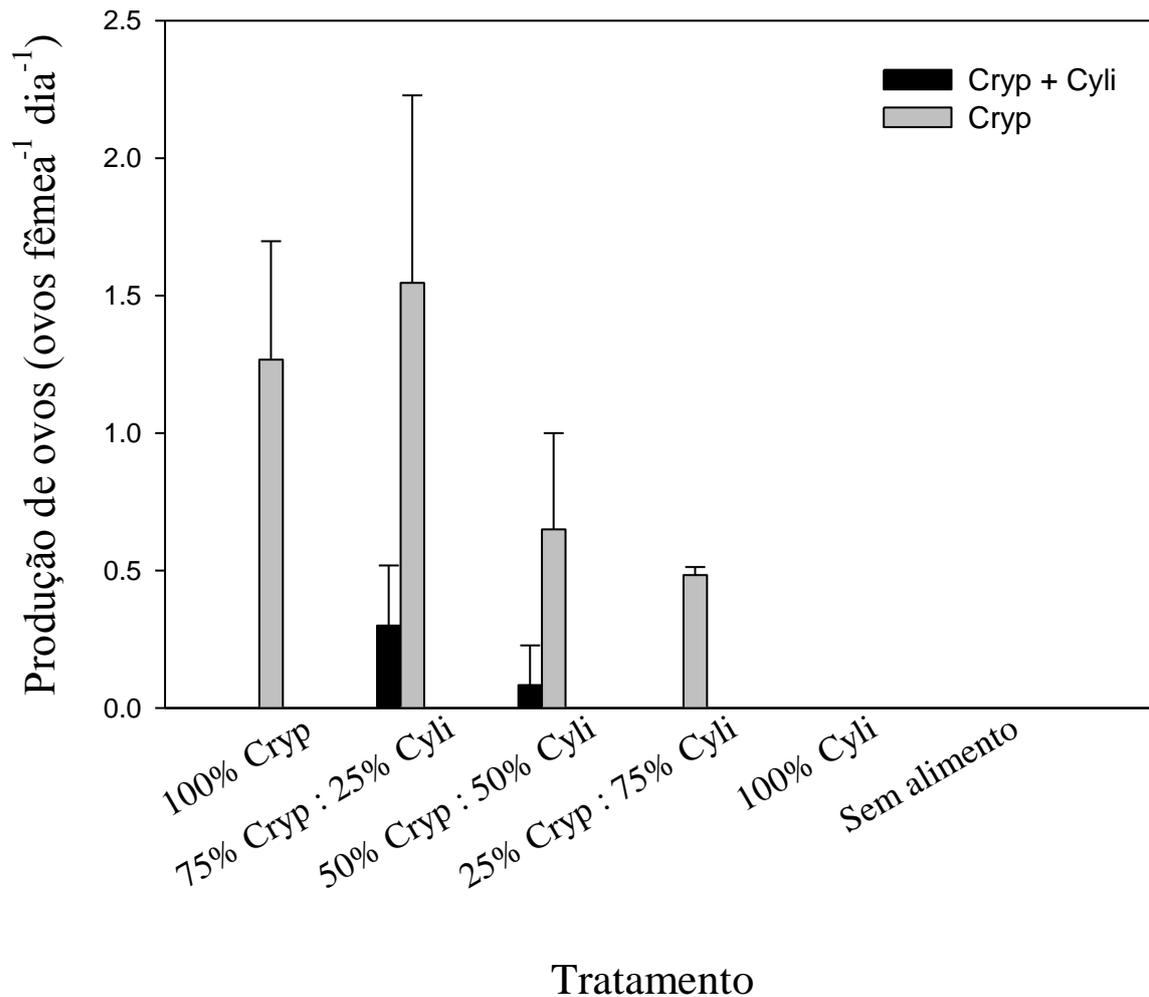


Figura 2.5: Produção de ovos (ovos fêmea⁻¹ dia⁻¹) para o copépodo *Notodiaptomus iheringi* em dietas de *Cryptomonas obovata* (Cryp) : *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyli), apenas Cryp (controle nutritivo) e controle sem alimento. Barras indicam 95% dos intervalos de confiança para três réplicas. Tratamentos 25% Cryp : 75% Cyli, 100% Cyli e sem alimento: produção de ovos = 0.

2.4 DISCUSSÃO

Efeitos negativos do aumento da proporção da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* em dietas mistas foram mais evidenciados para a reprodução do que para sobrevivência em copépodos da espécie *Notodiaptomus iheringi*. As probabilidades de sobrevivência foram diminuídas a partir do aumento da concentração da cianobactéria e foram maiores nos controles nutritivos do que nas respectivas dietas mistas, exceto para o tratamento 50% *Cryptomonas obovata* : 50% *Cylindrospermopsis raciborskii* (= 50% *C. obovata*). Além disto, os valores de HR indicaram que o aumento na proporção de *C. raciborskii* ocasionou um pequeno aumento na probabilidade de morte dos copépodos. A diminuição desta probabilidade aconteceu com o aumento na proporção de *C. obovata*. Contrariando a hipótese

do estudo, a produção de ovos, assim como porcentagem de fêmeas ovadas sempre foram mais baixas estatisticamente em dietas com a presença de *C. raciborskii*, independente da proporção desta cianobactéria.

A capacidade de sobrevivência de copépodos a períodos sem alimento está associada principalmente à capacidade destes animais em possuir reservas de lipídios (e.g. triglicerídeos e ésteres de cera) (BUTLER, 1994). Copépodos que possuem uma reserva maior de ésteres de cera serão menos afetados por períodos sem alimento do que aqueles que possuem reserva de triglicerídeos (KOSKI & BRETELER, 2003). Um estudo conduzido com o copépodo diaptomídeo *Diaptomus kenai* mostrou que esta espécie armazena principalmente triglicerídeos, variando de 25 a 80% da reserva total de lipídios (BUTLER, 1994). Uma vez que *Diaptomus kenais* e *Notodiaptomus iheringi* pertencem à mesma família Diaptomidae, pode-se inferir que a baixa sobrevivência deste último copépodo encontrada no tratamento sem alimento pode estar associada a uma maior reserva de triglicerídeos destes animais. O período de sobrevivência sem alimento para *N. iheringi* (9 dias) foi semelhante a outros períodos reportados na literatura para copépodos calanóides: 7 a 9 dias para *Eurytemora affinis* e *Pseudodiaptomus forbesi* (GER et al., 2010b), 6 a 10 dias para *Acartia tonsa* e 3 a 6 dias para *Centropages typicus* (DAGG, 1977).

A diminuição da sobrevivência e reprodução do copépodo *N. iheringi* na presença da *C. raciborskii* possivelmente não foi causada por inibição no consumo alimentar, uma vez que estes animais apresentaram taxas de remoção significativas, mesmo que em taxas baixas, em dietas mistas de *C. raciborskii* e o alimento nutritivo (ver Capítulo 1). Apesar de consumir *C. raciborskii*, alguns fatores como deficiência nutricional e toxicidade poderiam explicar os efeitos inibitórios desta cianobactéria na sobrevivência e reprodução deste copépodo.

As análises da sobrevivência e reprodução de copépodos em dietas mistas de um alimento suspeito (e.g. *C. raciborskii*) e um nutritivo (e.g. *C. obovata*) podem indicar se há um efeito da deficiência nutricional e/ou toxicidade do alimento na fisiologia do animal. O alimento suspeito pode ser tanto nutricionalmente inadequado (o aumento na proporção do tipo nutritivo tenderá a compensar esta deficiência nutricional) quanto tóxico (compensação não ocorrerá e os efeitos benéficos do tipo nutritivo não serão detectados) (JÓNASDÓTTIR et al., 1998; PRINCE et al., 2006).

Dentre as dietas mistas, as menores probabilidades de sobrevivência foram encontradas no tratamento 100% *C. raciborskii*. Outros estudos já mostraram altas taxas de mortalidade para copépodos calanóides quando alimentados com monoculturas de cianobactérias. Um aumento na mortalidade de fêmeas dos copépodos *Temora longicornis* e

Pseudocalanus elongatus foi evidenciado em tratamentos com concentração da cianobactéria *Synechococcus* sp. em torno de 0.3–0.8 mgC L⁻¹ (KOSKI & BRETELER, 2003). Estas taxas também foram altas para o copépodo *Eurytemora affinis* alimentado com monoculturas da cianobactéria tóxica filamentosa *Nodularia* sp. (KOSKI et al., 1999).

Porém, nas dietas mistas, as probabilidades de sobrevivência encontradas indicam que a sobrevivência dos copépodos é dependente da concentração de *C. raciborskii*. O aumento na proporção de *C. raciborskii* ocasionou uma diminuição na probabilidade de sobrevivência do copépodo *N. iheringi*, exceto para o tratamento 50% *Cryptomonas obovata* : 50% *Cylindropermopsis raciborskii*, no qual as taxas foram similares ao controle nutritivo.

Apesar de ter sido evidenciada reprodução nos tratamentos 75% Cryp : 25% Cyli e 50% Cryp : 50% Cyli, esta foi afetada estatisticamente pela presença de *C. raciborskii*, independente da concentração desta cianobactéria. Estes resultados indicam que o consumo desta cianobactéria tóxica estaria associado à baixa reprodução no copépodo *N. iheringi*. A diminuição na produção de ovos pela presença de cianobactérias em dietas mistas também já foi reportado para outros estudos avaliando o efeito da espécie filamentosa *Nodularia* sp. em *Eurytemora affinis* (KOSKI et al., 1999) e *Acartia tonsa* (SCHIMIDT & JÓNASDÓTTIR, 1997).

Cianobactérias não possuem em sua composição grandes concentrações de ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas (PUFA) tais como ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3 - EPA) e ácido docosaenoico (22:6 ω 3 - DHA) (AHLGREN et al., 1992). Este tipo de ácido graxo é essencial para a complementação da dieta em organismos zooplancônicos e sua ausência está associada com a baixa produção secundária nestes animais (GULATI & DEMOTT, 1997; MÜLLER-NAVARRA et al., 2000). Em contrapartida, altas concentrações do ácido graxo essencial alfa linolênico (18:3 ω 3 – ALA) são encontradas na composição bioquímica de cianobactérias e alguns animais, tais como copépodos harpacticóides e ciclopoídes, são capazes de sintetizar PUFA a partir deste ácido graxo (DESVILLETES et al., 1997; NANTON & CASTELL, 1998; CARAMUJO et al., 2008). Porém, copépodos calanóides não são capazes de alongar e desnaturar o ácido alfa linolênico para a produção significativa de PUFA (BELL et al., 2007). Por conta disto, dietas que possuem cianobactérias podem ser nutricionalmente deficientes em permitir a sobrevivência e reprodução destes animais. Em suma, a presença de *C. raciborskii* na dieta ocasiona uma deficiência nutricional que pode estar associada a um efeito negativo na sobrevivência e reprodução.

A cepa de *C. raciborskii* (LETC CYRF01) utilizada no presente estudo é produtora de saxitoxinas e o efeito neuroticológico desta toxina já foi reportado em cladóceros, com a diminuição da atividade natatória destes animais (FERRÃO-FILHO et al., 2007; FERRÃO-FILHO et al., 2014). Mesmo não tendo sido avaliada, a capacidade natatória pode ter sido afetada no copépodo *N. iheringi*, uma vez que alguns animais estavam paralisados ao final do experimento. Este efeito deletério na capacidade natatória dos animais pode ter sido determinante para a sobrevivência e reprodução, uma vez que a velocidade de natação é importante para a procura de alimento, assim como o encontro de fêmeas e machos para o acasalamento (BUSKEY, 1998).

Efeitos negativos das saxitoxinas na digestibilidade do alimento e secreção de enzimas já foram sugeridos em estudos anteriores avaliando o efeito da alga tóxica *Alexandrium lusitanicum* no copépodo *Acartia clausi* (DUTZ, 1998). Além disto, o consumo energético para o seqüestro interno de toxinas e a desintoxicação pode ter sido suficiente alto ocasionando uma demanda energética maior para a reprodução em fêmeas em dietas tóxicas (DUTZ, 1998). Alterações nos processos digestórios do copépodo *N. iheringi* assim como alto gasto energético com processos de desintoxicação podem explicar também a inibição da sobrevivência e reprodução deste copépodo calanóide.

Finalmente, a exposição às saxitoxinas nas dietas pode ter ocasionado alterações na morfologia das gônadas e desenvolvimento dos ovócitos. Gônadas menos desenvolvidas e com tamanho reduzido foram reportadas no copépodo *Acartia tonsa* e *Temora longicornis* alimentados com a alga tóxica *Alexandrium minutum* (KOZLOWSKY-SUZUKI et al., 2009). Os autores sugeriram que estas modificações nas gônadas assim como alterações na produção de ovócitos aconteceram devido à presença de saxitoxinas (KOZLOWSKY-SUZUKI et al., 2009). Todavia, os autores observaram um aumento na produção de ovos ao longo do tempo, indicando que a conversão da alga tóxica ingerida em energia para reprodução é mais demorada em dietas com toxinas (KOZLOWSKY-SUZUKI et al., 2009). A mesma resistência adquirida ao longo do tempo de experimento pode não ter acontecido no presente estudo, uma vez que a reprodução foi significativamente inibida.

Em suma, a sobrevivência do copépodo calanóide *N. iheringi* em dietas mistas de *C. raciborskii* foi influenciada pela proporção desta cianobactéria. Em contrapartida, a reprodução de *N. iheringi* foi inibida, independente da concentração de *C. raciborskii* na dieta. A variação nas diferentes respostas em diferentes proporções de *C. raciborskii* indica que este organismo pode ser tanto nutricionalmente inadequado (baixas concentrações de PUFA em cianobactérias e incapacidade de bioconversão de PUFA em calanóides) quanto

tóxico (incapacidade de movimentos natatórios, alterações no amadurecimento e tamanho de gônadas, gasto energético com desintoxicação em copépodos).

A partir dos resultados deste estudo pode-se concluir que florações com contribuição de *C. raciborskii* em mais de 25% da biomassa total podem provocar um efeito deletério moderado ou neutro na sobrevivência de copépodos, mas podem inibir a reprodução. Desta forma, espera-se que a reprodução nestes copépodos seja mais afetada em florações desta cianobactéria em relação à sobrevivência destes animais. Porém, a presença de uma maior variedade de itens alimentares (KOSKI et al., 2002) e/ou a resistência adquirida em copépodos por exposição prévia (GER et al., 2011) podem explicar a sobrevivência e reprodução de copépodos em ambientes com ocorrência de *C. raciborskii* em sistemas aquáticos.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados ao longo dos dois capítulos desta dissertação indicam respostas variáveis na alimentação, sobrevivência e reprodução no copépodo *Notodiaptomus iheringi* em dietas contendo a cianobactéria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* e uma alga nutritiva.

Em conclusão tem-se que:

A) Alimentação:

- Proporções maiores que 50% de *C. raciborskii* nas dietas mistas ocasionaram uma inibição nas taxas de remoção totais pelo copépodo *N. iheringi*;
- A seleção alimentar esteve mais relacionada à quantidade do que à qualidade nutricional do tipo alimentar avaliado;
- Esta fraca seleção pela qualidade do item alimentar pode ter sido provocada tanto pelo efeito das saxitoxinas quanto pela não adaptação prévia dos animais a esta cianobactéria.

B) Sobrevivência e Reprodução:

- Foram evidenciados efeitos negativos nas probabilidades de sobrevivência do copépodo quando a proporção de *C. raciborskii* na dieta mista foi de 25 e 75%. Para a proporção de 50%, nenhum efeito foi evidenciado;
- A porcentagem de fêmeas com ovos assim como a produção de ovos foram negativamente afetadas pela presença de *C. raciborskii*, independente da concentração desta nas dietas mistas;
- Esta variação nas taxas de sobrevivência e reprodução dos copépodos ao longo dos tratamentos pode ser explicada pelo baixo valor nutricional das cianobactérias, incapacidade de bioconversão de PUFA em copépodos calanóides, pelos efeitos neurotóxicos das saxitoxinas, alterações no amadurecimento e tamanho das gônadas e gasto energético pelos copépodos com processos de desintoxicação.

Este é o primeiro estudo que avalia o efeito da cianobactéria invasora *C. raciborskii* na sobrevivência e reprodução de copépodos calanóides. Os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir para o entendimento do comportamento alimentar assim como dinâmica populacional de copépodos calanóides na presença da cianobactéria *C. raciborskii*.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, G.; GUSTAFSSON, I. B.; BOBERG, M. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 37-50, 1992.
- BELL, M.V.; DICK, J. R.; ANDERSON, T. R.; POND, D. W. Application of liposome and stable isotope tracer techniques to study polyunsaturated fatty acid biosynthesis in marine zooplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 29, p. 417–422, 2007.
- BERNARDI, D.R.; GIUSSANI, G. Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview. **Hydrobiologia**, v. 200/201, p.29-41, 1990.
- BONILLA, S.; AUBRIOT, L.; SOARES, M. C. S.; GONZÁLEZ-PIANA, M.; FABRE, A.; HUSZAR, V. L. M.; LÜRLING, M.; ANTONIADES, D.; PADISÁK, J.; KRUK, C. What drives the distribution of the bloom forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*?. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79(3), p. 594–607, 2011.
- BOON, P. I.; BUNN, S. E.; GREEN, J. D.; SHIEL, R. J. Consumption of cyanobacteria by freshwater zooplankton: implications for the success of ‘top-down’ control of cyanobacterial blooms in Australia. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 45, p. 875–887, 1994.
- BOUVY, M.; M. PAGANO.; M. TROUSSELLIER. Effects of cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). **Aquatic Microbiology Ecology**, v. 25, p. 215–227, 2001.
- BURNS, C. W. & HEGARTY, B. Diet selection by copepods in the presence of cyanobacteria. **Journal of Plankton Research**, v. 16(12), p. 1671-1690, 1994.
- BURNS, C. W. & XU, Z. Calanoid copepods feeding on algae and filamentous cyanobacteria: rates of ingestion, defaecation and effects on trichome length. **Journal of Plankton Research**, v. 12, p. 201-213, 1990.
- BUSKEY, E. J. Components of mating behavior in planktonic copepods. **Journal of Marine Systems**, v. 15, p.13-21, 1998.

- BUTLER, N. M. Lipid storage in *Diaptomus kenai* (Copepoda; Calanoida): effects of inter- and intraspecific variation in food quality. **Hydrobiologia**, v. 274, p. 9-16, 1994.
- CARAMUJO, M. J.; BOSCHER, H. T. S.; ADMIRAAL, W. Fatty acid profiles of algae mark the development and composition of harpacticoid copepods. **Freshwater Biology**, v. 53, p. 77-90, 2008.
- CHESSON, J. Measuring preference in selective feeding. **Ecology**, v. 59, p.211–215, 1978.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. London:E&FN Spon, 1999.
- CODD, G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. **Water Sci Technol**, v. 32, p. 149–156, 1995.
- COLIN, S. P. & DAM, H. G. Testing for toxic effects of prey on zooplankton using sole versus mixed diets. **Limnology & Oceanography**, v.47, p. 1430–1437, 2002.
- COSTA, S. M.; FERRÃO-FILHO, A.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of saxitoxin- and non-saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans. **Harmful Algae**, v. 28, p. 55-63, 2013.
- DAGG, M. Some effects of patchy food environments on copepods. **Limnology & Oceanography**, v. 22, p. 99-107, 1977.
- DEMOTT W.R., MOXTER F. Foraging cyanobacteria by copepods: responses to chemical defences and resource abundance. **Ecology**, v.72, p. 1820–1834, 1991.
- DESVIETTES, C.H.; BOURDIER G.; BRETON, J.C. On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosaehaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on microalgae. **Journal of Plankton Research**, v. 19, p. 273–278, 1997.
- DUTZ, J. Repression of fecundity in the neritic copepod *Acartia clausi* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum*: relationship between feeding and egg production. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 175, p. 97–107, 1998.

FERRÃO-FILHO, A. S.; SOARES, M. C. S.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollutions**, v 158, p. 2084-2093, 2010.

FERRÃO-FILHO, A.; CUNHA, R.; MAGALHÃES, V. F.; SOARES, M. C. S.; BAPTISTA, D. F. Evaluation of sub-lethal toxicity of cyanobacteria on the swimming activity of aquatic organisms by image analysis. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v 2, p. 1-8, 2007.

FERRÃO-FILHO, A.; SOARES, M. C. S. S.; LIMA, R. S.; MAGALHÃES, V. F. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (Cladocera). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33(1), p. 223-229, 2014.

FIGUEREDO, C. C.; RÜCKERT, G. U.; CUPERTINO, A.; PONTES, M. A.; FERNANDES, L. A.; RIBEIRO, S. G.; MARAN, N. R. C. Lack of nitrogen as a causing agent of *Cylindrospermopsis raciborskii* intermittent blooms in a small tropical reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**. DOI: 10.1111/1574-6941.12243, 2013.

FOX, J. & CARVALHO, M. S. The RcmdrPlugin.survival Package: Extending the R Commander Interface to Survival Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 49(7), p. 1-32, 2012.

GER K.A.; ARNENSON P.; GOLDMAN C.R.; TEH S. J. Species specific differences in the ingestion of *Microcystis* cells by the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi*. **Journal of Plankton Research**, v. 32, p. 1479-1484, 2010a.

GER, K. A.; PANOSSO, R.; LÜRLING, M. Consequences of acclimation to *Microcystis* on the selective feeding behavior of the calanoid copepod *Eudiaptomus gracilis*. **Limnology and Oceanography**, v. 56, p. 2103-2114, 2011.

GER, K.A.; TEH, S.J.; BAXA, D.V.; LESMEISTER, S.; GOLDMAN C.R. The effects of dietary *Microcystis aeruginosa* and microcystin on the copepods of the upper San Francisco Estuary. **Freshwater Biology**, v. 55, p. 1548-1559, 2010b.

GULATI, R. D. & DEMOTT, W. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspective and priorities. **Freshwater Biology**, v. 38, p. 753-768, 1997.

HONG, Y.; BURFORD, M. A.; RALPH, P. J.; UDY, J. W.; DOBLIN, M. A. The cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* is facilitated by copepod selective grazing. **Harmful Algae**, v 29, p. 14-21, 2013.

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

KÂ, S.; MENDOZA-VERA, J. M.; BOUVY, M.; CHAMPALBERT, G.; GOM-KÂ, R. & PAGANO, M. Can tropical freshwater zooplankton graze efficiently on cyanobacteria?. **Hydrobiologia**, v. 679, p. 119-138, 2012.

KALFF, J. **Limnology**. Prentice Hall, 592p, 2011.

KAPLAN, E.L & MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Amer. Statis. Assn**, v. 58 (282), p. 457-481, 1958.

KARADZIC, V.; SIMIC, G. S.; NATIC, D.; RZANICANIN, A.; CIRIC, M. Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). **Hydrobiologia**, v. 711, p. 43-60, 2013.

KORMÁKOVÁ, J. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In: T Azevedo (ed.). **Anais do IV Congresso Latino-Americano de Ficologia, II Reunião Ibero Americana de Ficologia e VII Reunião Brasileira de Ficologia**, São Paulo, Brasil, vol.I, p. 327:340, 1998.

KOSKI, M. & BRETELER, K. W. Influence of diet on copepod survival. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 264, p. 73-82, 2003.

KOSKI, M.; ENGSTRÖM, J.; VIITASALO, M. Reproduction and survival of the calanoid copepod *Eurytemora affinis* on a diet of cyanobacterium *Nodularia* sp. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 186, p. 187–197, 1999.

KOSKI, M.; SCHMIDT, K.; ENGSTRÖM, J.; VIITASALO, M.; JÓNASDÓTTIR, S. H.; REPKA, S.; SIVONEN, K. Calanoid copepods feed and produce eggs in the presence of toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena*. **Limnology & Oceanography**, v. 47, p. 878-885, 2002.

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

KOZLOWSKY-SUZUKI, B., KOSKI, M., HALLBERG, E., WALLÉN, R., CARLSSON, P. Glutathione transferase activity and oocyte development in copepods exposed to toxic phytoplankton. **Harmful algae**, v. 8, p. 395-406, 2009.

LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P. A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO, S.M.F.O., OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359–1373, 1999.

LEHMAN, J. T. The filter feeder as an optimal forager, and the predicted shapes of feeding curves. **Limnology and Oceanography**, v. 2 (1), p.501-516, 1976.

LÜRLING, M. & A. M. VERSCHOOR. F0-spectra of chlorophyll fluorescence for the determination of zooplankton grazing. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 145–157, 2003.

LÜRLING, M. & BEEKMAN, W. Grazer induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales;Chlorophyceae): coenobium and spine formation. **Phycologia**, v.38, p. 368–376, 1999.

MANLY, B. F. J. Tables for the analysis of selective predation. **Res. Pop. Ecol.**, v. 14, p. 74–81, 1972.

MATSUMURA-TUNDISI, T. Latitudinal distribution of Calanoida copepods in freshwater aquatic systems of Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46(3), p. 527-553, 1986.

MEUHLIN, J. Advances in Marine Ecology: The biology of calanoid copepods. **Adv. Mar. Bio.**, v. 33, p. 1-707, 1998.

MOLICA, R. J. R., ONODERA, H., GARCIA, C., RIVAS, M., ANDRINOLO, D., NASCIMENTO, S. M., MEGURO, H., OSHIMA, Y., AZEVEDO, S. M. F. O., LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*

(Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 41, p. 606–611, 2002.

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

NANTON, D. A. & CASTELL, J. D. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. **Aquaculture**, v.163, p. 251–261, 1998.

OLIVER, R. L. & GANF, G. G. Freshwater Blooms. In: B. A., WHITTON; M. POTTS (eds.). **The ecology of Cyanobacteria. The diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer, p. 149-194, 2000.

PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 107, p. 563-593, 1997.

PAERL, H. W. & HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, p. 27–37, 2009.

PAERL, H. W. & OTTEN, T. G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. **Harmful Algae**, v. 29, p. 14-21, 2013.

PAERL, H. W. & PAUL, V. J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, p. 1349-1363, 2012.

PANOSSO, R & LÜRLING, M. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. **Journal of Plankton Research**, v. 32, p. 1393–1404, 2010.

PANOSSO, R.; CARLSSON, P.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; AZEVEDO, S.M.F.O. & RANELI, E. Effect of grazing by a neotropical copepod *Notodiaptomus*, on a natural cyanobacterial assemblage of toxic and non-toxic cyanobacterial strains. **Journal of Plankton Research**, v. 25, p. 1169–1175, 2003.

PREVIATTELLI, D. **Sistemática do gênero *Argyrodiaptomus* Brehm, 1933 (Crustacea: Copepoda: Diaptomidae)** 2006. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, Manaus, 2006, 175p.

PRINCE, E. K.; LETTIERI, L.; MCCURDY, K. J.; KUBANEK, J. Fitness consequences for copepods feeding on a red tide dinoflagellate: deciphering the effects of nutritional value, toxicity, and feeding behavior. **Oecologia**, v. 147, p. 479-488, 2006.

RECKNAGEL, F.; ORBB, P. T.; CAO, H. Inductive reasoning and forecasting of population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* in three sub-tropical reservoirs by evolutionary computation. **Harmful Algae**, v. 31, p. 26-34, 2014.

RIETZLER, A. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Life cycle, feeding and adaptive strategy implications on the co-occurrence of *Argyrodiaptomus furcatus* and *Notodiaptomus iheringi* in Lobo-Broa reservoir (SP, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 62(1), p. 93-105, 2002.

ROCHA, O. & DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. **Journal of Plankton Research**, v. 7(2), p. 279-294, 1985.

SANTOS-SILVA, E. N.; BOXSHALL, G. A. & ROCHA, C. E. F. The Neotropical genus *Notodiaptomus* Kiefer, 1936 (Calanoida: Diaptomidae): redescription of the type species *Notodiaptomus deitersi* (Poppe, 1891) and designation of a neotype. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.34 (2), p. 114-128, 1999.

SCHMIDT, K. & JÓNASDÓTTIR, S. Nutritional quality of two cyanobacteria: how rich is a 'poor' food? **Mar. Ecol. Progr. Ser.**, v. 151, p. 1–10, 1997.

SCHOPF, J.W. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In Whitton, B.A., and Potts, M. (eds). **The Ecology of Cyanobacteria**. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 13–35, 2000.

SINHA, R.; PEARSON, L. H.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; ORR, P. T.; NEILAN, B. A. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones e Is climate change responsible?. **Water Research**, v. 46, p. 1408-1419, 2012.

SMAYDA, T. J. Complexity in the eutrophication–harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. **Harmful Algae**, v. 8, p. 140-151, 2008.

SOARES M.C.S., LÜRLING M., PANOSSO R. & HUSZAR V.L.M. Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1183-1189, 2009b.

SOARES, M. C. S.; HUSZAR, V.; MIRANDA, M. N.; MELLO, M. M.; ROLAND, F.; LÜRLING, M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, v. 717(1), pp. 1-12, 2013.

SOARES, M.C.S.; LÜRLING, M.; HUSZAR, V.L.M. Responses of the rotifer *Brachionus calyciflorus* to two tropical toxic cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa*) in pure and mixed diets with green algae. **Journal of Plankton Research**, v.32, p. 999-1008, 2010.

SOARES, M.C.S.; ROCHA, M. I. A.; MARINHO, M. M.; AZEVEDO, S. M. F. O.; BRANCO, C. W. C. & HUSZAR, V. L. M. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. **Aquat Microb Ecol.**, v. 57, p. 137–149, 2009a.

SOMMER, U.; SOMMER, F. & SANTER, B. Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. **Ecol. Lett.** v. 4, p. 545-550, 2001.

SOUSA, W.; ATTAYDE, J.L., ROCHA, E.S., ESKINAZI-SANT'ANNA, E. The response of zooplankton assemblages to variations in the water quality of four man-made lakes in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Plankton Research**, v. 30, p. 699-708, 2008.

TURNER, J. T. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. **Zoological Studies**, v. 43(2), p. 255-266, 2004.

VERITY, P. G. & SMETACEK, V. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystem. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 130, p. 277-293, 1996.

- VIDAL, L. & KRUK, C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. **Panam. J. Aquat. Sci.**, v. 3, p. 142–151, 2008.
- WEERS, P. M. M. & GULATI, R. D. Effect of addition of polyunsaturated fatty acids to the diet on the growth and fecundity of *Daphnia galeata*. **Freshwater Biology**, v. 38, p. 721-729, 1997.
- WILLIAMSON, C. E. & REID, J. W. Copepoda. In: Thorp, J. H. & Covich, A. (eds.). **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. p. 915-954, 2001.
- WILSON A.E.; SARNELLE O. & TILLMANN A.R. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments. **Limnology and Oceanography**, v.51, p. 1915–1924, 2006.
- WORK, K. A. & HAVENS, K. E. Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. **Journal of Plankton Research**, v. 25(10), p. 1301-1307, 1993.
- XU, Z & BURNS, C. W. Development, growth and survivorship of juvenile calanoid copepods on diets of cyanobacteria and algae. **Int. rev. gesamt. Hydrobiol.**, v. 75, p. 73-87, 1991.
- ZAGATTO, P. A. & FERRÃO-FILHO, A. S. Acute Effects of a *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Strain on Mouse, *Daphnia* and fish. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 3, p. 121, 2013.