

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE
ANTIMICROBIANOS EM CULTIVOS DE
PLÂNCTON MARINHO**

VANESSA OCHI AGOSTINI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE.

**Orientador: Dr. Erik Muxagata
Coorientador: Dr. Paulo Cesar Abreu**

**RIO GRANDE
Fevereiro, 2014**

À minha família,

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Dr. Erik Muxagata, e meu Coorientador, Dr. Paulo Cesar Abreu, por acreditarem em mim e pelo conhecimento transmitido.

À minha família, pelo apoio, carinho e incentivo.

Ao Matias do Nascimento Ritter, por estar sempre ao meu lado me apoiando incondicionalmente em toda minha trajetória acadêmica.

À Universidade Federal do Rio Grande, ao Instituto de Oceanografia, aos Laboratórios de Zooplâncton, de Fitoplâncton e Microrganismos marinhos e pela disponibilidade do espaço de trabalho.

À Estação Marinha de Aquacultura (EMA) e seus funcionários pelo fornecimento de água do mar.

À Priscila Teixeira-Amaral, Waldemar Amaral, Anette Duarte pela amizade, auxílio na logística, nas coletas e no desenvolvimento da Dissertação.

Aos meus amigos, pelo carinho e companhia, Karine Mariane Steigleder, Juliana Frabício Tisca, Luciana Menezes, Carlos Vinícius Weiss, Júlio Zemor, Jefferson Bortolotto, Danielle Ortiz de Ortiz e Laís Fernanda Lopes.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, pelo acompanhamento e parceria no decorrer do curso, Eduardo Renault, Carolina Islabão, Amália Detoni, Márcio Souza, Érica Silveira, Lise Maria Ferreira, Savênia da Silveira.

Um agradecimento especial para os Doutores Haig They Ng pelo ajuda dada na parte logística das análises de micro-organismos e Lucélia Borges pelo auxílio e colaboração nos experimentos envolvendo cultivos de microalgas e Vera Olvera pelo carinho e incentivo durante todo o Mestrado.

À veterinária do Biotério da FURG, Alice Meirelles Leite, pelo auxílio na aquisição dos antibióticos utilizados nos experimentos.

À Doutora Ana Maria Azambuja pela ajuda nas dúvidas de estatística.

À Banca Examinadora pela participação na defesa e pelas valiosas contribuições dadas ao trabalho realizado.

A todos que de alguma forma colaboraram para a minha formação acadêmica.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Experimentação científica	10
1.2 Histórico	12
1.2.1 Efeitos benéficos do uso de antibióticos em meios artificiais	13
1.2.1.1 Cultivos de microalgas	14
1.2.1.2 Produção de macroalgas	16
1.2.1.3 Cultivos de protozoários	16
1.2.1.4 Produção de nematódeos	17
1.2.1.5 Produção de crustáceos	17
1.2.1.6 Produção de moluscos	18
1.2.1.7 Produção de peixes	19
1.2.2 Efeitos adversos do uso de antibióticos em meios artificiais	20
1.3 Observações e Conclusão	22
1.4 Objetivo geral	25
1.4.1 Objetivos específicos	25
1.5 Justificativa	26
2 SÍNTESE DA METODOLOGIA	27
3 CAPÍTULO I – Avaliação do uso de antibióticos na sobrevivência e produção de ovos do copépode <i>Temora turbinata</i> (Dana 1849) quando adicionado no meio de produção e no alimento	30
3.1 Introdução	31
3.2 Material e Métodos	32
3.3 Resultados	35
3.4 Discussão	41
3.5 Conclusão	46

4	CAPÍTULO II - Avaliação dos efeitos do uso de antibióticos no crescimento de microalgas utilizadas como alimento em meios de produção de crustáceos.....	47
	4.1 Introdução.....	48
	4.2 Material e Métodos.....	51
	4.3 Resultados.....	52
	4.4 Discussão.....	60
	4.5 Conclusão.....	64
5	CAPÍTULO III - Efeito da aplicação de antimicrobianos em meios de produção de zooplâncton marinho e o seu potencial de inibição de micro-organismos aderidos.....	65
	5.1 Introdução.....	66
	5.2 Material e Métodos.....	68
	5.3 Resultados.....	72
	5.4 Discussão.....	79
	5.5 Conclusão.....	83
6	DISCUSSÃO GERAL.....	84
7	PERSPECTIVAS.....	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
	APÊNDICE I.....	113
	APÊNDICE II.....	122

RESUMO

A inibição de bactérias em cultivos é imprescindível para a realização de experimentos em que é necessário mensurar a contribuição dos micro-organismos na comunidade. Além disso, a presença excessiva destes micro-organismos pode causar a mortalidade de espécies de interesse para a aquicultura. Por este motivo, o presente trabalho teve como objetivo comparar a eficácia de agentes antimicrobianos aplicados em cultivos de organismos marinhos, a fim de verificar os seus efeitos em organismos alvo e não alvo. Sendo assim, foram avaliados diferentes tratamentos nos cultivos das microalgas *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana* e na produção dos copépodes *Temora turbinata* e *Acartia tonsa*, sendo os antibióticos inseridos somente no meio de produção (M), somente no alimento (A) e no meio de produção e no alimento (M/A), selecionando os tratamentos com os melhores resultados de crescimento/sobrevivência em relação ao controle para a análise de densidade microbiana aderida. De nove tratamentos testados, apenas cinco tiveram resultados positivos. Observou-se que os melhores resultados de sobrevivência estavam relacionados a antibióticos inseridos somente no meio de produção ou somente no alimento. Dentre os tratamentos avaliados quanto ao seu potencial na inibição de micro-organismos aderidos, verificou-se que $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de penicilina + $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de estreptomicina + $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de neomicina foi a combinação de antibióticos mais eficiente, com uma redução de até 93 % de bactérias aderidas. Nestas condições, este tratamento parece ser uma solução para cultivos em que é preciso diminuir a densidade bacteriana aderida a superfícies sem causar danos ao fitoplâncton e/ou ao zooplâncton marinhos.

Palavras-chave: Antibióticos; Bactérias; Biofilme; Copépodes; Purificação.

ABSTRACT

Inhibition of bacteria in cultures is very important for experiments in which it is necessary to measure the contribution of microorganisms in the community. Furthermore, the excessive presence of these microorganisms may cause the mortality of species that has interest for aquaculture. Therefore, this study aimed to compare the efficacy of different antimicrobials applied in marine cultures in order to verify their effects on target and non-target organisms. Thus, different treatments were evaluated in cultures of the microalgae *Conticribra weissflogii* and *Isochrysis galbana* as well as in production of the copepods *Temora turbinata* and *Acartia tonsa*, with the treatments being tested in the production medium, only in food and on both (*i.e* production medium and food), choosing those treatments with the best results of growth/survival compared to control for the analysis the density of adhered bacteria. From nine treatments tested, only five had positive results. It was observed that the best survival results were related to those where antibiotic was inserted only in the production medium or to those inserted only in food. Among the treatments evaluated for their potential in inhibiting adhering bacteria, it was found that 0.25 g L⁻¹ of penicillin + 0.08 g L⁻¹ of streptomycin + 0.04 g L⁻¹ of neomycin was the most effective in decreasing the density of bacteria, with a reduction of 93 % compared to control. Under those conditions, this treatment seems to be a solution for cultures where it is necessary to reduce bacterial density adhered to surfaces without causing damage to marine phytoplankton and/or zooplankton.

Keywords: Antibiotics; Bacteria; Biofilm; Copepod; Purification.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Experimentação científica

Experimentos científicos muitas vezes são prejudicados pela presença excessiva de bactérias, as quais podem mascarar ou tendenciar resultados, dependendo dos objetivos do estudo (Spencer 1952).

A presença de micro-organismos, em especial bactérias, em experimentos aquáticos pode gerar problemas metodológicos, pela dificuldade em excluí-los ou diminuí-los eficazmente do ambiente para, por exemplo, remover a contaminação nos cultivos (Spencer 1952), estimar a contribuição da respiração bacteriana em relação a toda comunidade (Yetka & Wiebe 1974) e avaliar interações entre as espécies (Sherr *et al.* 1986).

Apesar de muitos anos de investigação, ainda existem vários problemas na produção e cultivo de organismos, como peixes, invertebrados e microalgas, principalmente devido à presença de bactérias patogênicas no meio (Torkildsen & Magesen 2004).

Meios de produção e cultivo em grandes densidades, em combinação aos restos mortais de organismos e altas cargas de matéria orgânica estimulam a seleção e o crescimento de bactérias oportunistas (Olafsen 1993, Vadstein *et al.* 1993), resultando em uma produção inferior a esperada (Lipton *et al.* 2003). As bactérias são as principais responsáveis por doenças em invertebrados e peixes, sendo a causa da mortalidade de larvas na carcinicultura (Wyban & Sweeney 1991). Karunasagar *et al.* (1994) relatou em

seu estudo a mortalidade em massa do camarão tigre, *Penaeus monodon* Fabricius 1798, causada pela bactéria *Vibrio harveyi*.

Em cultivos de microalgas, as bactérias competem ativamente pelos mesmos recursos necessários à sobrevivência do fitoplâncton (Hamdan & Jonas 2007), causando a inibição do seu crescimento. Na literatura, é evidenciado o problema de se obter ambientes completa (axênicos) ou parcialmente (semi-axênicos) livres de bactérias (Spencer 1952).

Segundo Zumstein (1900), a densidade de bactérias pode ser controlada por condições como a temperatura de incubação, o tamanho do inóculo, o pH e o conteúdo orgânico do meio.

Alexandre *et al.* (2008) verificaram que a radiação ultravioleta (UV) é um dos vários processos físicos que podem ser utilizados para a esterilização ou higienização de água e de superfícies. Estes autores observaram que a esterilização por UV foi altamente eficiente para um tempo de exposição superior a 30 segundos e distância mínima de 20 cm da fonte, causando a redução total da carga microbiana.

A esterilização com utilização da autoclave também é um método eficaz (Canaan *et al.* 2010). No entanto, quando a pesquisa envolve produção e/ou cultivos, se torna difícil evitar a contaminação da água esterilizada fisicamente, por meio do ar, sendo necessário esterilizá-la novamente, pois cultivos de algas ou a produção de animais envolvem a transferência e manipulação de organismos em intervalos de tempo (Sindermann 1986). Pappas & Hoffman (1952) consideram métodos alternativos de grande valor, mas acreditam que por si só podem não ser adequados e que a utilização de antibióticos

proporciona uma valiosa ferramenta para a obtenção de culturas livres de bactérias.

Um antibiótico é uma substância natural produzida pelos processos metabólicos de micro-organismos que podem inibir ou matar outros micro-organismos. A capacidade dos antibióticos difere, sendo geralmente relacionada aos mecanismos de ação e concentração, podendo ser classificada como bacteriostática, inibindo a síntese proteica, ou bactericida, causando a morte (Dixon 2000).

Por este motivo, o uso de inibidores metabólicos específicos, tais como antimicrobianos, parece ser uma alternativa, desde que não haja danos aos organismos de interesse (Trotted *et al.* 2011).

1.2 Histórico

A utilização de inibidores de procariontes, como os antibióticos, no controle do crescimento bacteriano em cultivos teve início aproximadamente na década de 1940 (Couch 1939). A partir de então, antibióticos passaram a ser utilizados para o controle da densidade bacteriana (Defoirdt *et al.* 2007) (Apêndice I).

No entanto, tomou força quando estudos documentaram a correlação negativa entre a densidade bacteriana e a sobrevivência e desenvolvimento de larvas de moluscos (Davis & Chanley 1956, Costiow & Bookhout 1957, Guillard 1959, Loosanoff & Davis 1963), havendo um maior enfoque neste assunto no período entre 1950 e 1970, com estudos sobre o benefício do uso de antibióticos em meios de cultivo e de produção (Spencer 1952, Oppenheimer

1955, Marshal & Orr 1955, Provasoli & Gold 1962, Loosanoff & Davis 1963, Conover 1967, Tighe-Ford 1970, Walne 1974, Ukeles 1977).

Durante a última década, tem havido um interesse renovado no uso de inibidores específicos em meios artificiais, principalmente estreptomicina (Tungaraza *et al.* 2003, Fouilland *et al.* 2007), penicilina (Trotted *et al.* 2011), estreptomicina + canamicina (Hamdan & Jonas 2007), penicilina + estreptomicina (Pringault *et al.* 2009, Trotted *et al.* 2011) e penicilina + neomicina + estreptomicina (Veuger *et al.* 2004, Cozzi & Cantoni 2006). Além do ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, imipenem, cefoxetina, gentamicina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, ceftriaxona, ampicilina e sulfazotrim (Costa *et al.* 2008), sendo a maioria desses estudos focado em interações entre o fitoplâncton e as bactérias (Hamdan & Jonas 2007, Pringault *et al.* 2009) e a competição por nitrogênio dissolvido (Veuger *et al.* 2004, Cozzi & Cantoni 2006, Fouilland *et al.* 2007).

1.2.1 Efeitos benéficos do uso de antibióticos em meios artificiais

Vários autores obtiveram êxito em seus estudos utilizando inibidores específicos para obter resultados claros de quantificação de respiração bacteriana (Yetka & Wiebe 1974, Pringault *et al.* 2009), de avaliação do crescimento bacteriano (Wheeler & Kirchmann 1986) e de assimilação de nitrogênio (Veuger *et al.* 2004, Cozzi & Cantoni 2006, Fouilland *et al.* 2007). Além da compreensão de interações tróficas (DeLorenzo *et al.* 2001), como as

de predador-presa (Sherr *et al.* 1986) e de competição entre bactérias e fitoplâncton (Hamdan & Jonas 2007).

Ainda, a aplicação de antimicrobianos visando à diminuição da densidade bacteriana para beneficiar o crescimento de organismos e/ou acelerar o seu desenvolvimento também é descrita na literatura (Spencer 1952, Tighe-Ford 1970, Walne 1974).

Dos artigos publicados sobre o tema entre 1930 e 2013 a maioria se refere à purificação de meios de cultivo de microalgas, seguido de meios de produção invertebrados, enfatizando crustáceos e, posteriormente, protozoários. Isto porque, o uso de antibióticos pode beneficiar organismos como microalgas (Spencer 1952), protozoários (Provasoli & Gold 1962), invertebrados (Tighe-Ford 1970) e peixes (Oppenheimer 1955).

1.2.1.1 Cultivos de microalgas

A aplicação de antibióticos em cultivos de microalgas teve início por Fish em 1950 (Vieira 1977), que obteve como resultado a eliminação de bactérias agregadas à parede de microalgas.

Segundo Hamdam & Jonas (2007), os antibióticos estreptomicina e canamicina são indicados para cultivos de microalgas, pois não influenciam negativamente nas taxas de produção de fitoplâncton, possuindo a capacidade de inibir o metabolismo de bacterioplâncton e a sua absorção de carbono orgânico dissolvido. Já Spencer (1952) verificou que o antibiótico penicilina (100 UI.mL^{-1}) empregado no cultivo da diatomácea *Nitzschia closterium* não

ocasionou nenhum dano à espécie, e manteve o cultivo livre de bactérias por três semanas.

Antia & Kalmakoff (1965) utilizaram, com sucesso, uma combinação de antibióticos com surfactante, Tween-80, para purificar o cultivo de *Tetraselmis maculata*, aplicando penicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + estreptomicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + cloranfenicol ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Jones *et al.* (1973) utilizaram uma série de diluições, contendo a mistura de penicilina ($7\text{-}1000 \text{ ng.mL}^{-1}$) + cloranfenicol ($0,3\text{-}40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + neomicina ($0,1\text{-}16 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em uma tentativa de manter o cultivo de *Oscillatoria* sp. livre de bactérias. Com a exceção de *Pseudomonas*, todas as bactérias foram eliminadas.

Galloway & Krauss (1959) testaram o potencial de toxicidade seletiva de oxitetraciclina, estreptomicina, polimixina-B, tetraciclina, penicilina, bacitracina, cloromicetina e gramicidina ($0,1\text{-}1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) usando-os isoladamente em três espécies de algas, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* e apenas polimixina B mostrou seletiva toxicidade.

Nos meios de produção de *Pediastrum boryanum* e *Chlorella vulgaris*, Jones *et al.* (1973) utilizou $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina + $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetraciclina + $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol + $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de aureomicina + $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ceporina + $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de neomicina + $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina.

Gatesoupe (1989) e Subhash *et al.* (2004) sugerem a aplicação de antibióticos em cultivos de microalgas para uso como alimento de outros organismos cultiváveis. Em uma cultura de *Isochrysis galbana*, a qual foi utilizada como alimento para ostras, Subhash *et al.* (2004) verificaram que seis

horas de exposição da microalga ao antibiótico cloranfenicol (10 mg.L^{-1}) foi suficiente para reduzir a densidade bacteriana patogênica, sem afetar adversamente as algas e as ostras.

1.2.1.2 Produção de macroalgas

A combinação de penicilina ($1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$) + estreptomicina (7 mg.mL^{-1}) foi aplicada durante vários dias para esterilizar os meios de produção de *Ulva* (*Enteromorpha*) *linza* e *Cladophora rivularis* (*gracilis*), obtendo assim a sua purificação do meio (Berglund 1969). Já Millner *et al.* (1979), acrescentou $35 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de penicilina e estreptomicina no meio de produção da macroalga de *Ulva* (*Enteromorpha*) *intestinalis*.

Green *et al.* (1967) purificou o meio de *Acetabularia acetabulum* (*mediterranea*) com 1 mg.mL^{-1} de penicilina + $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de neomicina + $34 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de nistatina (micostatina).

1.2.1.3 Cultivo de protozoários

Provasoli & Gold (1962) utilizaram uma combinação de antimicrobianos no cultivo do dinoflagelado *Gyrodinium cohnii*: neomicina ($25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) + sulfato de polimexina B (15 UI.mL^{-1}) + dihidrostreptomicina ($500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) + tetraciclina ($25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) + candidina (15 UI.mL^{-1}). Os autores relataram que a espécie *G. cohnii* possui elevada resistência aos antibióticos e fungicida testados, sugerindo o emprego dos mesmos em cultivos.

O cultivo de *Euglena gracilis* livre de bactérias foi obtido através da combinação de penicilina (2000 UI.mL^{-1}) + estreptomicina (1000 µg.mL^{-1}) (Pappas & Hoffmann 1952). Conforme Goodwin (1950) e Ukeles (1977), a adição de antimicrobianos nestes cultivos reduz a mortalidade de protozoários.

1.2.1.4 Produção de nematódeos

Epps *et al.* (1950) utilizou antibióticos para a esterilização do meio de produção de *Ascaris lumbricoides*, proporcionando uma oportunidade para investigar os requisitos nutricionais, bem como o metabolismo deste parasita.

1.2.1.5 Produção de crustáceos

No meio de produção de zoés da espécie de caranguejo *Metacarcinus magister* (Dana 1852) utilizou-se um pré-tratamento com vários antibióticos, a fim de se obter uma sobrevivência elevada do crustáceo. Concentrações baixas ($1\text{-}10 \text{ mg.L}^{-1}$) de cloranfenicol foram igualmente bem sucedidas quanto 100 mg.L^{-1} de estreptomicina + 100 mg.L^{-1} de penicilina, não alterando o desenvolvimento do caranguejo (Fisher & Nelson 1978).

A adição do antibiótico Crystamycin® (300 mg de penicilina G sódica e 0,5 g de sulfato de estreptomicina, diluídos em 2 mL de água destilada), de amplo espectro, no meio de produção de cirripédios *Elminius modestus*, praticamente eliminou o crescimento bacteriano e aumentou a taxa de sobrevivência das larvas do crustáceo (Tighe-Ford 1970, Harms 1987).

Marshall & Orr (1955) utilizaram estreptomicina para prevenir o crescimento excessivo de populações de bactérias em meio de produção de copépodes de água doce. Entretanto, em geral a combinação de antibióticos é mais eficiente que o seu uso individual no combate do crescimento excessivo de micro-organismos (Kinne 1977). Sendo assim, (Mullin & Brooks 1967) utilizaram penicilina + estreptomicina no meio de produção do copépode *Rhincalanus nasutus* Giesbrecht 1888, garantindo a melhor eficiência.

No meio de produção do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), Costa *et al.* (2008) usaram os antibióticos ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, imipenem, cefoxetina, gentamicina, ciprofloxacina, rofurantoina, ceftriaxona, ampicilina, sulfazotrim. Já Rego *et al.* (2012) utilizaram somente a eritromicina.

Em relação às condições químicas da água de cultivo, Silva *et al.* (2012) observaram que os valores de oxigênio dissolvido, pH, salinidade e amônia não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem antibiótico; porém, o nitrito apresentou valor significativamente maior no tratamento com antibiótico, mas sem afetar o desenvolvimento de camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille 1817).

1.2.1.6 Produção de moluscos

O estudo da aplicação de antimicrobianos em meios de produção de moluscos iniciou na década de 1950 com o objetivo de diminuir doenças causadas por bactérias em ostras (Walne 1956, 1958, 1974).

Fitt *et al.* (1992) verificaram que o desenvolvimento e a sobrevivência da veliger do molusco *Tridacna derasa* foi significativamente maior em tratamentos com antibióticos em relação ao controle, sendo a combinação de estreptomicina + neomicina responsável por este resultado.

Resultados positivos no meio de produção da espécie de molusco *Agropecten purpuratus*, utilizando estreptomicina + furaltadona, foram verificados por Riquelme *et al.* (2001). Na produção comercial de abalones, Handler *et al.* (2006) registraram a utilização de variados antimicrobianos: tetraciclina, oxitetraciclina, amoxilina, trimetoprim, sulfanamida + trimetoprim.

1.2.1.7 Produção de peixes

O uso de antibióticos em meios de produção de peixes foi iniciado por Oppenheimer (1955), o qual demonstrou que a combinação de penicilina + estreptomicina aumenta a percentagem de eclosão de ovos de *Sardinops caerulea*, *Gadus callarias* e *Pleuronichthys* sp. Na década de 1970 foi avaliada a eficiência de vários antibióticos no cultivo de peixes (Struhsaker *et al.* 1973, 1974 e 1975).

Conforme Pereira Jr. *et al.* (2006), o antibiótico cloridrato de oxitetraciclina é utilizado na aquariofilia e na aquicultura para controle e profilaxia de doenças bacterianas em peixes. Mais recentemente, o uso de ampicilina, cefuroxina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofuratoína, norfloxacin, tetraciclina e sulfonamidas foi indicado para a espécie *Oreochromis niloticus* (Carneiro *et al.* 2007).

1.2.2 Efeitos adversos do uso de antibióticos em meios artificiais

Apesar dos benefícios, a tendência atual é reduzir o uso de antibióticos devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana, problemas ecológicos, restrições a importações pela presença de resíduos nos tecidos de organismos cultivados e possíveis danos à saúde pública (Sotomayor & Balcázar 2003, Defoirdt *et al.* 2007, Kim & Aga 2007).

Além disso, agentes antibacterianos têm sido frequentemente detectados em efluentes de esgotos, águas superficiais e águas subterrâneas (Ying & Kookama 2007), sendo necessário, portanto, avaliar os riscos que as substâncias antibióticas podem representar (Guo & Chen 2012).

Apenas alguns estudos investigaram os efeitos dos antibióticos nos organismos aquáticos (Wollenberger *et al.* 2000), sendo a grande maioria desses estudos concentrados em sistemas de água doce e no efeito dos antibióticos individualmente (Liu *et al.* 2011, Weber *et al.* 2011).

Antibióticos agem como indutores para expressão de genes bacterianos que codificam mecanismos de resistência às drogas (Butaye *et al.* 2003). Não obstante, existe a hipótese de que a resistência a antibióticos é variada entre ambientes e regiões, dependendo principalmente da pressão de seleção imposta pelo ecossistema (Pereira Jr. *et al.* 2006), sendo que o poder de seleção é proporcional ao tempo de exposição das bactérias ao antimicrobiano (Ali Abadi & Lees 2000).

O uso de antibióticos pode ter efeitos subletais adversos sobre a fisiologia das algas, além de alterações morfológicas nas células. Vieira (1977)

observou que a espécie *Phaeodactylum tricornutum* apresentava a forma oval e uma fase LAG três vezes maior que as células do meio de cultivo sem antibióticos.

Os antibióticos bacitracina e sulfadiazina foram considerados tóxicos para *Euglena gracilis* (Pappas & Hoffmann 1952). Já o fungicida Nistatina inibiu o crescimento de espécies de Chlorophyta, Euglenophyta, Chrysophyta e Cyanophyta, em concentrações de 1-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Somente a Bacillariophyceae foi tolerante (Lampen & Arnow 1961).

Vance (1966) expôs *Microcystis aeruginosa* a vários antibióticos na faixa de concentração 0,01-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e somente a neomicina e a Dihidrostreptomicina inibiram o crescimento das bactérias sob condições que permitiram crescimento de algas. Essa espécie, juntamente com *Acutodesmus obliquus*, foi utilizada como bioindicadora, com o intuito de investigar os efeitos do antibiótico clorotetraciclina, sendo verificada significativa toxicidade, com interferência no crescimento da população e na acumulação de clorofila-a das duas espécies, sendo a segunda mais sensível que a primeira (Guo e Chen 2012).

O antibiótico rifampicina com concentração acima de 25 ppm causou anormalidade na morfologia e no comportamento de larvas do molusco *Tridacna derasa* (Fitt *et al.* 1992). Já a canamicina (100 mg.L^{-1}) e a neomicina (50 mg.L^{-1}) causaram a mortalidade de zoés do caranguejo *Cancer magister* (Fisher & Nelson 1978) e o cloranfenicol (Cloromicetina) causou um efeito nocivo sobre a *Ascaris lumbricoides* (Epps *et al.* 1950).

Além disso, o uso de antibióticos pode causar alterações nos organismos como mutações genéticas (Droop 1967, Kumar 1964), perda de coloração em microalgas e protozoários (Provasoli *et al.* 1948) e inibição da síntese micondrial (Lloyd 1974).

1.3 Observações e Conclusão

Entre 1930 e 2013 houve o predomínio do uso de penicilina e estreptomicina nos meios de cultivo e produção de organismos. No entanto, a percentagem de utilização têm diminuído (Apêndice I), devido provavelmente aos novos antibióticos disponíveis. Atualmente, há um crescente uso de cloranfenicol e neomicina. Não obstante, cabe ressaltar que tanto a penicilina quanto a estreptomicina continuam a ser utilizados.

Na última década, a utilização de antimicrobianos está relacionada principalmente a experimentações científicas no meio aquático em que é necessária a eliminação ou a diminuição do bacterioplâncton. Sendo a realização do estudo dependente de meios de cultivos e de produção livres de bactérias.

Além disso, para obter resultados claros deve haver uma investigação prévia sobre as suas características e efeitos, garantindo a maior eficiência dos antimicrobianos no sistema aquático. Segundo McCracken (1989), existe um método aplicável para cada espécie, pois cada meio possui diferentes comunidades de micro-organismos e graus de sensibilidade a substâncias químicas, podendo exibir variadas respostas ao mesmo produto químico.

Sendo assim, alguns cuidados devem ser tomados para a utilização de antibióticos em meios artificiais:

- ✓ Observação da tolerância dos organismos de interesse aos antimicrobianos escolhidos, preferencialmente de amplo espectro, sendo combinações de antibióticos mais eficientes do que eles utilizados individualmente (Pappas & Hoffmann 1952, Kinne 1977), entretanto, com atenção aos efeitos de neutralização entre eles. Speck *et al.* (1951) relataram que a aureomicina e a terramicina antagonizaram a ação da penicilina em cultivos.
- ✓ No desenvolvimento de técnicas de uso de antibióticos para a obtenção de culturas livres de bactérias certamente seriam rentáveis procedimentos prévios de purificação/esterilização de material, tais como vidrarias, diminuindo assim alguns dos contaminantes bacterianos (Pappas & Hoffmann 1952).
- ✓ Avaliar a eficiência dos antibióticos selecionados, através de estimativa de densidade bacteriana, verificando o início do efeito e a sua meia vida no meio.
- ✓ Avaliar a necessidade de reposição, mesmo quando não houver troca de meio de cultivo, a fim de manter o meio com o mínimo de bactérias possível.

- ✓ Provavelmente os antibióticos selecionados terão resultados adequados quanto à inibição das bactérias no meio de cultivo, todavia, provocará um crescimento excessivo de fungos, sendo necessário incluir uma pequena concentração de um inibidor de eucarionte à combinação de antibióticos, com prévio teste de sensibilidade. Provasoli *et al.* (1951) observaram o predomínio de leveduras na ausência de bactérias, empregando um fungicida no meio.
- ✓ Processamento e descarte adequado dos meios de cultivos e de produção com antibióticos, evitando a contaminação ambiental com os mesmos e/ou com bactérias resistentes.

Ressalta-se ainda que, o uso de antibióticos na aquicultura deve ser limitado, a fim de se reduzir a resistência, além de evitar o risco da presença de resíduos nos alimentos destinados ao consumo humano (Bruun *et al.* 2003). Em contrapartida, o uso de inibidores específicos pode ser um método valioso para o estudo de interações, como competição e mutualismo, ou a falta de interação entre os diferentes componentes das comunidades microbianas e poderiam ser usados para avaliar a importância relativa de micro-organismos nos fluxos biogeoquímicos (Trotted *et al.* 2011).

Devido a isso é possível concluir que, empregados os cuidados necessários, é possível utilizar esta ferramenta em experimentos científicos, que visem sistemas sem a contaminação bacteriana para fornecer uma melhor estimativa dos resultados.

1.4 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar o efeito de diferentes antimicrobianos em cultivos de microalgas e na produção de copépodes, a fim de verificar o seu potencial de aplicação em experimentos científicos que visem à inibição de bactérias aderidas a superfícies.

1.4.1 *Objetivos específicos*

- Selecionar o (s) antimicrobiano (s) que possui (em) potencial de uso em cultivos/produção de plâncton marinho, através da observação da sua equivalência ou benefício em relação a meios sem o uso de antimicrobianos;
- Determinar onde o (s) antimicrobiano (s) deve (m) ser aplicado (s): se no meio de produção, no alimento ou em ambos;
- Testar a eficiência do (s) antimicrobiano (s) selecionado (s) na inibição de micro-organismos aderidos e o seu potencial de aplicação em experimentos científicos;
- Avaliar o tempo de início do efeito e a meia-vida do(s) antimicrobiano (s) selecionado (s) no ambiente marinho artificial.

1.5 Justificativa

A justificativa para o desenvolvimento da presente Dissertação é a importância de conseguir a inibição de bactérias em meios aquáticos artificiais, possibilitando a realização de experimentos científicos de importância ecológica em que é necessário mensurar a contribuição dos micro-organismos na comunidade. Entretanto, muitas vezes não são realizados pela ausência de uma solução viável. Ressalta-se que as respostas obtidas nestes experimentos são relevantes para o entendimento das interações tróficas e podem também contribuir para várias áreas do conhecimento.

A aplicação de antimicrobianos possui, não somente o potencial de contribuição na obtenção de respostas ecológicas, mas também de beneficiamento da sobrevivência e desenvolvimento de organismos cultiváveis - sendo relevante para aquicultura - e de solução de problemas de contaminação e de biocorrosão - sendo importante para engenharia civil, naval e de materiais.

Ressalta-se ainda, a falta de estudos referentes ao uso de substâncias antimicrobianas em cultivos com espécies da região costeira subtropical e aos efeitos nos organismos alvo e não alvo. Além disso, trabalhos existentes abordando a eficiência de antimicrobianos enfatizam micro-organismos presentes na coluna d'água e não os aderidos a um substrato. Adicionalmente, os trabalhos já publicados não estimaram a real redução bacteriana em relação ao meio de cultivo sem antibiótico, tampouco, a sua meia vida no ambiente aquático.

2. SÍNTESE DA METODOLOGIA

Foram selecionados para avaliação, fracionadamente, antimicrobianos já testados em relação ao seu potencial de inibição de bactérias, segundo a literatura especializada, os quais obtiveram êxito em cultivos de organismos ou em experimentos científicos (Tabela I). Porém, quando necessário foi elaborado um novo tratamento baseado em resultados obtidos pelo presente estudo.

Tabela I. Lista de tratamentos (antimicrobianos) utilizados na atual Dissertação de Mestrado com seus respectivos autores e a sua utilização.

Legenda	Antimicrobianos testados no atual estudo	Autores	Utilização
T1	0,1 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina	Pringault <i>et al.</i> (2009)	Experimento
T2	0,32 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,005 g.L ⁻¹ de cloranfenicol + 0,025 g.L ⁻¹ de sulfato de neomicina + 0,5 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,025 g.L ⁻¹ de tetraciclina	Provasoli & Gold (1962)	Copépodes/ Fitoplâncton
T3	100 µL.L ⁻¹ da solução (0,3 g de penicilina G potássica + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada)	Tighe-Ford (1970)	Zooplâncton
T4	0,05 g.L ⁻¹ de sulfato de neomicina	Yetka & Wieb (1974)	Experimento
T5	0,5 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,5 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,1 g.L ⁻¹ de cloranfenicol	Couch (1939)	Fungo
T6	0,63 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina	Borojevic (1966)	Porífero
T7	0,2 g.L ⁻¹ de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica	Sherr <i>et al.</i> (1986)	Experimento
T8	0,32 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina	Spencer (1952)	Fitoplâncton
T9	0,025 g.L ⁻¹ de penicilina G potássica + 0,08 g.L ⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,040 g.L ⁻¹ de sulfato de neomicina	Atual estudo	Copépodes

Para tal, realizaram-se experimentos utilizando os copépodes *Temora turbinata* (Fig. 1a) e *Acartia tonsa* (Fig. 1b), em meios de produção com aplicação de antimicrobianos. Além disso, testou-se o efeito dos antimicrobianos em cultivos das microalgas *Conticribra weissflogii* (Fig. 1c) e *Isochrysis galbana* (Fig. 1d), com o objetivo de avaliar o efeito no alimento destes organismos zooplancônicos, sendo a primeira alga utilizada tanto nas primeiras fases de desenvolvimento de copépodes, em combinação com microalgas menores (e.g. *I. galbana*), quanto na fase adulta. A segunda é utilizada somente nos estágios iniciais (náuplio e copepodito) (Kaminski 2004).

Ressalta-se que para os experimentos com o zooplâncton foram utilizados copépodes adultos, por este motivo somente a microalga *C. weissflogii* foi inserida no meio de produção como alimento.

Cabe salientar que os copépodes, bem como a água do mar, aplicados nos experimentos foram coletados diretamente do ambiente, ao invés de serem previamente cultivados em laboratório, com o objetivo de garantir uma maior variabilidade genética de organismos. Por este motivo, a quantidade de réplicas nos experimentos representa a abundância dos mesmos no ambiente.

Os antibióticos foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich® e com o apoio da veterinária responsável pelo Biotério da Universidade Federal do Rio Grande, a qual forneceu receitas para a compra de parte das substâncias (princípio ativo) em farmácias de manipulação.

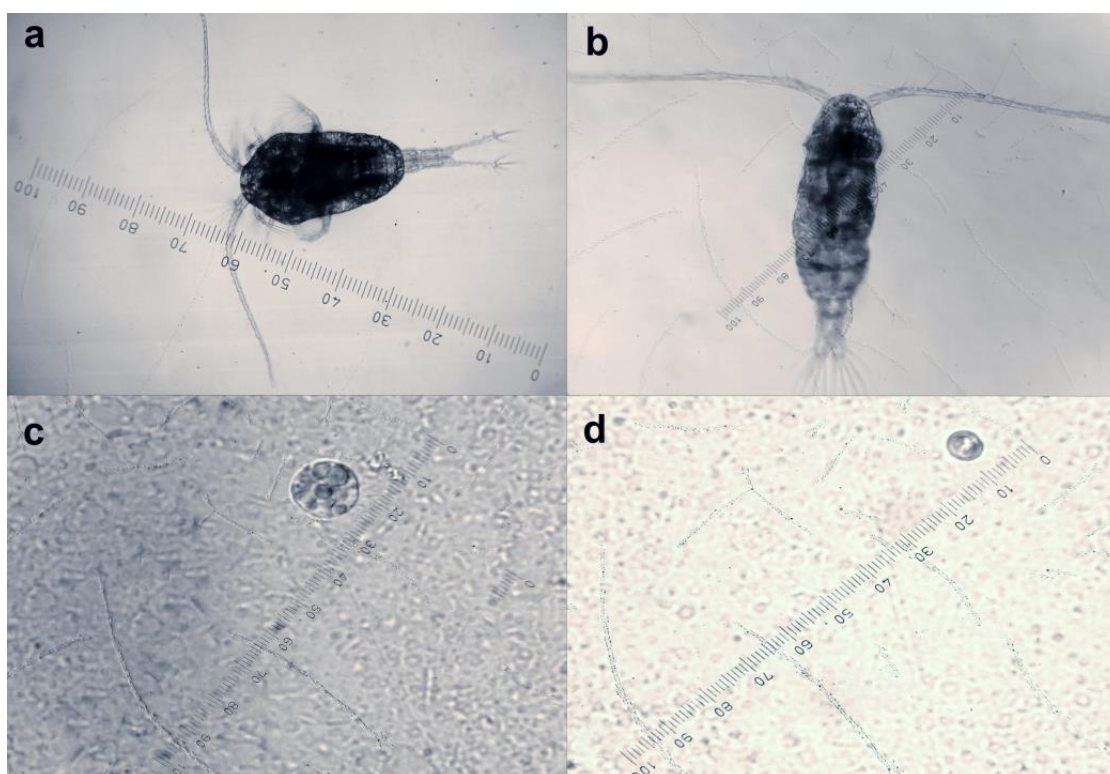


Figura 1. Organismos utilizados como bioindicadores no atual trabalho. a: copépode *Temora turbinata* (aumento de 10 X); b: copépode *Acartia tonsa* (aumento de 10 X); c: microalga *Conticribra weissflogii* (aumento de 40 X); d: microalga *Isochrysis galbana* (aumento de 40 X).

3. CAPÍTULO I

**Avaliação do uso de antibióticos na sobrevivência e produção de ovos do
copépode *Temora turbinata* (Dana 1849) quando adicionado no meio de
produção e no alimento**

Vanessa Ochi Agostini^{a,b}; Laís Fernanda Lopes^{b,c}; Priscila Teixeira-Amaral^{a,b};
Erik Muxagata^b

^aPrograma de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

^bLaboratório de Zooplâncton, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

^cBolsista de Iniciação Científica do CNPq.

3.1 Introdução

Os crustáceos copépodes são considerados os metazoários mais abundantes do planeta (Mauchiline 1998), representando um importante elo de ligação entre os níveis tróficos de muitos ecossistemas aquáticos costeiros (Hopcroft & Roff 1998). Por este motivo, os copépodes têm sido estudados para uso na aquicultura, como alimento para outras espécies (Schipp *et al.* 1999).

A espécie de copépode *Temora turbinata* (Temoridae) é encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Bradford-Grieve *et al.* 1999), com importância ecológica relevante (Fleminger 1975, Bradford 1977). Além destas características, apresenta alta tolerância a variações de salinidade e temperatura e possui um ciclo de vida curto (Cunha 2008), facilitando a sua produção.

Os copépodes desempenham um papel importante na dieta dos estágios juvenis de peixes e são naturalmente ricos em ácidos graxos (Støttrup *et al.* 1986), com valor nutricional e digestibilidade maior que artemias e rotíferos, que tradicionalmente são utilizados como alimento vivo na aquicultura (Schippe *et al.* 1999).

A possibilidade de utilização de copépodes como alimento vivo (Schippe *et al.* 1999), exige que mais estudos sejam realizados para otimizar a produção. A sobrevivência, a produção e o sucesso destes cultivos depende da taxa de fecundidade da espécie, estritamente relacionada à disponibilidade de alimento (Checkley 1980), temperatura (Garrido *et al.* 2000) e salinidade adequados (Cardozo 2004). Além disso, segundo Hirst & McKinnon (2001), a produção de ovos pode ser utilizada para estimar as taxas de natalidade e de recrutamento da população, além do potencial reprodutivo da espécie. No entanto, é necessária a identificação das melhores condições de produção para esta espécie (Días *et al.* 2012).

Segundo Pelletier & Chapman (1996), o uso de antibióticos em meios de produção pode aumentar a sobrevivência, o crescimento e o tempo de vida de crustáceos, favorecendo a diminuição de doenças causadas por bactérias (Wyban & Sweeney 1991).

Por este motivo, o objetivo do presente estudo foi testar o efeito de diferentes combinações de antibióticos inseridos no meio de produção e no alimento de *T. turbinata*, a fim de beneficiar a sua sobrevivência e a sua produção de ovos, testando o potencial de produção desta espécie para uso econômico e/ou experimental.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultivo de Zooplâncton do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sendo representados por um controle (sem a aplicação de antibióticos no meio de produção e no alimento) e 21 tratamentos: T1) 0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Pringault *et al.* 2009); T2) 0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,005 g.L⁻¹ de cloranfenicol + 0,025 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina + 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,025 g.L⁻¹ de tetraciclina (Provasoli & Gold 1962); T3) 100 µL.L⁻¹ da solução (0,3 g de penicilina G potássica + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada (Tighe-Ford *et al.* 1970)); T4) 0,05 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina (Yetka & Wiebe 1974); T5) 0,5 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,1 g.L⁻¹ de cloranfenicol (Couch 1939); T6) 0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Borojevic 1966); T7) 0,2 g.L⁻¹ de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L⁻¹ de penicilina G potássica (Sherr *et al.* 1986). Os tratamentos acima citados foram repetidos nas seguintes situações: meio de produção e alimento com antibiótico (M/A); meio de produção com antibiótico e alimento sem antibiótico (M); meio de produção sem antibiótico e alimento com antibiótico (A).

Para avaliar o benefício do uso de antibióticos em meio artificial realizou-se, primeiramente, a coleta de zooplâncton com rede de plâncton cilíndrico-cônica de 200 µm de malha e 30 cm de diâmetro, através de arrastos horizontais, na Praia do Cassino, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, sendo a espécie *Temora turbinata* (Dana 1849) (Copepoda, Calanoida), identificada

segundo Pillai (1975) e separada do resto da comunidade com pipeta de *Pasteur* após visualização em microscópio estereoscópico, obtendo-se assim os exemplares necessários para a realização dos experimentos de tolerância a antibióticos e produção de ovos.

Para o experimento de tolerância, os indivíduos adultos de *T. turbinata* foram separados sem distinção de sexo e aclimatados durante 30 horas para eliminar possíveis indivíduos debilitados pelo estresse gerado na coleta. Após a aclimação, os organismos foram dispostos individualmente em nove unidades experimentais (UE) para o controle e para cada tratamento, representando as réplicas, sendo que as UE continham 100 mL de meio natural, o qual foi renovado diariamente. Realizou-se a observação das UE a cada 24 horas, sendo contabilizada a sobrevivência dos indivíduos durante 96 horas (Resgalla & Laitano 2002).

Para estimativa de produção de ovos, os indivíduos adultos de *T. turbinata* foram separados com distinção de sexo, sendo aclimatados durante 30 horas para eliminar possíveis indivíduos debilitados pelo estresse gerado na coleta e para que as fêmeas liberassem os ovos produzidos no ambiente natural. Após a aclimação, os organismos foram dispostos em casais, uma fêmea e um macho, nas UE, representantes do controle e de cada tratamento, com nove réplicas, sendo que cada UE continha 200 mL de meio (com água natural filtrada em malha de 20 μ m).

A quantificação dos ovos produzidos ocorreu com 24 horas (0-24 h) e com 48 horas (24-48 h) de exposição. Para facilitar a remoção dos ovos produzidos, em cada UE foi colocada uma rede de 230 μ m de malha separando-

os dos adultos. O meio de produção foi inteiramente renovado com 24 horas, sendo ele juntamente com os ovos produzidos fixados com formaldeído a 4 %.

Em ambos os experimentos, as UE foram mantidas em salinidade 30, temperatura 25 °C (Brendolan 2004) e fotoperíodo 14:10, refletindo as condições de coleta. Ministrou-se a alimentação dos organismos diariamente utilizando a diatomácea *Conticribra (Thalassiosira) weissflogii* Stachura-Suchoples & Williams 2009 (20.000 cel.mL⁻¹) (Teixeira *et al.* 2010). As UE foram agitadas a cada três horas para a suspensão do alimento.

Após a sua utilização, os antibióticos foram guardados em recipientes de vidro fechados, esperou-se um mês para o término do efeito dos mesmos, sendo posteriormente autoclavados para eliminar possíveis micro-organismos resistentes, sendo o conteúdo então descartado no ambiente.

O teste estatístico utilizado foi a Análise de Variância Bifatorial para os resultados de sobrevivência comparando os resultados do controle e dos tratamentos em relação ao tempo. Já Análise de Variância Unifatorial foi utilizada para testar a diferença entre o controle e os tratamentos em relação à sobrevivência total e à produção de ovos. Ambas as Análises de Variância foram seguidas do Teste *post-hoc* Tukey.

3.3 Resultados

Ao final do experimento de tolerância (96 horas) foram observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos na sobrevivência de *Temora turbinata*. Na situação com antibiótico somente no M (Fig. 1a), os

tratamentos T2 e T5 foram detentores da menor sobrevivência em relação ao controle ($p=0,000$) (0 % sobrevivência). Na situação com antibiótico somente no A (Fig. 1b) o tratamento T5 apresentou novamente alta mortalidade (20 % de sobrevivência) em relação ao controle e aos outros tratamentos ($p=0,000$). Em compensação, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Já na situação com antibióticos no M/A (Fig. 1c), observou-se que os tratamentos T2, T5 e T7 apresentaram as menores sobrevivências em relação ao controle e aos demais tratamentos ($p=0,000$) (0 %, 0 %, 40 %, respectivamente).

Quando observado os resultados de sobrevivência total, ou seja, levando em conta a média de sobrevivência de todos os tempos de exposição, é possível constatar diferenças entre o controle e os tratamentos (Fig. 2). Foi possível perceber que mesmo sem diferenças significativas, os tratamentos T1, T3, T4 e T6 apresentaram resultados de sobrevivência de *T. turbinata* maiores que o controle nas três diferentes situações de aplicação de antibióticos.

O T4, seguido do T1, do T6 e do T3 foram estatisticamente diferentes do T2 ($p=0,000$), T5 ($p=0,000$) e T7 ($p=0,000$). O T4 apresentou a maior sobrevivência. Já as situações de aplicação de antibióticos com a maior sobrevivência no T1 e no T6 foram, igualmente, no M e no M/A, já para T3 foi na situação M/A.

Na avaliação dos resultados de todos os tratamentos, a situação de aplicação dos tratamentos com melhor sobrevivência de *T. turbinata*, independentemente dos antibióticos utilizados foi no A, seguido de M e M/A.

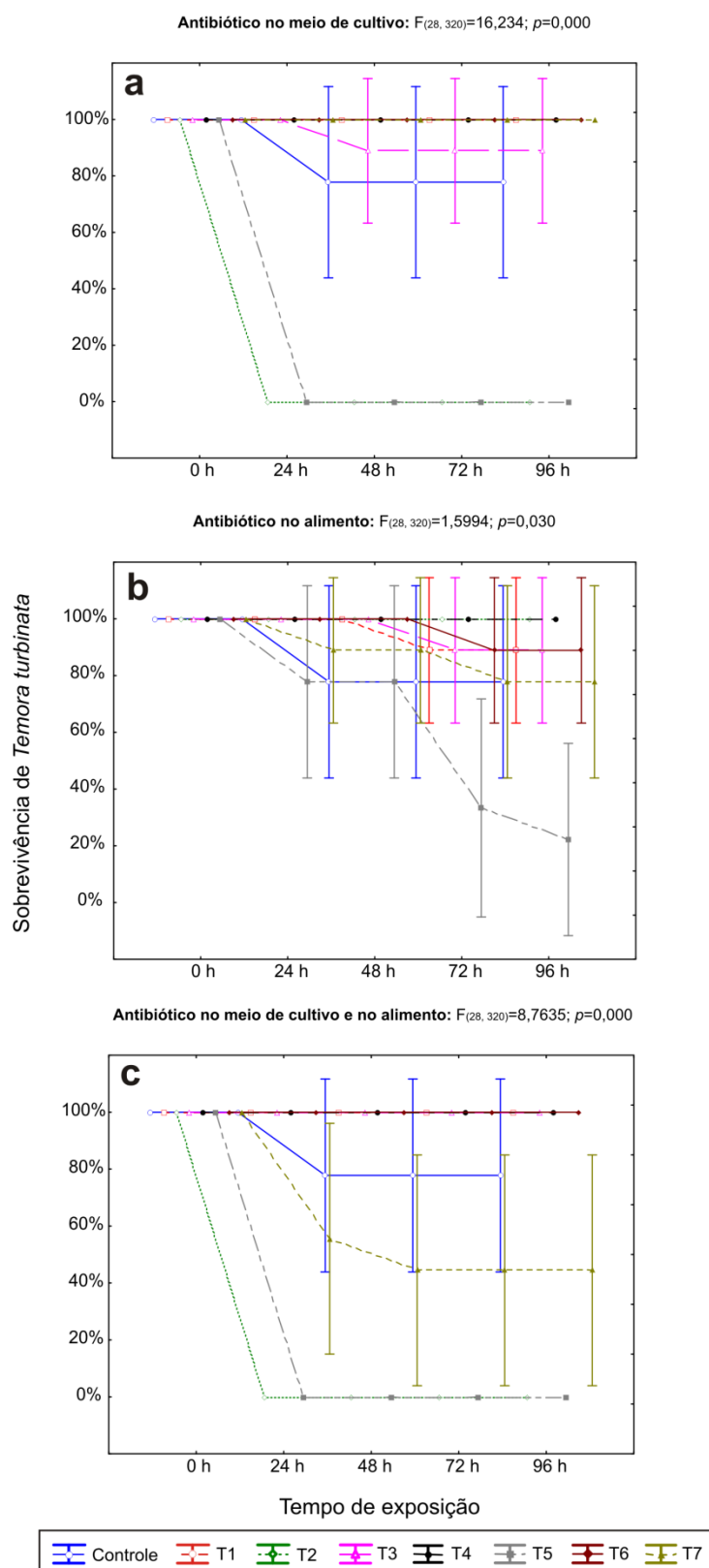


Figura1. Sobrevivência de *Temora turbinata* exposta ao controle e a tratamentos com antibióticos em diferentes tempos de exposição. a: antibiótico somente no meio de cultivo; b: antibiótico somente no alimento; c: antibiótico no meio de cultivo e no alimento. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

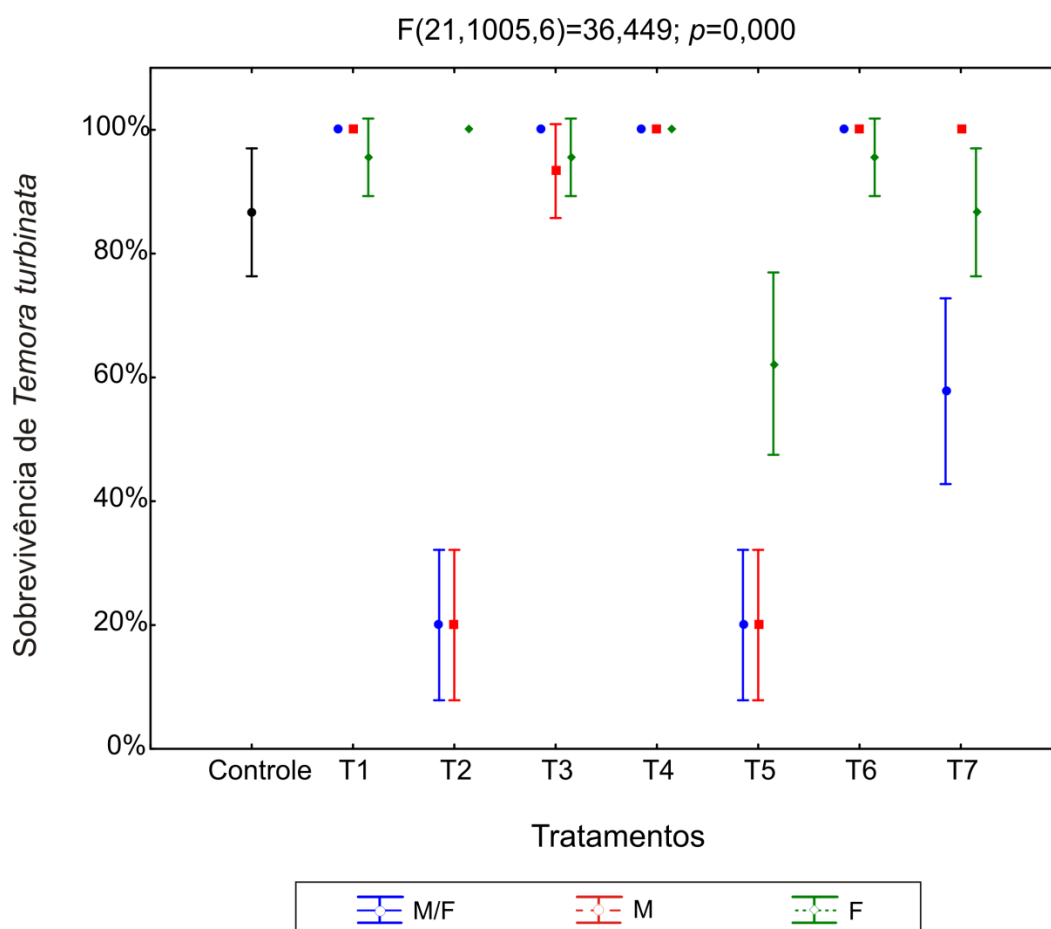


Figura 2. Sobrevivência média de *Temora turbinata* exposta por 96 horas ao controle e a tratamentos com antibióticos em diferentes situações de aplicação: antibiótico somente no meio de produção (M); antibiótico somente no alimento (A); antibiótico no meio de produção e no alimento (M/A). As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão

Em relação à produção de ovos de *Temora turbinata*, foram observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com 24 e 48 horas de exposição. Quando avaliados os resultados com aplicação de antibiótico somente no M (Fig. 3a) foi visualizada diferença estatística com 24 horas de exposição, entre o controle e os tratamentos T2 e T5 ($p=0,027$), sendo o controle detentor de uma maior quantidade de ovos produzidos. Com 48 horas de exposição, para a mesma situação, o controle não apresentou diferenças de produção de ovos quando comparada ao T2 e T5. Os tratamentos T1, T4, T6 e

T7 apresentaram as maiores produções de ovos nos dois tempos de exposição.

Na situação com aplicação de antibióticos somente no A (Fig. 3b) não houve diferença significativa na produção de ovos entre o controle e os tratamentos com 24 horas nem com 48 horas de exposição, no entanto cabe ressaltar que o controle e o T5 tiveram a menor produção de ovos com 48 h. Já na situação de aplicação de antibióticos no M/A (Fig. 3c), houve diferenças significativas na quantidade de ovos produzidos.fêmea⁻¹. Os tratamentos T2 e T5 não apresentaram produção de ovos. No entanto, com 48 horas não foi verificado diferença em relação ao controle. O tratamento T7 apresentou uma baixa produção de ovos nesta situação. Entre os dois tempos de exposição, 24 horas obteve a maior produção de ovos levando em conta a média de todos os tratamentos.

As quantidades médias de ovos produzidos.fêmea⁻¹ do controle e dos tratamentos nas diferentes situações de aplicação com 24 e 48 horas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. As quantidades médias de ovos produzidos.fêmea⁻¹ de *Temora turbinata* do controle e dos tratamentos nas diferentes situações de aplicação de antibióticos: somente no meio de produção (M); somente no alimento (A); no meio de produção e no alimento (M/A), com 24 e 48 horas de exposição.

Situação Exposição	M		A		M/A	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Controle	3	2,3	3	2,3	3	2,3
T1	3	3	3	3	3	3
T2	2,7	0	2	0	1,3	0
T3	3	2,6	3	3	3	3
T4	3	3	3	3	3	3
T5	0	0	2,3	2,3	0	0
T6	3	3	3	3	3	3
T7	3	3	2,6	2,6	1,6	1,3

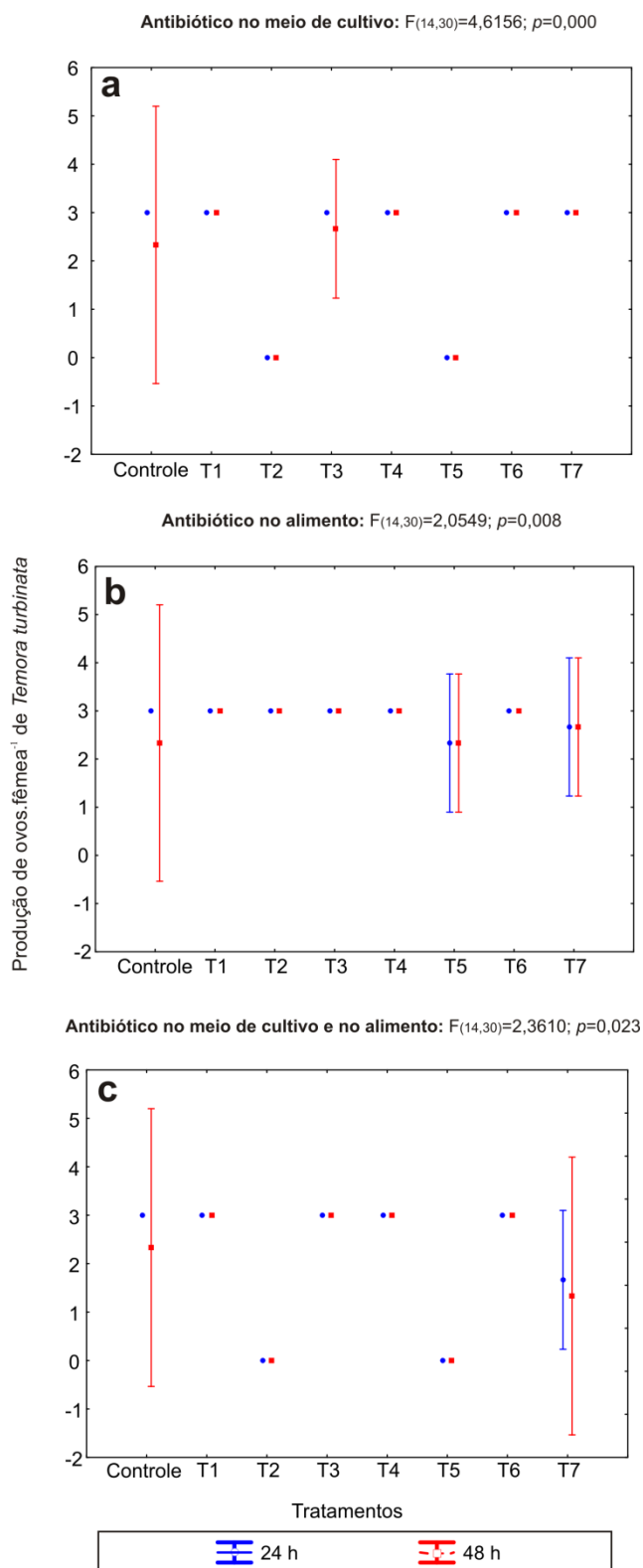


Figura 3. Produção de ovos de *Temora turbinata* exposta ao controle e a diferentes tratamentos com antibióticos com 24 e 48 horas de exposição. a: antibiótico somente no meio de produção; b: antibiótico somente no alimento; c: antibiótico no meio de produção e no alimento. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

3.4 Discussão

A intenção inicial era utilizar a espécie de copépode *Acartia tonsa* Dana (1849) como bioindicadora, recomendada pelo ISO 14669 (1999). No entanto, como os organismos utilizados são coletados diretamente do ambiente para a execução do experimento, e no dia da coleta não havia *A. tonsa* em densidade significativa, optou-se por usar a *Temora turbinata*, que ao contrário, encontrava-se em grande quantidade.

A família Acartiidae tolera variadas salinidades e temperaturas (Mauchline 1998), ao contrário de *T. turbinata*, sugerindo que esta seja tanto ou menos tolerante a variações ambientais. Porém, para afirmar com maior exatidão, seriam necessários experimentos de sensibilidade, utilizando as duas espécies em contato com a mesma substância.

Quando avaliada a sobrevivência de *T. turbinata* no controle e nos tratamentos foi possível constatar que a utilização de antibióticos em meio de produção destes organismos pode trazer benefícios. Sendo relatado na literatura o potencial de uso de antibióticos em meios de produção de copépodes (Marshall & Orr 1955, Conover 1962, Neunes & Pongolini 1965, Conover 1966, Conover 1967, Mullin & Brooks 1967).

Os tratamentos T1, T3, T4 e T6 mostraram-se com potencial de aplicação, no entanto, os tratamentos T1 e T4 foram considerados os melhores, pois nestes obteve-se total sobrevivência nas três situações de aplicação, antibióticos somente no meio de produção, somente no alimento e no meio de produção e no alimento.

A neomicina havia sido empregada com sucesso em meios de produção de peixes (Struhsaker *et al.* 1974) e de moluscos (Fitt *et al.* 1992) e em combinação com outros antibióticos no cultivo de protozoários (Provasoli & Gold 1962, Divan & Schnoes 1982) e fitoplâncton (Soli 1963, Provasoli & McLaughlin 1963, Droop 1967, Jones *et al.* 1973, Vieira 1977, Youn & Hur 2007) e na produção de macroalgas (Green *et al.* 1967).

Yetka & Wiebe (1974) utilizaram este antibiótico em um experimento para obter resultados de quantificação de respiração bacteriana, através de sua inibição. Porém, não havia sido testado na produção de copépodes com o objetivo de beneficiá-lo.

Os demais tratamentos com alta sobrevivência de *T. turbinata*, T3 e T6, já são conhecidos sobre o seu potencial em meios de produção de invertebrados. Este fato é vinculado à combinação de penicilina e estreptomicina, combinação esta utilizada na maioria dos cultivos/produção de organismos com aplicação de antibióticos (Couch 1939, Spencer 1952, Provasoli & Gold 1962, Antia & Kalmakoff 1965, Fisher & Nelson 1978, Millner *et al.* 1979, Saga & Sakai 1982, Harms 1987, Shaw *et al.* 1994).

Não obstante, é importante salientar o efeito adverso dos tratamentos T2, o qual causou a mortalidade de *T. turbinata*. O uso de antibióticos pode causar alterações nos organismos como mutações genéticas (Droop 1967, Kumar 1964), perda de coloração em microalgas e protozoários (Provasoli *et al.* 1948) e inibição da síntese mitocondrial (Lloyd 1974). Além disso, Epps *et al.* (1950) observaram que o Cloranfenicol causou um efeito nocivo sobre *Ascaris lumbricoides*. Como ambos os tratamentos possuem este

antibiótico em sua combinação pode ter sido esta a causa da alta mortalidade, o que sugere a ausência de tolerância ou ainda, toxicidade aguda, sendo o efeito tóxico decorrente da exposição de organismos a antibióticos já relatada na literatura (Delupis *et al.* 1992, Wollenberger *et al.* 2000, Flaherty & Dodson 2005, Isidori *et al.* 2005, Drillet *et al.* 2007).

O T7 apresentou resultados altos de sobrevivência de *T. turbinata* somente quando aplicado no meio de produção e no alimento separadamente, sendo superior e igual ao controle, respectivamente.

Estes resultados também reforçam o potencial dos copépodes para os ensaios de toxicidade (Karlsson *et al.* 2006). Todavia, é necessário mais estudos, preferencialmente utilizando uma carta de sensibilidade para a espécie como controle dos ensaios (Zagatto 2006).

Em relação à produção de ovos, foi verificado que tanto o T1 quanto o T3, T4 e T6 obtiveram os melhores resultados em relação ao controle com 24 e 48 horas de exposição em todas as situações de aplicação. Somente o T3 teve uma produção média um pouco menor em 48 horas quando aplicado somente no meio de cultivo, mas acima do controle.

Houve diferença entre o tempo de 24 horas e 48 horas no controle e nos tratamentos, sendo o primeiro tempo detentor de uma maior produção total. Verificou-se que o T2 e o T5 não apresentaram produção de ovos em nenhum tempo de exposição, no entanto, na situação de aplicação somente no alimento tiveram considerável produção.

O T7 apresentou os melhores resultados de produção de ovos quando aplicado somente no meio de produção e somente no alimento, sendo superior

ao controle com 48 horas de exposição. Entretanto, a sua aplicação não é recomendada quando inserida no meio de produção e no alimento (M/A).

Kaminski & Montú (2005) observaram que a espécie *T. turbinata* possui uma desova descontínua em picos, ou seja, em dias consecutivos produz diferentes quantidades de ovos. Isso foi observado, principalmente no controle, onde houve uma produção maior com 24 horas e menor com 48 horas. Porém, para verificar esta relação com maior exatidão sugere-se um experimento de produção de ovos de no mínimo 96 horas, observando a variação da produtividade.fêmea⁻¹.dia⁻¹.

Na literatura é encontrado para a mesma espécie uma produção entre 5 e 21 ovos.fêmea⁻¹.dia⁻¹ (Kaminski & Montú 2005). As autoras realizaram o experimento em diferentes condições de produção, o que pode ter levado a produções diferentes. Kaminski & Montú (2005) utilizaram meios com salinidade de 30±2 e temperatura de 20±1 °C, sendo a dieta composta por *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros calcitrans*.

Cunha (2008) verificou que o alimento monoalgal *Conticribra weissflogii* resultou em uma maior fecundidade de *T. turbinata*. Irigoien *et al.* (2000) relataram que há uma relação direta entre a taxa de produção de ovos em copépodes e a concentração de diatomáceas. Teixeira *et al.* (2010) constaram que o ideal para experimentos de produção de ovos do copépode *Acartia tonsa* é a utilização da concentração 20.000 células.mL⁻¹ de *C. weissflogii*, a mesma utilizada no atual estudo com *Temora turbinata*.

Conforme Turner (1984), a espécie *T. turbina* é onívora, alimentando-se de um amplo espectro de tamanho e qualidade de alimento, o que pode ter

interferido diretamente na produtividade de fêmeas no atual estudo. Os copépodes podem ingerir protistas heterotróficos em maiores taxas do que o fitoplâncton (Verity & Paffenhöfer 1996).

Como esperado, foi observado que os resultados de sobrevivência e produção de ovos de *Temora turbinata* foram estritamente relacionados, ou seja, os tratamentos que tiveram alta sobrevivência apresentaram alta produção de ovos, enquanto que os tratamentos que tiveram mortalidade não apresentaram produção.

Existem muitas vantagens na utilização de copépodes como alimento de organismos produzidos para fins econômicos, no entanto, estas vantagens são dependentes do estabelecimento de protocolos que garantam sua maior sobrevivência e seu melhor desenvolvimento. Além disso, apesar de apresentar naturalmente uma baixa produção de ovos.fêmeas⁻¹, o que inviabiliza a sua utilização na aquicultura, a espécie *T. turbinata* possui potencial de produção visando a sua utilização em experimentos científicos, como bioindicadora.

3.5 Conclusão

Antibióticos aplicados em cultivos/produção de organismos marinhos possuem o potencial de beneficiá-los, são alternativas para aplicação em experimentos científicos de cunho ecológico e cultivo de copépode onde é necessária a manutenção da sobrevivência e produtividade de ovos. A aplicação de antibióticos somente no alimento ou somente no meio de

produção parecem ser mais eficiente. Ressalta-se que, testes prévios devem ser realizados, aplicando os antibióticos no meio de cultivo/produção da espécie de interesse, a fim de evitar efeitos adversos.

4. CAPÍTULO II

**Avaliação dos efeitos do uso de antibióticos no crescimento de
microalgas utilizadas como alimento em meios de produção de
crustáceos**

Vanessa Ochi Agostini^{a,b}; Lucélia Borges^b; Erik Muxagata^b; Paulo Cesar Abreu^b

^aPrograma de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

^bUniversidade Federal do Rio Grande (FURG) - Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

4.1 Introdução

Apesar de muitos anos de investigação, ainda existem vários problemas na produção e cultivo de organismos, tal como à alta mortalidade, atribuída principalmente a presença de bactérias patogênicas (Torkildsen & Magnesen 2004). Cultivos em altas densidades em combinação aos restos mortais de organismos e às altas cargas de matéria orgânica estimulam a seleção e o crescimento de bactérias oportunistas (Olafsen 1993, Vadstein *et al.* 1993).

Esta alta densidade bacteriana pode resultar em uma produção dos organismos de interesse inferior à esperada (Lipton *et al.* 2003), pois as bactérias são responsáveis por doenças em invertebrados e peixes (Wyban & Sweeney 1991) e, como consequência, pela sua mortalidade em massa (Karunasagar *et al.* 1994). Em cultivos de microalgas, as bactérias podem causar o mesmo dano, pois competem ativamente pelos mesmos recursos necessários à sobrevivência do fitoplâncton (Hamdan & Jonas 2007).

As microalgas marinhas desempenham um papel fundamental na aquicultura (Riquelme & Avendaño-Herrera 2003), pois são comumente utilizadas não somente como alimento humano, mas também como alimento em cultivos de espécies marinhas comerciais (Pauw *et al.* 1984, Utting 1985).

Kaminski (2004) verificou que as microalgas *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana* possuem potencial de utilização como alimento na produção do copépode *Acartia tonsa*, sendo a primeira alga utilizada tanto nas primeiras fases de desenvolvimento, em combinação com microalgas menores (*e.g.* *I. galbana*), quanto na fase adulta, já a segunda utilizada somente nos estágios iniciais (náuplio e copepodito) por causa da variação de tamanho.

Cultivos de microalgas marinhas livres de bactérias podem ser desenvolvidos com a utilização de antibióticos (Spencer 1952), podendo ser inseridas diretamente nos tanques de produção de invertebrados e peixes, servindo assim de alimento (Gatesoupe 1989, Subhash *et al.* 2004). No cultivo de *Isochrysis galbana*, o qual foi utilizado como alimento para ostras, Subhash *et al.* (2004) verificaram que seis horas de exposição da microalga ao antibiótico cloranfenicol (10 mg.L^{-1}) foi suficiente para reduzir a densidade bacteriana patogênica, sem afetar adversamente as algas e as ostras. Sendo assim, o uso de antibióticos em cultivos pode trazer benefícios aos organismos de interesse, favorecendo o seu crescimento, melhorando e/ou acelerando o seu desenvolvimento (Tighe-Ford 1970, Walne 1974).

Em contraponto, existe a possibilidade de contaminação ambiental com alguns destes componentes (Sarmah 2006, Xu *et al.* 2007). E esta contaminação está relacionada ao uso impróprio e indiscriminado de

antimicrobianos, propiciando a ocorrência de resistência microbiana e efeitos indesejados sobre organismos não alvo (Kim & Aga 2007).

Agentes antibacterianos têm sido frequentemente detectados em efluentes de esgotos, águas superficiais e águas subterrâneas (Ying & Kookama 2007), sendo necessário, portanto, avaliar os riscos que as substâncias antibióticas podem representar (Guo & Chen 2012). Porém, apenas alguns estudos investigaram os efeitos dos antibióticos nos organismos aquáticos (Wollenberger *et al.* 2000). Além disso, a grande maioria das pesquisas concentra-se em sistemas de água doce e no efeito dos antibióticos individualmente (Liu *et al.* 2011, Weber *et al.* 2011).

Com a contaminação continuada dos ecossistemas aquáticos, ferramentas são necessárias para avaliar a sensibilidade dos organismos aquáticos a substâncias, a fim de se constatar ou não os seus efeitos negativos (Reinfelder *et al.* 2000).

Dados de tolerância disponíveis na literatura mostraram que microalgas podem ser mais sensíveis do que crustáceos e peixes a antibióticos (Orvos *et al.* 2002, Isidori *et al.* 2005), sendo consideradas bons organismos biondicadores.

As microalgas são algas unicelulares, eucariontes que habitam ambientes marinhos e de água doce em todo o mundo (Falciatore & Bowler 2002). Devido à sua alta produtividade, são consideradas como principais representantes da base da cadeia alimentar (Marx & Uhen 2010).

Por este motivo, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso de diferentes combinações de antibióticos no cultivo das espécies *Conticribra*

weissflogii (Bacillariophyceae) e *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae), observando a possível inibição ou incremento de crescimento populacional ao longo do tempo.

4.2 Material e Métodos

Por meio dos resultados obtidos no experimento de sobrevivência com o copépode *Temora turbinata* optou-se por realizar testes utilizando os tratamentos que obtiveram respostas positivas, sendo excluído o tratamento T2, o qual concluiu-se não ser recomendado, e incluído mais um tratamento (T8), para avaliar os efeitos dos mesmos no crescimento de microalgas utilizadas como alimento em cultivos de copépodes marinhos. O T5, que também teve resultados negativos na sobrevivência de *T. turbinata*, foi mantido para comparar a sensibilidade do fitoplâncton em relação ao zooplâncton.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) durante sete dias, empregando as espécies de microalgas *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) Parke 1949 e *Conticribra* (*Thalassiosira*) *weissflogii* (Bacillariophyceae) (Grunow) Stachura-Suchoples & Williams 2009 como organismos bioindicadores. O experimento contou com 24 erlenmeyers (200 mL) para cada microalga, previamente esterilizados em autoclave, contendo 100 mL de cultivo, representando um controle e sete tratamentos, com três réplicas cada: Controle (sem antibiótico); T1) 0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Pringault *et al.*

2009); T3) 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$ da solução (0,3 g de penicilina G potássica + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada (Tighe-Ford 1970); T4) 0,05 g.L^{-1} de sulfato de neomicina (Yetka & Wieb 1974); T5) 0,5 g.L^{-1} de penicilina G potássica + 0,5 g.L^{-1} de sulfato de estreptomicina + 0,1 g.L^{-1} de cloranfenicol (Couch 1939); T6) 0,63 g.L^{-1} de penicilina G potássica + 0,25 g.L^{-1} de sulfato de estreptomicina (Borojevic 1966); T7) 0,2 g.L^{-1} de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L^{-1} de penicilina G potássica (Sherr *et al.* 1986); T8) 0,32 g.L^{-1} de penicilina G potássica + 0,83 g.L^{-1} de sulfato de estreptomicina (Spencer 1952).

A espécie vinha sendo cultivada em meio de cultivo F/2 (Guillard 1975) com salinidade 30 para *C. weissflogii* e 28 para *I. galbana*, temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo 12:12 com iluminação artificial ($70 \mu\text{mol photons s}^{-1}\text{m}^{-2}$) em incubadora tipo DBO (Marconi 403). A concentração inicial das microalgas *C. weissflogii* e *I. galbana* utilizadas no experimento foi de $1.406 \text{ cel.mL}^{-1}$ e 188 cel.mL^{-1} , respectivamente. Para o experimento, mantiveram-se as mesmas condições de cultivo, com exceção do fotoperíodo, o qual foi de 14:10 para intensificação do crescimento celular. Como não houve o uso de aeradores, os frascos foram agitados a cada 6 horas para evitar a sedimentação das células.

Para acompanhar o aumento da densidade celular foram realizadas coletas de 2 mL de cada cultivo diariamente, no mesmo horário e após a homogeneização dos frascos. O material coletado foi depositado em eppendorf e fixado com lugol. As contagens celulares foram realizadas em câmara de *Neubauer*, usando microscópio óptico

Após a sua utilização, os antibióticos foram guardados em recipientes de vidro fechados, esperou-se um mês para o término do efeito dos mesmos, sendo posteriormente autoclavados para eliminar possíveis micro-organismos resistentes, sendo o conteúdo então descartado no ambiente.

Foram analisados os dados de densidade celular em relação ao tempo, velocidade de crescimento e tempo de duplicação. Os dados foram tratados com estatística paramétrica. Para os valores que não estavam representados seguindo os pressupostos de normalidade, os resíduos foram transformados. O teste utilizado foi a Análise de Variância Bifatorial para os resultados de densidade celular.mL⁻¹ em cada tratamento em relação ao tempo. Já Análise de Variância Unifatorial foi utilizada para testar as diferenças de densidade celular total, de taxa de duplicação por dia e de tempo de duplicação entre os tratamentos. Ambas as análises foram seguidas do Teste *post-hoc* Tukey.

4.3 Resultados

Quando avaliada *C. weissfloggi*, verificou-se que esta espécie apresentou tolerância significativa ($p>0,05$) a todos os tratamentos, quando comparados ao controle, em todos os tempos de exposição avaliados. Já para a espécie *I. galbana*, ao final do experimento, com 168 horas de exposição, também não foram verificadas densidades celulares (cel.mL⁻¹) diferentes estatisticamente entre o controle e os tratamentos. Porém, quando avaliado os tempos de exposição separadamente observaram-se diferenças. Com 24 e 48 horas de exposição, o tratamento T7 teve uma densidade celular superior ao

controle ($p=0,000$) e com 72 horas de exposição, tanto o tratamento T6 quanto o T7 tiveram densidades superiores ao controle ($p=0,005$) e ($p=0,000$), respectivamente.

Mesmo não sendo verificada diferença significativa entre o controle e os tratamentos ao final do experimento, é possível perceber tendências de benefício ou inibição do aumento no crescimento populacional com o uso de antibióticos quando visualizados os diferentes tratamentos, separadamente, em relação ao controle, tanto para *C. weissflogii* quanto para *I. galbana* (Figs. 1 e 2).

O tratamento T5 apresentou um menor número de células em relação ao controle em todos os tempos de exposição para *C. weissflogii*. Para *I. galbana* este tratamento foi o segundo pior, sendo o T3 detentor da menor densidade celular em relação ao controle e aos demais tratamentos.

Não obstante, para *C. weissflogii* e *I. galbana*, os tratamentos T6, T7 e T8 apresentaram uma densidade celular final maior que o controle, respectivamente.

Em relação à variação de densidade ocorrida durante o experimento, é possível observar um contínuo incremento celular em relação ao tempo no controle e em todos os tratamentos, sendo o número de células quantificadas em 168 horas de exposição entre 2,5 e 4 vezes maior para *C. weissflogii* e 7 a 16 vezes maior para *I. galbana* em comparação ao início do experimento.

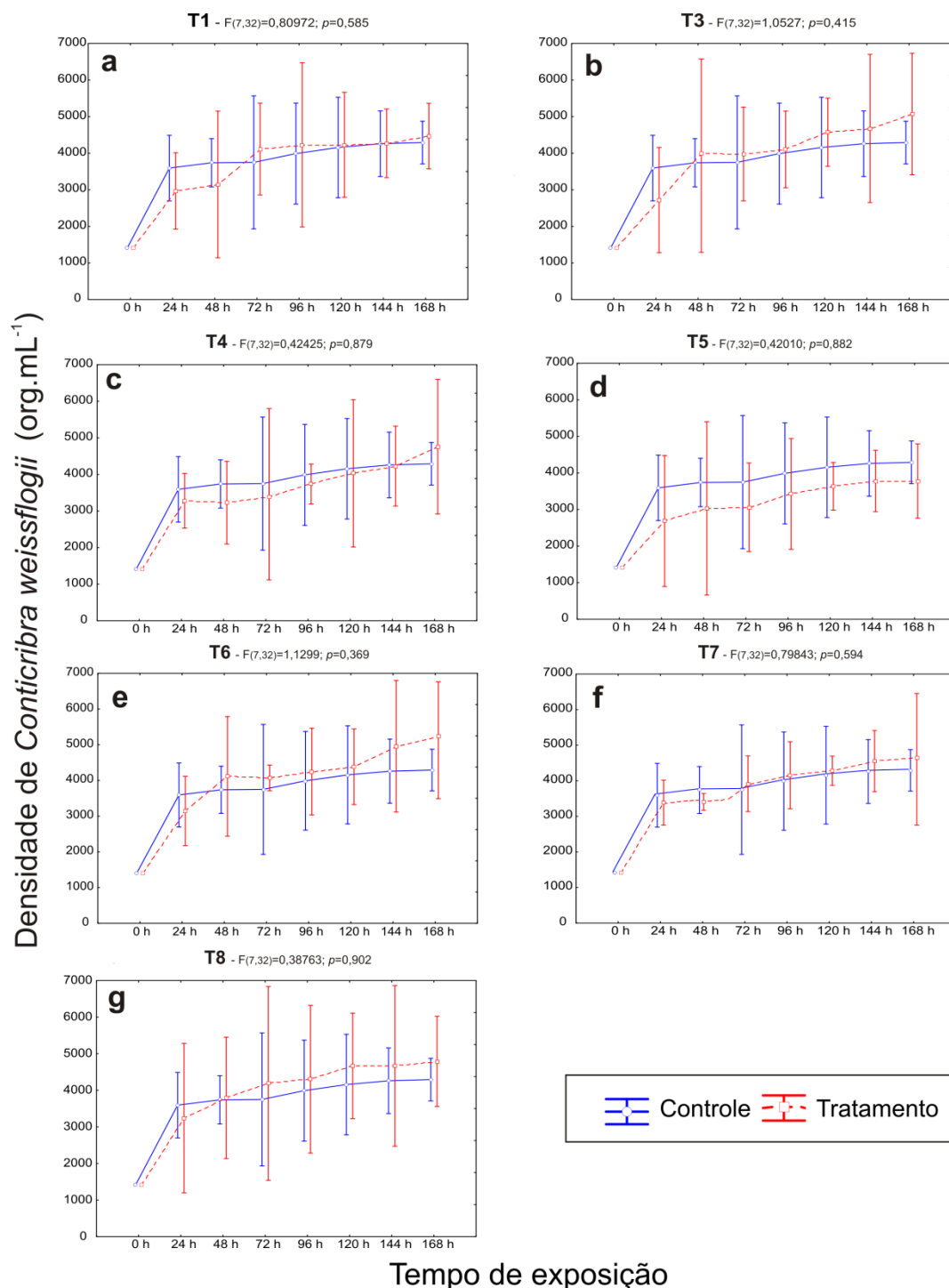


Figura 1. Gráfico representando a densidade de *Conticribrá weissflogii* (cel mL⁻¹) em cada tratamento em relação ao controle nos diferentes tempos de exposição. a: T1) 0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina; b: T3) 100 µL.L⁻¹ da solução (0,3 g de penicilina G potássica + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada); c: T4) 0,05 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina; d: T5) 0,5 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,1 g.L⁻¹ de cloranfenicol; e: T6) 0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina; f: T7) 0,2 g.L⁻¹ de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L⁻¹ de penicilina G potássica; g: T8) 0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

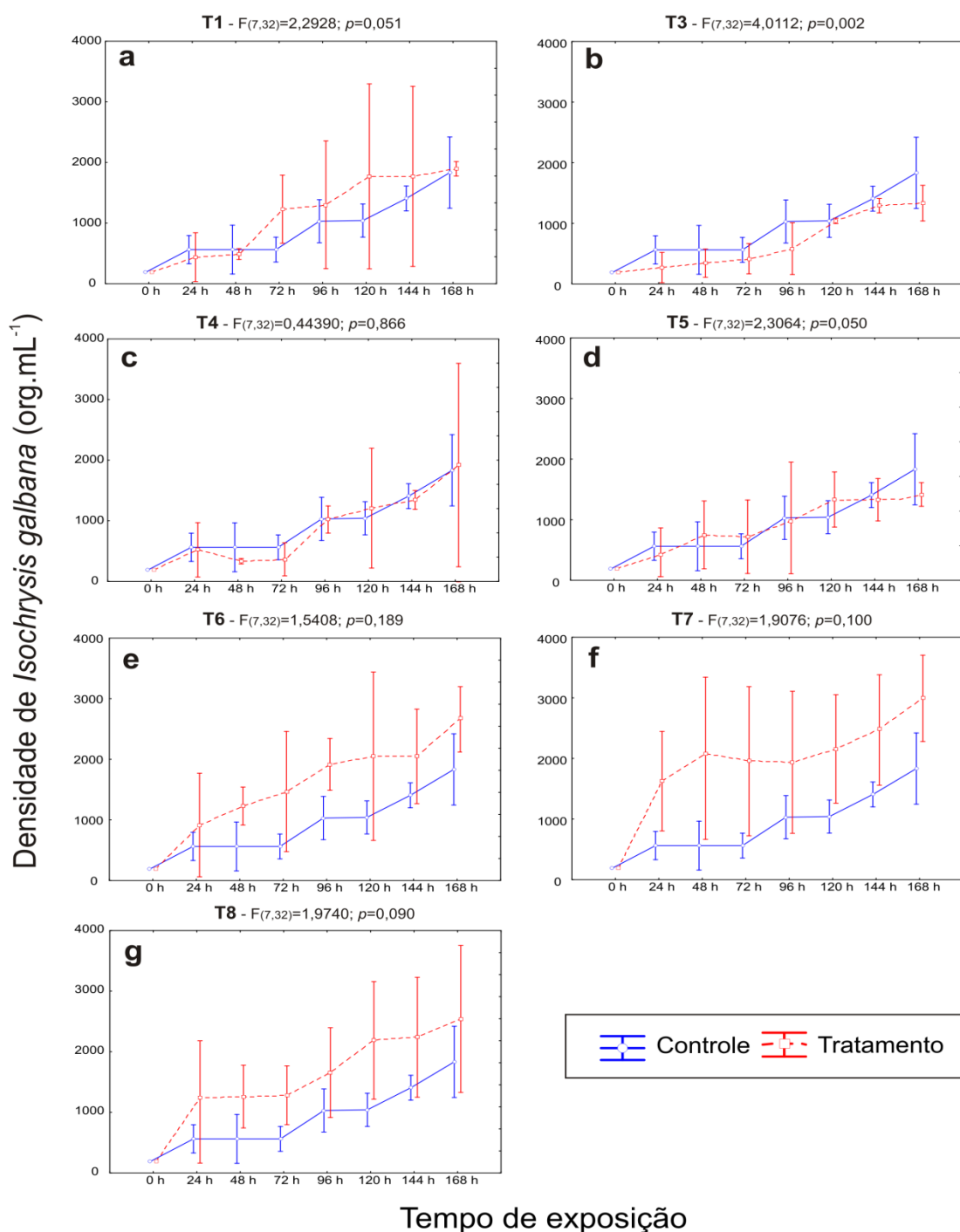


Figura 2. Gráfico representando a densidade de *Isochrysis galbana* (cel.mL⁻¹) em cada tratamento em relação ao controle nos diferentes tempos de exposição. a: a: T1) 0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina; b: T3) 100 µL.L⁻¹ da solução (0,3 g de penicilina G potássica + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada); c: T4) 0,05 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina; d: T5) 0,5 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,1 g.L⁻¹ de cloranfenicol; e: T6) 0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina; f: T7) 0,2 g.L⁻¹ de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L⁻¹ de penicilina G potássica; g: T8) 0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

Quando avaliada a percentagem de diferença de densidade celular (cel.mL^{-1}) nos tratamentos, ao fim do experimento, em comparação ao controle, é possível observar que a maioria dos tratamentos tiveram um crescimento celular maior que o controle, com exceção do T5 para *C. weissflogii* e do T3 e T5 para *I. galbana*, os quais apresentaram uma inibição de crescimento celular, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Percentagem de diferença de densidade celular (cel.mL^{-1}) de *Conticriba weissflogii* e *Isochrysis galbana* nos tratamentos (com combinações de antibióticos) em relação ao controle (sem antibiótico) ao final do experimento (168 horas de exposição).

Percentagem de incremento celular comparado com o controle (168 horas de exposição)		
Tratamentos	<i>Conticriba weissflogii</i> (cel.mL^{-1})	<i>Isochrysis galbana</i> (cel.mL^{-1})
T1	4 %	3 %
T3	18 %	-27 %
T4	11 %	5 %
T5	-12 %	-23 %
T6	22 %	46 %
T7	8 %	64 %
T8	12 %	39 %

Para a microalga *C. weissflogii* o maior incremento celular em relação ao controle ocorreu no T6, seguido do T3 e do T8, com 22 %, 18 % e 12 %, respectivamente. Já para a microalga *I. galbana*, os tratamentos T7, T6 e T8 apresentaram as maiores densidades celulares ao final do experimento com 64 %, 46 % e 39 %, respectivamente.

Outro ponto importante foi a diferença observada nas médias de taxa de crescimento, de duplicação diária e de tempo de duplicação entre o controle e os tratamentos para ambas as espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa média de crescimento, de duplicação média diária e tempo de duplicação total das espécies *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana* no controle (sem antibiótico) e nos tratamentos (com combinações de antibióticos).

Tratamentos	Taxa de crescimento	Duplicação.dia ⁻¹	Tempo de duplicação (dias)
<i>Conticribra weissflogii</i>			
Controle	0,164	0,236	4,3
T1	0,165	0,238	4,0
T3	0,182	0,263	3,8
T4	0,173	0,250	4,1
T5	0,141	0,203	5,0
T6	0,201	0,289	3,5
T7	0,167	0,241	4,3
T8	0,175	0,252	4,0
<i>Isochrysis galbana</i>			
Controle	0,325	0,469	2,1
T1	0,284	0,410	2,5
T3	0,280	0,404	2,5
T4	0,323	0,466	2,2
T5	0,289	0,417	2,4
T6	0,385	0,555	1,8
T7	0,394	0,568	1,8
T8	0,371	0,535	1,9

Quando avaliado o incremento celular das microalgas, levando em conta a média de células de todos os tempos de exposição para o controle e os tratamentos, é possível observar novamente a superioridade de densidade dos tratamentos T6 ($p=0,985$), T3 ($p=0,999$) e T8 ($p=1,000$) para *C. weissflogii* (Fig. 3a) e T7 ($p=0,000$), T6 ($p=0,017$) e T8 ($p=0,014$) para *I. galbana* (Fig. 3b) em relação ao controle.

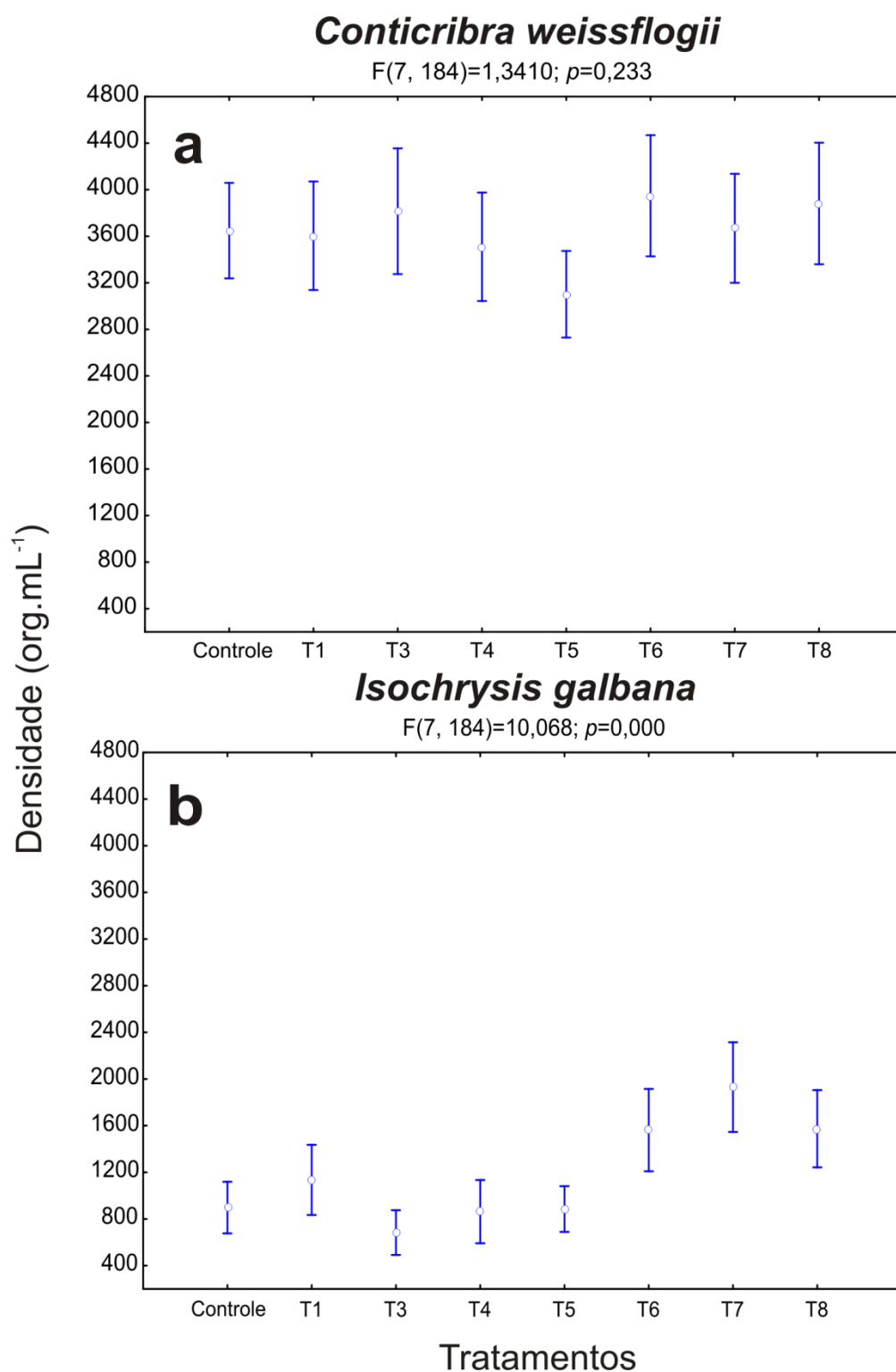


Figura 3. Gráficos representando as densidades celulares totais (cel.mL⁻¹) de *Conticribra weissflogii* (a) e *Isochrysis galbana* (b) no controle e nos tratamentos, levando em conta a média de densidade de todos os tempos de exposição. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

4.4 Discussão

A ausência de diferença estatística entre o controle e os tratamentos comprova a tolerância para as combinações de antibióticos e concentrações testadas, corroborando com Reifelder *et al.* (2000). Mesmo assim, cabe ressaltar, que na literatura é relatado que alguns antibióticos podem causar danos a algas eucariontes (Reifelder *et al.* 2000) como inibição de crescimento.

Além disso, outros fatores podem estar associados aos resultados, como um efeito inibitório tardio, as concentrações máximas testadas ou a sensibilidade das espécies avaliadas no atual estudo. Chen & Jiang (2011) observaram a presença de um efeito bifásico de antibióticos no crescimento de algas, em que a primeira fase seria marcada pela inibição do crescimento e a segunda por um aumento populacional. Já no estudo realizado por Guo & Chen (2012), foi verificado que a espécie testada cresceu somente em uma das concentrações utilizadas do antibiótico Clorotetraciclina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), já nas outras mais altas o crescimento foi inibido. A sensibilidade do fitoplâncton em relação a antibióticos varia amplamente. Por exemplo, a espécie *Selenastrum capricornutum* foi considerada duas a três vezes menos sensível à maioria dos antibióticos do que a espécie *Microcystis aeruginosa* (Guo & Chen 2012).

No presente estudo verificaram-se diferenças de reações entre as espécies *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana* ao mesmo tratamento. Sendo o T3 benéfico para a primeira e prejudicial para a segunda com a inibição de seu crescimento, sendo 27 % inferior ao controle, mesmo sem diferença significativa.

A maioria das algas tolera maiores concentrações de antibióticos do que as bactérias em um curto tempo de exposição a altas concentrações (Lai *et al.* 2009). Porém, as microalgas diferem em sua sensibilidade, espécies estreitamente relacionadas às vezes têm tolerâncias bastante diferentes (Droop 1967). Spencer (1952) utilizou a penicilina para purificar as culturas de *Phaeodactylum*. Desde então, antibióticos têm tomado o seu lugar entre as técnicas padrão para purificar cultivos de algas e protozoários (Droop 1967).

A presença de tratamentos com densidades finais de *I. galbana* inferiores ao controle, pode estar relacionada à baixa tolerância desta espécie às combinações de antibióticos testados. Para o tratamento T3 não era esperado a inibição de crescimento de *I. galbana*, pois combinações de antibióticos com penicilina e estreptomicina (Borojevic 1966, Gold 1968, Tighe-Ford 1970, Pringault *et al.* 2009) são frequentemente encontradas com excelentes resultados de crescimento e desenvolvimento de organismos.

Foi possível observar também que o T5 teve um crescimento celular final 12 % inferior ao controle para a espécie *C. weissflogii* e 23 % inferior para *I. galbana*. Couch (1939) evidenciou em seu estudo que muitas espécies foram testadas com essa combinação de antibióticos, no entanto, a maioria não apresentou crescimento populacional. A menor densidade celular encontrada no T5 também pode estar relacionada à presença do cloranfenicol na combinação de antibióticos. Youn & Hun (2007) determinaram a extensão da inibição e a resistência bacteriana a vários antibióticos utilizados, individualmente e em combinação, em cultivos de microalgas e verificaram que os efeitos letais em microalgas e bactérias foram mais altas com o

cloranfenicol. Em vários países furazolidona, cloranfenicol e eritromicina não são permitidos em cultivos, devido a seus efeitos de toxicidade (Benbroock 2002).

Droop (1967) testou essa combinação de antibióticos em cultivos de diatomáceas e obteve excelentes resultados. Ainda, Campa-Córdova *et al.* (2006) verificaram que tanto o cloranfenicol quanto a eritromicina, utilizados individualmente em cultivos não afetaram o crescimento de *I. galbana*. Ambos os estudos entram em discordância com os resultados obtidos no presente trabalho. Todavia, Lai *et al.* (2009) também registrou efeitos letais do Cloranfenicol não somente em bactérias mas também em microalgas.

Outro ponto importante dos resultados foi o benefício observado no crescimento celular de *Conticribra weissflogii* principalmente no tratamento T6 detentor de uma densidade celular 22 % superior ao controle ao final do experimento. Já para a espécie *I. galbana*, o benefício mais relevante observado no incremento celular foi do tratamento T7. Segundo Tighe-Ford (1970), Walne (1974) e Drillet *et al.* (2011) a obtenção de culturas de microalgas livres de bactérias, exclui a competição entre os organismos, beneficiando o crescimento da espécie de interesse. Cabe ressaltar, que tanto o T6 quanto o T7 tiveram bons resultados para ambas as espécies.

Sherr *et al.* (1986) observaram que o uso desta combinação de antibióticos garantiu a completa inibição do bacterioplâncton, ao mesmo tempo não causou nenhum efeito adverso em protozoários e no nanoplâncton heterotrófico. É necessário, contudo, utilizar uma mistura de antibióticos de largo espectro, para evitar a persistência de algumas bactérias.

Além disso, a média do tempo de duplicação para os tratamentos T6 referente à *C. weissflogii* e T7 referente à *I. galbana* foi de 3,5 e 1,8 dias, enquanto os controles, 4,3 e 2,1 dias, respectivamente. Outros trabalhos de produção de microalgas obtiveram resultados melhores. Nas mesmas condições de temperatura e salinidade, Meinerz (2007) observou um tempo de duplicação de 3,4 dias para *C. weissflogii*. Porém, no estudo de Meinerz (2007) foi utilizada uma irradiância de $163 \mu\text{mol}^{-1}$, enquanto que no presente trabalho de $70 \mu\text{mol}^{-1}$, o que pode ter contribuído para este resultado. Já para *I. galbana* foi encontrado por Vasconcelos *et al.* (2009) um tempo de duplicação de 1,27 dias, todavia, os autores cultivaram a microalga em fotoperíodo integral, o que provavelmente está diretamente relacionado a um crescimento celular mais rápido do que no atual estudo em que se utilizou um fotoperíodo C:E (14:10).

Cabe ainda ressaltar, que o tempo de duplicação foi calculado com a média de todos os tempos de exposição analisados, desta forma, o antibiótico provavelmente já havia perdido o seu efeito. Sendo assim, acredita-se que a reposição diária do tratamento garantiria um tempo de duplicação ainda menor. Porém, é necessário mais estudos sobre o efeito desta reposição.

Verificou-se que os tratamentos testados no cultivo de *T. turbinata* apresentaram os mesmos resultados no cultivo das microalgas, no entanto, para o fitoplâncton houve não só a equivalência com o controle, como também um benefício no crescimento na maioria dos tratamentos, sugerindo que as espécies *C. weissflogii* e *Isochrysis galbana* podem ser mais resistentes que o copépode *T. turbinata* a antibióticos. Ainda, cabe ressaltar que as espécies de microalgas não responderam da mesma forma aos antibióticos. Diferentes

tratamentos foram os melhores para cada espécie. Além disso, o tratamento T3 teve resultados de crescimento superiores ao controle para *C. weissflogii* e inferiores para *I. galbana*.

As microalgas marinhas são amplamente utilizadas como alimento no estágio inicial de cultivos de larvas de moluscos, peixes e crustáceos (Campa-Cordova *et al.* 2006). Por este motivo, o estudo sobre o uso de antibióticos em cultivos de microalgas é valioso, a fim de melhorar a sua produção. Porém, enfatiza-se que o uso de antibióticos em cultivo pode causar efeitos não somente benéficos (Walne 1974), mas também adversos no seu crescimento (Lai *et al.* 2009) com observado no atual estudo.

4.5 Conclusão

Para ambas as espécies microalgas, *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana*, o T5 foi considerado prejudicial, em contrapartida, os tratamentos T6 e T8 foram considerados benéficos, evidenciando o potencial o do uso de antibióticos em cultivos destas espécies para a intensificação de produção. O T3 apresentou resultados opostos para as microalgas testadas, o que evievidencia uma sensibilidade diferente entre elas. Sendo assim, provavelmente a diatomácea *C. weissflogii* seja mais resistente.

5. CAPÍTULO III

Efeito da aplicação de antibióticos em meio de produção de zooplâncton marinho e o seu potencial de inibição de micro-organismos aderidos

Vanessa Ochi Agostini^{a,b}; Paulo Cesar Abreu^b; Erik Muxagata^b

^aPrograma de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

^bUniversidade Federal do Rio Grande (FURG) - Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil.

5.1 Introdução

Biofilme é o nome dado à comunidade microbiana aderida a superfícies como rochas e cascos de navios, animais e algas, na qual há produção de uma matriz polimérica (Dalton & March 1998, Lee *et al.* 2003). Estas complexas comunidades de micro-organismos interagem entre si e com o ambiente (Lee *et al.* 2008).

As bactérias aderidas podem causar vários danos às atividades humanas, dentre elas encontra-se experimentos científicos (Prigault *et al.* 2009) e cultivo/produção de organismos para fins econômicos (Torkildsen & Magnesen 2004). As bactérias são as principais responsáveis por doenças em invertebrados e peixes, sendo a causa da mortalidade de larvas (Wyban & Sweeney 1991).

Embora, muitos autores relatem a importância benéfica de bactérias em produções intensivas de crustáceos (Krummenauer *et al.* 2012) e até mesmo de peixes (Rocha *et al.* 2012), por meio da formação de bioflocos (BFTs), ressalta-se que em cultivos laboratoriais a comunidade bacteriana em altas densidades podem gerar mortalidade dos organismos de interesse (Spencer 1952).

Conforme Avnimelech (2007), BFT é composto por uma alta densidade de micro-organismos agregados à matéria orgânica disponível, como ração, fezes e organismos mortos. No entanto, na ausência desta matéria orgânica densa os micro-organismos podem se aderir aos organismos cultivados e/ou facilitar a proliferação de bactérias patogênicas (Torkildsen & Magnesen 2004). Ainda, para estabelecer o BFT no meio de produção é necessária intensa aeração (Avnimelech 2007), o que para organismos menores como copépodes torna-se inviável, por causa do estresse gerado.

Meios de produção podem ser prejudicados pela formação de biofilme em uma variedade de componentes submersos como gaiolas, redes, bóias, cordas, a parede dos tanques e até mesmo a superfície dos organismos. Todas estas estruturas servem como superfícies para a colonização, a qual é severamente problemática para cultivos e pode gerar impactos econômicos significativos (Fitridge *et al.* 2012).

Spencer (1952) enfatizou a dificuldade em se obter meios sem a contaminação de micro-organismos. Por este motivo, atualmente, muitas substâncias químicas têm sido usadas para prevenir a adesão de bactérias em superfícies (Tang & Cooney 1998). Todavia, normalmente estas substâncias causam danos a organismos não alvo (Takeuchi *et al.* 2004).

A utilização de inibidores de procariontes, como os antibióticos, no controle do crescimento bacteriano em cultivos teve início na década de 1940 (Couch 1939) e até hoje possui valorosa contribuição, seja para utilização em experimentos científicos (Trotted *et al.* 2011), como para beneficiar

cultivos/produção de microalgas (Subhash *et al.* 2004), de invertebrados (Tigue-Ford 1970) ou de peixes (Oppenheimer 1955).

Por este motivo, o atual estudo teve como objetivo comparar o efeito de diferentes antimicrobianos na produção de copépodes, a fim de verificar o seu potencial de aplicação em meios de produção de zooplâncton marinho e experimentos científicos, além de avaliar a sua eficácia na inibição de bactérias aderidas.

5.2 Material e Métodos

Por meio dos resultados obtidos com os experimentos de sobrevivência de *Temora turbinata* e de crescimento das microalgas *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana* foram selecionados os tratamentos com os melhores resultados: T1 (0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina), T4 (0,05 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina), T6 (0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina) e T8 (0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina), o qual somente foi testado nas microalgas. Baseado no trabalho de DeLorenzo *et al.* (2001) e levando em conta que combinações de antibióticos são mais eficientes na inibição de bactérias em meios artificiais (Pappas & Hoffmann 1952, Kinne 1977) agregou-se os tratamento T1 e T4, reduzindo as concentrações de cada antibiótico, obtendo-se assim o tratamento T9.

Além disso, realizou-se o experimento com o copépode *Acartia tonsa*, seguindo a recomendação do ISO 14669 (1999), possibilitando assim a

comparação com os resultados do T6 de *Temora turbinata*. A utilização do T8 também permitiu uma nova comparação de sensibilidade entre o fitoplâncton e o zooplâncton.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo de Zooplâncton do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), sendo dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na avaliação da sobrevivência do copépode Calanoida *Acartia tonsa* Dana 1849 em contato com as combinações de antibióticos selecionadas, já a segunda, consistiu na avaliação da eficácia dos antibióticos na inibição de bactérias aderidas, utilizando para isso os tratamentos com os melhores resultados de sobrevivência obtidos na primeira etapa do experimento.

Para avaliar a sobrevivência dos copépodes foram utilizadas 100 unidades experimentais (UE) de 200 mL, representadas pelo controle e nove tratamentos com 10 réplicas cada: Controle (sem antibiótico no meio); T6) 0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Borojevic 1966); T8) 0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Spencer 1952); T9) 0,025 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,08 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,04 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina. Sendo, os tratamentos acima, com exceção do controle, repetidos nas seguintes situações: meio de produção e alimento com antibiótico (M/A); meio de produção com antibiótico e alimento sem antibiótico (M); meio de produção sem antibiótico e alimento com antibiótico (A).

Os indivíduos de *A. tonsa* foram coletados com rede de plâncton cilíndrico-cônica de 200 µm de malha e 30 cm de diâmetro, através de arrastos horizontais, na Praia do Cassino, Rio Grande, RS, Brasil. Primeiramente, os organismos foram

identificados segundo Sabatini (1990) sob microscópio estereoscópico e separados do resto da comunidade com pipeta de *Pausteur*, posteriormente os indivíduos foram aclimatados durante 30 horas para eliminar possíveis indivíduos debilitados pelo estresse gerado na coleta. Após a aclimação, os organismos adultos foram separados, sem distinção de sexo, conforme ISO 14669 (ISO 1999), e colocados individualmente em cada UE em um volume de meio de 100 mL.

As UE foram mantidas em salinidade 30, temperatura 25 °C (Brendolan 2004) e fotoperíodo 14:10, refletindo as condições de coleta. Ministrou-se alimentação utilizando a diatomácea *Conticribra (Thalassiosira) weissflogii* Stachura-Suchoples & Williams 2009 (20.000 cel.mL⁻¹) (Teixeira *et al.* 2010), diariamente em cada UE. As UE foram agitadas a cada três horas para a suspensão do alimento, havendo renovação total do meio de produção diariamente. Para avaliar a tolerância dos organismos aos tratamentos, monitoraram-se as UE a cada 24 horas, sendo observada a sobrevivência dos indivíduos durante 96 horas (Resgalla & Laitano 2002).

Para avaliar a eficácia dos antibióticos na inibição de bactérias aderidas, seis corpos de prova de madeira (20 X 20 mm) foram higienizados antecipadamente com álcool-etílico a 70 % e imersos nos diferentes tratamentos, em tréplica. Os cultivos foram mantidos em salinidade 30, temperatura de 25 °C e fotoperíodo 14:10 (C:E) em incubadora tipo DBO (Marconi 403), refletindo as condições de coleta. Para evitar o acúmulo do biofilme em apenas um lado dos substratos, os cultivos foram agitados cinco vezes ao dia.

Para o acompanhamento da densidade microbiana aderida ao substrato, foram retiradas três réplicas aleatórias de corpos de prova de cada UE depois de

transcorridas 6, 12, 24, 72, 120 e 168 horas de exposição ao controle e aos tratamentos. O material foi diluído em 9 mL de água de Mili-Q e fixado com 1 mL de formol a 40 %. O desprendimento das bactérias aderidas ao corpo de prova ocorreu aplicando-se três pulsos de 15 segundos em cada lado do substrato com frequência de 20 kHz (Oliveira *et al.* 2006), utilizando o ultra-som (Cole-Parmer® serie 4710 – ultrasonic homogenizer), e, posteriormente, o material foi conservado no escuro sob refrigeração (8 °C).

Para a quantificação de bactérias foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada tratamento e réplica. Primeiramente, do tempo de exposição de 12 horas, para selecionar o tratamento de maior redução de densidade de bactérias aderidas em relação ao controle e posteriormente a análise dos outros tempos de exposição, referente às combinações de antibióticos selecionados. O material biológico obtido foi filtrado em filtros de polycarbonato (escurecidos com Irgalan Black) e corados com Laranja de Acridina (1 %), sendo este depositado entre uma lâmina e uma lamínula. A densidade de bactérias (org.cm^{-2}) foi estimada através da contagem de indivíduos em 30 campos semi-aleatórios por lâmina, visualizados em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan), sob aumento de 100 X.

Após a sua utilização, os antibióticos foram armazenados em recipientes de vidro fechados, esperou-se um mês para o término do efeito dos mesmos, sendo posteriormente autoclavados para eliminar possíveis micro-organismos resistentes, sendo o conteúdo então descartado no ambiente.

O teste utilizado para averiguar a diferença estatística dos resultados de sobrevivência em relação aos tratamentos e ao tempo de exposição de *Acartia tonsa* e dos resultados comparativos entre o controle e o tratamento relativos à

densidade de micro-organismos presentes no substrato nos diferentes tempos de exposição foi a Análise de Variância Bifatorial. Já Análise de Variância Unifatorial foi utilizada para testar a diferença entre os tratamentos em relação à sobrevivência total de *A. tonsa*. Ambas as Análises de Variância foram seguidas do Teste *post-hoc* de Tukey.

5.3 Resultados

Em relação à sobrevivência de *Acartia tonsa* no controle e nos tratamentos nos diferentes tempos de exposição e nas diferentes situações de aplicação foi verificada diferença significativa somente para o T8 quando aplicado no meio de produção e no meio de produção e alimento, o qual resultou na alta mortalidade dos copépodes. O tratamento T9 apresentou uma maior sobrevivência (100 %) em todas as situações. Já o tratamento T6 apresentou uma alta sobrevivência, equivalente ao controle nas situações de aplicação M e M/A e superior na situação A (Fig. 1).

Quando avaliado o controle e os tratamentos levando em conta a sobrevivência total, ou seja, a média de sobrevivência entre todos os tempos de exposição juntos, é possível observar o benefício do T9 para a sobrevivência dos copépodes em relação ao controle e aos demais tratamentos, mesmo a diferença significativa sendo observada somente em relação ao T8 ($p=0,000$) (Fig. 2).

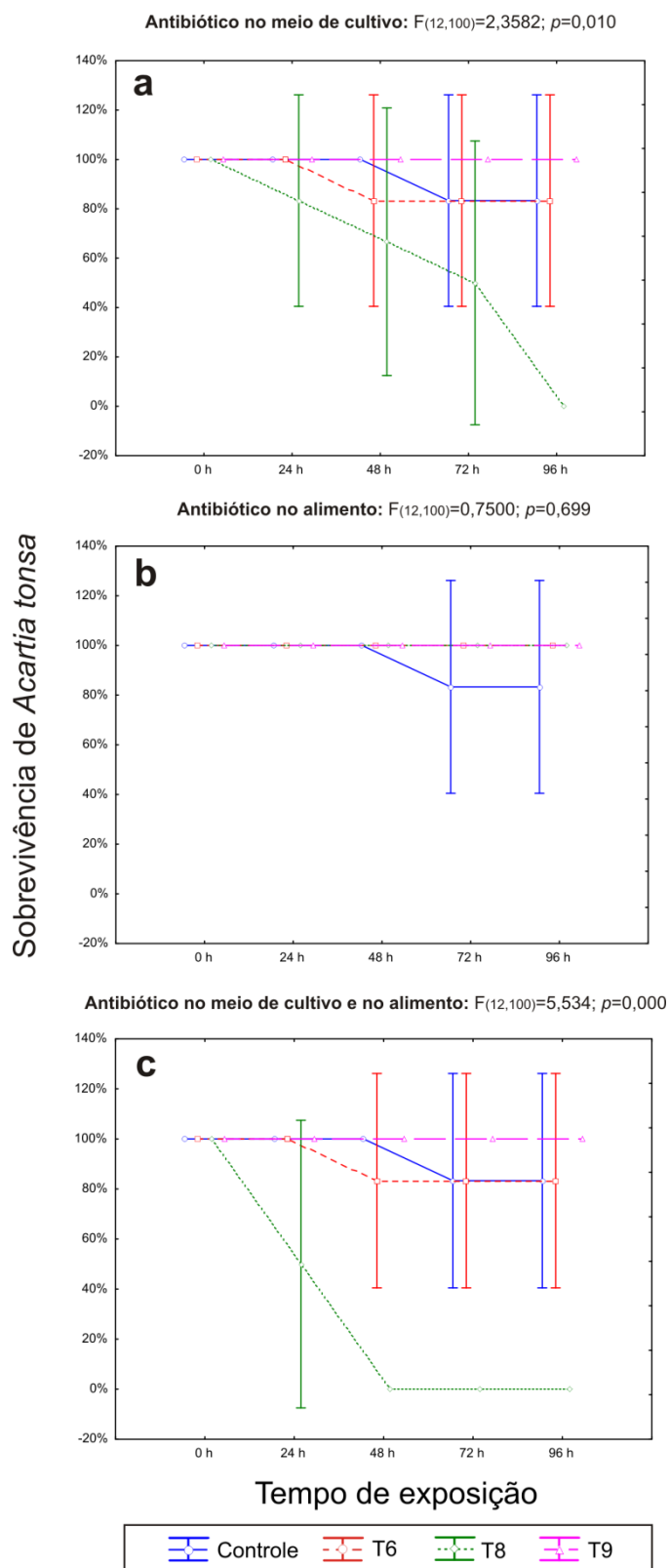


Figura 1. Percentagem de sobrevivência de *Acartia tonsa* no controle (sem antibióticos) e nos tratamentos (com combinações de antibióticos) nos diferentes tempos de exposição. a: antibiótico somente no meio de produção; b: antibiótico somente no alimento; c: antibiótico no meio de produção e no alimento. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

Devido a isso, somente os tratamentos T6 e T9 foram selecionados para a análise do potencial de inibição de bactérias aderidas. Todavia, as contagens foram realizadas fracionadamente, a fim de se verificar qual dos dois tratamentos deveriam ser avaliados por completo, ou seja, em todos os tempos de exposição.

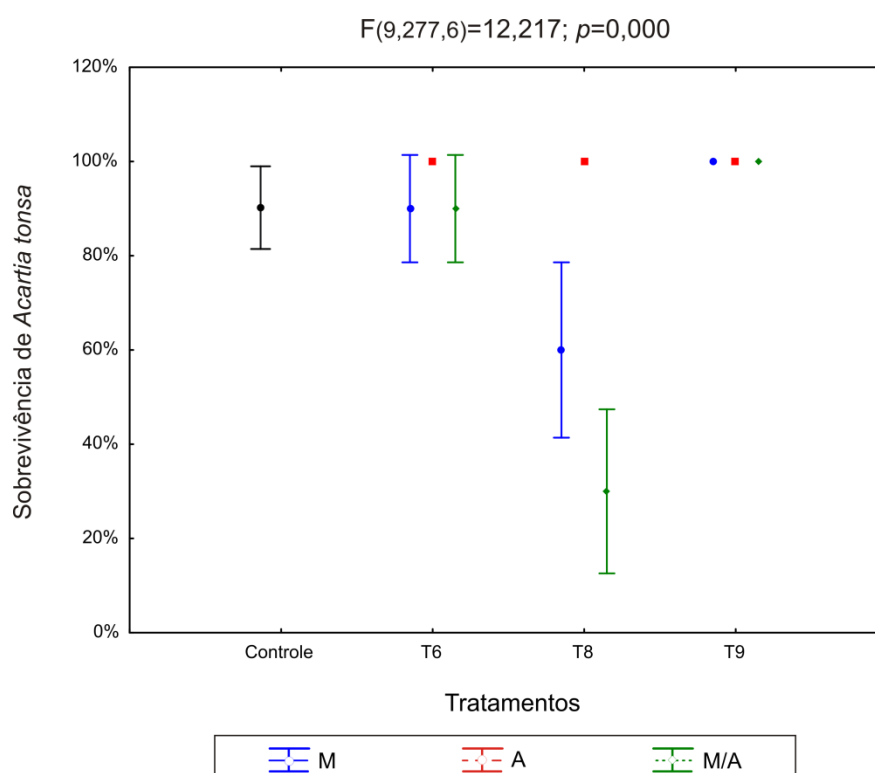


Figura 2. Percentagem de sobrevivência de *Acartia tonsa* no controle (sem antibióticos) e nos tratamentos (com combinações de antibióticos). As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

Após realizar a quantificação de bactérias aderidas (org.cm^{-2}), com 12 horas de exposição, verificou-se diferença em relação ao controle e todos os tratamentos, sendo o meio sem antibiótico detentor de uma maior densidade de bactérias ($19.802.262 \text{ org.cm}^{-2}$), enquanto que o T6 ($2.464.857 \text{ org.cm}^{-2}$) e o T9 ($1.341.144 \text{ org.cm}^{-2}$) corresponderam a uma densidade 88 % e 93 % inferior, respectivamente (Fig. 3).

Para ter certeza da melhor eficiência do T9 na inibição de bactérias aderidas, realizou-se uma nova quantificação comparando o controle e os tratamentos T6 e T9 com 72 horas de exposição.

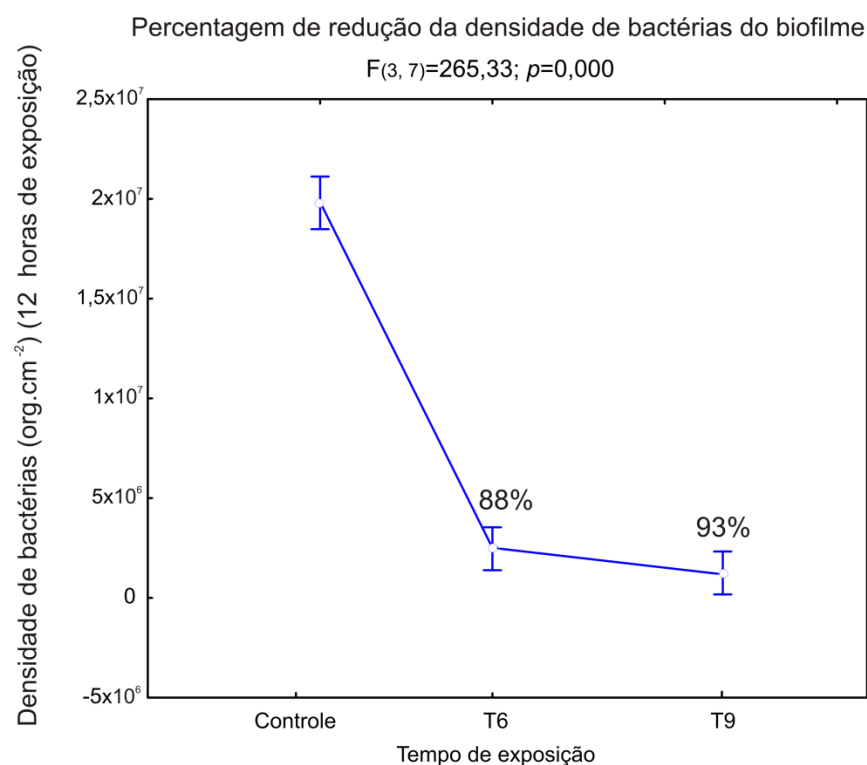


Figura 3. Densidade de bactérias aderidas (org.cm⁻²) com 12 horas de exposição ao controle e aos tratamentos. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

Observaram-se novamente diferenças significativas entre o controle (27.365.499 org.cm⁻²) e os tratamentos ($p=0,030$), sendo os meios com antibióticos detentores de uma menor densidade de bactérias aderidas, T6 (10.875.390 org.cm⁻²) e T9 (6.317.039 org.cm⁻²). O T9 novamente apresentou uma redução maior em relação ao controle (77 %) (Fig. 4a). No entanto, ao mesmo tempo em que houve esta diminuição ocorreu também o aparecimento de fungos aderidos ao substrato (Fig. 4b), sendo a sua densidade inversamente proporcional à redução das bactérias; o controle não apresentou fungos (Fig. 5).

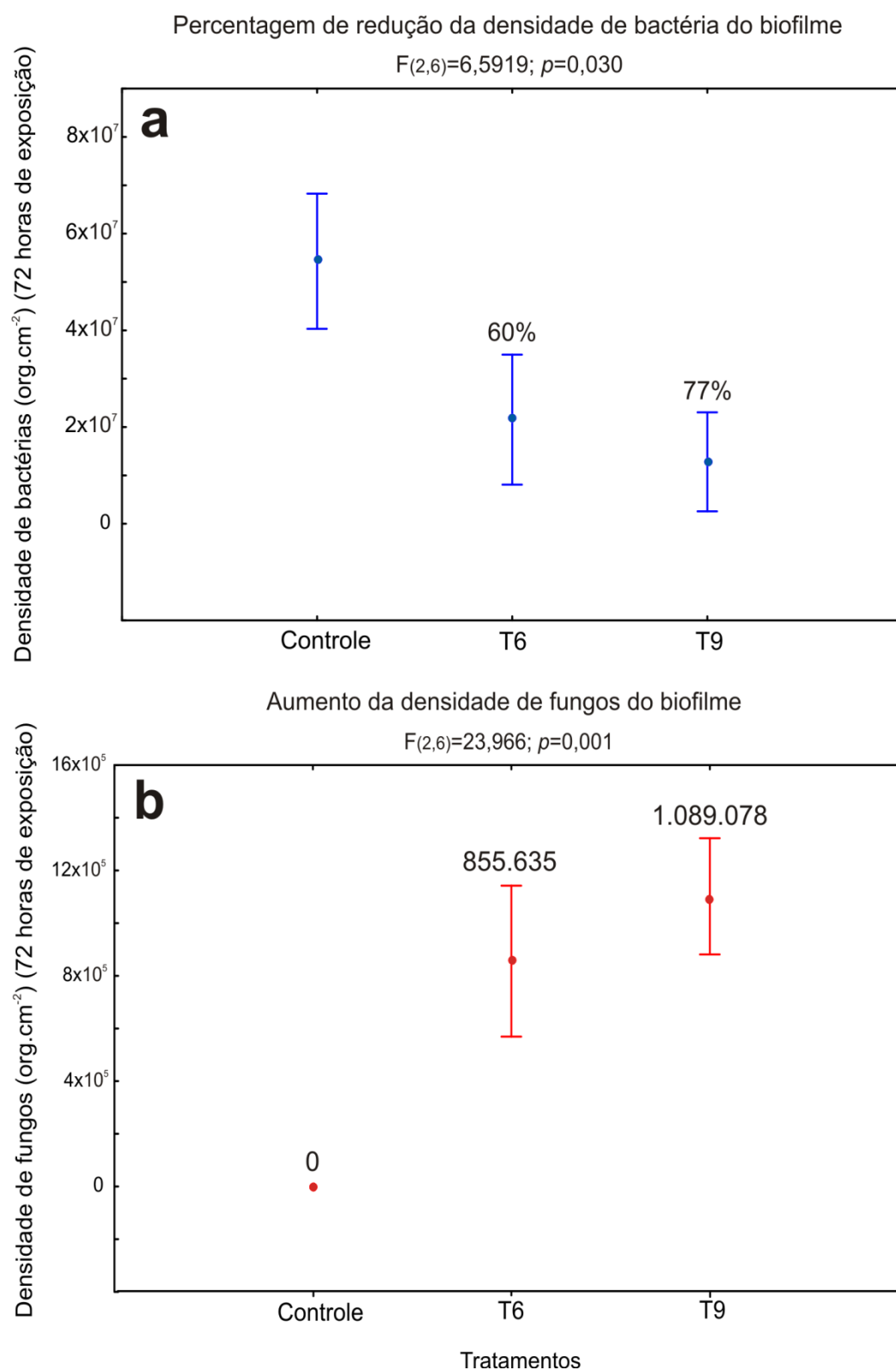


Figura 4. Densidade de micro-organismos (org.cm-2) com 72 horas de exposição ao controle e aos tratamentos. a: bactérias; b: fungos. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

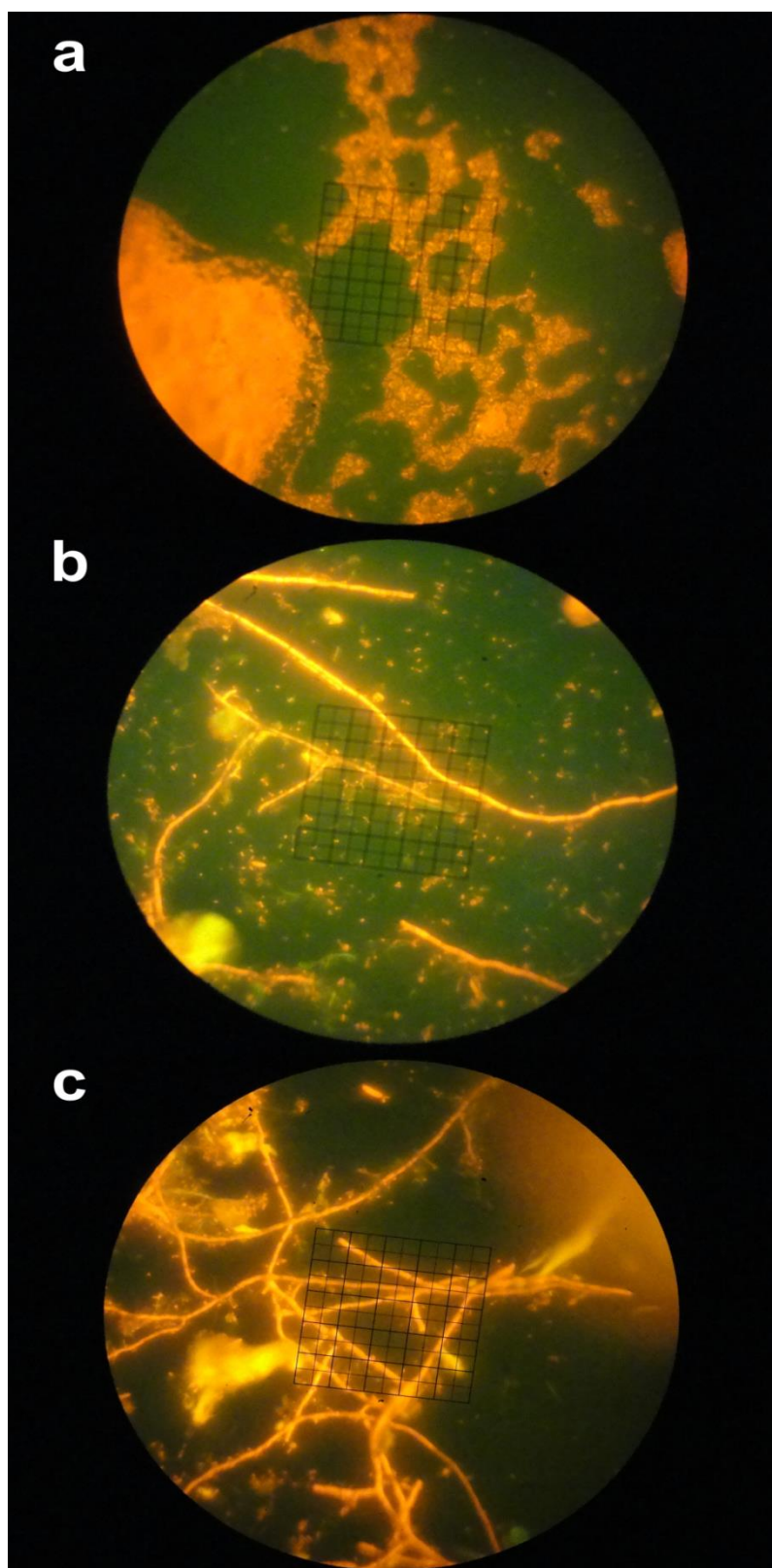


Figura 5. Composição da comunidade microbiológica aderida aos corpos de prova com 72 horas de exposição. a: controle (sem antibiótico no meio de cultivo); b: T6 - $0,63 \text{ g.L}^{-1}$ de Penicilina G potássica + $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina; c: T9 - $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de neomicina.

Quando avaliados todos os tempos de exposição, comparando a densidade de bactérias presentes no biofilme no controle e no tratamento (T9) é possível observar que esta combinação de antibióticos foi eficaz na diminuição da população de bactérias (Fig. 6). Em todos os tempos de exposição foi registrado um menor número de bactérias aderidas (org.cm^{-2}) no tratamento em relação ao controle, com diferença significativa ($p=0,000$). A maior inibição ocorreu com 12 horas, sendo registrados 93 % menos bactérias que o controle. Com 6 horas o efeito já havia iniciado, porém com 24 horas o efeito da combinação de antibióticos diminuiu para 70 %.

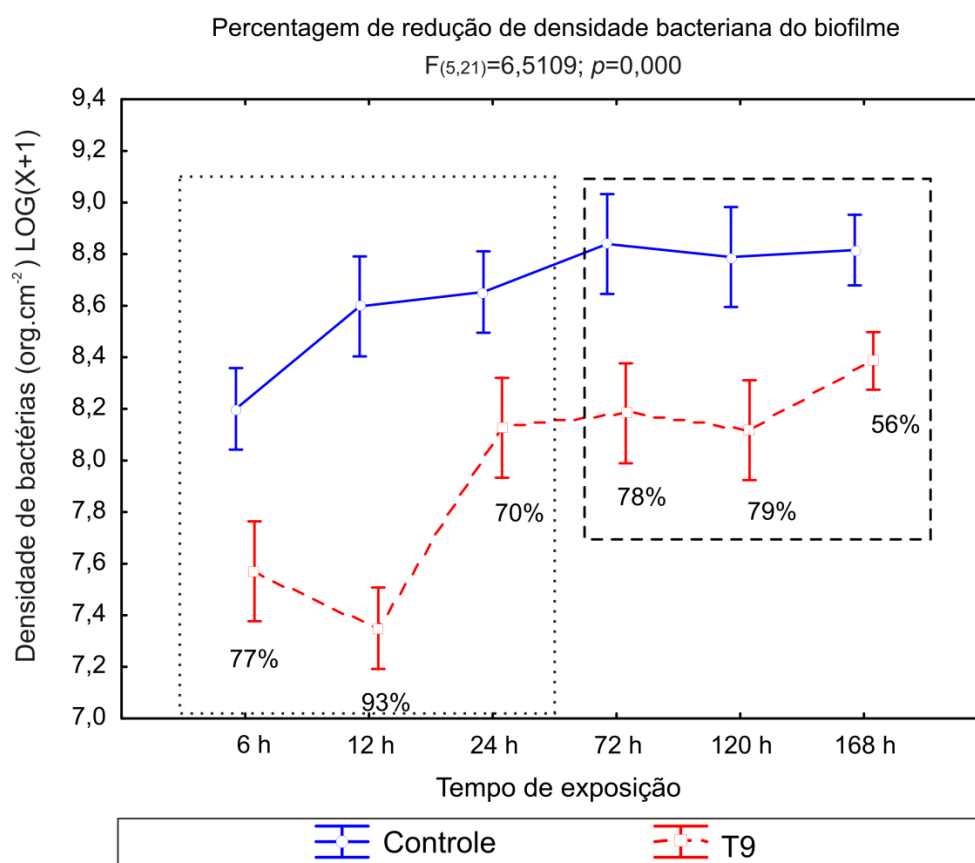


Figura 6. Comparação da densidade bacteriana (org.cm^{-2}) entre o controle e o tratamento T9 nos diferentes tempos de exposição. Linha pontilhada: maior eficácia dos antibióticos. Linha tracejada: interação entre bactérias e fungos. As barras representam os intervalos de confiança (95 %) de acordo com os desvios padrão.

5.4 Discussão

Em relação à sobrevivência de *Acartia tonsa*, os melhores resultados foram do T6 e do T9, sendo até mais eficientes que o controle.

Ambos os tratamentos possuem potencial de aplicação em meios de produção de zooplâncton marinho, podendo ser inserido somente no meio de produção, somente no alimento ou em ambos, sem causar efeitos negativos em organismos não alvo. Cabe ressaltar, que se a intenção da produção for melhorá-lo em relação a meios sem antimicrobianos, deve-se dar preferência pelo uso do T9, caso os antibióticos sejam inserido somente no alimento, o T6 também é uma alternativa.

As espécies de copépodes *Acartia tonsa* e *Temora turbinata* não apresentaram diferente sensibilidade ao T6, sendo este recomendado para uso em meios de produção, com aplicação somente no meio de produção, somente no alimento ou em ambos, o que sugere que *T. turbinata* pode ser utilizada como bioindicadora.

Já o tratamento T8 não é recomendado para aplicação no meio de produção e no meio de produção e no alimento de *Acartia tonsa*, pois estes copépodes são sensíveis a esta combinação de antibióticos, diferentemente das microalgas *Conticribra weisflogii* e *Isochrysis galbana*, as quais apresentaram um crescimento maior que o do controle com este tratamento, confirmando que estas espécies de microalgas são menos sensíveis que os copépodes testados.

Ambos os tratamentos apresentam penicilina e estreptomicina na sua composição, antibióticos largamente utilizados na produção de copépodes

(Marshall & Orr 1955, Conover 1962, Neunes & Pongolini 1965, Conover 1966, Conover 1967, Mullin & Brooks 1967, Shaw *et al.* 1994).

Borojevic (1966) utilizou com sucesso o T6 na produção de poríferos, a fim de analisar o seu desenvolvimento, já DeLorenzo (2001), agregou à combinação o antibiótico Neomicina, com o objetivo de avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana com ênfase no seu papel na alça microbiana (*microbial loop*).

Os antibióticos foram incluídos na aquicultura mundial como uma prática comum devido aos efeitos positivos sobre o ganho de peso e prevenção da mortalidade de espécies de interesse econômico (Gatlin 2002).

Estudos experimentais com zooplâncton têm beneficiado a produção de copépodes em pequena escala. Além disso, informações derivadas destes experimentos são importantes para uma variedade de áreas, pois cultivos/produções bem estabelecidos permitem o desenvolvimento de trabalhos com genética, comportamento alimentar, dinâmica populacional e de modelagem de taxas de produção (Drillet *et al.* 2011). Sendo assim, o estabelecimento de cultivos contínuos de zooplâncton possibilita estudos filogenéticos, fisiológicos e ecológicos.

Além disso, segundo Fitridge *et al.* (2012), o controle da incrustação na aquicultura é alcançado através da prevenção da colonização, da remoção física e da utilização de anti-incrustantes. No entanto, a contínua expansão da indústria da aquicultura e a legislação cada vez mais rigorosa requer o desenvolvimento de estratégias inovadoras que evitem a colonização de organismos indesejados em superfícies sem causar danos à fauna cultivada.

O T9 apresentou a maior inibição de bactérias aderidas em relação aos outros tratamentos. Não obstante, o uso de antibióticos resultou em um crescimento de fungos. Além disso, houve uma proporção de crescimento de fungos em relação à eficácia dos tratamentos na inibição de bactérias. Provasoli *et al.* (1951) observaram o predomínio de leveduras na ausência de bactérias, já Spencer (1952) observou que tanto a penicilina quanto a estreptomicina não foram eficazes no controle de Actinomicetos. Sendo a utilização de um fungicida necessária.

A utilização do T9 como inibidor de procariontes foi utilizada em outros estudos como Middelburg & Nieuwenhuize (2000a), Middelburg & Nieuwenhuize (2000b), Veuger *et al.* (2004), Cozzi & Cantoni (2006), todavia todos para experimentos científicos em que era necessária a máxima exclusão possível de bactérias do meio, sendo o atual estudo o primeiro a utilizar este tratamento com aplicação em cultivos de zooplâncton marinho.

Foi verificado que o T9 é eficaz na diminuição da densidade de bactérias aderidas em meio cultivo, como uma redução de até 93 % em relação ao controle, sendo o seu efeito iniciado nas primeiras 6 horas de exposição. Com 24 horas foi possível observar que o seu efeito diminui, sendo necessária uma nova aplicação no meio de cultivo para garantir uma manutenção desta inibição. Acreditamos que uma inibição de mais de 93 % das bactérias aderidas seja muito complexo de se obter no meio aquático artificial sem causar danos a organismos não alvo. Ainda, a ausência de um pré-tratamento na água do mar e a presença de matéria orgânica em excesso impedem a obtenção de um meio axênico.

Segundo Pappas & Hoffmann (1952), obter cultivos livres de bactérias é muito difícil, pois no meio estão presentes tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Além disso, Riquelme *et al.* (2001) evidenciaram que os antibióticos podem reduzir as bactérias presentes na água, mas eles não impedem a sua proliferação dentro dos organismos. Sendo assim, torna-se impossível adquirir tanques de produção de organismos totalmente livres de bactérias.

DeLorenzo *et al.* (2001) verificaram que a combinação de antibióticos penicilina + estreptomicina + neomicina mantiveram a densidade de bactérias significativamente menor que o do controle, em todas as épocas do ano testadas com 8, 16, 24, 48 e 72 horas de exposição. Observaram também que esta combinação de antibióticos praticamente não causou ação inibitória em ciliados, flagelados e fitoplâncton. Após a adição dos inibidores de procariontes a abundância bacteriana reduziu entre 40 e 79 % em relação ao controle com 8 horas de exposição e 67 e 71 % com 72 horas de exposição, sendo que no presente trabalho os valores foram de 77 e 78 % para seis e 72 horas respectivamente. Essa diferença pode estar relacionada às concentrações dos antibióticos estreptomicina e neomicina. No trabalho de DeLorenzo *et al.* (2001) a estreptomicina foi adicionada a uma concentração de $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ e a neomicina de $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ e no atual estudo estes valores foram invertidos, sugerindo ser mais eficiente. Ainda, os autores não informaram a meia vida dos antibióticos no meio nem se houve reposição dos mesmos no meio de cultivo.

5.5 Conclusão

A aplicação de $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de neomicina possui grande potencial de utilização tanto em experimentos científicos quanto no beneficiamento da produção de zooplâncton marinho para inibição de bactérias aderidas, entretanto, é necessário incluir um fungicida à combinação de antibióticos, pois os fungos ocupam o nicho disponibilizado pelas bactérias. O seu efeito inicia nas primeiras seis horas de exposição e reduz em até 93 % a densidade de bactérias aderidas, não obstante, a sua meia vida é curta, sendo necessária uma nova dosagem. Além disso, fazem-se necessários estudos adicionais sobre os efeitos em experimentos mais longos e qual o melhor tempo e concentração de reposição dos antibióticos no meio.

6. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados deste estudo sugerem claramente que os antibióticos podem ser utilizados para diminuir a quantidade de bactérias em meios de produção de zooplâncton marinho, não somente para beneficiá-los, mas também para uso em experimentos científicos em que seja necessária a diminuição considerável da densidade bacteriana. No entanto, testes de tolerância devem ser realizados previamente para evitar danos à espécie de interesse, ou seja, à espécie não alvo. Outro ponto importante, quando se trabalha com antimicrobianos, são os cuidados que se deve ter no armazenamento e no processamento após a sua utilização.

Dos nove tratamentos com antimicrobianos testados, apenas cinco tiveram resultados positivos em relação aos organismos testados, sendo estes equivalentes ou superiores ao controle (sem antibióticos): T1) 0,1 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Pringault *et al.* 2009); T4) 0,05 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina (Yetka & Wieb 1974); T6) 0,63 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,25 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Borojevic 1966); T7) 0,2 g.L⁻¹ de sulfato de vancomicina + 0,001 g.L⁻¹ de penicilina G potássica (Sheer *et al.* 1986); T9) 0,25 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,08 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,04 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina.

O tratamento T8) 0,32 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,83 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina (Spencer 1952) teve bons resultados somente no cultivo das microalgas testadas, com um crescimento populacional maior que o controle, mas com uma sobrevivência de copépodes inferior. Verificou-se que o

T8 foi prejudicial quando aplicado no meio de produção e no meio de produção e alimento do copépode *Acartia tonsa*, sugerindo uma maior tolerância do fitoplâncton em relação ao zooplâncton a esta combinação de antibióticos. Já o tratamento T3 ($100 \mu\text{L.L}^{-1}$ da solução (0,3 g de penicilina G potássica G + 0,5 g de sulfato de estreptomicina, dissolvidos em 2 mL de água destilada (Tighe-Ford 1970)) apresentou bons resultados para *C. weissflogii* e para *T. turbinada*, mas para *I. galbana* foi inferior ao controle, entretanto sem diferença significativa.

Tratamentos que continham o antibiótico Cloranfenicol causaram mortalidade nos organismos não alvo, não sendo sugerido a utilização desta substância em cultivos/produção de fitoplâncton e de zooplâncton marinhos.

Quando levado em conta o local de aplicação dos tratamentos, foi observado que os melhores resultados de sobrevivência estavam relacionados antibióticos inseridos somente no meio de produção ou somente no alimento. A situação de aplicação dos antibióticos no meio de produção e no alimento, não foi satisfatória, provavelmente pela intensificação da concentração dos tratamentos. Somente os tratamentos T1, T6 e T9 possuem o potencial de utilização em ambos. Como esperado, foi observado que os resultados de sobrevivência e produção de ovos foram estritamente relacionados, sendo assim, constatou-se serem mais relevantes, neste contexto, experimentos que avaliem a sobrevivência de organismos em relação à sua produtividade.

Cabe ainda ressaltar, que não somente o copépode Calanoida *Acartia tonsa*, mas também a espécie *Temora turbinata* podem ser utilizados como bioindicadores, uma vez que ambas apresentaram resultados equivalentes de sobrevivência nos mesmos tratamentos. A Tabela II apresenta os resultados

obtidos com cada tratamento ao final de cada experimento, indicando a sua utilização em relação à espécie cultivada: *Temora turbinata*, *Acartia tonsa*, *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana*.

Dentre os tratamentos avaliados quanto ao seu potencial na inibição de micro-organismos aderidos, verificou-se que $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de neomicina é o mais eficiente na diminuição da densidade de bactérias, com uma redução de até 93 % em relação ao controle.

Verificou-se também que o início do efeito ocorre nas primeiras seis horas de exposição e que, dentre os tempos de exposição avaliados, a maior diminuição de densidade bacteriana ocorreu com 12 horas, sendo que com 24 horas foi observada a perda de efeito parcial. Desta forma, são necessários mais estudos referentes à sua meia vida no ambiente aquático artificial. Observou-se a presença de fungos nos cultivos com 72 horas de exposição e acreditamos que a adição de um fungicida de amplo espectro neste tratamento seja imprescindível para se avaliar o início do seu efeito, a sua meia vida e os resultados da ausência de competição com fungos no ambiente aquático. Nestas condições, este tratamento parece ser uma solução para meios de cultivo/produção em que é preciso diminuir a densidade bacteriana aderida.

Tabela II. Resultados obtidos nos tratamentos ao final de cada experimento, indicando a sua utilização em relação à espécie cultivada/produzida: *Temora turbinata*, *Acartia tonsa*, *Conticribra weissflogii* e *Isochrysis galbana*. Legenda dos antibióticos - P: penicilina G potássica; E: sulfato de estreptomicina; N: sulfato de neomicina; C: cloranfenicol; V: sulfato de vancomicina; T: tetraciclina. Legenda de aplicação - R: recomendado; R*: recomendado (melhor tratamento); NR: não recomendado; NR#: não recomendado (sem diferença significativa em relação ao controle). Legenda do local de aplicação – M: somente no meio de produção; A: somente no alimento; M/A: no meio de produção e no alimento.

Legenda	Capítulo da Dissertação	I	II	II	III
	Organismo Cultivado	<i>T. turbinata</i>	<i>C. weissflogii</i>	<i>I. galbana</i>	<i>A. tonsa</i>
	Tratamentos	Sobrevivência/Crescimento			
T1	0,1 g.L ⁻¹ de P + 0,1 g.L ⁻¹ de E	R (M, A, M/A)*	R	R	
T2	0,32 g.L ⁻¹ de P + 0,005 g.L ⁻¹ de C + 0,025 g.L ⁻¹	NR			
T3	100 µL.L ⁻¹ da solução (0,3 g de P + 0,5 g de E)	R (A)	R	NR#	
T4	0,05 g.L ⁻¹ de N	R (M, A, M/A)*	R	R	
T5	0,5 g.L ⁻¹ de P + 0,5 g.L ⁻¹ de E + 0,1 g.L ⁻¹ de C	NR	NR	NR	
T6	0,63 g.L ⁻¹ de P + 0,25 g.L ⁻¹ de E	R (M, A, M/A)	R*	R	R (M, A, M/A)
T7	0,2 g.L ⁻¹ de V + 0,001 g.L ⁻¹ de P	R (M, A)	R	R*	
T8	0,32 g.L ⁻¹ de P + 0,83 g.L ⁻¹ de E		R	R	R (A)
T9	0,025 g.L ⁻¹ de P + 0,08 g.L ⁻¹ de E + 0,04 g.L ⁻¹ de N				R (M, A, M/A)*

7. PERSPECTIVAS

Por meio das conclusões obtidas acerca da utilização de antimicrobianos na produção de zooplâncton marinho, seja para beneficiá-los ou para testar hipóteses em que é necessária a inibição de bactérias em meio aquático artificial, foram estabelecidas perspectivas a serem executadas.

Verificou-se que a combinação de antibióticos selecionada: $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de neomicina apresentou relevante diminuição de bactérias aderidas em meios artificiais marinhos, não obstante uma alta densidade de fungos se estabeleceu no nicho disponível.

Por este motivo, a inclusão de uma substância antifúngica deve ser realizada. Porém, nestas circunstâncias novos testes de efeito na comunidade devem ser realizados, verificando o seu efeito em vários níveis da cadeia trófica marinha, não somente em bactérias aderidas, microalgas e copépodes, como também em bactérias livres, fungos, principalmente protozoários, os quais são um importante complemento da dieta de várias espécies zooplanctônicas, e em diferentes invertebrados planctônicos. Alguns testes-piloto de tolerância, utilizando fungicidas em combinação com o T9, já foram realizadas, sendo obtidos resultados relevantes, incentivando a continuidade dos estudos sobre este tema.

Almeja-se também realizar testes de toxicidade aguda e crônica ao tratamento escolhido, em parceria com o laboratório de ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande; a avaliação do efeito do tratamento em

diferentes salinidades; a verificação do tempo e da concentração dos antimicrobianos para reposição nos cultivos, mantendo assim a máxima redução da densidade de micro-organismos pelo tempo que for necessário e, por fim; a realização de um experimento científico com o objetivo de testar a hipótese de que há uma relação de dependência entre o assentamento larval e a presença de biofilme microbiano no substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEARN, DG, SP MEYERS & RA NICHOLS. 1968. Extracellular proteases of yeasts and yeast-like fungi. *Appl. Microbiol.*, 16: 1370–1374.
- ALANIS, AJ. 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.*, 36: 697–705.
- ALEXANDRE, FA, JAF FARIA & CF CARDOSO. 2008. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. *Ciênc. agrotec., Lavras*, 32(5): 1524-1530.
- ALI ABADI, FS & P LEES. 2000. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14: 307-313.
- ANTIA, NJ & J KALMAKOFF. 1965. Growth rates and cell yields from axenic mass culture of fourteen species of marine phytoplankters. *Fish. Res. Bd. Canada MS Rept. Series (Oceanog. Limnol.)*, 203: 24.
- AVNIMELECH, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture*, 264: 140-147.
- BENBROOCK, CM. 2002. Antibiotic drug use in U.S. aquaculture: information available. Disponível em: <http://www.latp.org>. Acesso em: 10/02/2013.
- BERGLUND, H. 1969. On the cultivation of multicellular marine green algae in axenic culture. *Sv. Bot Tidskr.*, 63: 251-264.
- BOROJEVIC, R. 1966. Étude expérimentale de la differenciation des cellules de l'éponge au cours de son développement. *Devl. Biol.*, 14: 130-153.

- BRADFORD, JM. 1977. Distribution of the pelagic copepod *Temara turbinata* in New Zealand coastal waters, and possible Trans-Tasman population continuity. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 11(1):131-144.
- BRADFORD-GRIEVE, JM, EL MARKHASANA, CEF ROCHA & B ABIAHY. 1999. Copepoda. In: BOLTOVSKOY, D. (Ed.). South Atlantic Zooplankton. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 2: 869-1098.
- BRADLEY, PM, DP CHENEY & N SAGA. 1988. One step antibiotic disk method for obtaining axenic cultures of multicellular marine algae. *Plant Cell Tiss. Org.*, 12: 55-60.
- BRENDOLAN, RA. 2004. Utilização do microcrustáceo *Kalliapseudes schubartii* em testes de ecotoxicologia. Dissertação de Mestrado (Biologia Marinha). Universidade Federal Fluminense, Brasil, 107 p.
- BRUUN, MS, L MADSEN & I DALSGAARD. 2003. Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different *in vitro* antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, 215: 11-20.
- BUTAYE, P, A CLOECKAERT & S SCHWARZ. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22: 205-210.
- CANAAN, JMM, KC PESTANA & MI SILVA. 2010. Avaliação do processo de esterilização por autoclavagem utilizando indicadores biológico e químico. Programa geral de saúde e segurança do trabalhador. Trabalho de Conclusão. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil, 25 p.

- CAMPA-CÓRDOVA, AI, A LUNA-GONZÁLEZ, F ASCENCIO, E CORTÉS-JACINTO & CJ CÁCERES-MARTÍNEZ. 2006. Effects of Chloramphenicol, Erythromycin, and Furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture*, 260:145–150.
- CARDOZO, AP. 2004. Influência de diferentes salinidades na reprodução e crescimento de *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). Monografia de Conclusão. Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 27 p.
- CARNEIRO, DO, HCP FIGUEIREDO, DJ PEREIRA JR, CAG LEAL & PVR LOGATO. 2007. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59(4): 869-876.
- CHECKLEY, DM. 1980. The egg production of a marine planktonic copepod in relation to its food supply: laboratory studies. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 430–446.
- CHEN, H & JG JIANG. 2011. Toxic effects of chemical pesticides (trichlorfon and dimehypo) on *Dunaliella salina*. *Chemosphere*, 84: 664–670.
- CONOVER, RJ. 1962. Metabolism and growth in *Calanus hyperboreus* in relation to its life-cycle. *Rapp. Cons. Int. Explor. Mer. V. 153*: 190-197.
- CONOVER, RJ. 1966. Feeding on large particles by *Calanus hyperboreus* (Kröyer). In: BARNES, H (Ed.). Some contemporary studies in marine science: 187-194.
- CONOVER, RJ. 1967. Reproductive cycle, early development, and fecundity in laboratory populations of the copepod *Calanus hyperboreus*. *Crustaceana*, 13: 61-72.

- COSTA, RA, G HITZSCHKY, F VIEIRA, GC SILVA, RHSF VIEIRA & SS SAMPAIO. 2008. Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp. isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará – Nota prévia. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, 45(6): 458-462.
- COSTIOW, DP & CG BOOKHOUT. 1957. Larval development of *Balanus eburneus* in the laboratory. *Biol. Bull.*, 112(3): 13-324.
- COUCH, JN. 1939. Technic for collection, isolation and culture of Chytrids. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 55: 208-214.
- COZZI, S & C CANTONI. 2006. Partition nitrogen uptake in phytoplankton and bacteria using bactericidal agents and light dependent incubations. *Period. Biol.*, 108: 145-150.
- CUNHA, DR. 2008. Estudo comparativo dos copépodes *Temora stylifera* e *Temora turbinata* na plataforma continental sudeste do Brasil no verão e inverno de 2002. Dissertação de Mestrado (Oceanografia Biológica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 155 p.
- DALTON, HM & PE MARCH. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 252-255.
- DAVIS, HC & PE CHANIEY. 1956. Effects of some dissolved substances on bivalve larvae. *Proc. Nat. Shellfish. Assoc.*, 46: 59-74.
- DEFOIRDT, T, N BOON, P SORGELOOS, W VERSTRAETE & P BOSSIER. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.*, 25: 472-479.

- DeLORENZO, ME, AJ LEWITUS, GI SCOTT & PE ROSS, 2001. Use of metabolic inhibitors to characterize ecological interactions in an estuarine microbial food web. *Microb. Ecol.*, 42: 317-327.
- DÍAZ, XFG, B BARKOKEBAS, RPS CAMPELO, ML KOENING, R SCHWAMBORN, S NEUMANN-LEITÃO. 2012. An evaluation of different microalgal diets for the culture of the Calanoid copepod *Temora turbinata* (Dana, 1849) in the laboratory. *Tropical Oceanography*, 40(1): 133-142.
- DELUPIS, GDDi, A MACRI, C CIVITAREALE & L MIGLIORE. 1992. Antibiotics of zootechnical use: Effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 22: 53-60.
- DIVAN, CL & HK SCHNOES. 1982. Production of axenic *Gonyaulax* cultures by treatment with antibiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 250-254.
- DIXON, BA. 2000. Antibiotics. In: STICKNEY, RR (Ed.). Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley & Sons, Inc., USA, 1063 p.
- DONOVICK, R, FE PANSY, HA STOUT, H STANDER, MJ WEINSTEIN, W GOLD & 1955. Some in vitro characteristics of nystatin (Mycostatin). In: STERNBERG, TH & VD NEWCOMER (Ed.), herapy of fungus diseases: An international symposium. Little, Brown and Co, USA, 176-185.
- DRILLET, G, S FROUËL, MH SICHLAU, PM JEPSEN, JK HØJGAARD, AK JOARDER & BW HANSEN. 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315: 155–166.
- DROOP, MR. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br. Phycol. Bull.* 3: 295-297.

- EBRINGER, L, A JURASEK, J KONICEK, M KONICKOVA, N LAHITOVA & S TRUBACIK. 1976. Mutagenic Action of Nitrofurans on *Euglena gracilis* and *Mycobacterium phlei*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 9(4): 682-689.
- EPPS, W, M WEINER & E BUEDING. 1950. Production of steam volatile acids by bacteriafree *Ascaris lumbricoides*. *Jour. Inf. Dis.*, 87: 149-151.
- FALCIATORE, A & C BOWLER. 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 109–130.
- FELL, JW, DG AHEARN, SP MEYERS & FJJr ROTH. 1960. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Fla. And adjacent benthic areas. *Limnol. Oceanogr.*, 5: 336-371.
- FISH, GR. 1950. A method of obtaining bacteria-free cultures of a marine flagellate and *Enteromorpha intestinalis* using penicillin. *Acta Horti gothoburg*, 18:82-89.
- FISHER, WS & RT NELSON. 1978. Application of Antibiotics in the Cultivation of Dungeness Crab, *Cancer magister*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 1343-1349.
- FITRIDGE, I, T DEMPSTER, J GUENTHER & Rde NYS. 2012. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28:7, 649-669.
- FITT, WK, GA HESLINGAB & TC WATSONB. 1992. Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. Tridactinidae). *Aquaculture*, 104: 1-10.
- FLAHERTY, CM & SI DODSON. 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61:200-207.
- FLEMINGER, A. 1975. Geographic distribution and morphological divergence in American coastal-zone planktonic copepods of the genus *Labidocera*. In:

- CRONIN, LE (Ed.). Estuarine research, Chemistry, Biology, e the Estuarine system. Academic Press, New York. 1:392-419.
- FOUILLAND, E, M GOSSELIN, RB RIVKIN, C VASSEUR & B MOSTAJIR. 2007. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *J. Plankton Res.*, 29(4): 369- 376.
- FRIES, L 1963. On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plant.* 16: 695-708.
- FULLER, MS. 1964. A new technique for the isolation of aquatic fungi. *Bioscience*, 14(9): 45-46.
- GALLOWAY, RA & RW KRAUSS. 1959. The differential action of chemical agents, especially polymyxin-B, on certain algae, bacteria and fungi. *Am. J. Bot.*, 46: 40-49.
- GARRIDO, MJ, RJ HAROUN & HA LESSIOS. 2000. Annual reproductive periodicity of the sea urchin *Diadema antillarum* Phillipi in Jamaica. *Bull. Mar. Sci.* 36: 377-384.
- GATESOUBE, FJ. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatment of rotifers as food for turbot larvae *Scophthalmus maximus*. In: PAUW, N. (Ed.), Aquaculture - a Biotechnology in progress. European Aquaculture Society Bredene, Bélgica, 721-730.
- GATLIN, DM. 2002. Nutrient and fish health. In: HALVER, JE & RW HARDY (Eds.). Fish Nutrient. 671-702. San Diego, CA: Academic Expresss.
- GHOSH, A & JJ GHOSH. 1963. Effect of nystatin and amphotericin B on the growth of *Candida albicans*. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, 23: 2-44.
- GOLD, K. 1968. Some factors affecting the stability of thiamine. *Limnol. Oceanogr.*, 13: 185-188.

- GOLD, K. 1969. Tintinnida: feeding experimantes and lorica development. *J. Protozool.*, 16: 507-509.
- GOODWIN, CM. 1950. The effect of penicillin and dihydrostreptomycin on Protozoa with special reference to the problems of bacteria-free culture and speciation in *Euglena*. *Proc. Amer. Soc. Protozool.*, 1:6.
- GREEN, B, V HEILPORN, S LIMBOSCH, M BOLONKHERE & I BRACHET. 1967. The cytoplasmic DNAs of *Acetabularia mediterranea*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 1351-1358.
- GUILLARD, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (Eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, USA, 26-60.
- GUILLARD, RRL. 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull.* 117: 258-266.
- GUILLARD, RRL & JH RYTHER. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* HUSTEDT, and *Detonula confervacea* (CLEVE) GRAN. *Can. J. Microbial.*, 8: 229-239.
- GUO, RX & JQ CHEN. 2012. Phytoplankton toxicity of the antibiotic chlortetracycline and its UV light degradation products. *Chemosphere*, 87: 1254–1259
- HAGENBUCH, IM & JL PINCKNEY. 2012. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Res.*, 46:5028-5036.

- HAMDAN, L & R JONAS. 2007. The use of antibiotics to reduce bacterioplankton uptake of phytoplankton extracellular organic carbon (EOC) in the Potomac River estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 342: 242-252.
- HANDLINGER, J, J HARRIS, J CARSON & D TAYLOR. 2006. Potential for antibiotic use in abalone. FRDC Final Report I. ABALONE AQUACULTURE SUBPROGRAM: THE POTENTIAL FOR ANTIBIOTIC USE IN ABALONE FOR DISEASE CONTROL. Fisheries Research and Development Corporation. Tasmania Aquaculture & Fisheries Institute. University of Tasmania. 75 p.
- HARMS, J. 1987. Energy budget for the larval development of *Elminius modestus* (Crustacea: Cirripedia). *Helgoland. Meess.*, 41: 45-67.
- HIRST, AG & AD McKINNOON. 2001. Does egg production represent adult female copepod growth? A call to account for body weight changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 223: 179-199.
- HOPCROFT, RR & JC ROFF. 1998. Zooplankton growth rates: the influence of female size and resources on egg production of tropical marine copepodites. *Mar. Biol.*, 132: 79-86.
- HOPPE, H-G 1972. Untersuchungen zur Ökologie der Hefen im Bereich der westlichen Ostree. *Kieler Meeresforsch.*, 28:54-77.
- IRIGOIEN, X, RP HARRIS, RN HEAD & D HARBOUR. 2000. The influence of diatom abundance on the egg production rate of *Calanus helgolandicus* in the English. *Limnol Oceanogr.*, 45(6):1433-1439.

- ISIDORI, M, M LAVORGNA, A NARDELLI, L PASCARELLA & A PARRELLA. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.*, 346: 87–98.
- ISO – International Organization for Standardization, 1999, *ISO 14669:1999*, Water Quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Geneva.
- ITHACA, NY & AH MAHMOUD. 1944. Isolation of *Trichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) in bacteria-free cultures by the use of penicillin. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 38: 219-222.
- JONES, PR, MT COTTRELL, DL KIRCHMAN & SC DEXTER. 2007. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb. Ecol.*, 53: 153-162.
- KAMINSKI, SM. 2004. Influência da alimentação sobre a reprodução e o desenvolvimento do copépode Calanoida *Acartia tonsa* Dana 1849, em cultivo intensivo. Dissertação de Mestrado (Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 30 p.
- KAMINSKI, SM & MA MONTÚ. 2005. Produção de ovos dos copépodes costeiros *Acartia tonsa*, *Temora stylifera* e *Temora turbinata*, da Praia do Cassino – Rio Grande – RS. *Atlântica*, 27(2): 103-111.
- KARLSSON, J, M BREITHOLTZ & B EKLUND. 2006. A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Mar. Pollut. Bull.*, 52: 1661–1667.
- KARUNASAGAR, I, R PAI, GR MALATHI & I KARUNASAGAR. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203-209.

- KECK, K. 1964. Culturing and experimental manipulation of *Acetabularia*. In: PRESCOTT, D (Ed.), *Methods in Cell Physiology*, Academic Press, USA,. 1: 189-213.
- KIM, S & DS AGA. 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Env. Health, Part B*, 10: 59-573.
- KINNE, O. 1977. Research cultivation. In: KINNE, O. (Ed.). *Marine ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal Waters*. John Wiley & Sons, Ltd., Germany, 579-1293.
- KINSKY, SC. 1961. Alterations in the permeability of *Neurospora crassa* due to polyene antibiotics. *J. Bacteriol.*, 82: 889-897.
- KRUMMENAUER, D, CA SEIFERT JR, LH POERSCH, GK FOES, GRDe LARA & W WASIELESKY JR. 2007. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: análise da reutilização da água. *Atlântica*, 34(2): 103-111.
- KUMAR, HD. 1964. Streptomycin and penicillin induced inhibition of growth and pigment production in blue-green algae and production of strains of *Anacystis nidulans* resistant to these antibiotics. *J. exp. Bot.*, 15: 232-250.
- LAI, HT, HH HOU, CI SU & CL CHEN. 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 329–334.
- LAMPEN, JO & P ARNOW. 1961. Inhibition of algae by nystatin. *Bacteriol.* 82: 247-251.

- LEE, JJ, LJ CROCKETT, J HAGEN & R STONE. 1974. The taxonomic identity and physiological ecology of *Chlamydomonas hedleeyi* sp.nov. algal flagellate symbiont from the foraminifer *Archaias angulatus*. *Brit. Phycol. J.*, 9: 407-422.
- LEE, JJ, JH TIETJEN, RJ STONE, WA MULLER, J RULLMAN & M MCENERY. 1970. The cultivation and physiological ecology of members of salt marsh epiphytic communities" *Helgoland. Wiss. Meer.*, 20: 136-156.
- LEE, YK, K-K KWON, KH CHO, HW KIM, JH PARK & HK LEE. 2003. Culture and Identification of Bacteria from Marine Biofilms. *J. Microbiol.*, 41(3):183-188.
- LEE, YK, J-H NAM, YH KIM, K-H LEE & DH LEE. 2008. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J. Microbiol.*, 46(2): 174-182.
- LIPTON, AP, SK SUBHASH, R PAUL RAJ & A ANITHA RANI. 2003. First Indian Pearl Congress and Exposition. 52– 54.
- LIU, B, X NIE, W LIU, P SNOEIJIS, C GUAN & MTK TSUI. 2011. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotox. Environ. Safe*, 74: 1027-1035.
- LLOYD, D. 1974. Dark respiration. *In*: STEWART, WDP (Ed.). *Algal physiology and biochemistry*. Oxford, Blackwell, 505-529.
- LOOSANOFF, VL & HC DAVIS. 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Adv. Mar. Biol.*, 1: 1-136.

- MARSHALL, SM & AP ORR. 1955. *Calanus finmarchicus* food uptake, assimilation, and excretion in adult copepods. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 34: 495-529
- MARX, FG & MD UHEN. 2010. Climate, critters, and cetaceans: cenozoic drivers of the evolution of modern whales. *Science*, 327: 993–996.
- MAUCHLINE J. 1998. The Biology of Calanoid Copepods: Advances in Marine Biology. London, Academic Press, 710 p.
- MCCRACKEN, IR. 1989. Purifying algal cultures a review of chemical methods. *Proc. N.s. inst. Sci.*, 38: 145-168.
- MEINERZ, LI. 2007. Influência da temperature, salinidade e nutrients dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira. Dissertação de Mestrado (Aquicultura). Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 76 p.
- MEYERS, SP, DG AHEARN, W GUNKEL & FJ ROTH. 1967. Yeasts from the North Sea. *Marilm. Biol.* 1: 118-123.
- MIDDELBURG, JJ & J NIEUWENHUIZE. 2000a. Uptake of dissolved nitrogen in turbid, tidal estuaries. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 192: 79-88.
- MIDDELBURG, JJ & J NIEUWENHUIZE. 2000b. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate-rich Thames estuary. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 203: 13-21.
- MILLNER, PA, ME CALLOW & LV EVANS. 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Planta*, 147: 174-177.
- MORGAN, BB. 1946. The use of antibodies in the purification of *Trichomonas foetus* (protozoa) cultures. *Anat. Rec.*, 94: 437.

- MULLER, WA & JJ LEE. 1969. Apparent indispensability of bacteria in foraminiferan nutrition. *J. Protozool.*, 16: 471-478.
- MULLIN, MM & ER BROOKS. 1967. Laboratory Culture, Growth Rate, and Feeding Behavior of a Planktonic Marine Copepod. *Limnol. Oceanogr.*, 12(4): 657-666.
- NEUNES, HW & GF PONGOLINI. 1965. Breeding a pelagic copepod, *Euterpina acutifrons* (Dana) in the laboratory. *Nature*, 208: 571-573.
- OLAFSEN, JA. 1993. The microbial ecology of fish aquaculture. In: HEEN, K, RL MONAHAN & F UTTER (Eds.). *Salmon Aquaculture*. Fishing News Books, Inglaterra, 166–175.
- OLIVEIRA, SS, W WASIELESKY JR., ELC BALLESTER & PC ABREU. 2006. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método "Fluorescent in situ Hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, 28(1): 33-45.
- OPPENHEIMER, CH. 1955. The effect of marine bacteria on the development and hatching of pelagic fish eggs and the control of such bacteria by antibiotics. *Copeia*, 1: 42-49.
- ORVOS, DR, DJ VERSTEEG, J INAUEN, M CAPDEVIELLE, A ROTHENSTEIN & V CUNNINGHAM. 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21:1338–1349.
- PALINCASAR, EE. 1959. Nutricional effects of nucleic acid components on cultures of the suctorian *Podophrya collini*. *J. Protozool.*, 6: 195-201.
- PAPPAS, GD & H HOFFMAN. 1952. The use of antibiotics for obtaining bacteria-free cultures of euglena. *Ohio J. Sci.* 52: 102-105.

- PAUW, N De, J MORALES & G PERSOONE. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. *Hydrobiologia*, 116-117.
- PEREIRA Jr., DJ, HCP FIGUEIREDO, DO CARNEIRO & CAG LEAL. 2006. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciênc. Agrotec. Lavras.*, 30(6): 1190-1195.
- PILLAI, PP. 1975. Post-naupliar development of the Calanoid Copepod *Temora turbinata* (Dana), with remarks on the distribution of the species of the genus *Temora* in the Indian Ocean. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 17(1): 87-95.
- PRINGAULT, O, S TESSON & E ROCHELLE-NEWALL. 2009. Respiration in the light and bacterio-phytoplankton coupling in a coastal environment. *Microbial Ecol.*, 57(2): 321-334.
- PROVASOLI, L & K GOLD. 1962. Nutrition of the American Strain of *Gyrodinium cohnii*. *Archiv. Ffir. Mikrobiologie*, 42:196-203.
- PROVASOLI, L & JJA McLAUGHLIN. 1963. Limited heterotrophy of some photosynthetic dinoflagellates. In: Symposium on Marine Microbiology. OPPENHEIMER, CH (Ed.), 105-113.
- PROVASOLI, L, I PINTNER & L PACKER. 1951 . Use of antibiotics in obtaining pure cultures of algae and protozoa. *Proc. Am. Soc. Protozool.* 2: 6.
- PROVASOLI, L, SH HUNTER & A SCHATZ. 1948. Streptomycin induced chlorophyll-less races of *Euglena*. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 69: 279-282.

- RAY, C. 1966. Discussion remarks to 'Round Table: practical problems'. In: Whales, Dolphins, and Porpoises. NORRIS, KS (Ed.). University of California Press, EUA, 650 p.
- RESGALLA Jr., C & KS LAITANO. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas téc. Facimar*, 6:153-163.
- REGO, M, E SILVA, N CALAZANS, J VOGEELEY, R NERY, R SOARES & S PEIXOTO. 2012. Utilização de probiótico e antibiótico no cultivo de pós-larvas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. *Atlântica*, 34(2): 1237-143.
- REINFELDER, JR, RE JABLONKA & M CHENEY. 2000. Metabolic responses to subacute toxicity of trace metals in a Marine microalga (*Thalassiosira weissflogii*) Measured by calorimetry. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(2): 448–453.
- RIQUELME, CE & R AVENDAÑO-HERRERA. 2003. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 76: 725–736.
- ROCHA, AFDa, PC ABREU, W WASIELESKY JR & MB TESSER. 2012. Avaliação da formação de bioflocos na criação de juvenis de tainha *Mugil cf. hospes* sem renovação de água. *Atlântica*, 34(1) 63-74.
- SABATINI, ME. 1990. The developmental stages (Copepodids I to VI) of *Acartia tonsa* Dana, 1849 (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana.*, 59(1): 53-61.
- SAGA, N & Y SAKAI. 1982. A new method for pure culture of macroscopic algae, the one step selection method. *J. Phycol.*, 30: 40-43.

- SARMAH, AK, MT MEYER & AB BOXALL. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65:725–759.
- SCHIPP, GR, JMP BOSMANS & AJ MARSHALL. 1999. A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174: 81-88.
- SEAMAN, GR. 1947. Penicillin as an agent for sterilization of protozoan cultures. *Science*, 106: 327
- SESHADRI, R & JMcN SIEBURTH. 1971. Cultural estimation of yeasts on seaweeds. *Appl. Microbial.*, 22: 507-512.
- SHAW, BA, RJ HARRISON & RJ ANDERSEN. 1994. Evaluation of the copepod *Tigriopus californicus* as a bioassay organism for the detection of chemical feeding deterrents produced by marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 121: 89–95.
- SHEATH, RG. 1975. Formation of floridean starch: effects of various antibiotics. *J. Phycol.* 11: 11.
- SHEPHARD, DC. 1970. Axenic culture of *Acetabularia* in a synthetic medium. In: PRESCOTT, DM (Ed.), *Methods in Cell Physiology*. Academic Press, EUA. 4: 49-69.
- SHERR, B, E SHERR, T ANDREW, R FALLON & S NEWELL. 1986. Trophic interactions between heterotrophic Protozoa and bacterioplankton in estuarine water analyzed with selective metabolic inhibitors. *Mar Ecol-Prog Ser.*, 32:169-179.

- SILVA, EFB, CN FRÓES, DM SOUZA, R SOARES, S PEIXOTO, W WASIELESKY & ELC BALLESTER. 2012. Uso de probióticos na produção de pós-larvas de camarão-rosa. *Pesq. agropec. bras.*, 47(6): 869-874.
- SINDERMANN, CJ. 1986. The role of pathology in aquaculture. In: BILIO, M, H ROSENTHAL & CJ SINDERMANN (Eds.), *Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives*. European Aquaculture Society. Editora Venezia, Bélgica, 585 p.
- SOLI, G. 1964. A system for isolating phytoplankton organisms in unialgal and bade riafree culture. *Limnol. Oceanogr.*, 9: 261-268.
- SOTOMAYOR, MA & JL BALCÁZAR. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Revista Aquatic.*, 19: 9-15.
- SPECK, RS, E JARWETZ & IB GUNNISON. 1951. Studies on antibiotic synergism and antagonism. *Arch. Intern. Med.*, 88: 166-174.
- SPENCER, CP. 1952. On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 31: 97-106.
- STØTTRUP, JG, JG BELL & JR SARGENT. 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture*, 176: 257-269.
- STØTTRUP, JG. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquac. Res.*, 3: 703–711.
- STØTTRUP, JG & J JENSEN. 1990. Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid *Acartia tonsa* Dana. *J. Exp. Mar. Ecol.*, 147: 87-105.

- STØTTRUP, JG, K RICHARDSON, E KIRKEGAARD & NJ PIHL. 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, 52: 87-96.
- STRUHSAKER, JW, DY HASHIMOTO, SM GIRARD, FT PRIOR & TD COONEY. 1973. Effect of antibiotics on survival of carangid fish larvae (*Caranx mate*), reared in the laboratory. *Aquaculture*, 2: 53-58.
- STRUHSAKER JM, MB ELDRIDGE & T ECHEVERRIA. 1974. Effects of benzene (a water-soluble component of crude oil) on eggs and larvae of Pacific herring and north-ern anchovy. In: VERNBERG, FJ & WB VERNBERG (Ed.). Pollution and physiology of marine organisms. Academic press Inc., EUA, 253-284.
- STRUHSAKER JW, WJ BALDWIN & GI MURPHY. 1975. UN1HI-SEAGRANT-TR-75-02. 124 p.
- SUBHASH, SK, AP LIPTON & R PAUL RAJ. 2004. Antibiotic exposure to minimize microbial load in live feed *Isochrysis galbana* used for larval rearing of Indian pearl oyster *Pinctada fucata*. *Curr. Sci. India*, 87(10): 25.
- SUEHIRO, S & Y TOMIYASU. 1962. Studies on marine yeasts. V. Yeasts isolated from seaweeds. *J. Fac. Agric. Kyushu U.*, 12: 163-169.
- SUEHIRO S, Y TOMIYASU. 1964. Studies on the marine yeasts. VII : On the utilization of plankton and seaweeds by yeasts. *J. Fac. Agr. Kyushu U.*, 13(1): 227-235.
- TAKEUCHI, I, S TAKAHASHI, S TANABE & N MIYAZAKI. 2004. Butyltin concentrations along the Japanese coast from 1997 to 1999 monitored by *Caprella* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Environ. Res.*, 57: 397-414.

- TANG, RJ & JJ COONEY. 1998. Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 20: 275–280.
- TEIXEIRA, PF, MK SONIA, TR AVILA, AP CARDOZO, JGF BERSANO, & A BIANCHINI. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *An. Acad. Bras. Cienc.*, 82(2): 333-339.
- TIGHE-FORD, DJ, MJD POWER & DC VAILE. 1970. Laboratory rearing of barnacle larvae for antifouling research. *Helgoland Wiss. Meer.*, 20: 393-405.
- TIPPER, DJ & A WRIGHT. 1979. The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. In: SOKATCH, R & LN ORNSTON (Eds.), *The bacteria: Mechanisms of adaptation*. Academic Press, New York. 7: 291-426.
- TORKILDSEN, L & T MAGNESEN. 2004. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) survival in different rearing systems. *Aquacult. Int.*, 12(4–5):489–507.
- TROTTET, A, E FOUILLAND, C LEBOULANGER E LANOUGUÈRE & M BOUVY. 2011. Use of inhibitors for coastal bacteria and phytoplankton: Application to nitrogen uptake measurement *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 93:151-159.
- TUNGARAZA, C, N BRION, V ROUSSEAU, W BAEYENS & L GOEYENS. 2003. Influence of bacterial activities on nitrogen uptake rates determined by the application of antibiotics. *Oceanologia*, 45(3): 473–489.
- TURNER JT. 1984. Zooplankton feeding ecology: contents of fecal pellets of the copepods *Temora turbinata* and *T. stylifera* from continental shelf and slope waters near the mouth of Mississippi River. *Mar. Biol.*, 82: 73-83.

- UKELES, R. 1977. Unicellular plants. In: KINNE, O (Ed.). Marine ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters. John Wiley & Sons, Ltd., Germany, 368-466.
- UTTING, SD. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquac. Eng.* 4: 175–190.
- VADSTEIN, O, G OIE, Y OLSEN, I SALVESEN, J SKJERMO & G SKJAK-BREAK. 1993. In: REINERTSEN, H. *et al.* (Eds.), Fish Farming Technology. A. A. Balsema Publishers, Rotterdam, 69–75.
- VANCE, BD. 1966. Sensitivity of *Microcystis aeruginosa* and other blue-green algae and associated bacteria to selected antibiotics. *J. Phycol.* 2: 2-128.
- VASCONCELOS, RFL, APFDOS SANTOS, YF MARINHO, LBG DOS SANTOS, NKF CALAZANS, RDM DO NASCIMENTO, DMDEM DANTAS, WDEM COSTA & AO GÁLVEZ. 2009. Avaliação do crescimento de três microalgas: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* e *Chlorella vulgaris*, visando à utilização como biocombustíveis. In: Anais da IX Jornada de Ensino, Pesquisa, Extensão, Pernambuco. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0160-1.pdf>. 3 p.
- VELANKAR, NK. 1958. Inhibition of bacteria from marine sources by Aureomycin. *P. Indian. Acad. Sci. A.* XLVII(2): sec B, 86-96.
- VERITY, PG & GA PAFFENHÖFER. 1996. On assessment of prey ingestion by copepods. *J. Plankton Res.*, 18: 1767-1779.
- VEUGER, B, J MIDDELBURG, H BOSCHER, J NIEUWENHUIZE, P RIJSWIJK, E ROCHELLE-NEWALL & N NAVARRO. 2004. Microbial uptake of dissolved

- organic and inorganic nitrogen in Randers Fjord. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, 61: 507-515.
- VIEIRA AAH. 1977. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e de Ubatuba, SP. *Bolm. Inst. Oceanogr.*, 26(2): 303-338.
- WALNE, PR. 1956. Bacteria in experiments on rearing oyster larvae. *Nature*, 178: 91.
- WALNE, PR. 1958. The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis*. *J. mar. boil. Ass.*, 37: 415-425.
- WALNE, PR. 1974. Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years: Experience at Experience at Conwy- llod. England, Fishing News Books Limited, 189 p.
- WEBER, KP, MR MITZEL, RM SLAWSON, RL LEGGE. 2011. Effect of ciprofloxacin on microbiological development in wetland mesocosms. *Water Res.*, 45(10): 3185-3196.
- WHEELER, PA & DL KIRCHMAN. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 998-1009.
- WILLIAMS, LF & WN PLASTRIDGE. 1946. Use of antibiotic substances for freeing *Trichomonas foetus* from bacteria. *Jour. Bact.*, 51: 127.
- WINDLER, M, A GRUBER & PG KROTH. 2012. Purification of benthic diatoms from associated bacteria using the antibiotic imipenem. *Endocyt. Cell Res.*, 22: 62-65.
- WOLLENBERGER, L, B HALLING-SØRENSEN & KO KUSK. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40: 723-730.

- WYBAN, JA & JN SWEENEY. 1991. Intensive shrimp production technology: the Oceanic Institute shrimp manual, USA. 158 p.
- XU, WH, G ZHANG, SC ZOU, XD LI & YC LIU. 2007. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using highperformance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 145: 672–679.
- YANG, L-H, G-G YING, H-C SU, JL STAUBER, MS ADAMS, MT BINET., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(5): 1201–1208.
- YETKA, JE & WJ WIEBE. 1974. Ecological application of antibiotics as respiratory inhibitors of bacterial populations. *Appl. Microbiol.*, 28: 1033-1039.
- YING GG & RS KOOKANA. 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environ. Int.*, 33:199–205.
- YOUN, J-Y & SB HUR. 2007. Antibiotics and Their Optimum Concentration for Axenic Culture of Marine Microalgae. *Algae*, 22(3): 229-234.
- ZAGATTO, PA. 2006. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, PA & E BERTOLETTI (Eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. RiMa, 1-13.
- ZUMSTEIN, H. 1900. Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. *Jb. wiss. Bot.*, 34: 149-198.

APÊNDICE I

Apêndice I. Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 1/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
penicilina + estreptomicina + cloranfenicol	Fungos	Couch (1939)
penicilina	<i>Trichomonas foetus</i> (protozoário)	Ithaca & Mahmoud (1944)
*	<i>Trichomonas foetus</i> (protozoário)	Morgan (1946)
penicilina	<i>Trichomonas foetus</i> (protozoário)	Williams & Plastridge (1946)
penicilina	Protozoários	Seaman (1947)
*	Fitoplâncton	Fish (1950)
*	<i>Ascaris lumbricoides</i> (nematódeo)	Epps (1950)
penicilina e dihiestreptomicina	<i>Euglena gracilis</i> (protozoário)	Goodwin (1950)
aureomicina + cloridrato de oxitetraciclina + penicilina	*	Speck <i>et al.</i> (1951)
estreptomicina cacl2 + penicilina	<i>Nitzschia closterium</i> (fitoplâncton)	Spencer (1952)
penicilina	Fitoplâncton	Spencer (1952)
penicilina + estreptomicina	<i>Euglena gracilis</i> (protozoário)	Pappas & Hoffman (1952)
nistatina	Fitoplâncton	Donovick <i>et al.</i> (1955)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 2/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
penicilina + estreptomicina	<i>Sardinops caerulea</i> , <i>Gadus callarias</i> e <i>Pleuronichthys</i> sp. (peixes)	Oppenheimer (1955)
penicilina + estreptomicina	Ostras (molusco)	Walne (1956)
aureomicina	*	Velankar (1958)
penicilina + estreptomicina	Ostras (molusco)	Walne (1958)
estreptomicina	Copépodes de água doce	Marshall & Orr (1958)
terramicina, estreptomicina, polimixina-b, tetraciclina, penicilina, bacitracina, cloromicetina e gramicidina	<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> (fitoplâncton)	Galloway & Krauss (1959)
penicilina	<i>Podophrya collini</i> (protozoário)	Palincsar (1959)
clorotetraciclina + cloranfenicol + estreptomicina	*	Fell <i>et al.</i> (1960)
nistatina	Fitoplâncton	Lampen & Arnow (1961)
*	Fitoplâncton	Kinsky (1961)
clorotetraciclina + ácido cítrico	Fitoplâncton	Suehiro & Tomiyasu (1962)
penicilina + dihiestreptomicina	<i>Detonula confervacea</i> e <i>Cyclotella nana 3H</i> (fitoplâncton)	Guillard & Ryther (1962)
penicilina + cloranfenicol + neomicina + polimixina b + dihiestreptomicina + tetraciclina + candicina	<i>Gyrodinium cohnii</i> (protozoário)	Provasoli & Gold (1962)
estreptomicina, penicilina	<i>Calanus hyperboreus</i> (copépode)	Conover (1962)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 3/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
anfoterexina b + estreptomicina	Fitoplâncton	Ghosh & Ghosh (1963a)
penicilina + estreptomicina	<i>Stylonema alsidii</i> (macroalga)	Fries (1963)
penicilina + cloranfenicol + neomicina + polimixina b	<i>Gyrodinium resplendens</i> (fitoplâncton)	Provasoli & McLaughlin (1963)
polimixina b + neomicina	Diatomáceas (fitoplâncton)	Soli (1963)
clorotetraciclina + ácido cítrico	Fitoplâncton	Suehiro & Tomiyasu (1964)
estreptomicina + penicilina	*	Fuller (1964)
penicilina + estreptomicina + cloranfenicol	<i>Acetabularia</i> sp. (fitoplâncton)	Keck (1964)
penicilina + estreptomicina + cloranfenicol	<i>Tetraselmis maculata</i> (macroalga)	Antia & Kalmakoff (1965)
penicilina	<i>Euterpina aculifrons</i> (copépode)	Neunes & Pongolini (1965)
estreptomicina, penicilina	<i>Calanus hyperboreus</i> (copépode)	Conover (1966)
penicilina + estreptomicina	<i>Mycale contarenii</i> (porífero)	Borojevic (1966)
cicloeximidina, oxitetraciclina, clorotetracilica, tetraciclina	<i>Crassostrea virginica</i> (molusco)	Ray (1966)
estreptomicina, penicilina	<i>Calanus hyperboreus</i> (copépode)	Conover (1967)
cloranfenicol + clorotetraciclina + estreptomicina	*	Meyers <i>et al.</i> (1967)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 4/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
estreptomicina + cloranfenicol	Diatomáceas (fitoplâncton)	Droop (1967)
penicilina + neomicina + nistatina	<i>Acetabularia acetabulum</i> (mediterranea) (macroalga)	Green <i>et al.</i> (1967)
penicilina + estreptomicina + cloranfenicol + neomicina	Diatomáceas (fitoplâncton)	Droop (1967)
penicilina + estreptomicina	<i>Rhincalanus nasutus</i> (copépode)	Mullin & Brooks (1967)
cloranfenicol	*	Ahearn <i>et al.</i> (1968)
gentamicina	*	Ahearn <i>et al.</i> (1968)
penicilina + estreptomicina	<i>Tintinnopsis tubulosa</i> (protozoário)	Gold (1968)
penicilina + estreptomicina	<i>Tintinnopsis tubulosa</i> (protozoário)	Gold (1969)
penicilina + estreptomicina	<i>Ulva</i> (<i>Enteromorpha</i>) <i>linza</i> e <i>Cladophora rivularis</i> (<i>gracilis</i>) (fitoplâncton)	Berglund (1969)
cloranfenicol + novobiocina	Foraminifera (protozoário)	Muller & Lee (1969)
carbenicilina + penicilina + vancomicina + canamicina	<i>Acetabularia mediterranea</i> (fitoplâncton)	Shephard (1970)
novobiocina + eritromicina, novobiocina + coli-micina + nistatina, novobiocina + coli-micina + fungizone	Nematoda	Lee <i>et al.</i> (1970)
penicilina + estreptomicina	<i>Elminius modestus</i> (cirripédio)	Tighe-Ford <i>et al.</i> (1970)
cloranfenicol	*	Seshadri & Sieburth (1971)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 5/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
dihiestreptomicina, binotal	*	Hoppe (1972)
penicilina + clorafenicol + neomicina e penicilina + tetraciclina + cloranfenicol + aureomicina + ceporina + nomicina	<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Pediastrum boryanum</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> (fitoplâncton)	Jones <i>et al.</i> (1973)
coli-micina, geopen + carbelicina, penicilina, policilina + ampicilina, keflin + cefalotina, aerosporina	Peixes	Struhsaker <i>et al.</i> (1973)
eritromicina, carbenicilina, penicilina, ampicilina, cefalotina, nitrofurantaina, sulfadiazina	<i>Caranx mate</i> (peixe)	Struhsaker <i>et al.</i> (1973)
penicilina + estreptomicina	Ostras (molusco)	Walne (1974)
cloranfenicol + coli-micina	Foraminífera (protozoário)	Lee <i>et al.</i> (1974)
coli-micina, estreptomicina, penicilina, neomicina, cloranfenicol	Peixes	Struhsaker <i>et al.</i> (1974)
iloticina	Peixes	Struhsaker <i>et al.</i> (1975)
*	Fitoplâncton	Sheath (1975)
estreptomicina e derivações, canamicina, carbomicina, eritromicina, tilosina, lincomicina, rubiflavina, mixina, novobiocina, ácido nalidixic	<i>Euglena gracilis</i> e <i>Mycobacterium phlei</i> (protozoário)	Ebringer <i>et al.</i> (1976)
cloranfenicol + estreptomicina + penicilina + neomicina + cicloeximidina e neomicina + cicloeximidina	Fitoplâncton	Vieira (1977)
cloranfenicol e estreptomicina + penicilina	<i>Cancer magister</i> (caranguejo)	Fisher & Nelson (1978)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 6/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
penicilina + estreptomicina	<i>Ulva (Enteromorpha) intestinalis</i> (macroalga)	Millner <i>et al.</i> (1979)
estreptomicina + cloanfenicol	Fitoplâncton	Tipper & Wright (1979)
dihidroestreptomicina + neomicina + penicilina + anfotexicina b	<i>Gonyaulax catenella</i> e <i>Gonyaulax excavata</i> (protozoários)	Divan & Schnoes (1982)
penicilina + estreptomicina + cloranfenicol	<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> (macroalga)	Saga & Sakai (1982)
penicilina, vancomicina, cloranfenicol	Experimento científico	Sherr <i>et al.</i> (1986)
cloranfenicol	*	Wheeler & Kirchmann (1986)
vancomicina + penicilina	Experimento científico	Sherr <i>et al.</i> (1986)
penicilina + estreptomicina	<i>Elminius modestus</i> (cirripédio)	Harms (1987)
ampicilina, carbenicilina, cefaloridina, cefalotina, cloranfenicol, clortetraciclina, colistina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, incomicina, ácido nalidixic, neomicina, novobiocina, rifampin, estreptomicina, sulfa triple, tetraciclina, trimetoprim, vancomicin, penicilina, polimixina b	Macroalgas	Bradley <i>et al.</i> (1988)
*	Revisão (fitoplâncton)	McCracken (1989)
penicilina, neomicina, estreptomicina	<i>Tridacna deresa</i> (molusco)	Fitt <i>et al.</i> (1992)
penicilina + dihiestreptomicina + cloranfenicol + dutrose e oxitetraciclina, amoxilina, ácido oxolinico, trimetoprim + sulfadiazina, trimatoprim	<i>Tigriopus californicus</i> (copépode)	Shaw <i>et al.</i> (1994)
penicilina + neomicina + estreptomicina	Experimento científico	Middelburg & Nieuwenhuize (2000a)
penicilina + neomicina + estreptomicina	Experimento científico	Middelburg & Nieuwenhuize (2000b)
penicilina + neomicina + estreptomicina	Experimento científico	DeLorenzo <i>et al.</i> (2001)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 7/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
estreptomicina + furaltadona	<i>Argopecten purpuratus</i> (molusco)	Riquelme <i>et al.</i> (2001)
estreptomicina	Experimento científico	Tungaraza <i>et al.</i> (2003)
cloranfenicol	<i>Isochrysis galbana</i> (fitoplâncton)	Subhash <i>et al.</i> (2004)
penicilina + neomicina + estreptomicina	Experimento científico	Veuger <i>et al.</i> (2004)
penicilina + neomicina + estreptomicina	Experimento científico	Cozzi & Cantoni (2006)
cloranfenicol, eritromicina, furaltadone	<i>Isochrysis galbana</i> e <i>Chaetoceros gracilis</i> (fitoplâncton)	Campa-Córdova <i>et al.</i> (2006)
tetraciclina, oxitetraciclina, amoxilina, sulfonamida + trimetoprim, trimetoprim	Abalone (molusco)	Handler <i>et al.</i> (2006)
oxitetraciclina	Peixes	Pereira Jr. <i>et al.</i> (2006)
estreptomicina	Experimento científico	Foulland <i>et al.</i> (2007)
estreptomicina + canamicina	Experimento científico	Hamdan & Jonas (2007)
ampicilina, cefuroxina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, tetraciclina, sulfonamidas	<i>Oreochromis niloticus</i> (peixe)	Carneiro <i>et al.</i> (2007)
dihidroestreptomicina, neomicina, cloranfenicol, dihidroestreptomicina + neomicina	<i>Chlorella ellipsoidea</i> , <i>Isochrysis galbana</i> e <i>Heterosigma ahashiwo</i> , <i>Cyclotella didymus</i> , <i>Thalassiosira allenii</i> (fitoplâncton)	Youn & Hur (2007)

Continua

Apêndice I (continuação). Lista dos principais trabalhos publicados sobre o uso de antimicrobianos em cultivos/produção de organismos e experimentos científicos, com intuito de se obter um meio livre de micro-organismos. (*) sem especificação. (Parte 8/8).

Antimicrobianos utilizados	Tipo de cultivo/produção	Autor(es)
ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, imipenem, ceftazidima, gentamicina, ciprofloxacina, rofurantoina, ceftriaxona, ampicilina, sulfazotrim	<i>Litopenaeus vannamei</i> (camarão)	Costa <i>et al.</i> (2008)
triclosan, triclocarban, roxitromicina, claritromicina, tilisina, tetraciclina, clorotetraciclina, norfloxacina, sulfametoxazole, ciprofloxacina, sulfametazina, trimetoprim	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (fitoplâncton)	Yang <i>et al.</i> (2008)
penicilina + estreptomicina	Experimento científico	Pringault <i>et al.</i> (2009)
cloranfenicol, florfenicol, tiamfenicol	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Tetraselmis chui</i> (fitoplâncton)	Lai <i>et al.</i> (2009)
penicilina + estreptomicina	Experimento científico	Trotted <i>et al.</i> (2011)
clorotetraciclina	<i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Scenedesmus obliquus</i> (fitoplâncton)	Guo & Chen (2012)
lincomicina, ciprofloxacina, tilasina	<i>Cylindrotheca closterium</i> e <i>Navicula ramosissima</i> (fitoplâncton)	Hagenbuch & Pinckney (2012)
eritromicina	<i>Litopenaeus vannamei</i> (camarão)	Rego <i>et al.</i> (2012)
imipenem	Diatomáceas (fitoplâncton)	Windler <i>et al.</i> (2012)

APÊNDICE II



Coleta de organismos para a realização dos experimentos. Praia do Cassino, Rio Grande, Brasil.



Experimento de sobrevivência de copépode em incubadora tipo DBO (Marconi 403)



Experimento de produção ovos do copépode *Acartia tonsa* em incubadora tipo DBO (Marconi 403)



Experimento de inibição de bactérias aderidas. Extração de bactérias do biofilme, utilizando o ultra-som (Cole-Parmer® serie 4710 – ultrasonic homogenizer)