

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

**DO PLÂNCTON AO BENTOS: INFLUÊNCIA
DE DIFERENTES FATORES FÍSICOS,
QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO PROCESSO
DE BIOINCRUSTAÇÃO**

VANESSA OCHI AGOSTINI

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

**Orientador: Dr. Erik Muxagata
Coorientador: Dr. Alexandre José Macedo**

**RIO GRANDE
Janeiro, 2018**

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

**DO PLÂNCTON AO BENTOS: INFLUÊNCIA
DE DIFERENTES FATORES FÍSICOS,
QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO PROCESSO
DE BIOINCRUSTAÇÃO**

VANESSA OCHI AGOSTINI

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

**Orientador: Dr. Erik Muxagata
Coorientador: Dr. Alexandre José Macedo**

**RIO GRANDE
Janeiro, 2018**

À minha família,

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Dr. Erik Muxagata, e meu Coorientador, Dr. Alexandre José Macedo, pelo incentivo, 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.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica pelo incentivo e oportunidades dadas durante o desenvolvimento do Doutorado.

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

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), ao Centro de Biotecnologia (IB), ao Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana pelo sanduíche realizado, bem como pela disponibilidade do espaço de trabalho.

À Priscila Teixeira-Amaral, Waldemar Amaral, Laís Fernanda de Palma Lopes, Danielle Ortiz de Ortiz, Letícia Baldoni, Claus Inck, Octavio Esquivel, Professora Anette Duarte, Professor Renato Nagata pela amizade e parceria durante o desenvolvimento da Tese e aos alunos do laboratório de zooplâncton.

À Daniele Trentin, Flávia Brust, Sharon Reis, Anelise Baptista, Ana Becker, Luana Boff, Laura Silva, Franciane Senger, Rodrigo, Muriel Barros, pela amizade, parceria e ensinamentos, bem como a professora Dra. Tiana Tasca pelo fornecimento do marcador DAPI durante o desenvolvimento do sanduíche na UFRGS.

Aos professores Dra. Maria Alejandra Gomez Pivel e Dr. Fernando Erthal, bem como, a Sandro Petró, Elis Regina Beltram, Anderson Moraes, Nathalia Carvalho da Luz e Tiago Menezes Freire pela amizade, parceria e pelo espaço de trabalho cedido na UFRGS.

Ao laboratório de Ecologia de Vegetação Costeira da FURG e a professora Margareth Copertino pelo empréstimo do Multiparâmetro para a execução de experimentos laboratoriais.

Aos meus amigos, pelo carinho e companhia, Karine Mariane Steigleder, Juliana Frabrício Tisca, Luciana Menezes, Roberto do Nascimento Farias, Carlos Vinícius Weiss, Júlio Zemor, Mariana Lanari, Paula Lima Canabarro.

Às representantes discentes do PPGOB Elisa Seyboth, Derien Verneti e Luciana Medeiros pela amizade, apoio, companheirismo, conversas durante o período do Doutorado.

A Karine Mariane Steigleder pela amizade e pelo auxílio em coletas de campo durante o Doutorado.

À Estação Marinha de Aquacultura (EMA) e seus funcionários pelo fornecimento de água do mar, em especial a Dr. Alessandro Cardoso.

Ao Projeto Ecológico de Longa Duração (PELD) na Lagoa dos Patos e costa adjacente.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL), ao Professor Dr. Robert Boyle e à equipe técnica Erica Silveira, Ana Cristina Kalb, Caroline Ruas e Rudinei Fiorio.

À Faculdade de Farmácia pela utilização do citômetro de fluxo e aos técnicos Camilo D'amore, Leonardo Bodo, Leticia Telles e Thaís Erig.

A Cacinele Rocha e ao Laboratório de Análise de Águas e Sedimentos do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos pelas análises de água.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, pelo acompanhamento, discussões e parceria em disciplinas, qualificação e no decorrer do curso.

Um agradecimento especial para as Doutoradas Carolina Islabão e Lucélia Borges pelo auxílio e colaboração nos experimentos envolvendo cultivos de microalgas, professora Dra. Clarisse Odebrecht, Savênia da Silveira, Dr. Márcio Souza, Andréa Rocha e Vanessa Corrêa pela ajuda na identificação do perifíton e Vera Olvera pelo carinho e incentivo durante todo o Doutorado.

À veterinária do Biotério da FURG, Alice Meirelles Leite, pelo auxílio na aquisição dos antibióticos utilizados nos experimentos e à Graciéle Cunha Alves da UFMG pelo auxílio com a identificação de fungos.

Ao Dr. Marco Faimali, a Dra. Veronica Piazza, a Dra. Francesca Garaventa, Dra. Chiara Gambardella, Dra. Silvia Morgana, Dr. Lorenzo Merotto, Dr. Giovanni Pavanello, Dra. Erica Carlig, Dra. Laura, Dr. Roberto Stifanese, Davide Di Blasi, Elisa Costa, Linda Salvaneschi, Sergio Maggio e ao Istituto di Scienze Marine vinculado ao Consiglio Nazionale delle Ricerche em Genova, Itália, por permitir o desenvolvimento do estágio Sanduíche, pela parceria e contribuições no desenvolvimento da presente Tese de Doutorado.

À Banca de acompanhamento composta por Dr. Paulo Cesar Abreu, Dr. Leonir André Colling, Dra. Ana Maria Azambuja e Dra. Grasiela Pinho pelas valiosas contribuições dadas ao trabalho realizado.

Ao CNPq e a CAPES pelas bolsas de estudo durante o período de Doutorado no Brasil e durante o Estágio Sanduíche na Itália, respectivamente.

A FAPERGS-PRONEM (16/2551-000244-4) pelo projeto “Núcleo de Estudos Básicos e Aplicados em Adesão Microbiana: aspectos importantes na saúde humana e na indústria”.

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

ÍNDICE

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 PREFÁCIO.....	16
2 INTRODUÇÃO GERAL	20
2.1 Hipóteses	28
2.2 Objetivos.....	28
2.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	29
2.3 Justificativa.....	30
3 CAPÍTULO I – Uso de citômetro de fluxo para estudos envolvendo bactérias plancônicas e bactérias do biofilme: comparação com dados de microscopia	31
3.1 Introdução	32
3.2 Síntese da Metodologia	34
3.2.1 <i>Procedimento em ultra-som</i>	35
3.2.2 <i>Procedimento em citômetro de fluxo</i>	36
3.2.3 <i>Procedimento em microscópio de epifluorescência</i>	37
3.2.4 <i>Procedimento em microscópio eletrônico de varredura</i>	37
3.2.5 <i>Análises estatísticas</i>	38
3.3 Síntese dos Resultados.....	38
3.4 Conclusão	39
4 CAPÍTULO II – Investigação piloto dos principais fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a colonização de invertebrados em substratos consolidados.....	41
4.1 Introdução	42
4.2 Síntese da Metodologia.....	43
4.2.1 <i>Observação experimental: colonização do zooplâncton</i>	43
4.2.2 <i>Observação experimental: colonização do biofilme microbiano</i>	44
4.2.3 <i>Observação de campo: assembleia de moluscos</i>	44
4.2.4 <i>Análises estatísticas</i>	46

4.3 Síntese dos Resultados.....	46
4.3.1 <i>Observação experimental: colonização do zooplâncton</i>	46
4.3.2 <i>Observação experimental: colonização do biofilme microbiano</i>	47
4.3.3 <i>Observação de campo: assembleia de moluscos</i>	48
4.4 Conclusão.....	49
5 CAPÍTULO III – Seleção e avaliação de antimicrobianos para inibição de bactérias e fungos em cultivos marinhos controlados: potencial, efeito, eficiência e metodologia de aplicação	51
5.1 Introdução	52
5.2 Síntese da Metodologia.....	53
5.2.1 <i>Confirmação do potencial da combinação de antibióticos</i> ..	53
5.2.2 <i>Inclusão do antifúngico e avaliação dos efeitos na comunidade</i>	55
5.2.3 <i>Influência da salinidade e da contaminação via ar</i>	58
5.2.4 <i>Avaliação dos efeitos no fitoplâncton, micoplâncton e bacterioplâncton</i>	62
5.2.6 <i>Determinação da CI₅₀, CL₅₀ e CE₅₀</i>	63
5.2.6 <i>Metodologia de aplicação de antimicrobianos em meio marinho laboratorial</i>	66
5.2.7 <i>Metodologia geral e análises estatísticas</i>	69
5.3 Síntese dos Resultados.....	70
5.3.1 <i>Confirmação do potencial da combinação de antibióticos</i> ...	70
5.3.2 <i>Inclusão do antifúngico e avaliação dos efeitos na comunidade</i>	71
5.3.3 <i>Influência da salinidade e da contaminação via ar</i>	72
5.3.4 <i>Avaliação dos efeitos no fitoplâncton, micoplâncton e bacterioplâncton</i>	74
5.3.5 <i>Determinação da CI₅₀, CL₅₀ e CE₅₀</i>	75
5.3.6 <i>Metodologia de aplicação de antimicrobianos em meio marinho laboratorial</i>	75
5.4 Conclusão.....	77

6 CAPÍTULO IV - Relação entre as bactérias do biofilme e a sucessão ecológica em substratos consolidados durante o processo de bioincrustação ..	79
6.1 Introdução	80
6.2 Síntese da Metodologia.....	81
6.2.1 Avaliação da comunidade marinha residente	81
6.2.2 Experimento de colonização.....	82
6.2.3 Análises estatísticas	86
6.2 Síntese dos Resultados.....	86
6.3 Conclusão.....	88
7 CAPÍTULO V – Efeito da idade do biofilme, tipo de substrato e composição da comunidade inicial na colonização do metazooplâncton no processo de bioincrustação	90
7.1 Introdução	91
7.2 Síntese da Metodologia.....	92
7.2.1 Experimento laboratorial – Brasil.....	92
7.2.2 Experimento de campo – Itália	94
7.2.3 Análises estatísticas	98
7.3 Síntese dos Resultados.....	98
7.3.1 Experimento laboratorial – Brasil.....	98
7.3.2 Experimento de campo – Itália	99
7.4 Conclusão.....	102
8 DISCUSSÃO GERAL	104
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
10 CONCLUSÃO GERAL.....	114
11 PERSPECTIVAS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
APÊNDICE I – Resumo: Protocolo em citômetro de fluxo para estimativas de abundância e tamanho de bactérias planctônicas e associadas a biofilmes em amostras marinhas: comparação com dados de microscopia.....	142
APÊNDICE II – Artigo completo: What determines sclerobiont colonization on marine mollusk shells	144

APÊNDICE III – Resumo: Uma revisão sobre os efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de organismos planctônicos: uma ferramenta para experimentos ecológicos.....	178
APÊNDICE IV – Artigo completo: Evaluation of antibiotics as a methodological procedure to inhibit free-living and biofilm bacteria in marine zooplankton culture	180
APÊNDICE V – Resumo: <i>Insights</i> sobre a inibição do biofilme bacteriano e fungos aderidos de cultivos de plâncton marinho utilizando uma nova combinação de antimicrobianos.....	195
APÊNDICE VI – Resumo: Efeito de antimicrobianos no crescimento do bacterioplâncton e do micoplâncton em cultivos de <i>Amphibalanus improvisus</i> (Darwin, 1854) (Cirripedia - Crustacea): influência da salinidade e da exposição ao ar	197
APÊNDICE VII – Resumo: Diminuição da densidade de bactérias e fungos em cultivos de microalgas marinhas utilizando antimicrobianos	199
APÊNDICE VIII – Resumo: Ensaio ecotoxicológico laboratorial para avaliação dos efeitos antimicrobianos em organismos marinhos	201
APÊNDICE IX – Resumo: Potencial de aplicação de antimicrobianos em experimentos científicos marinhos e sua manutenção no sistema.....	203
APÊNDICE X – Resumo: Relação entre o biofilme bacteriano marinho e o estabelecimento de perifíton, protozooplâncton e metazooplâncton no processo inicial de bioincrustação	205
APÊNDICE XI – Resumo: Acoplamento planctônico-bentônico: efeito da idade do biofilme, material do substrato e composição do biofilme microbiano na colonização de metazooplâncton	207

RESUMO

A bioincrustação representa um grave problema econômico devido aos danos causados a substratos consolidados artificiais (embarcações, plataformas e dutos de petróleo). O processo consiste na adesão de vários organismos, iniciando pelo biofilme bacteriano, seguido do perifíton e terminando na colonização do metazooplâncton (invertebrados). No entanto, os fatores que influenciam esta colonização ainda não são bem explicados, sendo as características da superfície, a comunidade bacteriana associada ao substrato e a disponibilidade de larvas de invertebrados no plâncton fatores em potencial. Por este motivo, a presente Tese teve como objetivo principal avaliar a influência de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos (textura, composição, material, posição, orientação, exposição ao meio, cor e tamanho do substrato, bem como densidade de bactérias do biofilme, idade e composição do biofilme microbiano, potencial de colonização do metazooplâncton e presença de tinta anti-incrustante) para a colonização de bactérias, perifíton e zooplâncton em substratos consolidados, caracterizando a sucessão ecológica inicial associada ao processo de bioincrustação. Entretanto, para isso era necessário obter, através de comparações entre metodologias, um protocolo para o estudo de bactérias marinhas, possibilitando a análise eficiente, rápida e econômica desta comunidade. Desta forma, foi realizado um cultivo laboratorial, sendo analisada a densidade e o tamanho celular de bactérias marinhas tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme com 6 e 12 dias de exposição, sendo os resultados comparados entre o citômetro de fluxo (utilizando diferentes técnicas de marcação), microscopia de epifluorescência (amostras marcadas com laranja de acridina) e microscopia eletrônica de varredura. Após identificar a metodologia de melhor custo-benefício, foi avaliada de forma piloto a influência de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos, incluindo a densidade de bactérias do biofilme, para a colonização de invertebrados em conchas de moluscos vazias (substrato modelo), através de experimentos e observações de campo (Praia dos Concheiros, RS, Brasil). Posteriormente a identificação dos principais fatores de influência para o processo de bioincrustação, foram avaliados/selecionados antimicrobianos com o objetivo de inibir as bactérias e fungos em cultivos marinhos de forma atóxica para os demais componentes do plâncton (fitoplâncton e zooplâncton), sendo o tratamento selecionado utilizado para testar a relação entre a densidade de bactérias do biofilme e a sucessão ecológica no substrato consolidado através de um experimento laboratorial marinho, onde substratos de acrílico expostos a diferentes situações, texturas e orientações estiveram em contato com plâncton por até 12 dias. Em seguida, para investigar os efeitos do biofilme microbiano (idade e composição) e do material do substrato na colonização do metazooplâncton foram realizados um experimento laboratorial e um experimento de campo (Mar Mediterrâneo, Gênova, Itália). Com relação aos resultados, a citometria de fluxo (sem marcador) promoveu uma quantificação de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme de forma eficiente, rápida e econômica quando comparada ao uso de marcadores e às técnicas de microscopias (eletrônica de varredura e epifluorescência); em contrapartida, ambas as técnicas de microscopia apresentam dados mais precisos de tamanho celular. A textura (alta ornamentação, $> 20\mu\text{m}$), a cor (ocre), o tamanho ($<50 \text{ mm}^2$ ou $>1.351 \text{ mm}^2$), a composição (calcítica ou biomineralica), a orientação (horizontal) e o material (madeira e fibra de concreto) do substrato desempenharam um importante papel no estabelecimento do metazooplâncton. A pintura anti-incrustante não inibiu a colonização de bactérias no substrato, entretanto o perifíton/protozooplâncton e o metazooplâncton foram parcialmente inibidos. O potencial metazooplancônico é

importante, principalmente em termos de taxa, embora a colonização não seja necessariamente proporcional, no tempo e no espaço, à disponibilidade/quantidade destes organismos na coluna d'água. O tempo também exerceu um papel fundamental na composição da comunidade, embora uma maior densidade de bactérias associada a biofilmes maduros seja o principal fator de influência para o desencadeamento da sucessão ecológica, principalmente para o assentamento de invertebrados com ciclo de vida meroplânctônico. Esta hipótese foi testada de forma eficaz pela utilização da combinação de antimicrobianos (g L^{-1}): 0,025 de penicilina + 0,08 de estreptomicina + 0,04 de neomicina + 0,005 de nistatina que se mostrou eficiente na inibição de bactérias tanto planctônicas (92 %) quanto associadas ao biofilme (93 %). Embora as cianobactérias (perifíton) associadas ao biofilme exerçam um papel secundário para o assentamento do meroplâncton e primário para a colonização do ticoplâncton e do holoplâncton. Dentre os fatores testados para a ocorrência da bioincrustação, a densidade de bactérias heterotróficas associadas ao biofilme exerceu o efeito mais significativo, o que pode ser ainda intensificado dependendo dos fatores físicos (textura, orientação, tamanho do substrato) e químicos (material, composição, cor do substrato) que estão interagindo conjuntamente.

Palavras-chave: bactéria, meroplâncton, substrato consolidado, perifíton, zooplâncton.

ABSTRACT

Biofouling represents a serious economic problem due to damage on artificial hard substrates (vessels, platforms and oil pipelines). The process consists of the adhesion of several organisms, beginning with the bacterial biofilm, followed by the periphyton and ending in the metazooplankton colonization (invertebrates). However, the factors that influence this settlement are still not well explained, being the characteristics of the surfaces, the bacterial community associated to the substrate, and the availability of invertebrate larvae in the plankton are potential features. For this reason, the main objective of this thesis was to evaluate the influence of different physical, chemical and biological factors (substrates texture, composition, material, position, orientation, medium exposure, color and size, as well as biofilm bacteria density, microbial biofilm age and composition, metazooplankton colonization potential, and presence of antifouling paint) for the colonization of bacteria, periphyton and zooplankton on hard substrates, characterizing the initial ecological succession associated to the biofouling process. However, it was necessary to obtain, through comparisons between methodologies, a protocol for the study of marine bacteria, allowing the efficient, fast and economic analysis of this community. In this way, a laboratory culture was performed, analyzing the density and cellular size of both planktonic and biofilm-associated marine bacteria at 6 and 12 days of exposure, and the results were compared between the flow cytometer (using different stain techniques), epifluorescence (samples stained with acridine orange) and scanning electron microscopy. After identifying the most cost benefit methodology, the influence of different physical, chemical and biological factors, including biofilm bacteria density, for the colonization of invertebrates on mollusks empty shells (model substrate) was evaluated in a pilot way, through of experiments and field observations (Concheiros Beach, RS, Brazil). After the identification of the main influencing factors for the biofouling process, antimicrobials were evaluated/selected to inhibit bacteria and fungi in marine cultures in a non-toxic way to the other plankton components (phytoplankton and zooplankton). The selected treatment was used to test the relationship between the biofilm bacteria density and the ecological succession on hard substrate through a marine laboratory experiment where acrylic substrates were exposed to different situations, textures and orientations in contact with plankton for up to 12 days. Afterwards, a laboratory experiment and a field experiment (Mediterranean Sea, Genoa, Italy) were carried out to investigate the effects of microbial biofilm (age and composition) and substrate material on colonization of metazooplankton. About the results, flow cytometry (unstained) promoted a quantification of planktonic and associated-biofilm bacteria in an efficient, fast and economical way when compared to the use of stains and scanning and epifluorescence microscopies; in contrast, both microscopy techniques present more accurate data of cell size. The substrate texture (high ornamentation, $> 20 \mu\text{m}$), color (ocher), size ($<50 \text{mm}^2$ or $> 1,351 \text{mm}^2$), composition (calcitic or biomineral), orientation (horizontal) and material (wood and concrete fiber) played an important role in the establishment of metazooplankton. The antifouling paint did not inhibit the colonization of bacteria on the substrate, however the periphyton/protozooplankton and the metazooplankton were partially inhibited. The metazooplankton potential is important, especially in terms of taxa, although colonization is not necessarily proportional, in time and space, to the availability/quantity of these organisms in the water column. The time also played a fundamental role in the composition of the community, although a higher density of bacteria associated with mature biofilms was the main influence factor for the activation

of the ecological succession, mainly for the invertebrates' settlement with meroplanktonic life cycle. This hypothesis was effectively tested by the use of the antimicrobials combination (g L^{-1}): 0.025 penicillin + 0.08 streptomycin + 0.04 neomycin + 0.005 nystatin which proved to be efficient in inhibiting both planktonic (92 %) and biofilm-associated (93 %) bacteria. Although the biofilm-associated cyanobacteria (periphyton) play a secondary role for the meroplankton settlement and primary for tytoplankton and holoplankton colonization. Among the factors tested for the occurrence of biofouling, the density of heterotrophic bacteria associated with biofilm had the most significant effect, which may be further intensified depending on the physical (texture, orientation, substrate size) and chemical factors (material, composition, color of the substrate) that are interacting together.

Keywords: bacteria, meroplankton, hard substrate, periphyton, zooplankton.

1. PREFÁCIO

A presente Tese de Doutorado é um aprofundamento dos resultados da Dissertação de Mestrado intitulada “*Avaliação dos efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de plâncton marinho*” que objetivou avaliar e selecionar antibióticos para viabilizar testes de hipóteses ecológicas envolvendo a comunidade planctônica. O objetivo específico era utilizar esta ferramenta para testar o papel da comunidade bacteriana na sucessão ecológica durante o processo de bioincrustação. Objetivo este, testado na presente Tese, conjuntamente com outros fatores físicos, químicos e biológicos.

Além disso, durante o desenvolvimento da Dissertação, foi verificada a necessidade de se ter uma metodologia rápida, econômica e confiável para estimativas da comunidade bacteriana, já que a microscopia de epifluorescência (MEF), utilizada até o momento, era demorada e cara, o que desencadeou a inclusão do objetivo de desenvolvimento de um novo protocolo não dependente da microscopia, no caso o uso da citometria de fluxo.

O presente estudo foi desenvolvido em forma de experimentos científicos laboratoriais e de campo, envolvendo os Laboratórios de Zooplâncton do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), de Biofilmes e Diversidade Microbiana da Faculdade da Farmácia e de Microfósseis Calcáreos do Instituto de Geociências (IG) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), bem como do Istituto di Scienze Marine (ISMAR) do Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Gênova, Itália. As análises de bactérias foram realizadas em parceria com os Laboratórios de Fitoplâncton e Microrganismos Marinhos do IO-FURG e de Biofilmes e Diversidade Microbiana e contou com a equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL/FURG) para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em microscopia confocal (MC). Já o levantamento de invertebrados bentônicos associados ao navio encalhado Altair foi realizado em parceria com o Laboratório de Ecologia de Invertebrados Bentônicos também do IO-FURG.

Os antimicrobianos utilizados na atual pesquisa serviram apenas para o teste de hipótese em ambiente controlado (laboratório), o que pode auxiliar na busca por respostas sobre o estabelecimento da bioincrustação. A pesquisa não visa à aplicação destas substâncias diretamente no meio marinho natural. Após a sua utilização, os antimicrobianos

foram guardados em recipientes fechados, sendo coletados pela empresa de Serviços de Engenharia e Ambiental, SANIPLAN®.

A presente Tese será apresentada em forma de cinco Capítulos, a fim de facilitar o entendimento dos assuntos abordados (ver Organograma 1). Cada capítulo responderá uma parte dos objetivos e apresentará uma Introdução, uma síntese da Metodologia, bem como uma síntese dos Resultados e uma Conclusão. Os artigos científicos publicados, bem como os resumos em português dos artigos submetidos ou em processo de finalização referentes a cada Capítulo estarão inseridos em forma de **APÊNDICES** ao final da Tese. Diferente da versão digital, a versão impressa apresenta os artigos em formato completo, independentemente da prévia publicação ou não. Posteriormente à exposição de cada Capítulo, serão apresentadas a Discussão, as Considerações Finais e a Conclusão geral.

O **CAPÍTULO I** abordará o protocolo para uso de citômetro de fluxo (CF) para estudos envolvendo bactérias marinhas planctônicas e associadas a biofilme, bem como a comparação com dados das microscopias de epifluorescência (MEF) e eletrônica de varredura (MEV). *O artigo completo encontra-se no Apêndice I e está sob revisão no periódico Progress in Oceanography.*

O **CAPÍTULO II** abordará a investigação piloto dos principais fatores físicos, químicos e biológicos de substratos consolidados, usando conchas de moluscos como modelo à colonização do metazooplâncton, bem como a comparação entre o padrão de colonização observado experimentalmente e o preservado em assembleias de conchas ao longo do tempo. *O artigo completo encontra-se no Apêndice II e está publicado no periódico PLoS ONE.*

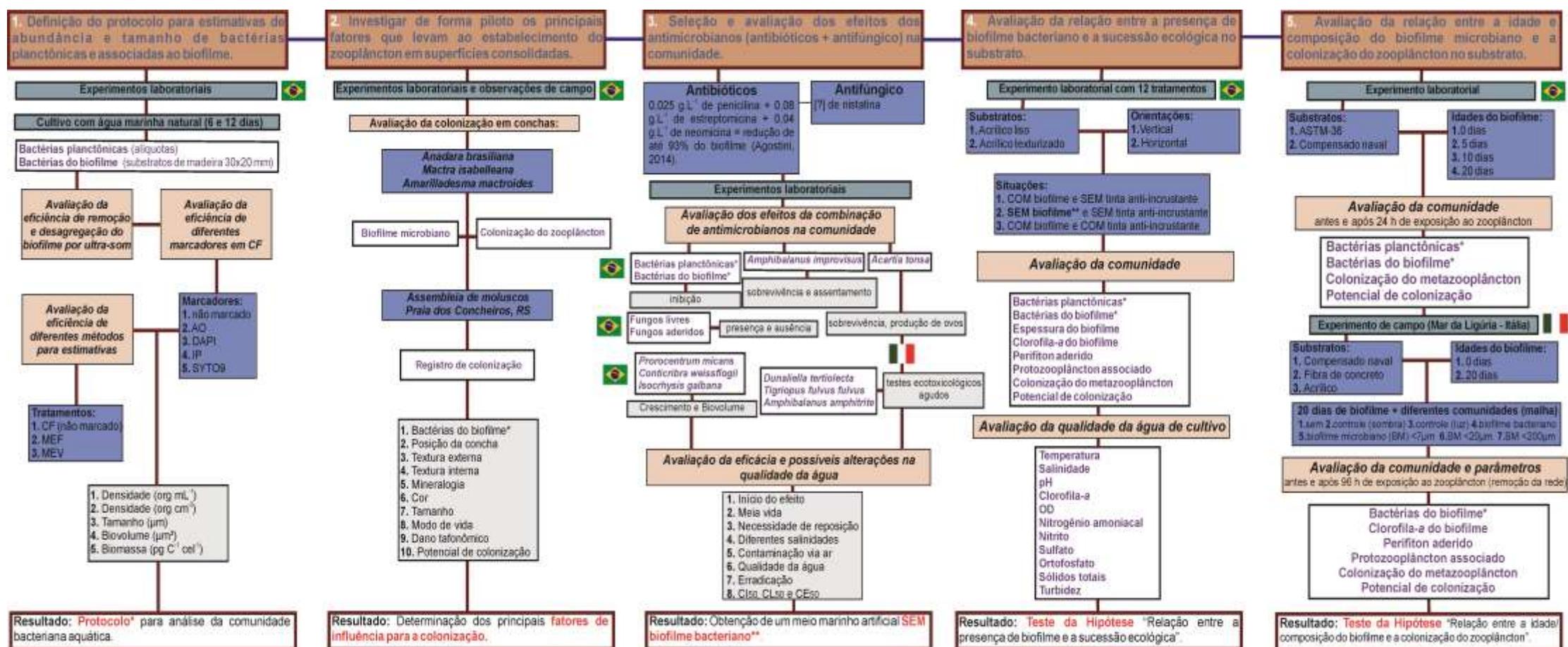
O **CAPÍTULO III** apresentará os experimentos para seleção e avaliação dos antimicrobianos para inibição de bactérias e fungos em cultivos marinhos controlados a fim de testar o papel de bactérias para a sucessão ecológica em substratos consolidados. *Os artigos completos e drafts encontram-se entre os Apêndices III-IX, estando um sob revisão no periódico Latin American Journal of Aquatic Research (Apêndice III), um publicado no periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências (Apêndice IV), um submetido ao periódico International Aquatic Research (Apêndice V), um em processo de finalização para submissão ao periódico Journal of Applied Phycology (Apêndice VIX), um submetido ao periódico Marine Ecology (Apêndice VII), um em processo de finalização para*

submissão ao periódico Chemistry and Ecology (Apêndice VIII) e um em processo de finalização para submissão ao periódico Methods in Ecology and Evolution (Apêndice IX).

O **CAPÍTULO IV** abordará o teste relação entre as bactérias do biofilme e a sucessão ecológica no substrato consolidado durante o processo de bioincrustação, utilizando o tratamento de antimicrobianos e a metodologia de aplicação selecionados no Capítulo III. *O artigo completo encontra-se no Apêndice X e está em preparação para submissão ao periódico Marine Ecology Progress Series.*

O **CAPÍTULO V** apresentará os experimentos referentes aos efeitos da idade do biofilme microbiano, material do substrato e composição da comunidade microbiana na colonização do metazooplâncton durante o processo de bioincrustação. *O artigo completo encontra-se no Apêndice XI e está em preparação para submissão ao periódico Marine Ecology Progress Series.*

Organograma 1. Apresentação da Tese de forma esquemática e resumida, enfatizando os principais objetivos, experimentos e resultados esperados.



realizados no Brasil realizados na Itália (Doutorado Sanduiche PDSE)

2. INTRODUÇÃO GERAL

A bioincrustação – *biofouling* – refere-se ao processo de acumulação de depósitos biológicos associados direta ou indiretamente a substratos consolidados (Scheer 1945, Epstein 1981, Wahl 1989, Characklis 1990).

O processo consiste na adsorção de moléculas orgânicas na superfície submersa, seja ela natural (*i.e.*, rochas, conchas, organismos) ou artificial (*i.e.*, quebra-mares, embarcações, dutos) e na colonização desta por espécies pioneiras de micro-organismos que formam um biofilme e, com a progressão da sucessão, ocorre o estabelecimento das larvas meroplantônicas incrustantes e sedentárias (Quaid & Miller 2010, Martín-Rodríguez *et al.* 2015).

Este processo inicia com uma fina película, logo após a exposição do substrato ao meio, com cerca de 20-80 nm de espessura, formada através da deposição de íons inorgânicos e compostos orgânicos de massa molecular relativamente elevada. Este filme pode alterar as cargas eletrostáticas e a superfície do material, facilitando a sua colonização por organismos, ocasionando assim a aceleração ou intensificação do processo corrosivo (Epstein 1981, Characklis 1990, Videla 2002, Beech *et al.* 2005) (Figura 1A).

A película inicial formada disponibiliza nutrientes e através de interações físico-químicas ocorre a adesão das bactérias, as quais se agregam por fibras (*pili*) e formam uma matriz de material polimérico extracelular (MPE) (Videla 2002, Flemming 2011) (Figura 1B). Esta matriz, composta por biomoléculas e água, permite que a comunidade regule várias atividades metabólicas a seu favor, bem como resista a condições ambientais adversas, como dessecação, choque osmótico e ação de antimicrobianos (Flemming & Wingender 2010, Vasudevan 2014). Este biofilme pode ainda apresentar associação de vírus e fungos.

Envolvidas pela MPE, as bactérias estão arranjadas de forma organizada, sendo reguladas por genes que resultam na formação, multiplicação e espalhamento do biofilme maduro, o qual neste estágio inicia os processos de desprendimento e de dispersão (Bridier *et al.* 2014) (Figura 1C).

Estes micro-organismos possuem uma grande importância para a área clínica (Hosein *et al.* 2002, Boyles *et al.* 2015), industrial (Coenye & Nelis 2010, AlAbbas *et*

al. 2013) e ambiental (Hoorman 2011, Céline *et al.* 2014), sendo o desenvolvimento de protocolos rápidos, confiáveis e econômicos, para estimativas de sua abundância e biomassa, importantes para várias áreas da microbiologia (Alsharif & Godfrey 2002). O que nos leva a pergunta: *qual seria a melhor metodologia para analisar a comunidade bacteriana marinha de uma forma eficiente, rápida e econômica?*

No ambiente marinho, após o desenvolvimento do biofilme inicial, microalgas, alveolados autotróficos e heterotróficos e esporos de macroalgas começam a aderir-se à superfície (Figura 1D). Posteriormente, ocorre o estabelecimento dos invertebrados, colonizadores terciários, acarretando a sobreposição dos estágios micro e macrobiológicos (esclerobiontes) (Abarzua & Jakubowski 1995) (Figura 1E).

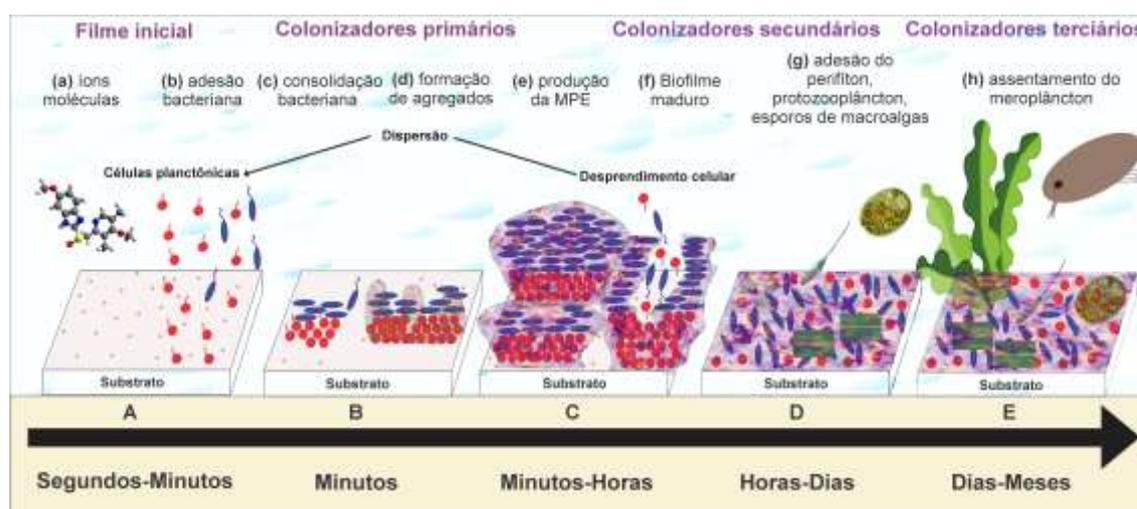


Figura 1. Processo de bioincrustação. **A:** Acumulação química e adesão bacteriana; **B:** reprodução bacteriana e formação de agregados; **C:** produção da Matriz Polimérica Extracelular (MPE); **D:** Adesão de microalgas, protozooplâncton e esporos de macroalgas; **E:** assentamento do meroplâncton (modificado de Agostini *et al.* 2017).

A maior parte dos invertebrados associados a substratos consolidados apresentam parte do seu ciclo de vida no plâncton como parte do zooplâncton (metazooplâncton), em sua maioria representados por organismos com ciclo de vida meroplancônico, onde passam parte de suas vidas como larvas, à deriva nas correntes oceânicas, e parte como adultos, no ambiente bentônico (López & Coutinho 2008, Pineda *et al.* 2010), sendo na maioria da vezes representados por organismos adultos sedentários (*e.g.*, gastrópodes) e incrustantes (*e.g.*, cirripédios) (Figura 2). Uma vez liberadas na coluna d'água, as larvas podem ser transportadas para regiões afastadas da

costa e, quando competentes, devem encontrar um substrato com as condições ideais para realizar o assentamento (López & Coutinho 2008, Quaid & Miller 2010).

Entende-se por assentamento o fenômeno biológico que compreende duas fases: a primeira inclui o comportamento de busca do local e a segunda trata da ocupação permanente no substrato, envolvendo metamorfose (Rodriguez *et al.* 1993).

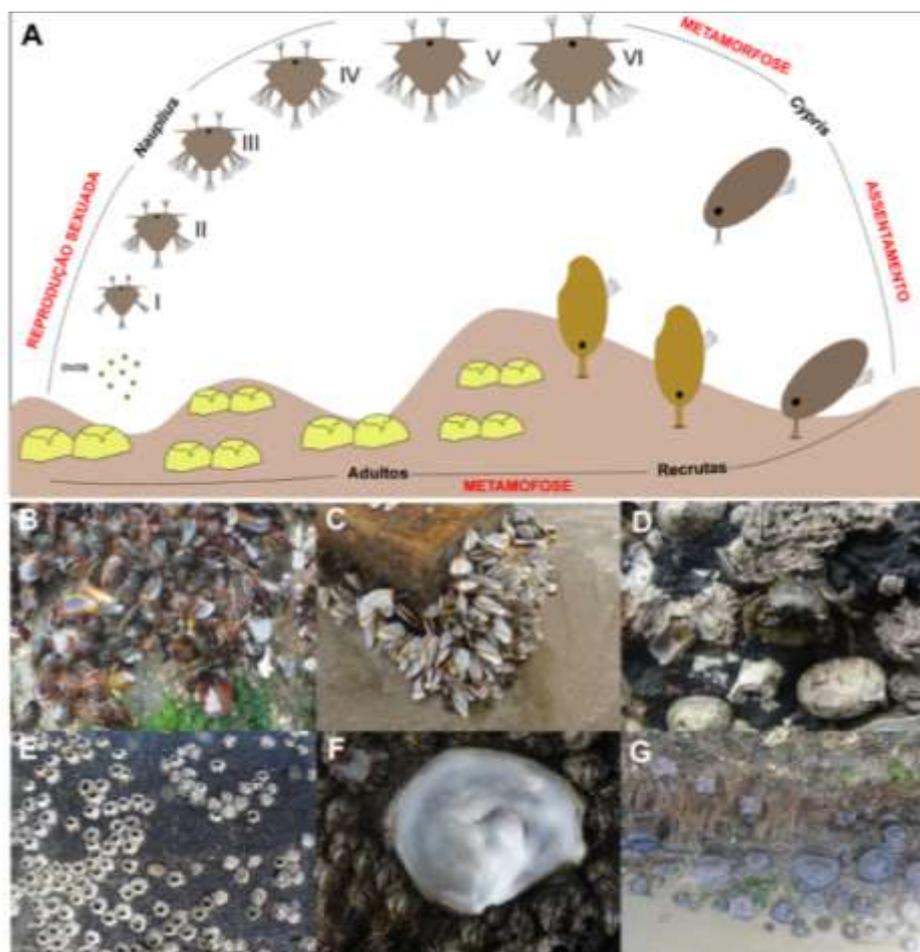


Figura 2. Organismos meroplânctônicos. **A:** Ciclo de vida de um cirripédio (Crustacea: Hexanauplia), enfatizando a colonização pela larva *cypris* planctônica no ambiente bentônico e sua metamorfose até a forma adulta (modificado de Agostini *et al.* 2017); **B:** mexilhões (Mollusca: Bivalvia); **C:** lepas (Crustacea: Hexanauplia); **D:** caranguejo (Crustacea: Malacostraca) e chapéu-chinês (Mollusca: Gastropoda); **E:** cirripédio (Crustacea: Hexanauplia); **F:** ostra (Mollusca: Bivalvia); **G:** anêmona-do-mar (Cnidaria: Anthozoa).

O holoplâncton e o ticoplâncton são classificações dadas aos organismos metazooplânctônicos, também baseadas no tempo de permanência no ambiente planctônico durante o seu ciclo de vida. O holoplâncton é caracterizado por um ciclo de vida inteiramente no ambiente planctônico (*e.g.*, copépodos Calanoida, eufausiáceos,

apendiculárias), enquanto o segundo compreende organismos que alternam periodicamente entre os ambientes planctônico e bentônico, ativamente (*i.e.*, nado) ou passivamente (*i.e.*, suspensão por ondas e correntes) (*e.g.*, misídeos, foraminíferos, ostracodes, anfípodas, copépodos harpacticoidas) (Lalli & Parsons 1997, Lenz 2000). Alguns destes organismos, podem ser registrados associados a substratos consolidados e à bioincrustação (Gollner *et al.* 2006, Sarmento *et al.* 2012), sendo classificados como metazooplâncton vágil, fauna vágil ou fauna acompanhante.

Os fatores que influenciam o assentamento de invertebrados em substratos consolidados ainda não são bem explicados. Alguns autores atribuem a capacidade de desenvolvimento da comunidade à qualidade fisiológica da larva (conteúdo energético, competência, adaptações fisiológicas, potencial larval) (Toonen & Pawlikc 2001, Jarret 2003, Gribben *et al.* 2006, Pineda *et al.* 2010), enquanto outros ao comportamento frente a estímulos específicos (material, textura, tamanho e cor do substrato, fluxo d'água, sinais químicos, presença e idade do biofilme, composição da comunidade residente, presença de coespecífico, interações ecológicas, espaço no substrato) (Hills & Thomason 1998, Connell 1999, Glasby 2000, Steinberg *et al.* 2002, Todd 2003, Thyjagarran *et al.* 2006, Bumbeer & Rocha 2012, Dobretsov *et al.* 2013a). Desta forma, o organismo reagiria de forma positiva (afinidade) ou negativa (inibição) a um ou mais destes fatores (Figura 3). O que nos leva a pergunta: *Quais são os principais fatores físicos, químicos e biológicos associados a substratos consolidados que levam um determinado organismo a colonizar uma determinada superfície?*

O fenômeno da bioincrustação contribui para a diversidade e produtividade biológica local e fornece recursos valiosos explorados pela pesca e pelo turismo. Além disso, contribui significativamente para o fluxo vertical de energia em zonas costeiras, através do acoplamento bentônico-pelágico (Schnack-Schiel & Isla 2005, Griffiths *et al.* 2017). No entanto, este fenômeno também representa um grande problema econômico, principalmente quando associado à colonização de cirripédios e mexilhões, devido aos danos causados às estruturas oceânicas como embarcações, *piers* e plataformas (Azis *et al.* 2001, Gama *et al.* 2009, Murthy & Venkatesan 2009, ACT 2011, Flemming 2011, Carl *et al.* 2012, Fitridge *et al.* 2012, Ozkan & Berberoglu 2013).

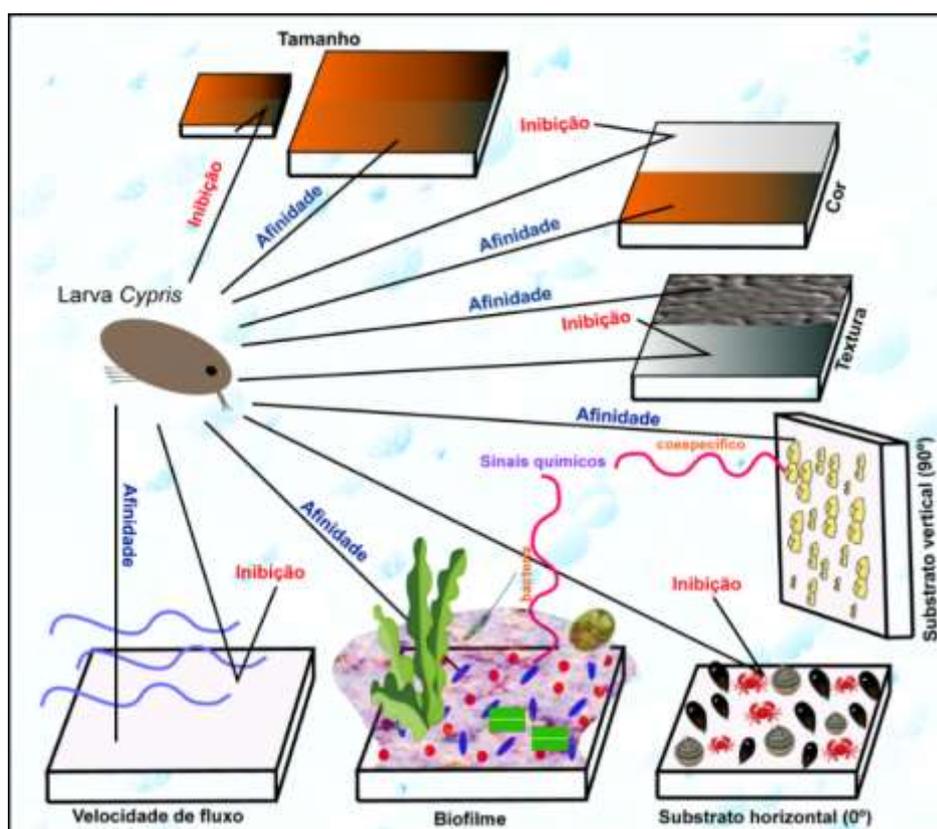


Figura 3. Fatores físicos, químicos e biológicos com potencial de inibir ou propiciar o assentamento de organismos em substratos consolidados marinhos (Agostini *et al.* 2017).

Em embarcações, aumentam o peso e diminuem a fluidez e o hidrodinamismo, causando maior consumo de combustível e, conseqüentemente, maior poluição ambiental (Younqlood *et al.* 2003, Callow & Callow 2011, Fittridge *et al.* 2012). Esta fauna pode ainda causar entupimento, maximização do desgaste pela erosão em tubulações marítimas, e também deixar os cabos submarinos quebradiços, reduzindo sua durabilidade (Landoulsi *et al.* 2011, Ozkan & Berberoglu 2013). Conforme Videla (2002) e Messano *et al.* (2008), o desenvolvimento da bioincrustação é um dos fatores que tornam a água do mar um meio mais corrosivo (biocorrosão), promovendo a deterioração acelerada de estruturas. As instalações fixas como plataformas, píeres e docas, são grandemente prejudicadas por este fenômeno (Gama *et al.* 2009). Estima-se que, em escala global, os prejuízos anuais com a bioincrustação sejam na ordem de quinze bilhões de dólares, incluindo gastos com a prevenção, manutenção e consumo de combustível (Azis *et al.* 2001).

Muitas tintas anti-incrustantes foram desenvolvidas para tentar diminuir os problemas gerados por este fenômeno. Não obstante, atualmente, ainda não existe uma

alternativa anti-incrustante ecologicamente segura que seja satisfatória (Konstantinou & Albanis 2004). Uma grande preocupação tem sido a real eficiência das substâncias anti-incrustantes que vem sendo descobertas, uma vez que elas atuam em organismos em etapa sucessional avançada, mas não garantem a eficiência em todo o processo (Molino & Wetherbee 2008, Teixeira 2010). Em outras palavras, se o estabelecimento de cirripédios for bloqueado, por exemplo, outro organismo pode causar o mesmo problema. Por esse motivo, acredita-se que substâncias que impeçam a instalação de estágios sucessionais iniciais, como o biofilme bacteriano, possam ser mais úteis (Yebra *et al.* 2004, Teixeira 2010), já que esta inibição poderia ser uma barreira para o estabelecimento de outros organismos no processo de sucessão ecológica.

O modelo de facilitação supõe que apenas certas espécies de "sucessão precoce" são capazes de colonizar o substrato virgem, devido às suas características particulares. Estes colonizadores iniciais modificam o ambiente de modo a torná-lo mais adequado para outras espécies de "sucessão tardia" (Jenkins & Martins 2010).

A Figura 4 apresenta um esquema mostrando a sucessão ecológica ao longo do tempo em substratos consolidados marinhos (Figura 4A), bem como uma reflexão sobre a consequência da retirada dos colonizadores primários (precoce), bactérias formadoras de biofilme, para a colonização secundária e terciária do substrato (tardia) (Figura 4B).

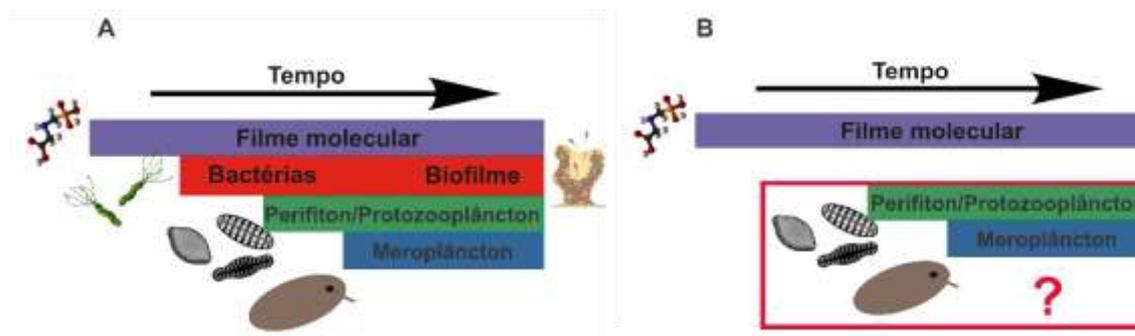


Figura 4. Sucessão ecológica em substratos consolidados ao longo do tempo. **A:** sucessão ecológica esperada; **B:** remoção dos colonizadores primários e reflexão sobre a possível influência no estabelecimento de outros colonizadores.

Fukami *et al.* (1997) e Sekar *et al.* (2004) observaram que a colonização de diatomáceas no substrato é estimulada pelo biofilme bacteriano. Da mesma forma que estudos de Unabia & Hadfield (1999) e Dobretsov & Qian (2006) verificaram a importância do biofilme para o assentamento de poliquetas *Hydroides elegans* (Haswell, 1883) e de briozoários *Bugula neritina* (Linnaeus, 1758), respectivamente, enquanto

que Bao *et al.* (2007) observaram que larvas de bivalves *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) assentam e realizam a sua metamorfose em resposta a um estímulo produzido por bactérias presentes no biofilme.

Da mesma forma, as larvas do mexilhão *M. edulis* Linnaeus, 1758 respondem a sinais químicos da comunidade bacteriana presente tanto na superfície do substrato quanto na coluna d'água circundante (Ganesan *et al.* 2010, Toupoint *et al.* 2012), e as larvas da espécie *M. coruscus* Gould, 1861 têm o seu assentamento e metamorfose aumentados em resposta à idade do biofilme (Wang *et al.* 2012). O biofilme está associado positivamente ao assentamento e metamorfose das ostras *Pinctada maxima* (Jameson, 1901) e *P. fucata* (Gould, 1850), respectivamente (Zhao *et al.* 2003, Yu *et al.* 2010). O mesmo padrão também é observado para cirripédios (O'Connor & Richardson 1996, Thiyagarajan *et al.* 1999, Freckelton *et al.* 2017), copépodos Harpacticoida (Dahms *et al.* 2007), poríferos (Whalan & Webster 2014) e corais (Erwin *et al.* 2008, Sneed *et al.* 2014), apesar de não haver consenso sobre qual a característica do biofilme estaria realmente afetando a colonização. O que nos leva a pergunta: *quais são as características em potencial do biofilme (densidade de bactérias, idade, composição) que poderiam estar afetando a colonização do metazooplâncton em substratos consolidados?*

Em todos os trabalhos supracitados as espécies foram estudadas separadamente, não havendo interação em termos de comunidade, excluindo da pesquisa as relações ecológicas de facilitação, tolerância e inibição entre indivíduos, as quais são responsáveis pela estruturação da comunidade (Absalão 1993). Estas interações representam a relação e a dependência de espécies para com outras espécies.

Além disso, as condições de orientação (Ács & Kiss 1991a, b, Connell 1999, Glasby 2000, Somsueb 2000, Glasby & Connell 2001, Kralj *et al.* 2006), textura (Hills & Thomason 1998, Berntsson *et al.* 2000a, 2000b, Bers & Wahl 2004, Scardino *et al.* 2008, Munroe *et al.* 2010, Carl *et al.* 2012) e material do substrato (O'Connor & Richardson 1994, Glasby 2000, Su *et al.* 2007; Burt *et al.* 2009; Cangussu *et al.* 2010, Chung *et al.* 2010, Vedaprakash *et al.* 2013) não são, na maioria das vezes, consideradas como fatores de influência para o assentamento das larvas. Entretanto, estas muitas vezes são decisivas para a colonização de algumas espécies.

Trabalhos com tal abordagem não foram realizados até o momento pela falta de alternativas de exclusão de bactérias associadas ao biofilme do meio, a fim de se testar a interação entre estes micro-organismos e os demais componentes associados a substratos consolidados. O que nos leva a pergunta: *como seria possível obter um substrato sem bactérias marinhas associadas ao biofilme sem afetar a comunidade não alvo?*

Por meio de pesquisas prévias, Agostini (2014) verificou o potencial de aplicação de uma combinação de antibióticos de amplo espectro em cultivos marinhos laboratoriais, com o intuito de avaliar a contribuição de bactérias na comunidade, sendo considerada uma ferramenta para a investigação das interações ecológicas supracitadas.

A partir do ano de 2000, houve um crescente aumento de estudos ecológicos aquáticos envolvendo a contribuição do bacterioplâncton na comunidade, sendo utilizados antimicrobianos em meios controlados como ferramenta para investigar a função ecológica de uma determinada comunidade, simulando ambientes naturais (DeLorenzo *et al.* 2001, Bidle *et al.* 2003, Veuger *et al.* 2004, Cozzi & Cantoni 2006, Tang *et al.* 2006a, 2006b, Fouilland *et al.* 2007, Hamdan & Jonas 2007, Pringault *et al.* 2009, Tartarotti & Torres 2009, Trottet *et al.* 2011). Embora a utilização de antibióticos para este fim tenha sido empregado pela primeira vez por Yetka & Wiebe (1974) sem sucesso, esta tentativa incentivou novos estudos.

Alguns dos trabalhos que utilizaram antimicrobianos com sucesso como procedimento para o investigações ecológicas avaliaram (i) o papel das bactérias na produção de metabólitos (Ringelberg & Van Gool 1998), (ii) o papel de micro-organismos no processo de decomposição (Tang *et al.* 2006a, 2006b), (iii) interações entre fitoplâncton e bactérias (Hamdan & Jonas 2007, Pringault *et al.* 2009), (iv) competição por nitrogênio dissolvido (Veuger *et al.* 2004, Cozzi & Cantoni 2006, Fouilland *et al.* 2007), (v) influência da atividade do bacterioplâncton na entrada de nitrogênio no sistema (Middelburg & Nieuwenhuize 2000a, 2000b; Tungaraza *et al.* 2003), (vi) interações no processo de assentamento de meroplâncton (Bao *et al.* 2007, Roberts *et al.* 2007, Wang *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013), e (vii) o potencial de síntese de proteínas por bactérias (Tartarotti & Torres 2009), existindo desta forma, o potencial de aplicação de antimicrobianos em experimento laboratorial para testar a relação entre a

presença de bactérias associadas ao biofilme e a sucessão ecológica em substrato consolidado durante o processo de bioincrustação.

A manipulação experimental em substratos consolidados propicia a compreensão mais detalhada dos mecanismos e processos que determinam a intensidade de interações entre as espécies (Coutinho 1995), permitindo caracterizar e avaliar uma comunidade, além da obtenção de resultados que auxiliem na pesquisa de soluções para os problemas gerados pelo fenômeno da bioincrustação às estruturas oceânicas, sem causar danos ambientais.

2.1 Hipóteses

- H₁)** O citômetro de fluxo permitirá a análise de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme de uma forma mais rápida e eficiente que as microscopias de epifluorescência e eletrônica de varredura, garantindo o melhor custo-benefício;
- H₂)** A textura (física), a composição (química) e a densidade de bactérias do biofilme (biológica) serão os fatores mais correlacionados à colonização do metazooplâncton em substratos consolidados;
- H₃)** A utilização da combinação de antimicrobianos (antibióticos e antifúngico) não causará danos agudos aos organismos não alvo, permitindo a sua utilização para investigar a relação entre a densidade de bactérias do biofilme e a sucessão ecológica em substratos consolidados durante o processo de bioincrustação;
- H₄)** Existirá uma relação positiva entre as bactérias associadas ao biofilme e a sucessão ecológica em substratos consolidados;
- H₅)** A densidade de bactérias do biofilme será o fator biológico mais relevante para a colonização do metazooplâncton em substratos consolidados.

2.2 Objetivos

O objetivo principal da presente Tese é avaliar a influência de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos: textura, composição, material, posição, orientação, exposição ao meio, cor e tamanho dos substratos, bem como presença, densidade de

bactérias do biofilme, idade e composição do biofilme microbiano, potencial de colonização do zooplâncton e presença/ausência de tinta anti-incrustante para a colonização de organismos (bactérias, perifíton e zooplâncton) em substratos consolidados, caracterizando a sucessão ecológica inicial associada ao processo de bioincrustação.

2.2.1 Objetivos específicos

- 1-** Avaliar diferentes técnicas (microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura e citômetro de fluxo) para realizar estimativas de abundância e de tamanho celular de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme, a fim de desenvolver um protocolo de melhor custo-benefício para estudos envolvendo bactérias marinhas;
- 2-** Investigar de forma piloto os principais fatores físicos, químicos e biológicos (textura, posição, tamanho, cor, composição e exposição do substrato, bem como densidade de bactérias do biofilme e potencial zooplanctônico de colonização) que levam ao estabelecimento do metazooplâncton em substratos consolidados;
- 3-** Selecionar/avaliar antimicrobianos (antibióticos + antifúngico) para ser usado como ferramenta para a investigação do papel das bactérias do biofilme na sucessão ecológica em substratos consolidados, abordando o seu potencial de utilização, o seu efeito na comunidade não alvo, a sua eficiência na inibição de bactérias e fungos tanto planctônicos quanto associados ao biofilme e a sua metodologia de aplicação em meio marinho controlado;
- 4-** Testar a relação entre as bactérias do biofilme e a sucessão ecológica ao longo do tempo em substratos consolidados caracterizados por diferentes situações (natural, tinta anti-incrustante, antimicrobianos), texturas (liso, texturizado) e orientações (vertical, horizontal);
- 5-** Investigar os efeitos da idade do biofilme microbiano (0, 5, 10, 20 dias), do material do substrato (madeira, aço, fibra de concreto, acrílico) e da composição da comunidade microbiana (bactérias, perifíton, protozooplâncton) na colonização do metazooplâncton em substratos consolidados.

2.3 Justificativa

Com o conhecimento adquirido com o atual trabalho, será possível entender de uma forma mais ampla através da avaliação de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos e a nível de comunidade o que leva um determinado organismo, seja ele uma bactéria, perifíton ou zooplâncton a colonizar um determinado substrato, bem como como se dá a interação entre estes organismos.

Em caráter ecológico, o presente estudo contribuirá com informações sobre o processo de acoplamento pelágico-bentônico em ambientes marinhos. Já em caráter aplicado, este conhecimento trará contribuições para diferentes áreas, que poderão ser utilizados para o estabelecimento de recifes artificiais, cultivos intensivos de invertebrados incrustantes (mexilhões, ostras, cirripédios) e formação biofilmes para serem usados como filtros biológicos. A presente Tese contribuirá também com a comparação entre metodologias para estudos envolvendo a comunidade bacteriana aquática, seja relacionada a estimativas de densidade e tamanho celular bacteriano seja utilizando antimicrobianos em ambientes controlados para o teste de hipóteses ecológicas, as quais poderão ser utilizados em outros estudos.

Além disso, as pesquisas referentes à colonização de superfícies, a fim de solucionar o problema da bioincrustação, poderão voltar-se aos fatores condicionantes ao estabelecimento de diferentes comunidades nos substratos em relação a estruturas oceânicas específicas. Caso comprovada a hipótese de que há uma relação positiva entre as bactérias associadas ao biofilme e a sucessão ecológica, será possível direcionar testes e técnicas anti-incrustantes em bactericidas, impedindo a progressão da sucessão ecológica através da inibição dos colonizadores primários.

3 CAPÍTULO I

**“Uso de citômetro de fluxo para estudos envolvendo
bactérias planctônicas e bactérias do biofilme:
comparação com dados de microscopia”**

Objetivo 1

3.1 Introdução

Bactérias são organismos unicelulares microscópicos com um tamanho médio entre 0,2 e 2,0 μm , embora algumas possam ser maiores (1–10 μm), presentes em todos os ambientes (Hoorman 2011).

No caso de ambientes aquáticos, as bactérias representam o segundo maior componente, atrás dos vírus, e estudos envolvendo a sua abundância e biomassa são fundamentais para entender o papel ecológico destes organismos dentro da cadeia trófica (Cho & Azam, 1988, Bouvier *et al.* 2001, Gurung *et al.* 2001, Farjalla *et al.* 2005, Sjöstedt *et al.* 2014, Burrell *et al.* 2015). Nestes ecossistemas, as bactérias podem estar livres na coluna d'água como parte do plâncton ou aderidas a superfícies vivas (*i.e.*, organismos) ou amorfas (*i.e.*, detritos, substratos consolidados) envoltas por uma matriz polimérica extracelular (MPE), sendo chamadas de agregado ou biofilme bacteriano (Lalli & Parson 1997, Kerstens *et al.* 2015).

Vários métodos têm sido propostos como alternativas para quantificar e medir as bactérias planctônicas (BP) e as associadas ao biofilme (BB) em ambientes aquáticos naturais e ensaios laboratoriais (Boulos *et al.* 1999), como a utilização de placas de contagem (Simu *et al.* 2005), coloração com cristal de violeta (Mampel *et al.* 2006), microscopias (Heidelberg *et al.* 2002, Mudryk & Podgórska 2006), e citometria de fluxo (Bouvier *et al.* 2001, Kerstens *et al.* 2015).

Embora a microscopia tenha nos feito conscientes sobre existência das bactérias no século XVII, somente com o surgimento do citômetro de fluxo no século XX tornou-se possível a implementação de estudos detalhados de micro-organismos em nível unicelular (Shapiro & Gerhard Nebe-von-Caron 2004). Além disso, de acordo com Felip *et al.* (2007), contagens em microscópio ainda consomem tempo e requerem um considerável esforço para obter estimativas acuradas. Assim, a partir da década de 1990, o citômetro de fluxo (CF) tem se tornado uma alternativa útil para a avaliação de células bacterianas em amostras aquáticas, comparado ao microscópio (Bouvier *et al.* 2001). Esta técnica consiste em um sistema de acoplamento óptico-eletrônico que registra uma célula ou partícula dispersa em contato com a luz incidente de um laser, permitindo a avaliação de medidas simultaneamente às características físicas múltiplas de uma única célula (tamanho, granulometria, complexidade) em suspensão (Figura 5A), usando um

controle/padrão com características conhecidas (*i.e.*, *beads*) (Figura 5B). No entanto, para o uso correto do CF existe a necessidade de calibração desta metodologia.

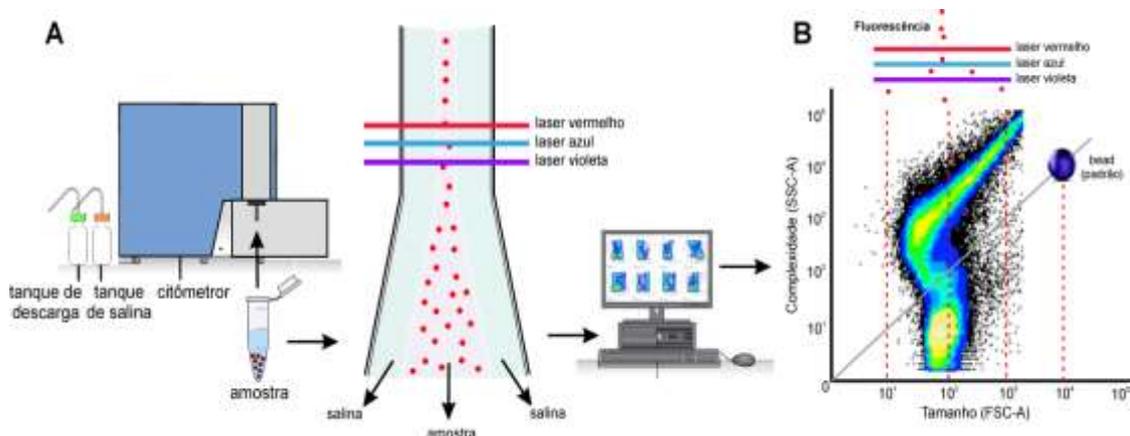


Figura 5. **A:** Componentes da técnica de citometria de fluxo para analisar as características de partículas, usando um **B:** controle/padrão (adaptado de BD FACSVerse 2011 e Yang *et al.* 2012).

Conforme Steen & Lindmo (1979), Gant *et al.* (1993), Walberg *et al.* (1996), Jochem (2000) e Ambriz-Aviña *et al.* (2014), as bactérias podem ser analisadas por CF quando em suspensão sem um marcador fluorescente, detectado pela dispersão da luz, embora estudos com marcadores sejam importantes para distinguir células de outras partículas (*i.e.*, detritos) (Steen & Lindmo 1979, Davey & Kell 1997).

Existem muitos marcadores para aplicação em citômetro de fluxo, bem como em análises em microscopia, e estas substâncias podem corar células lisadas ou não lisadas, ou ambas. No caso do biofilme, existem marcadores que coram também a MPE.

Apesar do grande número de técnicas disponíveis para o estudo de bactérias aquáticas planctônicas e associadas ao biofilme, ainda não há consenso sobre a metodologia mais eficaz para quantificar e caracterizar esses organismos de forma rápida, eficiente e econômica.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes técnicas: Microscopia de Epifluorescência (MEF), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Citometria de Fluxo (CF) para estimativas numéricas e de tamanho de bactérias marinhas tanto planctônicas (BP) quanto associadas ao biofilme (BB) com diferentes tempos de exposições/idade e selecionar o melhor protocolo e custo-benefício para estudos com bactérias em amostras marinhas.

3.2. Síntese da Metodologia

Água marinha natural (500 mL) com salinidade 25 foi coletada na Praia do Cassino, Rio Grande, Brasil e foi incubada a 20° C por 12 dias em fotoperíodo 12h:12h (claro:escuro). Dez substratos de madeira (30 × 20 mm) foram depositados no meio de cultivo para o crescimento do biofilme. A madeira foi selecionada, por ser um dos substratos mais utilizados para construção de embarcações e *piers*.

No sexto e décimo segundo dia de exposição, foram retiradas alíquotas (1 mL) e substratos para avaliar a eficiência do ultra-som (3 pseudoréplicas para cada tratamento) em desprender e desassociar o biofilme do substrato; para a comparação da eficiência dos diferentes marcadores em CF (10 pseudoréplicas para cada tratamento e comunidade); e para a comparação entre as metodologias CF, MEF e MEV respectivamente (10 pseudoréplicas para cada tratamento e comunidade), estimando o tamanho celular e a densidade bacteriana planctônica (BP) (org mL⁻¹) e associada ao biofilme (BB) (org cm⁻²).

Tabela 1. Sumário de cada tratamento utilizado para avaliar a eficiência do citômetro de fluxo (CF) e técnicas de microscopia (MEF e MEV) para quantificar e medir tanto as bactérias marinhas planctônicas quanto as associadas ao biofilme. Marcadores: 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), Laranja de Acridina (AO), Iodeto de Propidium (PI), ácido nucleico fluorescente verde (SYTO9).

Abreviação	Tratamentos
CF (sem marcador)	citometria de fluxo sem marcador
CF (DAPI)	citometria de fluxo com 4'-6-diamidino-2-fenilindole
CF (AO)	citometria de fluxo laranja de acridina
CF (PI)	citometria de fluxo iodeto de propidium
CF (SYTO9)	citometria de fluxo ácido nucleico fluorescente verde
MEF (AO)	microscopia de epifluorescência com marcador AO
MEV	microscopia eletrônico de varredura

As BP foram imediatamente depositadas em tubos de reação, enquanto os substratos foram colocados individualmente em 50 mL de solução salina estéril em tubo falcon para desprendimento do biofilme do substrato usando três pulsos de 20 kHz por

15 segundos em cada lado do substrato (Oliveira *et al.* 2006) em ultra-som Cole-Parmer® (series 4710 - ultrasonic homogenizer), com exceção dos substratos utilizados como controle na avaliação de eficiência de ultra-som e para avaliação de BB em MEV. Após o desprendimento, as amostras foram fixadas com formaldeído estéril a 4 % para análise em MEF e CF e em glutaraldeído estéril a 1 % para análise em MEV (Figura 6).

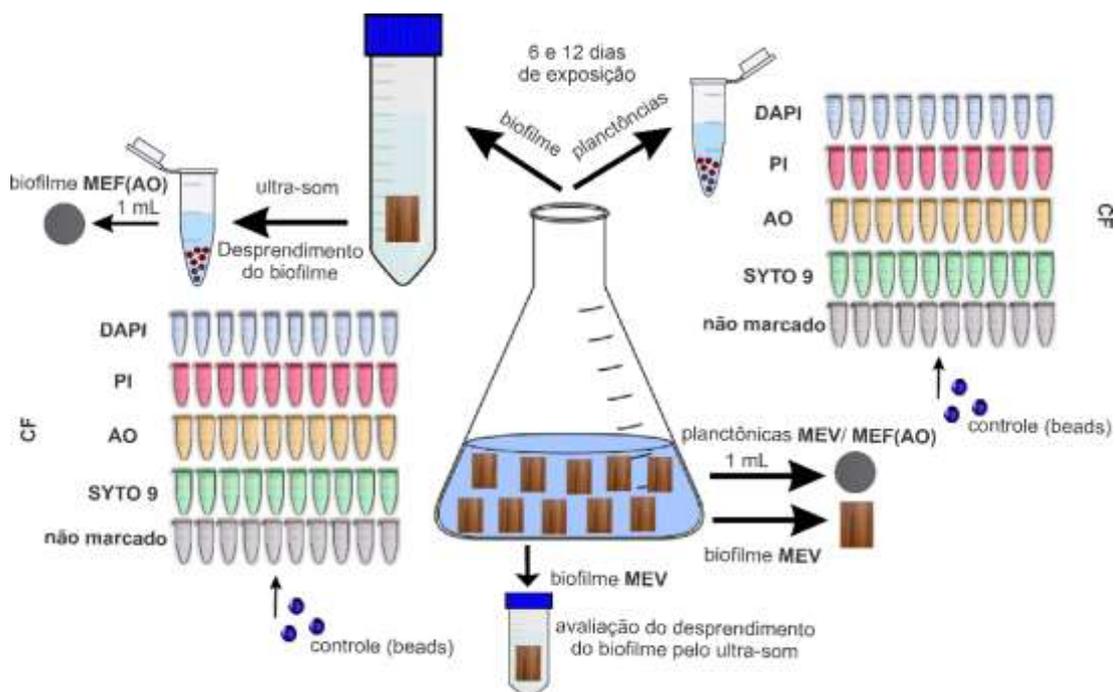


Figura 6 – Design do experimento realizado para definir o protocolo para estimativas de densidade e tamanho de bactérias marinhas planctônicas e associadas ao biofilme.

3.2.1 Procedimento em ultra-som

Foram analisados os substratos em MEV, com biofilme intacto, representando o biofilme antes do procedimento de ultra-som, e o biofilme desprendido após ultra-som. O procedimento de observação em MEV seguiu o protocolo de Freitas *et al.* (2010).

Para calcular a densidade bacteriana do biofilme (org cm^{-2}) antes e após o procedimento de ultra-som, as bactérias presentes no substrato foram contadas a partir de dez fotos, usando uma ampliação de $11.000\times$ ($97 \mu\text{m}^2$ de área).

3.2.2 Procedimento em citômetro de fluxo

O material bacteriano presente nas amostras foi corado com laranja de acridina (AO - Merck™) e DAPI (Sigma-Aldrich™) seguindo o protocolo de Kepner & Pratt (1994). Para corar bactérias em cada tratamento, foram adicionados 100 µL de solução-estoque de AO (1 g L⁻¹) ou DAPI (0,01 g L⁻¹) em 1 mL de amostra (atingindo 100 µg mL⁻¹ de concentração final para AO e 1 µg mL⁻¹ para DAPI), sendo incubada durante 15 min em temperatura ambiente no escuro (Porter & Feig, 1980).

Para o iodeto de propídio (PI) (solução de 20 mM em DMSO - Molecular Probes™) e ácido nucléico fluorescente verde (SYTO9) (solução 3,34 mM em DMSO - Molecular Probes™) foram adicionados 1,5 µL de marcador para cada 998,5 µL da suspensão bacteriana, sendo incubadas em temperatura ambiente no escuro durante 15 minutos (Kepner & Pratt 1994, Shapiro & Nebe-Von-Caron 2004, Ophus 2014).

A densidade de BP (org mL⁻¹) e de BB (org cm⁻²) foi estimada por citômetro de fluxo (BD FACSVersé™) na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), usando o software BD FACSuite™ para análise. O tempo de aquisição foi de 60 segundos por amostra, sendo as populações de bactérias avaliadas como percentagem pela escala logarítmica. A Tabela 2 apresenta as características dos marcadores mencionados acima, em relação ao seu potencial de marcação.

Tabela 2. Potencial dos marcadores de bactérias em corar células, MPE e detritos.

Marcador	Células não-lisadas	Células lisadas	MPE	Detritos	Referência
AO	●	●	●	●	Harrison <i>et al.</i> 2006
DAPI	●	●	●	●	Neu <i>et al.</i> 2002
SYTO9	●	●			Zhang <i>et al.</i> 2015
PI		●			Jin <i>et al.</i> 2005

O tamanho (µm) das células foi estimado usando o parâmetro *Forward Light Scatter* (FSC-A) com beads de latex de 6 µm (Molecular Probes™) como padrão (Herzenberg *et al.* 2006, Bouvier *et al.* 2011, Picot *et al.* 2012). O biovolume celular (µm³) foi estimado e convertido para biomassa celular bacteriana (pg C cell⁻¹) usando o

fator de conversão alométrico ($0,09 \cdot \text{biovolume}^{0,09}$) de Sun & Liu (2003) e Norland (1993), respectivamente.

3.2.3 Procedimento em microscópio de epifluorescência

A suspensão bacteriana presente em amostras de água e substratos foi filtrada (1 mL) em filtros de polycarbonato de $0,2 \mu\text{m}$ (Whatman Ø25mm) escurecidos com Irgalan Black, corados com Laranja Acridina (1 %) e observados sob microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan) em aumento de $100\times$.

Para calcular a densidade de BP (org mL^{-1}) e de BB (org cm^{-2}) foram contadas todas as bactérias encontradas dentro de um *grid* ($100 \mu\text{m}^2$) em 50 fotos, sendo realizada a média entre cada cinco fotos (totalizando 10 pseudoréplicas).

O tamanho das células (μm) foi também estimado em fotos, procedendo as medidas de 100 bactérias manualmente. O biovolume celular (μm^3), bem como a conversão para biomassa celular (pg C cell^{-1}) foram realizadas pela mesma metodologia descrita na seção 3.2.2.

3.2.4 Procedimento em microscópio eletrônico de varredura

As amostras de BP foram filtradas (1 mL) em filtros de polycarbonato de $0,2 \mu\text{m}$ (Whatman Ø25mm) escurecidas com Irgalan Black, enquanto as amostras de BB foram desidratadas diretamente com concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 95 e 100 %) (20 min cada), seco adicionando uma gota de acetona a 100 % e fixado em uma plataforma de alumínio. Ambas as amostras foram cobertas com filme de ouro e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060 conforme Freitas *et al.* (2010).

Para estimar a densidade de BP (org mL^{-1}), nos filtros de polycarbonato, e de BB (org cm^{-2}), nos substratos de madeira, foram tiradas 50 fotos em aumento de $11.000\times$ ($97 \mu\text{m}^2$ de área), sendo realizada a média para cada cinco fotos (totalizando 10 pseudoréplicas).

O tamanho das células (μm) foi também estimado em fotos, procedendo as medidas de 100 bactérias manualmente. O biovolume celular (μm^3), bem como a

conversão para biomassa celular (pg C cell^{-1}) foram realizadas pela mesma metodologia descrita na seção 3.2.1.

3.2.5 Análises estatísticas

O Modelo Linear Generalizado (GLM) foi usado para avaliar as possíveis diferenças na densidade de bactérias do biofilme antes e depois do procedimento do ultra-som com 6 e 12 dias de exposição. A ANOVA *one-way* foi usada para testar as possíveis diferenças na percentagem de marcação de células bacterianas entre os diferentes marcadores no CF. Para avaliar as possíveis diferenças na densidade de bactérias entre as metodologias de CF, MEF e MEV foi utilizado a análise GLM para cada tempo de exposição. Para as análises GLM, o modelo utilizado foi adaptado aos dados com distribuição de Poisson com função de ligação "log" utilizando o software livre R (2016). As análises foram seguidas do teste a *post-hoc* Tukey. Uma Correlação foi aplicada para avaliar a relação entre as medidas das bactérias entre as metodologias de CF, MEF e MEV, sendo seguida de uma Regressão.

3.3 Síntese dos Resultados

Quando analisada a eficiência da metodologia do ultra-som para o desprendimento de bactérias associadas ao biofilme do substrato, foi possível observar uma remoção de 94 % e 93 % da densidade bacteriana com 6 ($p < 0,001$) e 12 dias ($p < 0,001$) de idade, respectivamente.

Em relação ao desempenho do citômetro de fluxo em contar bactérias por diferentes métodos de marcação, foi observado que para BP com 6 ($F_{(4,45)}=0,041$; $p=0,997$) ou 12 dias de exposição ($F_{(4,45)}=0,009$; $p=1,000$), os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, para as BB, foi verificado um alto número de partículas não marcadas pelo tratamento com o marcador PI (6,63 %) comparado ao não marcado (0,00 %), AO (1,02 %) e SYTO9 (0,26 %) com 6 dias de idade ($F_{(4,45)}=5,675$; $p < 0,009$) e pelo tratamento PI (10,64 %) em relação aos tratamentos não marcado (0,00 %), AO (1,04 %), DAPI (1,02 %) e SYTO9 (0,56 %) com 12 dias de idade ($F_{(4,45)}=4,798$; $p < 0,02$).

Quando comparada às metodologias CF (não marcado) e as microscopias MEF e MEV para estimar a densidade de bactérias, foram observados resultados similares entre as metodologias tanto para as BP ($p=0,094$ com 6 dias de exposição) quanto para as BB ($p=0,058$ com 6 e $p=0,051$ 12 dias de idade). No entanto, com 12 dias de exposição, a densidade de BP estimada pela MEF foi diferente da estimativa do CF ($p<0,001$), embora similar ao MEV ($p=0,316$). Para todas as observações, a metodologia de MEF apresentou uma maior estimativa de densidade média de bactérias quando comparada ao MEV e ao CF.

Sobre as medidas, a técnica de CF superestimou o tamanho (μm), o biovolume (μm^3), e a biomassa (pg C cell^{-1}) de BP e de BB, quando comparada às metodologias MEV e MEF com 6 e 12 dias de exposição/idade. Entretanto, existe uma correlação positiva ($r=0,972$; $p<0,001$) entre as três metodologias, que permite a correção para os dados do CF.

3.4 Conclusão

- (i) O ultra-som (três pulsos de 15 s, 20 kHz, em cada lado do substrato) é uma eficiente ferramenta para a remoção de bactérias associadas ao biofilme marinho em substratos de madeira (área de 12 cm^2 em 50 mL de solução);
- (ii) Análises em CF (sem marcador) promovem uma quantificação eficiente de bactérias marinhas planctônicas e associadas ao biofilme quando comparadas à mesma técnica com uso de marcadores ou às microscopias MEF e MEV;
- (iii) As microscopias (MEF e MEV) propiciam uma estimativa mais precisa do tamanho de BP e de BB comparado ao CF. No entanto, as medidas obtidas pelo CF apresentam uma correlação positiva e significativa com as técnicas de MEF e MEV, desta forma, as medidas (tamanho, biovolume e biomassa) obtidas no CF permitem inferir de maneira segura se uma determinada amostra possui bactérias menores ou maiores que outra, comparando o FSC-A e podem ser corrigidas através do uso de equações:

$$\text{MEF}_{\text{Log}(x+1)} = -0,3412 + 0,61044 * \text{CF}_{\text{Log}(x+1)}$$

$$\text{MEV}_{\text{Log}(x+1)} = -0,3115 + 0,60696 * \text{CF}_{\text{Log}(x+1)}$$

- (iv) O CF pode ser usado como ferramenta para estudos de bactérias aquáticas planctônicas e associadas ao biofilme. As análises são rápidas e o custo de preparação das amostras, quando sem marcador, é baixo, permitindo o uso de um número maior de réplicas no estudo.

(ver resumo referente ao artigo completo submetido ao periódico Progress in Oceanography no APÊNDICE I, página 142)

4 CAPÍTULO II

“Investigação piloto dos principais fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a colonização de invertebrados em substratos consolidados”

Objetivo 2

4.1 Introdução

A relação entre a colonização de esclerobiontes (organismos epi- e endobiontes (Taylor & Wilson 2003)) e as características do substrato tem sido amplamente debatida por vários estudos sobre os ambientes marinhos modernos, bem como relacionados ao registro fóssil (Rodland *et al.* 2004, Bromley & Heinberg 2006).

Existem muitos estudos que compararam os padrões de colonização de esclerobiontes entre diferentes substratos (Freckelton *et al.* 2017). No entanto, ainda não há consenso sobre os principais fatores que podem afetar a colonização destes organismos em restos biológicos de invertebrados e vertebrados (*e.g.*, conchas, carapaças, esqueletos e ossos), os quais podem atuar como superfícies de colonização para o zooplâncton, especialmente em plataformas continentais cobertas por substratos não consolidados. Embora, em superfícies consolidadas não biológicas, a textura seja frequentemente citada (Hills & Thomason 1998, Carl *et al.* 2012, Whalan *et al.* 2015) juntamente com fatores biológicos, como competição por recursos (Agostini & Ozorio 2016), presença de coespecífico (Petroni *et al.* 2015) e interações ecológicas inter-específicas (Cangussu *et al.* 2010, Chung *et al.* 2010, Freckelton *et al.* 2017), que podem induzir ou repelir a colonização.

Experimentos realizados em substratos consolidados não biológicos, como aço, madeira e concreto, demonstraram que o assentamento de invertebrados pode ser positivamente (Hadfield *et al.* 2011) ou negativamente (Faimali *et al.* 2004) influenciado pelo biofilme bacteriano. Esses biofilmes são compostos por múltiplas espécies de bactérias envoltas por uma matriz polimérica extracelular, e seu desenvolvimento pode alterar a atratividade de um substrato consolidado para o perifíton, protozooplâncton, macroalgas e invertebrados (Freckelton *et al.* 2017).

Desta forma, o objetivo do presente capítulo foi avaliar a colonização do metazooplâncton em conchas vazias de moluscos com diferentes características físicas, químicas e biológicas (textura, posição, tamanho, cor, composição e exposição do substrato, bem como densidade de bactérias do biofilme e potencial metazooplancônico) a fim de investigar de forma piloto quais são os principais fatores que levam ao estabelecimento de organismos nestes substratos consolidados e mensurar o quanto do

padrão observado experimentalmente é preservado em assembleias de conchas ao longo do tempo.

4.2 Síntese da Metodologia

4.2.1 Observação experimental: colonização do zooplâncton

Conchas de *Anadara brasiliiana* (Lamarck, 1819), *Mactra isabelleana* d'Orbigny 1846 e *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) foram utilizadas para os experimentos, uma vez que são abundantes e possuem texturas externas distintas e cores semelhantes (branco = cor natural ou reduzida). Todas as conchas (36 espécimes, 12 de cada espécie) foram coletadas na Praia dos Concheiros, RS, Brasil (Figura 7B). Cada concha foi previamente observada sob um microscópio (Olympus BH-2) para garantir que não haviam injúrias (*i.e.*, predação, bioerosão, incrustação, fragmentação) e categorizadas usando sua textura (ornamentação) externa (0=*A. mactroides*; 2=*M. isabelleana*; 3=*A. brasiliiana*).

Posteriormente, as conchas foram depositadas em seis aquários (20 cm de diâmetro, 18 cm de altura) com água estuarina (filtrada através de uma malha de 20 µm) e mantidas a uma salinidade (23 ± 2), temperatura (25 °C) e fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro) constantes. As conchas foram depositadas nos aquários de forma que permitiu que os lados internos (côncavos) ou externos (convexos) ficassem expostos com seis réplicas. Uma vez por semana, a água foi parcialmente renovada (50 %), e a comunidade de zooplâncton também foi substituída. O suprimento de plâncton foi coletado no canal do estuário da Lagoa de Patos, localizado em Rio Grande, no sul do Brasil (Figura 7A). Em cada reposição, duas amostras foram coletadas usando uma rede de plâncton cônica (200 µm de malha) equipada com um fluxômetro (Hydro-Bios®). Após a coleta, as amostras de plâncton foram filtradas em malha de 500 µm para remover os principais predadores. Uma amostra foi dividida em seis partes iguais (quarteador Motoda) e colocada nos aquários, enquanto a outra amostra foi fixada (formaldeído a 4 %) para analisar o potencial do zooplâncton em colonizar as conchas.

4.2.2 Observação experimental: colonização do biofilme microbiano

Para avaliar a colonização das conchas por biofilmes bacterianos, cinco conchas de cada espécie (*A. brasiliiana*, *M. isabelleana* e *A. mactroides*) foram processadas em ultrassom (Oliveira *et al.* 2006) para o desprendimento de bactérias previamente aderidas, e fixadas a um cais localizado no canal do estuário da Lagoa de Patos (Figura 7B) durante o verão austral de 2014 (salinidade 23 ± 2 , temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Os tamanhos das conchas foram os mesmos que os usados no experimento laboratorial. As conchas foram recuperadas após cinco semanas de exposição e imersas em uma solução estéril de formaldeído a 4 % (50 mL). No laboratório, o biofilme foi destacado das superfícies usando três pulsos de 20 kHz por 15 segundos em cada lado das conchas com auxílio de um ultra-som Cole-Parmer® (series 4710 - *ultrasonic homogenizer*) (Oliveira *et al.* 2006).

A densidade de bactérias do biofilme (bact cm^{-2}) foi estimada através do citômetro de fluxo (BDFACSVerse™). No entanto, o tamanho das bactérias foi estimado usando microscopia de epifluorescência. O biovolume celular (μm^3) foi estimado e convertido para biomassa celular bacteriana (pg C cell^{-1}) usando o fator de conversão alométrico ($0,09 \cdot \text{biovolume}^{0,09}$) de Sun & Liu (2003) e Norland (1993), respectivamente.

Para avaliar a comunidade microbiana, o material biológico em suspensão obtido de cada concha foi filtrado (1 mL) através de filtros de policarbonato (escurecidos com Irgalan Black), corados com Laranja de Acridina (1 %) e observados em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan) sob aumento de 1000 \times .

4.2.3 Observação de campo: assembleia de moluscos

Para quantificar os esclerobiontes em conchas de moluscos, as amostras foram coletadas da Praia dos Concheiros (Figura 7B) na região costeira do sul do Brasil em dezembro de 2013. Esta localidade é conhecida por ter concentrações densas de bioclastos formadas por conchas transportadas a partir da plataforma continental interna durante eventos de tempestade. Cinco a sete quadrados (300 x 300 cm) foram

delimitados por transectos, sendo coletada uma camada de 5 cm. Um total de 11 transectos foram amostrados (Figura 7C).

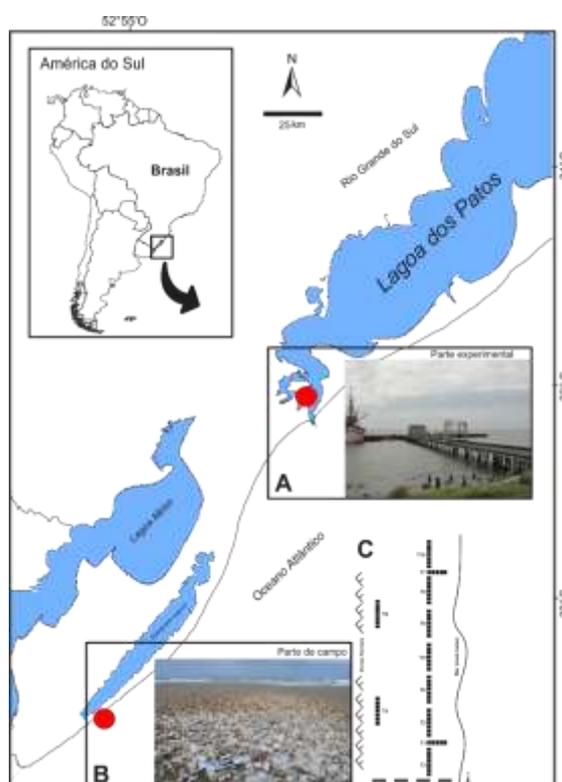


Figura 7. Área de estudo na costa do sul do Brasil. **A:** estuário da Lagoa dos Patos. Onde o experimento foi conduzido **B:** Praia dos Concheiros onde as amostras de conchas foram coletadas.

Todo o material coletado de cada quadrado foi identificado e armazenado em sacos de plástico e levados ao laboratório, onde foram lavados com água doce e peneirados com malhas de 500 μm . Os esclerobiontes, bem como as conchas foram identificados ao menor nível taxonômico possível. Além disso, as conchas foram caracterizadas de acordo com seu (i) modo de vida (infaunal profundo, infaunal sub-superficial, epifaunal de vida livre ou epifaunal incrustante), (ii) complexidade de ornamentação, interna (presente ou ausente) e externa (complexidade variando de ausente, pouca, média e alta), (iii) mineralogia predominante (aragonita, calcita, biominerálica) e (iv) cor (natural, reduzida, oxidada). As marcas deixadas pelos organismos colonizadores também foram consideradas (bioerosão); sendo identificadas e quantificadas sob um microscópio estereoscópico (Olympus BH-2) para determinar a presença ou ausência, porcentagem de cobertura e a localização da colonização na concha (parte interna ou externa).

4.2.4 Análises estatísticas

Para avaliar o potencial do zooplâncton (a relação entre os metazoários presentes na coluna de água e os colonizadores nos substratos disponíveis), a composição em cada amostra de zooplâncton foi estimada a partir de alíquotas (1-5% da amostra) e analisadas em câmara de Bogorov em microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg), sendo os resultados comparados à ocorrência nas conchas. O Modelo Linear Generalizado (GLM) foi utilizado para testar as diferenças entre a densidade e o número de taxa do zooplâncton estabelecido nas conchas e o lado da concha exposta (interno e externo). A análise GLM foi também aplicada para avaliar a densidade bacteriana do biofilme nas diferentes conchas de bivalves. O modelo foi adaptado à distribuição de Poisson com uma função de *link* "log". Os dados coletados da assembleia de moluscos foram transformados em variáveis categóricas usadas para observar a frequência de ocorrência de esclerobiontes (%) (bioerosão + incrustação) entre diferentes modos de vida, tamanhos das conchas, cor, ornamentações e mineralogias. A análise GLM foi utilizada para testar as possíveis diferenças. O modelo foi adaptado aos dados usando uma distribuição Binomial/Multinomial com uma função de *link* "logit". O teste a *post hoc* Tukey seguiu as análises. Foram aplicadas correlações para avaliar a relação entre a densidade de metazooplâncton estabelecida, a densidade de bactérias do biofilme e as diferentes ornamentações (textura) das conchas. Além de verificar a relação entre as diferentes variáveis categóricas e identificar possíveis covariâncias entre elas. Todas as análises foram realizadas no software R (2016).

4.3 Síntese dos Resultados

4.3.1 Observação experimental: colonização do zooplâncton

Os taxa meroplancônicos representaram 25 % (3.434 organismos m⁻³) do zooplâncton coletado no canal no estuário da Lagoa de Patos, enquanto o holoplâncton 74 % e o ticoplâncton 1 %. No entanto, o meroplâncton continha um maior número de taxa. Os organismos meroplancônicos dominantes foram gastrópodes (339 ± 426 org m⁻³), seguidos de bivalves (190 ± 228 org m⁻³), cirripédios (139 ± 87 org m⁻³),

hidromedusas ($29 \pm 36 \text{ org m}^{-3}$), poliquetas ($22 \pm 22 \text{ org m}^{-3}$) e decápodes ($10 \pm 17 \text{ org m}^{-3}$). Com relação aos colonizadores, bivalves, gastrópodes e cirripédios estiveram presentes em todas as conchas. No entanto, os decápodes foram registrados apenas em *Anadara brasiliiana*, enquanto os copépodos somente nas conchas de *A. brasiliiana* e *Mactra isabelleana*, e os pólipos de hidrozoários somente em *Amarilladesma mactroides*.

Foram observadas diferenças significativas na densidade de colonização do zooplâncton em relação às conchas ($p < 0,001$). No entanto, o número de taxa não foi alterado ($p = 0,243$). Não foram observadas diferenças de colonização entre o lado interno e externo das conchas (densidade $p = 0,280$; número de taxa $p = 0,111$), embora este fator possa afetar a densidade de assentamento de invertebrados ao interagir com o substrato ($p < 0,041$). A superfície interna apresentou o maior número de taxa médio, e foi composta principalmente de invertebrados sedentários e vágéis. *A. brasiliiana*, seguida por *M. isabelleana*, apresentou a maior densidade e o maior número de taxa estabelecido em comparação com *A. mactroides*. Foi observada uma correlação positiva ($r = 0,806$) e significativa ($F_{(1,13)} = 24,131$; $p < 0,001$) entre a densidade de colonização do metazooplâncton e a textura (ornamentação) externa, sendo superfícies mais heterogêneas mais atrativas.

4.3.2 Observação experimental: colonização do biofilme microbiano

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) na densidade bacteriana (bact cm^{-2}) entre as conchas avaliadas: *A. brasiliiana* apresentou a maior densidade de bactérias associadas ao biofilme ($16,3 \times 10^6 \pm 2.885$) seguida de *M. isabelleana* ($4,6 \times 10^6 \pm 32.951$) e *A. mactroides* ($1,2 \times 10^6 \pm 473.448$). Observou-se uma correlação positiva ($r = 0,896$) e significativa ($F_{(1,13)} = 49,278$; $p < 0,001$) entre a densidade das bactérias do biofilme e o grau de ornamentação externa das conchas.

Amarilladesma mactroides apresentou células bacterianas maiores ($\sim 0,7 \mu\text{m}$) do que as demais conchas e conseqüentemente um maior biovolume e biomassa, $13,18 \mu\text{m}^3$ e $0.114 \text{ pg C}^{-1} \text{ célula}^{-1}$, respectivamente. No entanto, uma comunidade microbiana mais complexa foi registrada para *M. isabelleana* e *A. brasiliiana*, com a presença de diatomáceas e fungos. Observou-se uma correlação positiva ($r = 0,878$) e significativa

($F_{(2,27)}=28,352$; $p<0,001$) entre a densidade de metazooplâncton estabelecido, a densidade de bactéria do biofilme e o grau de ornamentação externa das conchas.

4.3.3 Observação de campo: assembleia de moluscos

Das 1.965 conchas de moluscos (58 gastrópodes e 1.907 bivalves) coletadas na Praia dos Concheiros, apenas 828 apresentaram esclerobiontes (incrustação ou bioerosão). Organismos incrustantes foram registrados em apenas 87 conchas, embora os vestígios desses organismos foram observados em 741 conchas. Observou-se diferença significativa na colonização total de esclerobiontes entre as classes Bivalvia e Gastropoda ($p<0,001$).

A colonização do esclerobiontes também foi significativamente diferente entre as espécies ($p<0,001$) de ambas as classes. As conchas de *Crepidula* spp. e *Glycymeris* spp. exibiram o maior número de esclerobiontes entre os Gastropoda e Bivalvia, respectivamente. Conchas dos gastrópodes *Epitonium* sp. e *Sinum* sp., bem como os bivalves *Amarilladesma mactroides*, *Brachidontes* sp., *Laevicardium* sp., e *Perna perna*, não apresentaram organismos incrustantes ou bioerosão.

Os modos de vida e os tamanhos das conchas influenciaram na ocorrência de colonização de esclerobiontes em gastrópodes ($p<0,048$) e bivalves ($p<0,001$). Os moluscos epifaunais e infaunais rasos apresentaram maiores níveis de colonização. Aparentemente, a alteração da cor do substrato afeta a colonização de esclerobiontes nas conchas de gastrópodes ($p<0,050$) e bivalves ($p<0,001$), já que as conchas oxidadas (com coloração creme, amarelo, ocre ou vermelho) foram colonizadas preferencialmente.

Os níveis variados de ornamentação externa em Gastropoda não mostraram influência sobre a colonização do esclerobionte ($p=0,581$). Em contraste, a ornamentação de conchas de bivalves parece ser um fator-chave que controla o processo de colonização. As conchas com graus médios e altos de complexidade de ornamentação externa têm significativamente ($p<0,001$) mais esclerobiontes do que as conchas de bivalves com baixo grau de ornamentação, e o mesmo padrão foi observado para as superfícies internas das conchas ($p<0,001$). A mineralogia da concha também

influenciou a colonização, com significativamente mais incrustação e bioerosão, ocorrendo em conchas de bivalves compostas predominantemente por calcita ($p < 0,001$).

A maioria dos fatores analisados são covariáveis. O tamanho é um fator-chave, que está significativamente correlacionado com todas as variáveis. O tamanho está positivamente correlacionado com a cor e dano tafonômico, enquanto está negativamente correlacionado com ornamentação externa e mineralogia. Assim, tanto para os gastrópodes quanto para os bivalves, observou-se uma maior colonização média em conchas maiores que 1.351 mm^2 (gastrópodes $p < 0,037$; bivalves $p < 0,019$), enquanto não foram observadas diferenças significativas nas classes menores ($51\text{-}150 \text{ mm}^2$ para gastrópodes e $< 50 \text{ mm}^2$ para bivalves). Quando a bioerosão foi analisada separadamente da incrustação, esse padrão permaneceu o mesmo. No entanto, a incrustação ocorreu preferencialmente em gastrópodes $> 1.351 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$), enquanto nenhuma diferença foi observada para os bivalves ($p = 0,876$).

4.4 Conclusão

- (i) O metazooplâncton coloniza diferentes tipos de substratos (conchas), mas a densidade e o número de taxa são afetados pelas características físicas, químicas e biológicas do substrato. Além disso, a fauna incrustante está mais associada ao lado externo das conchas (maior heterogeneidade), enquanto a fauna vágil e sedentária está mais associada ao lado interno;
- (ii) A textura externa das conchas influencia diretamente a densidade de bactérias do biofilme, enquanto a colonização do zooplâncton responde diretamente à densidade das bactérias do biofilme e à biofilmes mais complexos, e conseqüentemente à textura (ornamentação) externa das conchas;
- (iii) O tamanho da concha é uma das variáveis mais significativas em relação à colonização dos invertebrados (esclerobiontes). A ornamentação externa também influencia a colonização, como demonstrado experimentalmente.

No entanto, todos os fatores podem ter um efeito covariável, afetando uns aos outros;

- (iv) Os padrões de ocorrência de colonização observadas para as conchas de bivalves não se aplicam da mesma maneira às conchas de gastrópodes (ornamentação externa e modo de vida/ exposição ao meio), o que provavelmente está relacionado a outros fatores que não foram avaliados;
- (v) Padrões semelhantes de ocorrência de colonização foram observadas entre os dados experimentais e deposicionais (assembleia de conchas), apesar do viés tafomonômico, mostrando um padrão de colonização. Essas observações permitem inferir que um experimento pode ser usado para explicar padrões paleontológicos.

(ver artigo completo publicado no periódico Plos One no APÊNDICE II, página 144)

5 CAPÍTULO III

**“Seleção e avaliação de antimicrobianos para inibição
de bactérias e fungos em cultivos marinhos
controlados: potencial, efeito, eficiência e metodologia
de aplicação”**

Objetivo 3

5.1 Introdução

Experimentos científicos laboratoriais envolvendo populações ou comunidades aquáticas são muitas vezes prejudicados pela presença de bactérias no meio de cultivo, que podem ser responsáveis por camuflar os resultados, devido ao papel que desempenham dentro da comunidade (Spencer 1952). Embora, a real interferência destes micro-organismos em sistemas aquáticos, mesmo laboratoriais, seja difícil de ser mensurada, pois condições, total (axênicas) ou parcialmente (semi-axênicas) livres de bactérias, são dificilmente atingíveis por longos períodos (Trottet *et al.* 2011). Neste contexto, um método eficiente para a inibição de bactérias, que não prejudique os organismos não-alvo, é necessário para permitir o estabelecimento de cultivos sem a sua influência, bem como, para a execução de testes de hipóteses que avaliem e quantifiquem o real papel destes micro-organismos na comunidade (Agostini 2014).

Yetka & Wiebe (1974) propuseram a utilização de inibidores procarióticos, tais como antibióticos, como uma ferramenta para inibir bactérias aquáticas e, assim, permitir a execução de experimentos científicos de cunho ecológico. Posteriormente, vários autores relataram sucesso no uso dessas substâncias para quantificar a respiração bacteriana (Pringault *et al.* 2009), crescimento bacteriano (Wheeler & Kirchmann 1986) e assimilação de nitrogênio (Fouilland *et al.* 2007), bem como para compreender as interações tróficas aquáticas (DeLorenzo *et al.* 2001).

Estes inibidores também podem excluir a competição entre grupos, beneficiando o crescimento de um grupo particular, como as microalgas (Droop 1967, Hamdan & Jonas 2007, Creswell 2010, Molina-Cárdenas *et al.* 2016), ou acelerar o desenvolvimento de espécies aquáticas tais como invertebrados e larvas de peixe (Conover 1967, Tighe-Ford *et al.* 1970, Verner-Jeffreys *et al.* 2004, Roberts *et al.* 2007, Agostini 2014, Howes *et al.* 2014).

Antimicrobianos têm sido usados há muito tempo para controlar doenças bacterianas e fúngicas na aquicultura, mas o uso maciço dessas substâncias sem cuidado ou controle resultou em uma limitação/proibição dessas substâncias em alguns países onde a produção era destinada ao consumo humano (Defoirdt *et al.* 2007). No entanto, com o devido cuidado, este procedimento pode ser utilizado em experimentos científicos dirigidos à obtenção de sistemas sem ou com o mínimo de contaminação

microbiana. Em contrapartida, para o uso de antimicrobianos em experimentos científicos, é necessário estimar a eficiência real dessas substâncias nas populações alvo (*i.e.*, bacteriana), e avaliar o seu efeito em diferentes níveis da comunidade, utilizando organismos não-alvo como bioindicadores (Agostini 2014, Agostini *et al.* 2016).

A aplicação da combinação de antibióticos: 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 proposta por Agostini (2014) em ensaios laboratoriais com a comunidade planctônica marinha resultou em uma inibição de até 95 % de bactérias associadas ao biofilme, bem como não causou mortalidade a organismos não alvo, apresentando potencial de utilização para o teste de hipóteses envolvendo a comunidade aquática. No entanto, este tratamento apresentou crescimento de fungos, sendo necessário a inclusão de um antifúngico e conseqüentemente testes para o desenvolvimento de um protocolo eficaz e seguro.

Desta forma, os objetivos deste capítulo são: (i) confirmar o potencial de utilização da combinação de antibióticos: 0,025 g L⁻¹ de penicilina + 0,08 g L⁻¹ de estreptomicina + 0,04 g L⁻¹ de neomicina e o crescimento de fungos, caso confirmado, (ii) incluir o antifúngico nistatina (Finley 2012) a esta combinação, determinando a sua concentração ideal para inibição de fungos (iii) sem afetar de modo agudo organismos planctônicos não-alvo (*i.e.*, holoplâncton, meroplâncton, bentos e fitoplâncton), (iv) determinar a CI₅₀, CL₅₀ e CE₅₀ de cada antimicrobiano, (v) verificar o efeito do tratamento de antimicrobianos selecionado na inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme e (vi) avaliar métodos de manuseio e aplicação que garantam uma maior eficiência, a fim de utilizar os antimicrobianos como ferramenta para o teste de hipóteses em meio marinho laboratorial.

5.2 Síntese da Metodologia

5.2.1 Confirmação do potencial da combinação de antibióticos

Foi realizado um experimento para avaliar o real potencial do uso da combinação de antibióticos proposto por Agostini (2014) em comparação a outros tratamentos, envolvendo os antibióticos mais citados na literatura para uso em cultivos

de plâncton marinho (ver resumo referente a revisão sobre antimicrobianos submetida ao periódico *Latin American Journal of Aquatic Research* no APÊNDICE III, página 178).

Para avaliar o efeito de diferentes combinações de antibióticos na comunidade planctônica marinha foram utilizados cinco tratamentos com doze repetições com três copépodos da espécie *Acartia tonsa* Dana 1849, sugerida pela ISO (ISO 14669 1999) como sensível, com 1 organismo 20 mL⁻¹, sendo contabilizada a sua sobrevivência a cada 24 h durante 72 h (Delupis *et al.* 1992). O meio de cultivo foi semi-estático, sendo completamente renovado a cada 24 horas para assegurar o efeito dos agentes antimicrobianos utilizados. A Tabela 3 apresenta os tratamentos utilizados para realização do experimento.

Posteriormente, um segundo experimento foi realizado para avaliar os efeitos iniciais do tratamento de antibióticos na comunidade bacteriana, com os melhores resultados de sobrevivência obtidos no primeiro experimento, bem como a sua meia-vida em meio marinho laboratorial.

Tabela 3. Apresentação dos tratamentos avaliados.

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos
T1	0,75 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,75 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina (modificado de Spencer 1952)
T2	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina (Agostini 2014)
T3	0,63 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,3 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,05 g.L ⁻¹ sulfato de neomicina + 0,01 g L ⁻¹ cloranfenicol (Droop 1967)
T4	0,02 g L ⁻¹ cloridrato de oxitetraciclina (Pereira Jr <i>et al.</i> 2006)

O experimento foi estático e representado por dois tratamentos contendo o meio de cultivo (120 mL) e seis substratos de madeira para o crescimento do biofilme. Para estimar a densidade de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme, foram retiradas alíquotas do meio (1 mL) e substratos após 6, 12, 24, 72, 120 e 168 horas de exposição de tratamento, em trélicas (Figura 8).



Figura 8. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.1 para confirmação do potencial dos antibióticos.

5.2.2 Inclusão do antifúngico e avaliação dos efeitos na comunidade planctônica

A partir dos resultados obtidos na seção 5.2.1, foram realizados experimentos para avaliar a sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa* (holoplâncton), do cirripédio *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854) (meroplâncton) e da microalga *Conticribra weissflogii* Stachura-Suchoples e Williams 2009 (fitoplâncton) expostos à combinação de antibióticos (penicilina, estreptomicina e neomicina) propostos, em diferentes concentrações, por Agostini *et al.* (2016) e DeLorenzo *et al.* (2001) (Tabela 4), somado à concentração de nistatina proposta por Finley (2012).

Dois copépodos, um macho e uma fêmea, foram colocados em unidades experimentais (UE) (1 organismo 25 mL⁻¹), um volume maior que o experimento anterior devido ao uso de uma malha de 140 µm para separar os copépodos dos ovos e pellets fecais produzidos (Runge & Roff 2000), com oito réplicas. Os copépodos foram expostos a diferentes cenários de aplicação dos antimicrobianos: no meio de cultivo e no alimento (MF), somente no meio de cultivo (M) e somente no alimento (F). Enquanto as cíprias dos cirripédios foram depositadas em outras UE (similares a placas multiposços) individualmente (1 organismo mL⁻¹) com seis réplicas por tratamento. Os experimentos foram estáticos e cada UE foi observada a cada 24 horas durante 96 horas (Resgalla & Laitano 2002). Os ovos e as pelotas fecais produzidas pelos copépodos

foram contabilizadas apenas ao final do experimento (96 horas) para avaliar os efeitos dos tratamentos na alimentação e na reprodução.

Tabela 4. Apresentação dos tratamentos utilizados para avaliar o potencial de inclusão do antifúngico nistatina ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) proposto por Finley (2012) à combinação de antibióticos proposto por DeLorenzo et al. (2001) e Agostini *et al.* (2016).

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos
T _A	$0,025 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de neomicina (Agostini <i>et al.</i> 2016)
T _{A+nistatina}	$0,025 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g L}^{-1}$ sulfato de neomicina + $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de nistatina
T _D	$0,025 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de neomicina (DeLorenzo <i>et al.</i> 2001)
T _{D+nistatina}	$0,025 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de neomicina + $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de nistatina

Para o experimento com *Conticribra weissflogii*, foi utilizada a concentração inicial de $31 \text{ células mL}^{-1}$, mantidas em 200 mL de meio, com seis repetições para cada tratamento. O experimento foi estático. Para acompanhar o aumento da densidade celular, foram amostrados 2 mL de cada UE (200 mL) com 24, 96, 168 horas de exposição, no mesmo horário e após a homogeneização. O material foi depositado em tubos de reação e fixado com lugol (1 %) (Thronsen 1978). As contagens de células foram realizadas em câmaras de Neubauer sob um microscópio ($40\times$ - Olympus BH-2) (Figura 9).

A partir dos resultados obtidos, um quarto experimento foi realizado a fim de avaliar a sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa* em contato com o tratamento de antibióticos que apresentou a maior sobrevivência nos experimentos anteriores com diferentes concentrações de nistatina, sendo dois indivíduos, sem distinção de sexo, depositados em cada UE ($1 \text{ organismo } 20 \text{ mL}^{-1}$), com dez réplicas por tratamento. O experimento foi semi-estático. Para avaliar o impacto dos tratamentos sobre a sobrevivência do copépodo, cada UE foi observada a cada 24 horas durante 96 horas (Resgalla & Laitano 2002). A Tabela 5 apresenta os tratamentos testados.

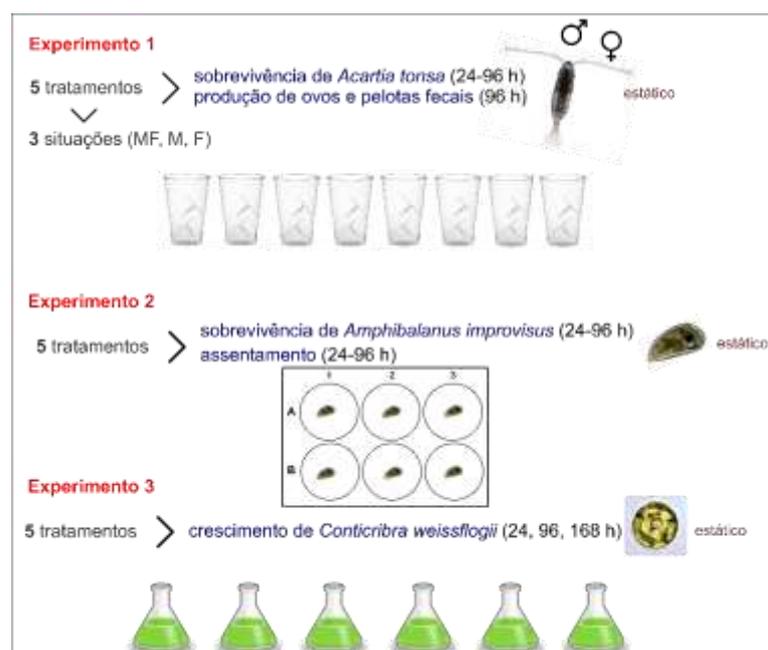


Figura 9. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.2 para inclusão do antifúngico à combinação de antibióticos e avaliação dos efeitos na comunidade planctônica não alvo.

Posteriormente, foi realizada a avaliação da eficácia e da meia-vida da combinação de antibióticos na inibição de bactérias e fungos aderidos, com os tratamentos que apresentaram a maior sobrevivência de *Acartia tonsa*, em réplicas.

Tabela 5. Apresentação dos tratamentos utilizados para avaliar o potencial de inclusão de diferentes concentrações de nistatina à combinação de antibióticos proposta por Agostini *et al.* (2016).

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos
T _A	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina (Agostini <i>et al.</i> 2016)
T _{A+n1}	T _A + 0,0025 g L ⁻¹ nistatina
T _{A+n2}	T _A + 0,005 g L ⁻¹ nistatina
T _{A+n3}	T _A + 0,01 g L ⁻¹ nistatina
T _{A+n4}	T _A + 0,015 g L ⁻¹ nistatina
T _{A+n5}	T _A + 0,02 g L ⁻¹ nistatina

Para tal, foram depositados seis substratos de madeira em novas UE (120 mL). Para estimar a densidade de bactérias do biofilme, os substratos foram retirados após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 48 e 168 horas de exposição aos tratamentos, sendo o experimento estático (Figura 10).



Figura 10. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.2 para inclusão do antifúngico à combinação de antibióticos e avaliação dos efeitos na comunidade bacteriana.

5.2.3 Influência da salinidade e da contaminação via ar

Após selecionar o tratamento composto por antibióticos e antifúngico nos experimentos da seção 5.2.2, realizou-se um experimento dividido em cinco etapas. Primeiramente, foi avaliada a sobrevivência e o assentamento do cirrípede *Amphibalanus improvisus* em meio de cultivo com a combinação selecionada de antimicrobianos: 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina, exposta a diferentes salinidades (Tabela 6). O experimento foi conduzido com dois indivíduos (cipris) em cada UE (1 organismo 20 mL⁻¹) com oito réplicas por tratamento e foi semi-estático. A segunda etapa consistiu na avaliação, com 24 horas de exposição em meio estático, da inibição das bactérias planctônicas e das bactérias associadas ao biofilme com cinco réplicas (volume 100 mL) para cada um dos seis tratamentos (Figura 11).

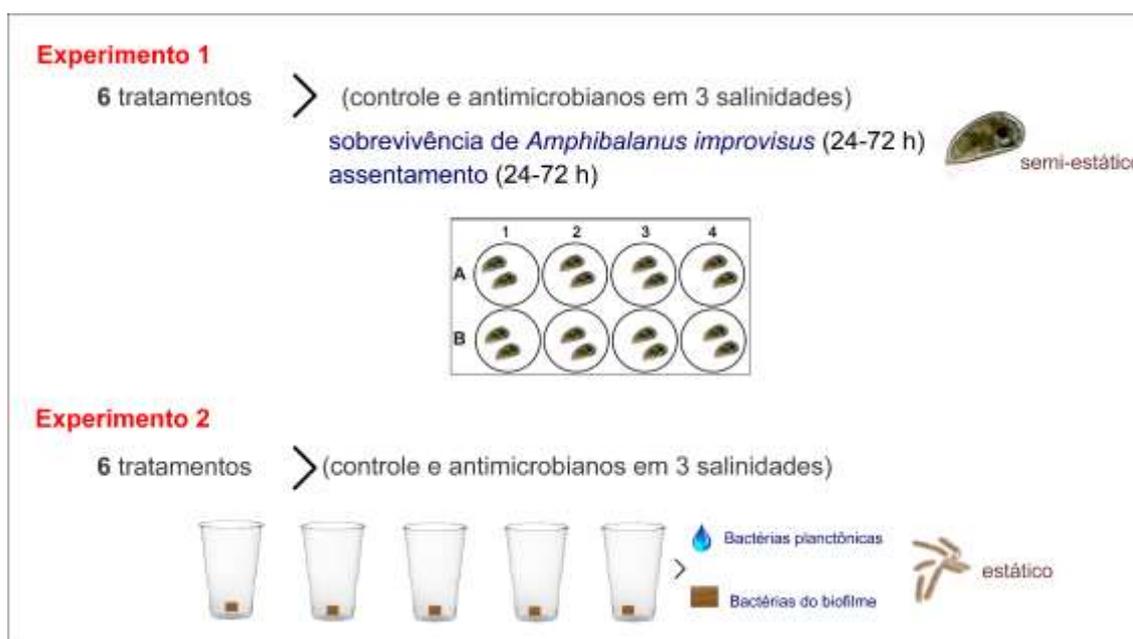


Figura 11. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.3 para avaliar a influência da salinidade na eficiência dos antimicrobianos.

Tabela 6. Apresentação dos tratamentos utilizados nos seis tratamentos em três salinidades para avaliar a resistência de *Amphibalanus improvisus* e a inibição de bactérias planctônicas e de bactérias associadas ao biofilme.

Abreviação	Composição
C _{S1}	Sem antimicrobianos em salinidade 1
T _{A+NS1}	Antimicrobianos na salinidade 1
C _{S15}	Sem antimicrobianos em salinidade 15
T _{A+NS15}	Antimicrobianos na salinidade 15
C _{S25}	Sem antimicrobianos em salinidade 25
T _{A+NS25}	Antimicrobianos na salinidade 25

Os cirripédios utilizados no experimento foram obtidos a partir de amostras de zooplâncton coletadas sob um evento *El Niño* (dezembro de 2014) (Australian Government Bureau of Meteorology 2015) no estuário interno (salinidade 1) e canal (salinidade 15) da Lagoa dos Patos, e na Praia do Cassino (salinidade 25), Rio Grande, RS (Figura 12). Para avaliar o impacto dos tratamentos sobre a sobrevivência e assentamento dos cirripédios, os cultivos foram observados a cada 24 horas durante 72 horas (Piazza *et al.* 2012).

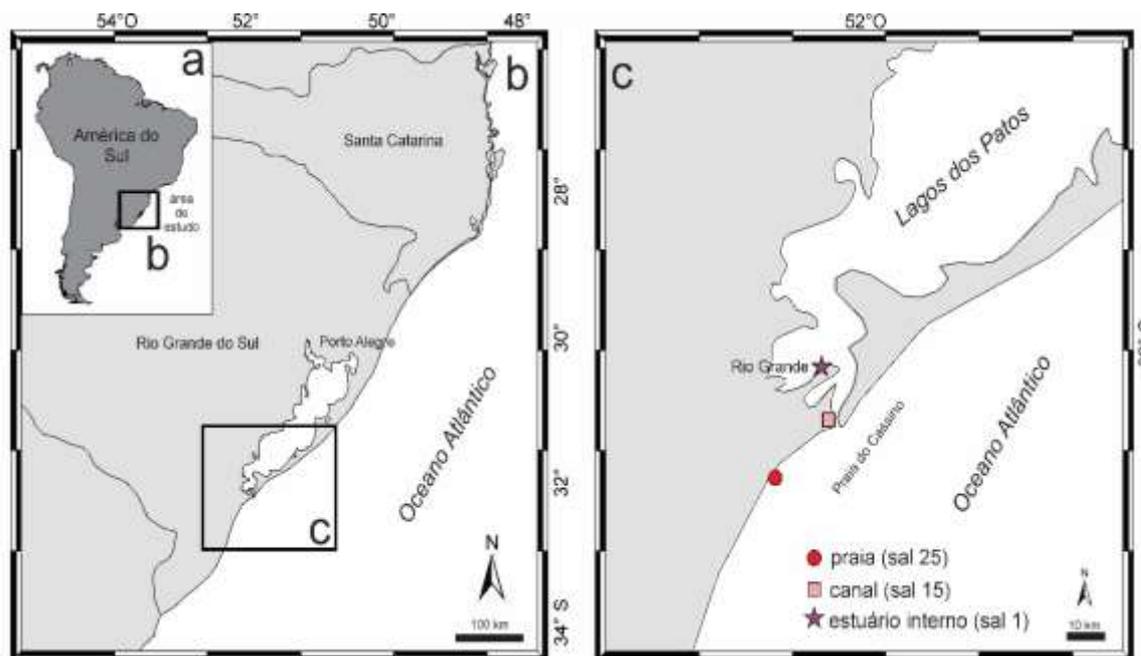


Figura 12. Mapa com localização dos pontos de coleta no município de Rio Grande no Rio Grande do Sul, Brasil.

A terceira etapa consistiu na avaliação da sobrevivência e do assentamento do cirripédio *Amphibalanus improvisus* em salinidade 25, exposto a tratamentos com antimicrobianos em cultivos abertos (sem cobertura, permitindo a contaminação via ar) e fechados (cobertos com filme PVC, evitando a contaminação via ar), com oito réplicas. Para avaliar o impacto dos tratamentos sobre a sobrevivência e assentamento dos cirripédios, os cultivos foram observados com 72 horas de exposição.

A quarta e a quinta etapa consistiram na estimativa da inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme. Para isso, dois e quatro substratos de madeira foram depositados em distintas UE (40 e 80 mL, respectivamente), e retirados em tréplica. Foram avaliados os efeitos iniciais (12 e 24 horas) (quarta etapa) e tardios (7, 14, 21 e 28 dias) (quinta etapa) dos antimicrobianos em meio de cultivo, sendo o experimento estático (Figure 12).

A Tabela 7 apresenta os tratamentos testados para avaliar a contaminação do ar na sobrevivência de *A. improvisus* e na comunidade bacteriana inicial e na comunidade de micro-organismos tardia.

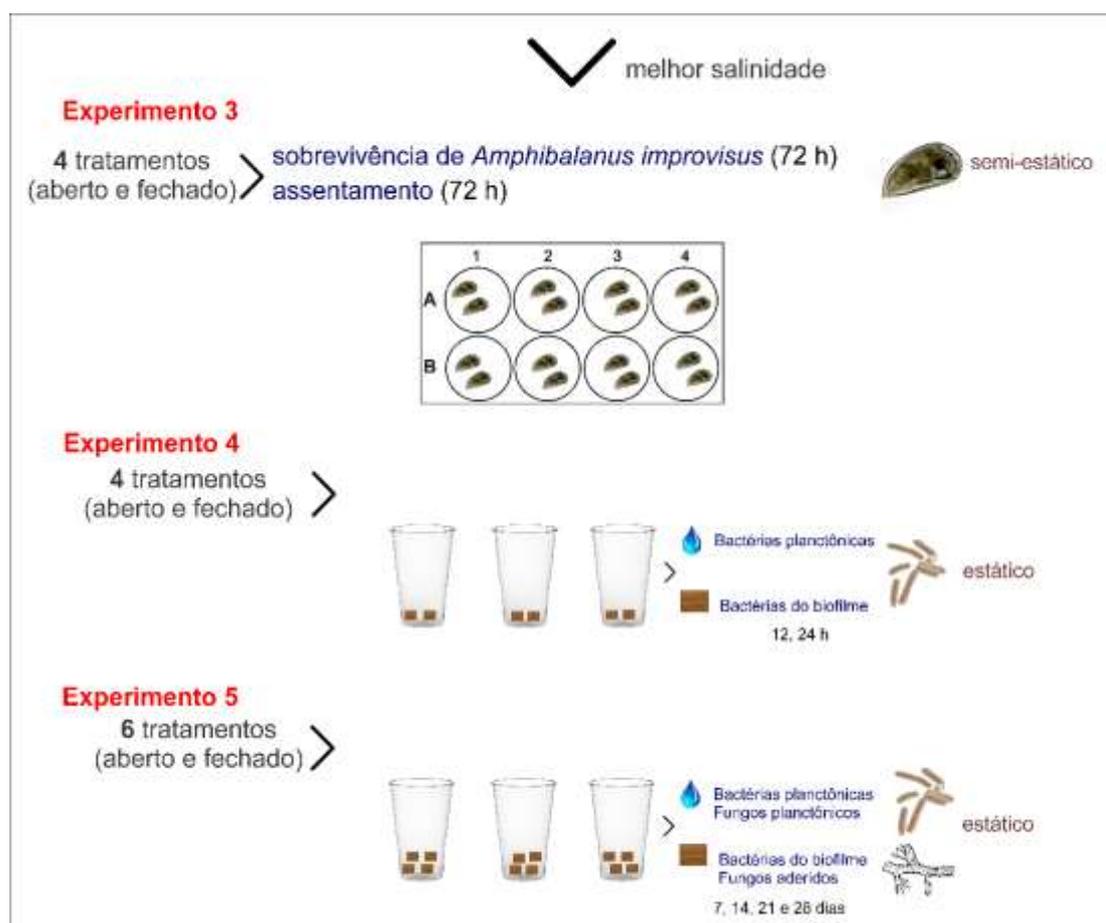


Figure 13. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.3 para avaliar a influência da contaminação via ar na eficiência dos antimicrobianos.

Tabela 7. Apresentação dos tratamentos utilizados para avaliar a contaminação do ar na sobrevivência de *Amphibalanus improvisus* e na comunidade bacteriana inicial ^(a) e na comunidade de micro-organismos tardia ^(b).

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos - aberto ^{a,b}
T _A	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina – aberto ^b
T _{A+N}	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina + 0.005 g L ⁻¹ nistatina – aberto ^{a,b}
Controle*	Sem antimicrobianos - fechado ^{a,b}
T _A *	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina - fechado ^b
T _{A+N} *	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina + 0.005 g L ⁻¹ nistatina - fechado ^{a,b}

5.2.4 Avaliação dos efeitos no fitoplâncton, micoplâncton e bacterioplâncton

Este experimento foi conduzido durante sete dias, usando cultivos de fitoplâncton das espécies *Isochrysis galbana* Parke, 1949, *Conticribra weissflogii* e *Prorocentrum micans* Ehrenberg, 1834 como bioindicadores. As culturas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer (200 mL) previamente autoclavados, contendo 100 mL de meio e inóculo, representando três tratamentos (Tabela 8) com quatro repetições cada.

As espécies foram cultivadas em diferentes meios de cultivo. Para *C. weissflogii* foi usado o meio F/2+sílica (Guillard 1975), para *I. galbana*, o meio F/2 (Guillard, 1975), e para *P. micans*, o meio L1 (Guillard & Hargraves, 1993). Todos os cultivos foram mantidos na temperatura de 25 ± 1 °C, salinidade 30 e fotoperíodo 12h:12h (claro:escuro) com luz artificial 3.780 lux em incubadora tipo DBO (Marconi 403).

Tabela 8. Apresentação dos tratamentos utilizados nos cultivos de *Conticribra weissflogii*, *Isochrysis galbana* e *Prorocentrum micans*.

Abreviação	Composição
Controle*	Sem antimicrobianos
T _A *	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina (Agostini <i>et al.</i> 2016)
T _{A+N} *	0,025 g L ⁻¹ penicilina G potássica + 0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina + 0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina + 0,005 g L ⁻¹ nistatina

A concentração inicial de *C. weissflogii*, *I. galbana*, e *P. micans* usadas no experimento foram 600, 800 e 100 células mL⁻¹, respectivamente. Em cada UE, cobertas com filme PVC, foram depositados quatro substratos de madeira para avaliar a comunidade associada ao biofilme.

Para verificar as alterações no biovolume e na densidade das células das microalgas, foram removidas diariamente amostras de 2 mL de cada cultivo após homogeneização manual. O material coletado foi depositado em tubos de reação e fixado com lugol (1 %) (Thronsen 1978).

As contagens de células foram feitas em câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico (Olympus CH2) com uma ampliação final de 40×. A densidade

celular, o rendimento (N_t/N_0) e as taxas de crescimento específico (μ) foram estimados (Wood *et al.* 2005).

A estimativa do biovolume (μm^3) das microalgas foi analisada através dos modelos geométricos de Sun & Liu (2003), relacionando à forma das células (25 células por réplica).

Para estimar a densidade bacteriana planctônica (org mL^{-1}) e do biofilme (org cm^{-2}), foram retiradas alíquotas do sobrenadante do meio (1 mL) após centrifugação, e substratos, os quais foram imersos em água salina estéril, para o desprendimento de bactérias por ultra-som (Oliveira *et al.* 2006) (Figure 14).



Figure 14. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.4 para avaliação os efeitos dos antimicrobianos no fitoplâncton, micoplâncton e bacterioplâncton.

5.2.5 Determinação da CI_{50} , CL_{50} e CE_{50}

Para a determinação de possíveis efeitos tóxicos dos antimicrobianos (penicilina G potássica, sulfato de estreptomicina, sulfato de neomicina e nistatina) em diferentes organismos marinhos (*Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959, *Amphibalanus amphitrite* (Darwin 1854), *Tigriopus fulvus fulvus* (Fischer 1860)) foram realizados experimentos laboratoriais no Istituto de Scienze Marine (ISMAR), Itália, sendo primeiramente testada a toxicidade da seguinte faixa de concentração: 0; 0,1; 1; 10; 100 mg L^{-1} para cada substância individualmente em meio natural estéril com salinidade 37. Posteriormente, selecionou-se uma segunda faixa de concentrações baseada nos resultados obtidos (Figura 15). A Tabela 9 apresenta as concentrações (mg L^{-1}) selecionadas para cada substância.

O potencial dos antimicrobianos para inibir o crescimento de algas foi avaliado utilizando a alga verde *Dunaliella tertiolecta*, representando o fitoplâncton. As algas foram obtidas da coleção do CNR ISMAR (Genova, Itália). As células de algas foram cultivadas em água do mar artificial Instant Ocean® com meio de cultura F/2 completo (Guillard & Ryther, 1962) a $20 \pm 0,5$ °C com um fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro) e intensidade de luz de 6.000 e 10.000 lux (Sbrilli *et al.* 1998).

Tabela 9. Tipo de substância e faixa de concentração selecionada para cada antimicrobiano.

Antimicrobianos	Substância	Característica	Concentrações (mg L ⁻¹)
Penicilina G potássica	antibiótico	inibidor de procarionte	0; 25; 50; 100; 250; 500
Sulfato de estreptomicina	antibiótico	inibidor de procarionte	0; 25; 50; 100; 250; 500
Sulfato de neomicina	antibiótico	inibidor de procarionte	0; 25; 50; 100; 250; 500
Nistatina	antifungico	inibidor de eucarionte	0; 1; 5; 10; 50; 100

Os testes de toxicidade foram estáticos e realizados de acordo com o método ISO (ISO 10253 2006), modificado conforme relatado na ICRAM (2001) e Costa *et al.* (2016) usando placas de 24 poços em substituição aos frascos de vidro. Foram preparadas quatro repetições para cada concentração antimicrobiana, incluindo o controle. A concentração inicial utilizada no ensaio foi de 1×10^4 células mL⁻¹. Após 72 h, o crescimento da cultura foi interrompido usando a solução de Lugol (Thronsen 1978, ICRAM 2001) e a inibição do crescimento de algas (% IC) foi avaliada em câmara de Neubauer, usando um microscópio invertido Leitz Diavert (Leitz, Alemanha).

Os sacos ovíferos do copépode bentônico *Tigriopus fulvus fulvus* foram coletados e separados de fêmeas do cultivo pré-estabelecidos no CNR ISMAR. Após 24 horas a 20 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h:8h (claro:escuro), os náuplius II disponíveis após a eclosão dos ovos foram utilizados. Os testes foram realizados em condições determinadas pelo método UNICHIM 2396 (UNICHIM 2014) e Faraponova *et al.* (2016). Os testes de exposição aguda foram realizados em placas de 24 poços com inspeções da mortalidade (M%) a cada 24 h. Os organismos foram considerados mortos quando incapazes de mover qualquer apêndice, mesmo após o estímulo físico. Quinze indivíduos para cada tratamento em tréplica foram imersos em 2 mL de solução (Tabela 9).

Os náuplios II de *Amphibalanus amphitrite* foram obtidos em condições laboratoriais, conforme protocolo de Piazza *et al.* (2012). Para a configuração dos bioensaios, foram colocados entre 15-20 organismos em placas de 24 poços de poliestireno contendo 2 mL de diluições de antimicrobianos em diferentes concentrações (Tabela 9). Os organismos foram incubados a $20 \pm 0,5$ °C no escuro. Cada tratamento foi preparado com quatro repetições e o ensaio foi estático. Após 24 e 48 h, as porcentagens de mortalidade (%M) e alteração da natação (%SSA) foram avaliadas sob estereomicroscópio (Leica MZ6). O número de imobilidade foi calculado por larvas mortas (considerando como mortas as larvas que não movem os apêndices durante 10 s) e as larvas "não natantes" (larvas que não movimentam o centro do corpo, mas movem seus apêndices) (Gambardella *et al.* 2015).

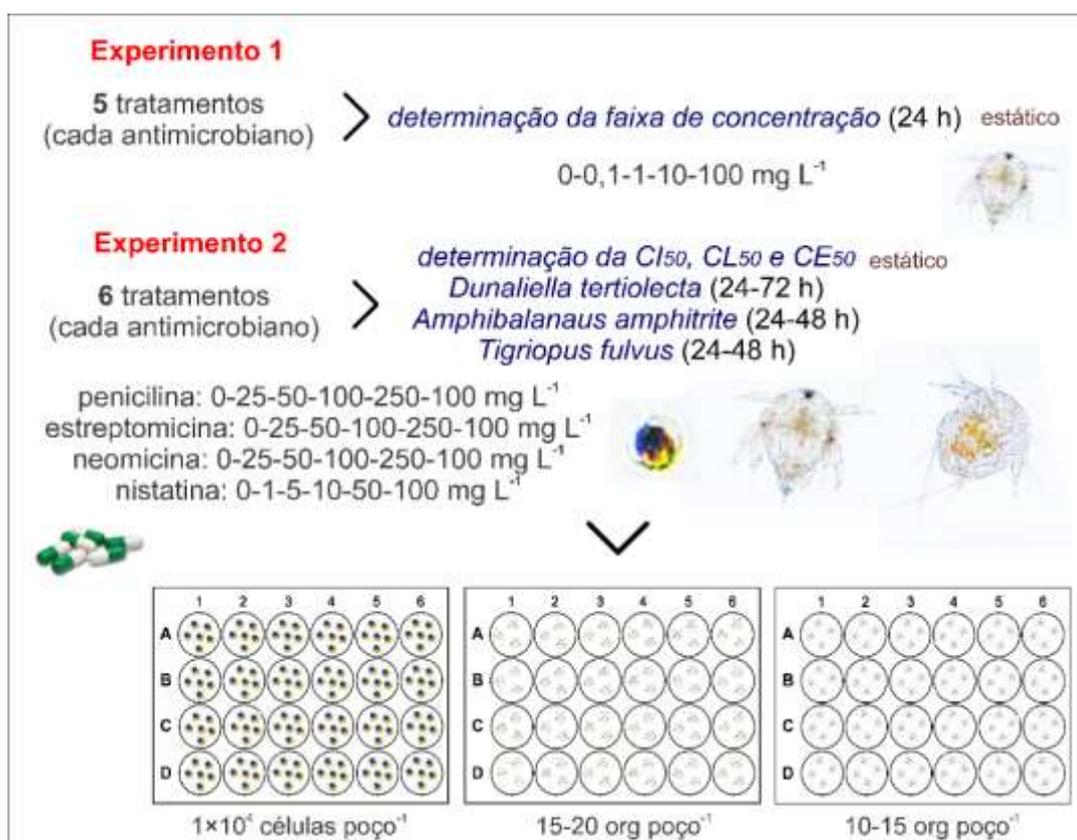


Figure 15. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.5 para avaliação os efeitos toxicológicos dos antimicrobianos no fitoplâncton e zooplâncton.

Os testes de mortalidade e/ou imobilidade foram considerados válidos quando a mortalidade/imobilidade no controle foi inferior a 10 % (US EPA 2002). Os testes de

inibição de crescimento de algas foram considerados válidos se a densidade celular do controle aumentasse por um fator de mais de $16\times$ com 72 h de exposição (ISO 10253 2006) em relação a cada tratamento. Para cada teste, os valores médios de CI_{50} , CL_{50} , CE_{50} e intervalos de confiança de 95 % foram calculados usando a análise de Spearman e Karber (Finney 1978). Os valores médios foram expressos como CI_{50} para o teste de inibição do crescimento de algas (concentração capaz de inibir o crescimento em 50 % em comparação com o controle) (Finney 1971), CL_{50} para a mortalidade de crustáceos (a concentração capaz de causar a mortalidade de 50 % da população testada) e CE_{50} para *A. amphitrite* (a concentração capaz de causar a mortalidade + alteração na natação de 50 % da população testada).

5.2.6 Metodologia de aplicação de antimicrobianos em meio marinho laboratorial

Este estudo foi dividido em cinco experimentos: o primeiro teve como objetivo avaliar a eficiência individual de cada agente antimicrobiano que compõem a combinação proposta na seção 5.2.4, em suas respectivas concentrações, na inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme. O experimento teve duração de 24 horas, sendo avaliada a densidade bacteriana com 6, 12, 18 e 24 horas de exposição e foi representado por cinco tratamentos, dispostos em UE de 80 mL, com cinco repetições (Figura 16). A Tabela 10 apresenta os tratamentos testados para avaliar a eficiência individual de cada agente antimicrobiano.



Figura 16. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.5 avaliando os efeitos individuais dos antimicrobianos na comunidade bacteriana.

Tabela 10. Apresentação dos tratamentos utilizados para avaliar a eficiência individual de cada agente antimicrobiano na inibição de bactérias planctônicas e de bactérias do biofilme.

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos
Penicilina	0,25 g L ⁻¹ penicilina G potássica
Streptomicina	0,08 g L ⁻¹ sulfato de estreptomicina
Neomicina	0,04 g L ⁻¹ sulfato de neomicina
Nistatina	0,005 g L ⁻¹ nistatina

O segundo experimento avaliou a sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa*, e o terceiro a inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme expostos a diferentes tempos de reposição da combinação de antimicrobianos: 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina no meio de cultivo (Tabela 11). O antifúngico nistatina foi aplicado apenas no início do experimento. Os cultivos foram mantidos cobertos (filme PVC) e em salinidade 25.

Para avaliar o impacto dos tratamentos na sobrevivência de *A. tonsa*, foram utilizados seis tratamentos com quatro repetições com oito indivíduos adultos cada (1 organismo 20 mL⁻¹), sem distinção de sexo. A sobrevivência foi observada a cada 24 horas durante 72 horas (Delupis *et al.* 1992).

O terceiro experimento teve duração de 10 dias (240 horas) e contou com cinco réplicas, em 100 mL de meio, por tratamento. Para a estimativa da densidade bacteriana, foram coletadas alíquotas (1 mL) e substratos de madeira após 12, 48, 102, 144, 204 e 240 horas de exposição.

No quarto experimento, foi avaliado o efeito de antimicrobianos na qualidade da água. Para isso, foram colhidas amostras de água de 100 mL de cada tratamento que continha 500 mL de volume em cada réplica (Tabela 11) com 72 e 240 horas de exposição para determinar a quantidade de sólidos totais (mg L⁻¹), ortofosfato (PO₄) (mg L⁻¹), nitrito (NO₂⁻) (mg L⁻¹) e sulfato (SO₄⁻²) (mg L⁻¹), sendo analisados seguindo a metodologia descrita por APHA (2012).

Tabela 11. Apresentação dos tratamentos utilizados para avaliar a sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa* e a inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme expostos a diferentes tempos de reposição da combinação antimicrobiana: 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina.

Abreviação	Composição
Controle	Sem antimicrobianos
T _{12X12}	Reposição a cada 12 horas
T _{24X24}	Reposição a cada 24 horas
T _{36X36}	Reposição a cada 36 horas
T _{48X48}	Reposição a cada 48 horas
T _{72X72}	Reposição a cada 72 horas

O quinto experimento avaliou a erradicação do biofilme, ou seja, a capacidade da combinação de antimicrobianos para erradicar um biofilme bacteriano marinho já consolidado, utilizando o ensaio de cristal violeta adaptado de Antunes *et al.* (2010), que avalia a biomassa do biofilme em espectrofotômetro (Figure 17).

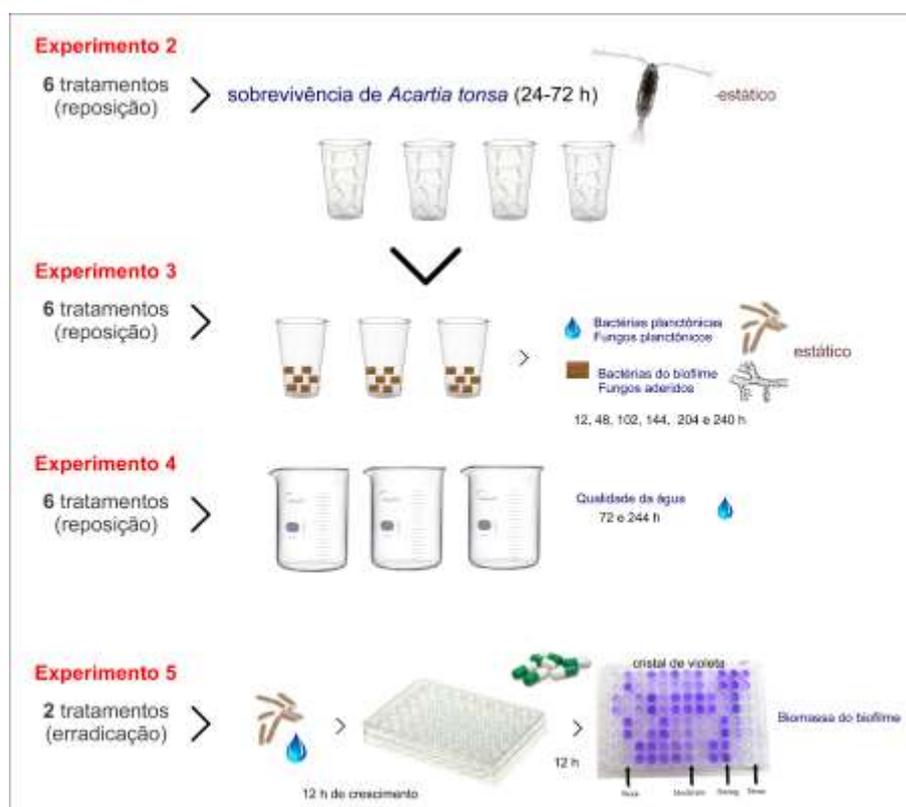


Figure 17. Desenho esquemático dos experimentos da seção 5.2.5 para desenvolvimento da metodologia de aplicação de antimicrobianos em meio marinho laboratorial.

5.2.7 Metodologia geral e análises estatísticas

Todos os organismos do metazooplâncton, com exceção dos utilizados na seção 5.2.5 (determinação da CI_{50} , CL_{50} e CE_{50}), foram coletados com uma rede de plâncton cilindro-cônica de 30 cm, equipada com uma malha de 200 μm . No laboratório, os espécimes foram identificados e separados do resto da comunidade, com o auxílio de pipetas Pasteur sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ40) (Lopes *et al.* 2017). Posteriormente, foram aclimatados para eliminar os organismos debilitados pelo estresse gerado na coleta.

As condições (temperatura, salinidade e fotoperíodo) dos experimentos foram as mesmas das observadas em campo durante as respectivas coletas. Os copépodos foram alimentados diariamente com a diatomácea *Conticribra weissflogii* a uma concentração de 20.000 células mL^{-1} (Teixeira *et al.* 2010).

As bactérias planctônicas coletadas das UE foram depositadas diretamente em tubos de reação e preservadas com formaldeído estéril a 4 %. O biofilme foi desprendido das superfícies de madeira usando três pulsos de 20 kHz de 15 s em cada lado dos substratos (Oliveira *et al.* 2006) com o auxílio de um ultra-som Cole-Parmer® (series 4710 - ultrasonic homogenizer). O material biológico foi então depositado em tubos de reação e armazenado no escuro a 8 °C até a análise. A densidade bacteriana planctônica (org mL^{-1}) e do biofilme (org cm^{-2}) foi estimada com um citômetro de fluxo (BD FACSVerser™).

Para a avaliação da comunidade microbiana, o material biológico (da água e do substrato) obtido a partir dos tubos de reação foi filtrado em filtros de policarbonato (escurecido com Irgalan Black), corado com Laranja de Acridina (1 %) e observado sob microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan) em aumento de 1000 \times . A presença ou ausência de fungos também foi observada. Os morfotipos bacterianos foram classificados de acordo com Zaritsky (1975). O tamanho (μm) e a complexidade das células foram avaliados utilizando os parâmetros de *Forward Light Scatter* (FSC-A) e *Light Side Scatter* (SSC-A) e microesferas de látex de 6 μm (Molecular Probes™) como padrão (Herzenberg *et al.* 2006, Bouvier *et al.* 2011, Picot *et al.* 2012). O tamanho das bactérias obtido no citômetro de fluxo foi comparado às medidas obtidas em microscopia de epifluorescência (medida de 100 bactérias). A estimativa e conversão de

biovolume (μm^3) para biomassa de células bacterianas (pg C cell^{-1}) foi feita usando o fator de conversão alométrica ($0.09 \cdot \text{biovolume}^{0.09}$) de Sun & Liu (2003) e Norland (1993), respectivamente.

A análise dos Modelos Lineares Generalizados (GLM) foi aplicada aos dados, utilizando o software livre R (2016). O modelo utilizado foi adaptado aos dados com distribuição Binomial/Multinomial (sobrevivência e assentamento) com função de link "logit" e com distribuição de Poisson (crescimento, rendimento e produção) com função de link "log". O teste a *post-hoc* Tukey seguiu as análises. A função de ligação inversa também foi usada para calcular as probabilidades estimadas. A análise de variância (ANOVA *one-way*), seguida de uma comparação de pares de Tukey foi utilizada para os dados toxicológicos.

5.3 Síntese dos Resultados

5.3.1 Confirmação do potencial dos antibióticos

Foram observadas diferenças significativas na sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa* entre os tratamentos ($p < 0,001$). Os tratamentos T1 e T3 causaram a mortalidade de todos os organismos nas primeiras 24 horas de exposição. Em contapartida, os tratamentos T2 e T4 apresentaram o mesmo resultado que o controle (100 % de sobrevivência) no mesmo período de observação.

Após 48 horas, 8, 17 e 25 % de mortalidade de *A. tonsa* foram observados no controle, T2 e T4, respectivamente, mas sem diferenças significativas entre eles. No final do experimento (72 horas de exposição), não houve diferença estatística nos resultados entre o controle, T2 e T4. No entanto, o tratamento T2 foi selecionado para o teste do potencial de inibição de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme, por se tratar de uma combinação de antibióticos, garantindo um amplo espectro de ação.

O tratamento T2 apresentou uma menor densidade de bactérias planctônicas (org mL^{-1}) em comparação ao controle, sendo observadas diferenças significativas com 6 e 12 horas de exposição ($p < 0,001$). Para as bactérias associadas ao biofilme (org cm^2), observou-se que o tratamento de antibióticos selecionado inibiu significativamente a

colonização bacteriana nos substratos com 12, 24 e 120 horas ($p < 0,001$), com uma redução bacteriana média de 78 % ao longo do experimento.

O maior efeito inibitório de bactérias planctônicas e de bactérias do biofilme em relação ao controle ocorreu com 6 (88 %) e 12 horas (93 %) de exposição, respectivamente.

Com 72 horas, os fungos do grupo Deuteromycota foram observados no substrato (esporos), enquanto na coluna de água sua presença foi menos significativa. Os fungos tanto livres quanto aderidos não foram observados no controle em qualquer tempo de exposição ou no T2 com 6, 12 ou 24 horas.

5.3.2 Inclusão do antifúngico e avaliação dos efeitos na comunidade planctônica

Nos testes de resistência com *Acartia tonsa* (copépodo), *Amphibalanus improvisus* (cirripédio) e *Conticribra weissflogii* (microalga) foram observados que os tratamentos com antifúngico nistatina ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) foram os mais prejudiciais para organismos não-alvo, bem como a concentração de antibióticos proposta por DeLorenzo *et al.* (2001). Dentre os três organismos avaliados, o copépodo *A. tonsa* foi o que apresentou maior sensibilidade, principalmente na situação M (antimicrobianos somente no meio de cultivo). Para este copépodo, o tratamento T_A apresentou a maior produção média de ovos (63 ± 25) e pelotas fecais (60 ± 16) na situação MF (antimicrobianos no meio de cultivo e no alimento), apresentando um maior desempenho que o controle.

No segundo experimento, foram observadas diferenças significativas na sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa* entre os tratamentos a partir de 48 h de exposição. Onde o T_{A+n4} e T_{A+n5} foram letais para copépodos (sobrevivência de 0 %), diferentemente do controle e dos outros tratamentos com antimicrobianos (>90 % de sobrevivência) ($p < 0,003$). A mesma situação ocorreu com 72 h de exposição. Entretanto, a sobrevivência no controle foi de 80 %. Com 96 h não foram observadas diferenças entre o controle (sobrevivência de 80 %) e os tratamentos T_A (sobrevivência de 100 %), T_{A+n1} (70 % de sobrevivência), T_{A+n2} (sobrevivência de 65 %) ($p > 0,960$). Embora, tenham sido observadas diferenças ($p < 0,009$) entre o controle e o T_{A+n3} (sobrevivência de 20 %).

Em relação à densidade bacteriana, observou-se uma diminuição das bactérias associadas ao biofilme nos tratamentos com antimicrobianos (T_A , T_{A+n_1} e T_{A+n_2}) em relação ao controle com 3, 6, 9, 12 e 15 horas de exposição ($p < 0,001$).

A partir das três primeiras horas do experimento, observou-se redução na densidade bacteriana ($>30\%$), embora com 12 horas tenha sido registrada a maior inibição (95 %) em comparação ao controle. A partir de 15 horas de exposição, ocorreu um aumento de densidade bacteriana em todos os tratamentos com antimicrobianos.

Em relação ao tamanho celular, todos os tratamentos com antimicrobianos apresentaram os mesmos valores que o controle com 12 horas de exposição, bem como apenas uma população, sendo a forma bacteriana cocóide predominante.

Todos os tratamentos com antimicrobianos testados foram eficazes na redução da densidade bacteriana, entretanto para a presença de fungos somente o tratamento T_{A+n_2} impediu a colonização destes eucariotos. Fungos não foram registrados no controle.

5.3.3 Influência da salinidade e da contaminação via ar

Não foram encontradas diferenças significativas na sobrevivência do cirripédio *Amphibalanus improvisus* entre os tratamentos ($p > 0,732$). Em qualquer salinidade, com ou sem a aplicação de antimicrobianos, a sobrevivência foi equivalente. Em contraste, para o assentamento foram observadas diferenças a partir de 24 horas de exposição ($p < 0,024$).

Na Salinidade 1 não houve assentamento no controle nem nos tratamentos com antimicrobianos. Para as salinidades 15 e 25, a taxa de assentamento aumentou em relação ao tempo de exposição, independentemente do meio. A maior taxa de assentamento ocorreu na salinidade 15 com 72 h de exposição (75 %).

As bactérias planctônicas apresentaram maior densidade (org mL^{-1}) no C_{S25} , sendo significativamente diferente do tratamento T_{A+NS25} , que apresentou uma densidade 95 % menor ($p < 0,001$). Na salinidade 15 (canal), observou-se o mesmo padrão ($p < 0,001$), porém com menor percentual de redução bacteriana (74 %). Para a salinidade 1 (estuário interno), não houve diferenças significativas entre o controle e o tratamento com antimicrobianos, embora a média de densidade bacteriana planctônica do C_{S1} ($16 \times 10^6 \pm 4.260.000$) tenha sido 36 % menor que no T_{A+NS1} ($27 \times 10^6 \pm 5.000.000$).

As bactérias do biofilme mostraram diferenças significativas na densidade (org cm^{-2}) entre o controle e o tratamento com antimicrobianos somente na salinidade 25 ($p < 0,001$), sendo verificada uma diminuição (77 %) das bactérias no T_{A+NS25} comparado ao C_{S25} . Na salinidade 15, a densidade média foi menor para T_{A+NS15} ($20 \times 10^6 \pm 6.465.135$), com uma redução de 39 % em relação à densidade média das bactérias do C_{S15} ($33 \times 10^6 \pm 6.984.127$). Quanto à salinidade 1, foi observado o inverso, sendo o T_{A+NS1} o detentor da maior densidade de bactérias ($41 \times 10^6 \pm 105.24.793$), quando comparado ao C_{S1} ($25 \times 10^6 \pm 2.388.571$), com 37 % menos bactérias do que o tratamento com antimicrobianos.

Tanto na comunidade planctônica quanto na do biofilme, a forma bacteriana dominante foi cocóides, sendo observada apenas uma população. Nenhum fungo foi observado.

No experimento realizado para avaliar a influência da contaminação microbiana via ar no cultivo do cirripédio *Amphibalanus improvisus*, não houve diferença significativa na sobrevivência das cigris entre os tratamentos ($p = 0,726$). No entanto, diferenças significativas foram observadas para a comunidade bacteriana planctônica ($p < 0,001$) e associada ao biofilme ($p < 0,001$). Com 12 horas de exposição, tanto a condição fechada quanto a aberta não interferiram na densidade bacteriana. Por outro lado, com 24 horas, as UE abertas apresentaram maior densidade média de bactérias planctônicas: C_{24h} ($6 \times 10^6 \pm 4.550.175$), T_{A+N24h} ($0,2 \times 10^6 \pm 54.629$) do que as UE cobertas com filme PVC: C_{24h}^* ($5 \times 10^6 \pm 1.866.498$), T_{A+N24h}^* ($0,1 \times 10^6 \pm 28.181$). Já as bactérias de biofilme apresentaram o mesmo padrão entre as UE abertas: C_{24h} ($22 \times 10^6 \pm 4.645.833$), T_{A+N24h} ($9 \times 10^6 \pm 4.788.059$) e fechadas: C_{24h}^* ($16 \times 10^6 \pm 6.065.476$), T_{A+N24h}^* ($6 \times 10^6 \pm 4.611.719$).

Assim, quando combinamos o uso de antimicrobianos em UE cobertas com filme PVC a inibição bacteriana foi de 98 % para bactérias planctônicas e de 72 % para bactérias associadas ao biofilme com 24 horas de exposição ($p < 0,001$), comparando ao controle aberto.

Em um período maior de cultivo, verificou-se que as UE fechadas apresentaram menores densidades bacterianas planctônicas ($p < 0,001$) e associadas ao biofilme ($p < 0,001$) do que as UE abertas, com as menores densidades em cultivos tratados com antimicrobianos. Através de um comparativo entre o C e o T_{A+N}^* com 7, 14, 21 e 28 dias de exposição, é possível observar uma redução na densidade de bactérias planctônicas de

57, 55, 63 e 92 %, respectivamente, e uma redução na densidade de bactérias do biofilme de 77, 94, 92 e 76 %.

Em ambos os tratamentos e comunidades a forma cocóide das bactérias foi predominante, sendo observada apenas uma população de bactérias planctônicas e duas de bactérias do biofilme tanto de UE abertas quanto fechadas.

Nos tratamentos com antimicrobianos, observou-se tamanhos de células menores de bactérias planctônicas quando comparado ao controle. O mesmo foi observado para todos os tratamentos da comunidade do biofilme. O tratamento T_{A+N} e T_{A+N}^* , bem como o controle não apresentaram fungos, diferentemente do T_A e T_A^* .

5.3.4 Avaliação dos efeitos no fitoplâncton, micoplâncton e bacterioplâncton

As espécies de fitoplâncton *Conticribra weissflogii* e *Prorocentrum micans* não apresentaram diferenças ($p > 0,318$) em suas densidades celulares médias (células mL^{-1}) entre os tratamentos, desde o início (24 h) até o final do experimento (168 h).

Isochrysis galabana apresentou diferenças na densidade celular entre tratamentos com 24 e 120 horas de exposição ($p < 0,004$). Com 24 h, os tratamentos T_A^* (11.725 ± 1.075 células mL^{-1}) e T_{A+N}^* (11.650 ± 1.350 células mL^{-1}) apresentaram uma maior densidade que o controle* (7.800 ± 500 células mL^{-1}). Por outro lado, com 120 h, o T_A^* (25.600 ± 3.550 cél mL^{-1}) apresentou uma menor densidade (64.500 ± 10.250 células mL^{-1}).

Houve um aumento contínuo na densidade celular nos tratamentos controle* e T_{A+N}^* , porém o T_A^* apresentou oscilação na densidade de microalgas entre os tempos de exposição. Em relação ao rendimento das espécies de fitoplâncton, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($p > 0,085$). Embora, o biovolume das células das microalgas (μm^3) tenha apresentado variação entre os tratamentos com antimicrobianos comparados ao controle* para todas as espécies ($p < 0,001$), sendo o controle* detentor dos maiores biovolumes.

Em média, os tratamentos T_A^* e T_{A+N}^* reduziram 75 e 67 % da densidade de bactérias planctônicas dos cultivos de *C. weissflogii*; 48 e 58 % de *I. galbana*; e 25 e 29 % de *P. micans*, respectivamente, enquanto que estes mesmos tratamentos reduziram 26

e 15 % do biofilme dos cultivos de *C. weissflogii*; 6 e 19 % de *I. galbana*; e 6 e 37 % de *P. micans*, respectivamente.

Com relação à comunidade bacteriana dos cultivos de microalgas com 168 horas de exposição, observou-se que as bactérias planctônicas tendem a apresentar mais de uma população, diferentemente do biofilme bacteriano que apresentou apenas uma população, independentemente do tratamento. As bactérias planctônicas apresentaram um maior tamanho celular do que as do biofilme. Houve um aumento no tamanho celular entre 24 e 168 h. Além disso, os tratamentos com antimicrobianos apresentaram células bacterianas maiores que o controle*.

Quanto à presença de fungos, observou-se que o tratamento controle* não apresentou contaminação em qualquer momento. O mesmo foi verificado para todos os tratamentos de *Conticribra weissflogii*. Por outro lado, fungos foram registrados no tratamento T_A* e T_{A+N}* para *Prorocentrum micans* com 168 h e para *Isochrysis galbana* apenas no T_A* com 168 h de exposição.

5.3.5 Determinação da CI₅₀, CL₅₀ e CE₅₀

Os antibióticos penicilina, estreptomicina e neomicina não apresentaram efeitos tóxicos, mesmo em alta concentração (500 mg L⁻¹). Por outro lado, para o antifúngico nistatina foi possível calcular o CI₅₀, CL₅₀ e CE₅₀, o qual deve ser aplicado em baixas concentrações (<10 mg L⁻¹) em cultivos de organismos. Os resultados mostraram que CE₅₀48h do cirripédio *Amphibalanus amphitrite* é o parâmetro mais sensível para estimar a toxicidade de antimicrobianos quando comparado ao CI₅₀72h da microalga *Dunaliella tertiolecta* e ao CL₅₀48h do copépodo *Tigriopus fulvus fulvus*. Embora, todos tenham sido capazes de identificar um efeito dose-dependente para a nistatina.

5.3.6 Metodologia de aplicação de antimicrobianos em meio marinho laboratorial

Ao analisar a eficiência individual de cada antimicrobiano, verificou-se diferenças significativas entre tratamentos na inibição de bactérias planctônicas (p<0,002) e do biofilme (p<0,002).

A maior inibição bacteriana ocorreu com 24 h de exposição para as bactérias planctônicas, sendo representada pela penicilina (86 %) e com 12 h para as bactérias de biofilme, sendo representada pela neomicina (66 %) quando comparadas ao controle.

Todos os antibióticos iniciaram a ação entre 6 e 12 horas de exposição. Para penicilina, neomicina e estreptomicina, a inibição de bactérias planctônicas mais elevada em comparação ao controle ocorreu entre 19 e 24 horas de exposição. Por outro lado, para as bactérias de biofilme a maior inibição ocorreu com 12 horas.

Os antimicrobianos têm uma inibição média mais elevada para as bactérias presentes na coluna de água em comparação com às associadas ao substrato. Para ambas as comunidades, planctônica e do biofilme, a penicilina apresentou a menor densidade bacteriana média em comparação ao controle.

Quanto ao segundo experimento, envolvendo a combinação de antimicrobianos, observou-se que o copépodo *Acartia tonsa* foi resistente a todas as frequências de reposição ($p > 0,059$), sendo observadas diferenças significativas na densidade bacteriana planctônica ($p < 0,001$) e do biofilme ($p < 0,001$) entre os tratamentos. Para bactérias planctônicas, de 12 a 240 horas de exposição, todos os tratamentos com antimicrobianos mostraram menos bactérias do que o controle ($p < 0,001$). Para a comunidade de biofilme, observou-se o mesmo, no entanto com 240 horas apenas o T_{12x12} apresentou diferença em relação ao controle ($p < 0,040$).

A maior inibição bacteriana ocorreu no tratamento T_{12x12} com 12 horas de exposição para as bactérias planctônicas (92 %) e associadas ao biofilme (93 %) em comparação ao controle. Por outro lado, observou-se que há uma perda de eficiência dos antimicrobianos ao longo do tempo. Com 48 horas, a inibição foi de 89 e 78 %, com 102 h de 85 e 77 %, com 144 h de 71 e 85 %, com 204 h de 72 e 70 %, com 240 h de 67 e 71 % para bactérias planctônicas e para as associadas ao biofilme, respectivamente.

Quanto à qualidade da água, observou-se que a aplicação de antimicrobianos afeta a acumulação de amônia, nitrito e ortofosfato ao longo do tempo, sendo registrados valores mais elevados que o controle. O padrão de acumulação é proporcional à frequência de reposição dos antimicrobianos no sistema. O total de sólidos e o sulfato não sofreram modificações. Baseado no método de cristal de violeta, observou-se que o tratamento com antimicrobianos inibe, mas não erradica o biofilme.

5.4 Conclusão

- (i) A combinação de antibióticos: 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 (seção 5.3.1) não apresenta efeitos letais sobre o organismo não-alvo testado, e ao mesmo tempo, foi eficiente na inibição de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme. No entanto, a presença de fungos em excesso foi observada (**ver artigo completo publicado no periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências no APÊNDICE IV, página 180**);
- (ii) A combinação de antibióticos + 0,005 g L⁻¹ do antifúngico nistatina (seção 5.3.2) não causou efeitos negativos sobre os organismos não-alvo testados e mostrou-se eficiente na inibição de bactérias e fungos associados ao biofilme (**ver resumo referente ao artigo completo submetido ao periódico International Aquatic Research no APÊNDICE V, página 195**);
- (iii) A combinação de antimicrobianos: 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina (seção 5.3.3) é uma solução para evitar o crescimento bacteriano e fúngico planctônico e associado ao biofilme de meios de cultivo marinhos com salinidade superior a 25, e sua eficácia é consideravelmente reforçada pelo uso de UE cobertas com filme PVC (**ver resumo referente ao artigo completo submetido ao periódico Marine Ecology no APÊNDICE VI, página 197**);
- (iv) O tratamento com antimicrobianos (com e sem antifúngico) (seção 5.3.4) apresentou grande potencial para remoção da contaminação bacteriana planctônica e aderida em cultivos de fitoplâncton de três filogenias distintas sem afetar o crescimento das microalgas, embora o seu biovolume seja afetado (**ver resumo referente ao artigo completo em processo de finalização para submissão ao periódico Journal of Applied Phycology no APÊNDICE VII, página 199**);

- (v) Os antibióticos penicilina, estreptomicina e neomicina (seção 5.3.5) podem ser aplicados em cultivos marinhos laboratoriais individualmente ou em combinação, sem efeitos tóxicos inibitórios (CI_{50}), letais (CL_{50}) ou comportamentais (CE_{50}) aos organismos considerados bioindicadores (concentração final $<500 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, o antifúngico nistatina só deve ser aplicado em baixas concentrações ($<10 \text{ mg L}^{-1}$) (**ver resumo referente ao artigo completo em processo de finalização para submissão ao periódico Chemistry and Ecology no APÊNDICE VIII, página 201**);
- (vi) No tratamento composto por $0,025 \text{ g L}^{-1}$ de penicilina G potássica + $0,08 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina + $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de neomicina + $0,005 \text{ g L}^{-1}$ de nistatina (seção 5.3.6), o antibiótico penicilina ($0,025 \text{ g L}^{-1}$) é a substância que mais contribui para a ação inibitória de bactérias planctônicas e de bactérias associadas ao biofilme. A reposição da combinação de antimicrobianos no sistema a partir de 12 horas não causa mortalidade ao copépodo bioindicador *Acartia tonsa*. No entanto, afeta a qualidade da água ao longo do tempo, sendo necessárias renovações do meio de cultivo. Este tratamento, quando reaplicado a cada 12 horas (antibióticos), é eficaz na inibição de bactérias (até 95 %) e fungos planctônicos e associados ao biofilme durante 240 horas de observação, contudo a inibição diminui ao longo do tempo. O tratamento inibe, mas não erradica o biofilme já formado (**ver resumo referente ao artigo completo em processo de finalização para submissão ao periódico Methods in Ecology and Evolution no APÊNDICE IX, página 203**).

6 CAPÍTULO IV

“Relação entre as bactérias do biofilme e a sucessão ecológica em substratos consolidados durante o processo de bioincrustação”

Objetivo 5

6.1 Introdução

Qualquer substrato consolidado natural ou artificial, quando imerso em água do mar não esterilizada, rapidamente é colonizado por organismos, diretamente (*i.e.*, incrustantes e sedentários) ou indiretamente (*i.e.*, vágeis), sendo este processo chamado de bioincrustação (Scheer 1945, Wahl 1989).

O processo consiste na adsorção de moléculas orgânicas na superfície submersa e na colonização desta por bactérias, envoltas por uma Matriz Polimérica Extracelular (MPE), que formarão um biofilme. Com a progressão da sucessão ecológica, microalgas (perifíton), alveolados heterotróficos ou mixotróficos (protozooplâncton) e esporos de macroalgas começarão a aderir-se à superfície. Por fim, ocorrerá o estabelecimento dos invertebrados, colonizadores terciários, acarretando a sobreposição dos estágios micro e microbiológicos (Abarzua & Jakubowski 1995, Quaid & Miller 2010, Dobretsov et al 2013) (ver Figura 1).

Este processo afeta seriamente as estruturas marítimas (*e.g.* biocorrosão, aumento de peso de embarcações, entupimento de dutos), levando a sérias consequências econômicas (Yebra et al. 2004, Callow & Callow 2011, Fitridge et al. 2012, Ozkan & Berberoglu 2013). Devido ao papel das comunidades marinhas bentônicas na área naval, pesquisas para evitar o assentamento de organismos nestas estruturas têm atraído grande interesse (Callow 2000, Gupta et al. 2009, Fitridge et al. 2012, Carl et al. 2012, Hadfield et al. 2014). Embora, informações sobre os fatores que influenciam a colonização dos organismos ainda sejam restritas.

Muitos fatores influenciam na seleção do substrato pelos organismos, relacionados principalmente às características da superfície do substrato, como textura (Hills & Thomason 1998, Berntsson et al. 2000a, 2000b, Bers & Wahl 2004; Scardino et al. 2008, Munroe et al. 2010, Carl et al. 2012), orientação (Connell 1999, Glasby 2000, Somsueb et al. 2000), bem como presença de biofilme microbiano (Satuito et al. 1997, Lau et al. 2005, Bao et al. 2007, Dworjanyn & Pirozzi 2008, Anderson & Epifanio 2009, Tebben et al. 2011, Toupoint et al. 2012, Sneed et al. 2014). Desta forma, o organismo reagiria de forma positiva (afinidade) ou negativa (inibição) ao assentamento, dependendo da situação encontrada.

Não obstante, na maioria dos trabalhos desenvolvidos até o momento, as espécies foram estudadas separadamente, não havendo interação em nível de comunidade, excluindo da pesquisa as relações ecológicas de facilitação e inibição entre indivíduos, as quais são responsáveis pela estruturação da comunidade (Absalão 1993).

Desta forma, o objetivo do atual trabalho foi testar se existe uma relação entre a colonização do perifíton, protozooplâncton e zooplâncton e a presença de bactérias associadas ao biofilme em substratos consolidados expostos a diferentes texturas e orientações, bem como presença/ausência de tinta anti-incrustante.

6.2 Síntese da Metodologia

6.2.1 Avaliação da comunidade marinha residente

Primeiramente, três anos de amostras de zooplâncton da Praia do Cassino, Rio Grande, Brasil (Figura 18A) vinculadas ao Projeto Ecológico de Longa Duração (PELD, sítio 8, estuário da Lagoa dos Patos e costa adjacente) foram analisadas para estipular o melhor período para realização do experimento de colonização, em relação à presença de invertebrados com potencial de colonização (meroplâncton). As coletas de zooplâncton do PELD foram realizadas mensalmente entre o período de novembro de 2009 e dezembro de 2012.

Posteriormente, foram analisadas sete amostras de meroplâncton no período de um mês (novembro), no ano de 2014, do entorno do navio encalhado Altair (Figura 18B). Todas as coletas foram realizadas com rede de plâncton cilindro-cônica (200 μm de malha) através de arrastos horizontais na subsuperfície do mar. Um fluxômetro (TSK) foi acoplado à boca da rede para permitir a estimativa de densidade de organismos. Dados de temperatura, salinidade, pluviosidade e clorofila-*a* também foram obtidos para o período.

Ainda, um levantamento de espécies bentônicas associadas ao navio encalhado Altair (Figura 18B) foi realizado durante o inverno e o verão de 2012 para facilitar a posterior identificação dos recrutas colonizadores dos substratos durante o experimento.

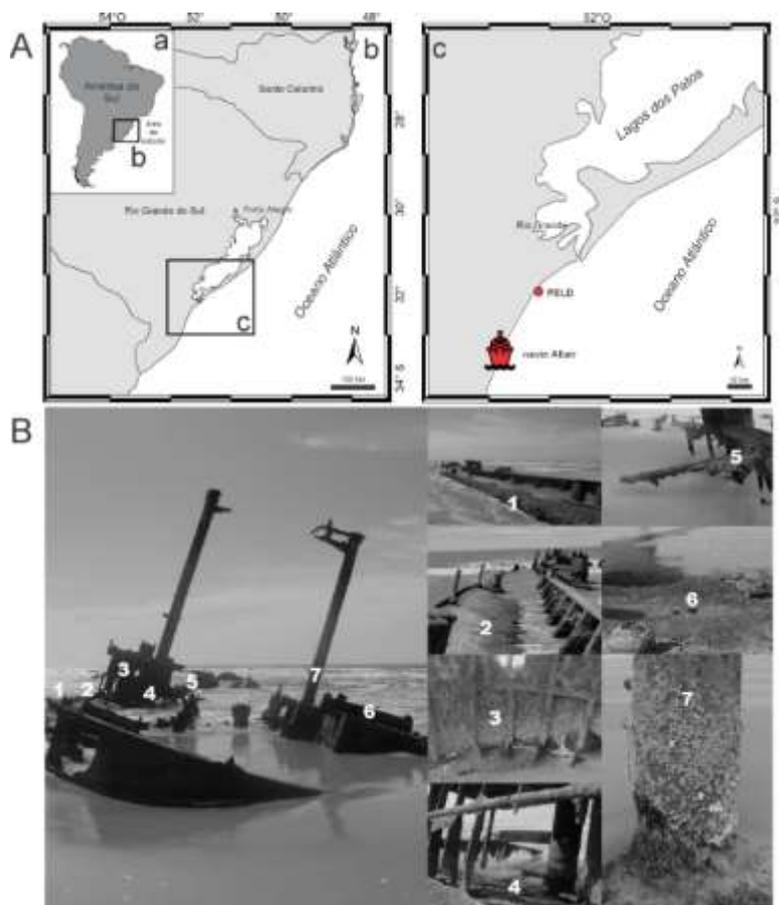


Figura 18. **A:** Mapa com a localização dos pontos de coleta de zooplâncton (PELD) e **B:** levantamento de espécies associada ao navio Altair: (1) casco esquerdo, (2) lado esquerdo interno, (3) cabine externa, (4) cabine interna, (5) lado direito interno, (6) casco direito, (7) mastro.

6.2.2 Experimento de colonização

O experimento de sucessão ecológica foi desenvolvido durante 12 dias, na primavera de 17 a 29 de novembro de 2015. Para tal, foram empregados 720 corpos de prova de acrílico retangulares (25 cm²) em 18 aquários (20 L), cada seis aquários representaram uma determinada situação combinada com diferentes texturas e orientações do substrato, totalizando 12 tratamentos (Tabela 12).

Nos tratamentos com tinta anti-incrustante, foi utilizada a tinta Supermarine ABC 095 (Renner) a base de óxido cuproso, regularmente utilizada no Porto de Rio Grande. Os tratamentos com o mínimo de biofilme foram realizados com uma combinação de antimicrobianos: 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina (Agostini 2014, Capítulo III, Agostini *et al.* 2016), a qual foi repostada no meio de cultivo a cada 12 horas para os antibióticos e a cada 5 dias para a nistatina (Capítulo III).

Para acompanhar o processo de colonização e de sucessão ecológica houve retiradas de acordo com as seguintes horas de exposição ao plâncton: 12 (1/2 dia), 72 (3 dias), 144 (6 dias), 216 (9 dias) e 288 (12 dias). Em todas as etapas do experimento, 144 corpos de prova foram destinados à análise de bactérias do biofilme, perifíton, protozooplâncton e metazooplâncton assentados.

Tabela 12. Tratamentos utilizados para avaliar o processo inicial de colonização em substrato consolidado

Situação		Textura		Orientação	
N	natural	S	liso	V	Vertical
				H	Horizontal
		T	com textura	V	Vertical
				H	Horizontal
P	com tinta anti-incrustante	S	liso	V	Vertical
				H	Horizontal
		T	com textura	V	Vertical
				H	Horizontal
A	com antimicrobianos (mínimo de bactérias associadas ao biofilme)	S	liso	V	Vertical
				H	Horizontal
		T	com textura	V	Vertical
				H	Horizontal

Houve renovação de 25 % da água dos aquários, posteriormente à sifonagem do fundo, juntamente com a reposição de plâncton com 0, 48, 96, 144, 192 e 240 horas, com exceção do primeiro dia que o abastecimento de água foi total. O plâncton marinho foi coletado horizontalmente (rede de plâncton de 200 μm) na Praia do Cassino, no entorno do navio encalhado Altair (Figura 18). Houve reposição do plâncton, dia sim dia não. O material amostrado foi filtrado em rede de 550 μm a fim de eliminar os principais predadores. Amostras foram também destinadas ao acompanhamento do potencial de colonização do zooplâncton e outras misturadas e quarteadas (quarteador Motoda) em 18 partes iguais para a deposição nos aquários (Figura 19). Os cultivos foram cobertos com filme PVC. Os organismos foram mantidos na temperatura (20° C) e no fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro) simulando as condições de coleta e aeradores com filtros de 0,2 μm (Satorius stedim Minisart®) na saída para os aquários garantindo o aporte de ar.

Durante o experimento houve medição das variáveis: temperatura, salinidade – potencial de hidrogênio (pH), Oxigênio Dissolvido (OD) e turbidez com auxílio do equipamento multiparâmetro (Hanna HI9828), além da clorofila-*a*, nitrogênio-amoniaco (N-NH₃), nitrito (NO₂⁻), ortofosfato (PO₄⁻³), sulfato (SO₄⁻²) e sólidos totais (ST), analisados segundo APHA (2012). Durante o experimento, também foram coletadas amostras da coluna d'água dos aquários para quantificação das bactérias planctônicas e da clorofila-*a* em cada situação.

Para a realização da quantificação e identificação de micro-organismos aderidos foram utilizados, em cada retirada, seis substratos (25 cm²) de cada tratamento, os quais foram imersos em 60 mL de solução salina (salinidade 25) estéril, procedendo-se o desprendimento no ultra-som Cole-Parmer® (series 4710 - ultrasonic homogenizer) (Oliveira *et al.* 2006). Após homogeneização, uma alíquota de 2 mL de cada réplica foi fixada com formaldeído estéril a 4 %, sendo armazenada no escuro sob refrigeração (8° C) para a quantificação de bactérias. Uma alíquota de 10 mL de cada tratamento, em tréplica, também foi removida para a quantificação e identificação do perifíton e do protozooplâncton. Além de 20 mL para a quantificação de clorofila-*a*, seguindo a metodologia de Ballester & Luiz (2003).

A densidade de bactérias planctônicas (org mL⁻¹) e associadas ao biofilme (org cm⁻²) foi estimada por citômetro de fluxo (BD FACSVerserTM), enquanto que a espessura do biofilme foi mensurada no software LAS AF em microscopia confocal (Leica, TCS SP8) através da marcação do material biológico do substrato com Laranja de Acridina (1 %) (amostras processadas segundo Fox *et al.* 1985, Overholtzer *et al.* 2007 e Harrison *et al.* 2006). Enquanto o tamanho (µm) das bactérias foi estimado em MEV (JSM - 6610LV) (amostras processadas segundo Freitas *et al.* 2010), através da medição de 100 bactérias por tratamento. Já a contagem e identificação do perifíton e do protozooplâncton se deram em câmara de Sedgwick-Rafter sob microscópio (Olympus IX51) com câmera acoplada (software DP2 – BSW).

Em relação aos macro-organismos, seis substratos (25 cm²) de cada tratamento foram raspados com auxílio de uma espátula e em seguida o material foi fixado em formaldeído tamponado a 4 %. O material fixado foi analisado em câmera de Bogorov sob microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg).

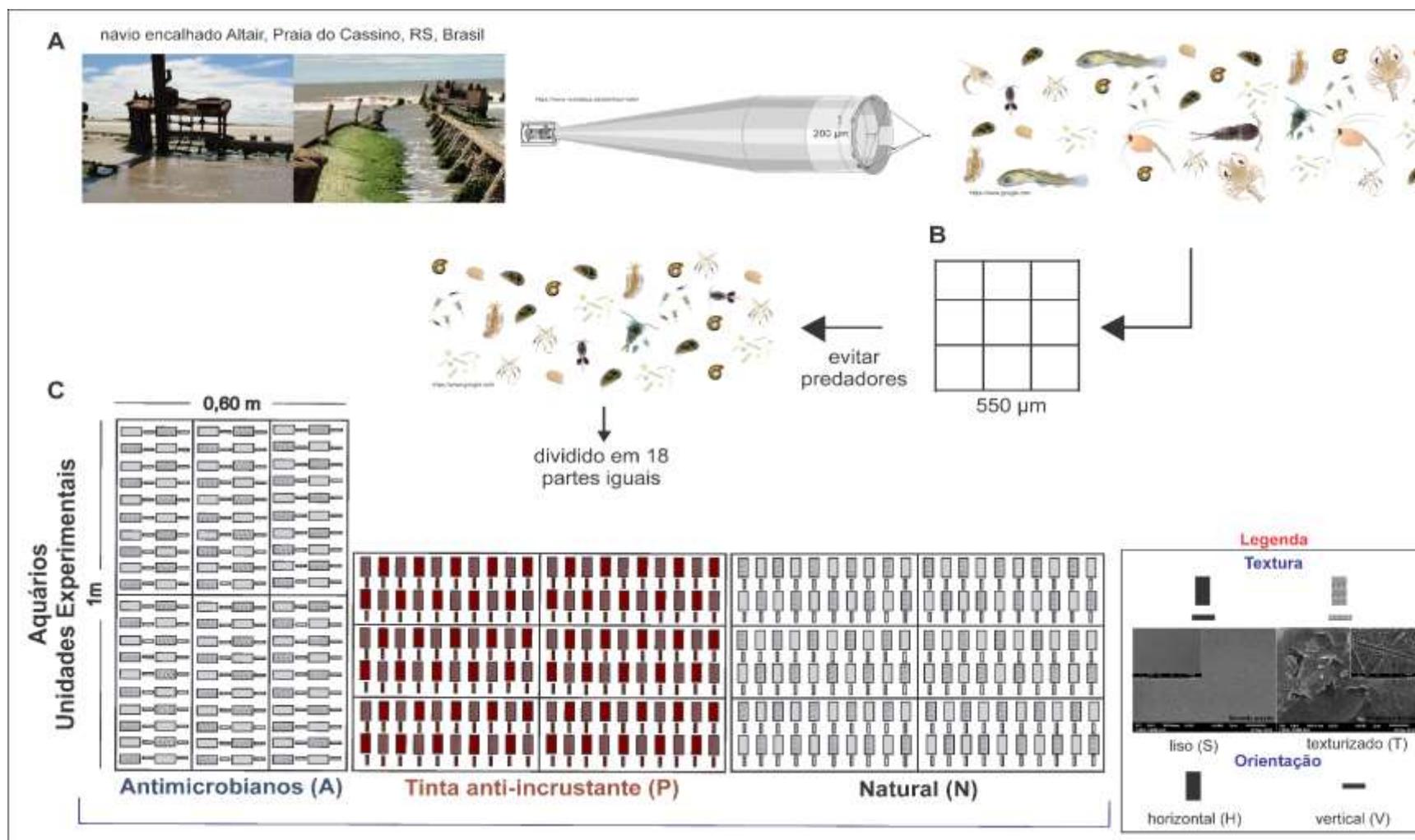


Figura 19. Design esquemático do experimento de sucessão ecológica. **A:** coleta de zooplâncton de subsuperfície nas proximidades do navio Altair com rede de plâncton de 200 µm de malha; **B:** filtração do material coletado em rede de 550 µm para eliminar os predadores e posterior quarteamento em 18 partes iguais para deposição nos aquários; **C:** tratamentos utilizados em cada unidade experimental com 6 réplicas para cada tratamento.

6.2.3 Análises estatísticas

O Modelo Linear Generalizado (GLM) foi utilizado para comparar o potencial meroplânctônico entre as estações do ano, meses, bem como entre os tratamentos no experimento de colonização, avaliando a densidade de organismos assentados e os parâmetros físico-químicos durante o tempo de experimento, utilizando o software livre R (2016). O teste a *post-hoc* Tukey seguiu as análises. A correlação foi aplicada para avaliar a relação entre densidade de bactérias do biofilme, concentração de clorofila-*a* e o assentamento do meroplâncton. O Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (MDS) foi escolhido para a ordenação dos dados de comunidade. Para a detecção de diferenças entre os dados de composição do perifíton, protozooplankton e meroplâncton, foram aplicadas Análises de Variância Multivariada com Permutações (PERMANOVA).

6.3 Síntese dos Resultados

Por meio da avaliação do meroplâncton nas amostras do PELD entre 2009 e 2012 foi verificado que a primavera apresentou a maior densidade de organismos e o maior número de taxa, bem como verificou-se que dentre os meses de primavera, novembro foi o detentor dos maiores valores. Quando avaliada a composição meroplânctônica de novembro de 2014 no entorno do navio encalhado Altair, verificou-se que a segunda quinzena apresentou mais organismos com potencial de colonização nos substratos consolidados. Já o levantamento das espécies associadas ao navio Altair apresentou 38 taxa, sendo 14 incrustantes, 5 sedentárias e 19 vágéis.

Durante o experimento de colonização verificou-se que a densidade bacteriana do biofilme (org cm^{-2}), perifíton (org cm^{-2}), protozooplâncton (org cm^{-2}) e meroplâncton (org m^{-2}) apresentaram diferenças entre os tratamentos em todos os tempos avaliados ($p < 0,001$). Para ambas as comunidades, a situação do substrato afetou a colonização, sendo as superfícies expostas à situação natural detentoras da maior densidade de organismos, seguida das com tinta anti-incrustante. A situação com antimicrobianos apresentou a menor densidade de organismos assentados. A orientação afetou a colonização do perifíton, conseqüentemente a concentração de clorofila-*a* ($\mu\text{g m}^{-2}$) associada ao biofilme, e do meroplâncton, sendo as superfícies horizontais mais

atrativas ($p < 0,001$). Enquanto a textura não foi um fator importante para a colonização dos organismos.

A tinta anti-incrustante não afetou negativamente a comunidade bacteriana. Houve um aumento na densidade de bactérias em relação ao tempo nos substratos naturais e com tinta anti-incrustantes. Em contrapartida, os substratos imersos em meio com antimicrobianos mantiveram-se com a mesma densidade bacteriana associada ao biofilme do início ao final do experimento, comprovando que o uso de antimicrobianos foi uma ferramenta eficiente para a inibição do biofilme microbiano nos substratos, o que foi confirmado pela microscopia confocal e pela microscopia eletrônica de varredura.

Uma correlação positiva (0,914) e significativa ($p < 0,001$) entre a densidade de bactérias do biofilme, a concentração de clorofila-*a* do biofilme e a densidade do meroplâncton assentado foi observada.

Em relação à composição de perifíton/protozooplâncton e meroplâncton, foi possível observar diferenças em relação ao tempo de exposição ($F=13,47$; $r^2=0,235$; $p < 0,001$ e $F=2,31$; $r^2=0,025$; $p < 0,022$, respectivamente), sendo registradas diferentes espécies em relação ao tempo. As diatomáceas colonizaram os substratos de forma mais representativa a partir de 144 horas. Enquanto, o protozooplâncton representado por *Strombidium* sp., *Acineta* sp., *Prorocentrum scutellum* e Ciliophora estiveram associados a uma colonização representativa tardia (após 216 horas).

A espécie de poliqueto *Phragmatopoma caudata* esteve associada a uma colonização inicial e sem um padrão de colonização específico relacionado ao perifíton ou ao protozooplâncton. As espécies de bivalve, *Brachidontes* sp., e o cirripédio, *Amphibalanus improvisus*, estiveram associadas a uma colonização em maiores densidades entre 72 e 144 horas, relacionada principalmente à ocorrência de Charophyta e Ochorophyta, com tamanho inferior a 5 μm . Já o gastrópode Littorinidade apresentou maior densidade após 216 horas de experimento, estando associado principalmente a diatomáceas cêntricas (Baciollariophyceae) e espécies de perifíton e protozooplâncton, entre 5 e 100 μm .

Diferenças na composição da comunidade (perifíton, protozooplâncton e meroplâncton) foram observadas entre as diferentes situações do substrato ($F=12,15$; $r^2=0,217$; $p < 0,001$), apresentando um agrupamento diferenciado referente ao uso de

antimicrobianos com diatomáceas com tamanho entre 5 e 20 μm . Enquanto os substratos com tinta anti-incrustante e naturais somente apresentaram uma composição diferente quando avaliadas diferentes escalas de tamanho do perifíton e do protozooplâncton ($F=13,93$; $r^2=0,241$; $p<0,001$). A ocorrência do protozooplâncton foi mais correlacionado com superfícies naturais. A orientação do substrato influenciou na composição do perifíton e do meroplâncton assentado ($F=2,45$; $r^2=0,036$; $p<0,023$ e $F=5,74$; $r^2=0,016$; $p<0,005$; respectivamente), sendo as superfícies horizontais mais atrativas à colonização. Em contrapartida, para o protozooplâncton este fator não influenciou na colonização ($F=1,02$; $r^2=0,006$; $p=0,388$). A textura não apresentou diferença na composição da comunidade (perifíton, protozooplâncton e meroplâncton).

Para a fauna vágil associada à bioincrustação, somente o fator situação do substrato apresentou diferenças com 12 ($p<0,044$), 216 ($p<0,024$) e 288 ($p<0,038$) horas de exposição, no entanto não foi observado um padrão de preferência dos organismos por um dos tratamentos.

Observou-se que o número de taxa assentado foi maior nos substratos na situação natural, seguido daqueles com tinta anti-incrustante e posteriormente com o mínimo de biofilme. Em relação ao potencial do zooplâncton, foi verificado que a segunda e a quinta reposição de zooplâncton foram as que mais contribuíram para os organismos colonizadores. Os parâmetros físico-químicos-biológicos do meio de cultivo avaliados praticamente não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

6.4 Conclusão

- (i) As bactérias (colonizadores primários) colonizam o substrato consolidado nas primeiras 12 horas de exposição, conjuntamente com algumas espécies de perifíton e de protozooplâncton (colonizadores secundários); embora o perifíton e o protozooplâncton tenham sido mais abundantes a partir de 72 horas e 216 horas, respectivamente, enquanto o assentamento do meroplâncton foi mais expressivo a partir de 144 horas (colonizadores terciários);
- (ii) Quando avaliada a densidade média, a pintura anti-incrustante parece não ter afetado negativamente a densidade de bactérias do biofilme, em contrapartida,

a densidade de perifíton, de protozooplâncton, bem como de meroplâncton assentado apresentaram uma redução em relação aos substratos naturais, embora o tratamento com antimicrobianos (com o mínimo de bactérias) pareça ser mais eficaz em inibir a colonização de micro e macro-organismos nos substratos consolidados;

- (iii) Observou-se uma relação positiva e significativa entre a presença/densidade de bactérias do biofilme, a concentração de clorofila-*a* do biofilme e a densidade de meroplâncton assentado nos substratos consolidados; entretanto, para a fauna vágil associada à bioincrustação (holoplâncton e ticoplâncton) não foi observado o mesmo padrão;
- (iv) Existe uma relação positiva entre o assentamento do meroplâncton e o biofilme microbiano durante a sucessão ecológica no substrato, todavia não está claro se a colonização do meroplâncton incrustante e sedentário depende diretamente da densidade de bactérias do biofilme (colonizadores primários) ou da densidade de perifíton (colonizadores secundários);
- (v) Os fatores que parecem estar influenciando a colonização da comunidade (perifíton, protozooplâncton e meroplâncton) no substrato consolidado são a densidade de bactérias do biofilme, seguido da orientação (perifíton e meroplâncton), sendo as superfícies horizontais mais atrativas. O potencial zooplantônico é importante em termos de número de taxa, mas o assentamento não é proporcional, no tempo e no espaço, à disponibilidade do meroplâncton na coluna d'água. Apenas porque as larvas estão disponíveis em um determinado tempo e lugar não significa que elas irão assentar em um substrato disponível.

(ver resumo referente ao artigo completo em processo de finalização para submissão ao periódico Marine Ecology Progress Series no APÊNDICE X, página 205).

7 CAPÍTULO V

“Efeito da idade do biofilme, tipo de substrato e composição da comunidade inicial na colonização do metazooplâncton no processo de bioincrustação”

Objetivo 5

7.1 Introdução

Invertebrados bentônicos associados a substratos consolidados marinhos podem contribuir para a diversidade e produtividade local, bem como para o fluxo vertical de energia em zonas costeiras, através do acoplamento bentônico-pelágico (Schnack-Schiel & Isla 2005). Em contrapartida, também estão associados a prejuízos econômicos a estruturas oceânicas como plataformas, embarcações e dutos, pois devido à sua colonização intensificam o processo corrosivo, aumentam o peso e causam entupimento destas estruturas (Yebra *et al.* 2004, Leer-Andersen & Larsson 2003, Schultz 2007, Schultz *et al.* 2011).

O assentamento destes invertebrados no substrato é subsequente à colonização de bactérias (colonizadoras primárias), que irão formar um biofilme através da produção extracelular de uma Matriz Polimérica (MPE) complexa, bem como à adesão do perifíton, do protozooplâncton e de esporos de macroalgas (colonizadores secundários), sendo este processo conhecido como bioincrustação (Scheer 1945, Wahl 1989, Quaid & Miller 2010) (ver Figura 1 na Introdução Geral).

Os invertebrados associados a este processo são representados em sua maioria por organismos zooplanctônicos com ciclo de vida meroplanctônico (*e.g.*, cirripédios) (ver Figura 2). Embora organismos holoplanctônicos (*e.g.*, copépodos Calanoida) e ticoplanctônicos (*e.g.*, anfípodos) possam também ser registrados associados a substratos consolidados (Gollner *et al.* 2006, Sarmiento *et al.* 2012), sendo classificados como fauna vágil ou acompanhante.

A escolha do local de assentamento pelo organismo é modulada por diferentes fatores, podendo estar associada às características da superfície do substrato consolidado, como o tipo de material (O'Connor & Richardson 1996, Glasby 2000, Su *et al.* 2007, Burt *et al.* 2009, Cangussu *et al.* 2010, Chung *et al.* 2010, Vedaprakash *et al.* 2013), assim como às características da comunidade residente, como a idade do biofilme bacteriano (Keough & Raimondi 1995, Wieczorek *et al.* 1995, O'Connor & Richardson 1996, Wieczorek & Tood 1997, Thiyagarajan *et al.* 1999, Hamer *et al.* 2001, Dobretsov & Qian 2006, Anderson & Epifanio 2009, Chung *et al.* 2010, Toupoint *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012, Campbell *et al.* 2011, Sneed *et al.* 2014, Whalan & Webster 2014), presença de perifíton (Daume *et al.* 1999, Gallardo & Buen 2003,

Dahms *et al.* 2004, Patil & Anil 2005, Ko & Hur 2011) e de protozooplâncton (Railkin 2004, Shimeta *et al.* 2012, Watson 2015), fatores estes que podem induzir ou inibir a colonização dos invertebrados.

Desta forma, o objetivo do atual trabalho foi testar se existe uma relação entre a colonização do zooplâncton e a idade do biofilme microbiano, bem como com a presença de diferentes comunidades de perifíton/protozooplâncton em diferentes materiais, expostos a condições laboratoriais e naturais subtropicais.

7.2 Síntese da Metodologia

7.2.1 Experimento laboratorial – Brasil

O experimento foi desenvolvido durante 21 dias na primavera (novembro de 2014). Primeiramente, induziu-se o crescimento do biofilme nos substratos em diferentes tempos. Para isso, substratos (25 cm²) orientados, devido à disponibilidade de espaço, verticalmente, (substratos horizontais ocupam mais espaços), de madeira do tipo compensado naval e de aço ASTM-36 (Figura 20) foram empregados alternadamente em um aquário (50×40×40 cm) através da utilização de suportes, o qual foi abastecido com 60 L de água do mar natural filtrada (20 µm) coletada na Praia do Cassino, no entorno do navio encalhado Altair (Figura 18), com salinidade de 25 e temperatura de 20° C. Em diferentes tempos (0, 5, 10 e 20 dias após o início do experimento) foram depositados 14 substratos de cada um dos materiais, de forma intercalada.

O cultivo foi mantido em sala climatizada nas mesmas condições de coleta com fotoperíodo 12h:12h (claro:escuro) sem aeração, para facilitar o crescimento do biofilme. Em cada um dos tempos, referente a cada idade do biofilme, foram retiradas três alíquotas do meio de cultivo, depositadas em tubos de reação e fixadas com formaldeído estéril (concentração final a 4 %), sendo mantidas no escuro sob refrigeração (8° C) para quantificação de bactérias planctônicas (org mL⁻¹).

Posteriormente aos 20 dias de crescimento máximo do biofilme microbiano, sete substratos de cada material e idade de biofilme foram removidos e lavados com solução salina estéril (0,9 %). Um dos substratos foi fixado com glutaraldeído estéril (1 %) (mínimo 12 horas) para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV), os

demais foram depositados em 60 mL de solução salina estéril para o desprendimento do biofilme dos substratos no ultra-som Cole-Parmer® (series 4710 - ultrasonic homogenizer) (Oliveira *et al.* 2006). As amostras foram fixadas com formaldeído estéril (concentração final a 4 %). Após uma homogeneização, uma alíquota de 2 mL de cada réplica foi depositada em tubo de reação, sendo armazenada no escuro sob refrigeração (8 °C) para quantificação de bactérias associadas ao biofilme (org cm^{-2}).

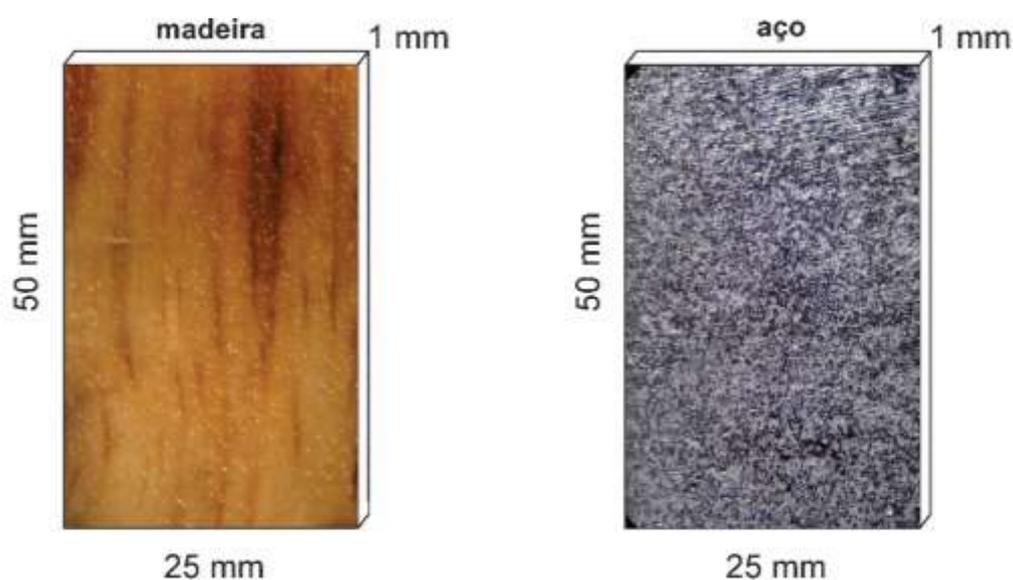


Figura 20. Substratos de madeira-compensado naval e aço-ASTM-36 utilizados no experimento laboratorial.

Para a observação da comunidade associada às superfícies em MEV, o material biológico foi processado segundo Freitas *et al.* (2010) e examinados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM - 6610LV.

Os demais substratos foram transferidos para um novo aquário com aeração onde o zooplâncton coletado foi depositado e mantido em fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro) e na mesma temperatura do cultivo de biofilme. A coleta de zooplâncton foi realizada no entorno do navio encalhado Altair (24 de novembro de 2014) com rede de plâncton cilindro-cônica de 30 cm de diâmetro e 200 μm por três minutos com duas repetições, garantindo o aporte de todos os grupos de organismos com potencial de colonização nos substratos. Um fluxômetro mecânico (TSK) foi acoplado à boca da rede a fim de se determinar o volume de água filtrado. O material amostrado foi filtrado em rede de 550 μm a fim de eliminar os principais predadores. Uma das amostras foi destinada ao acompanhamento do potencial de colonização, sendo analisada uma

alíquota de 1 a 5 % em câmara de Bogorov, feitas com sub-amostrador, enquanto a outra amostra foi depositada no aquário.

Após 24 horas de cultivo o experimento foi encerrado, procedendo-se a coleta dos substratos, os quais foram imersos individualmente em 60 mL de solução salina estéril (salinidade 25), sendo sete réplicas de cada material e idade do biofilme destinadas a quantificação e identificação da fauna vágil, sedentária e incrustante associada aos substratos.

A densidade de bactérias livres (org mL^{-1}) e associadas ao biofilme (org cm^{-2}) foi estimada por um citômetro de fluxo (BD FACSVersTM). O tamanho (μm) das células foi estimado usando o parâmetro *Forward Light Scatter* (FSC-A) com beads de latex (Molecular ProbesTM) como padrão (Herzenberg *et al.* 2006, Bouvier *et al.* 2011, Picot *et al.* 2012) e confirmado em MEV. O biovolume celular (μm^3) foi estimado e convertido para biomassa celular bacteriana (pg C cell^{-1}) seguindo os trabalhos Sun & Liu (2003) e Norland (1993), respectivamente.

Em relação aos macro-organismos assentados, procedeu-se a raspagem das superfícies com auxílio de uma espátula e em seguida foi realizada a fixação dos organismos em formaldeído tamponado a 4 %. O material fixado foi analisado em câmara de Bogorov em microscópio estereoscópico (Wild Heerbrugg).

7.2.2 Experimento de campo – Itália

Um segundo experimento de colonização foi realizado em ambiente natural onde placas de madeira, do tipo compensado naval, fibra de concreto e acrílico (25 cm^2) (Figura 21A) foram fixadas na Estação Marinha Experimental do Istituto di Scienze Marine (CNR ISMAR), localizada no Porto de Gênova, Itália (Mar Mediterrâneo) (Figura 21B), representando sete tratamentos com diferentes comunidades iniciais. Para selecionar o crescimento de diferentes comunidades, os substratos foram envoltos por redes com malhas específicas (7, 20 e $200 \mu\text{m}$) (Figura 22), totalizando 21 tratamentos (Tabela 13).

Primeiramente, houve o estabelecimento da comunidade, com exceção do tratamento 0 dias, sendo 14 substratos de cada material e tratamentos (Tabela 13) expostos verticalmente ao ambiente natural durante 20 dias, durante a primavera do

hemisfério norte (23 de maio a 16 de junho de 2017). Após este período, sete substratos de cada tratamento foram removidos para avaliação da comunidade estabelecida. Ainda, os substratos representantes do tratamento sem comunidade associada (substratos virgens) foram inseridos no ambiente e as redes foram removidas dos demais tratamentos, permitindo a colonização do metazooplâncton por 96 horas. Somente um dos lados do substrato foi analisado.

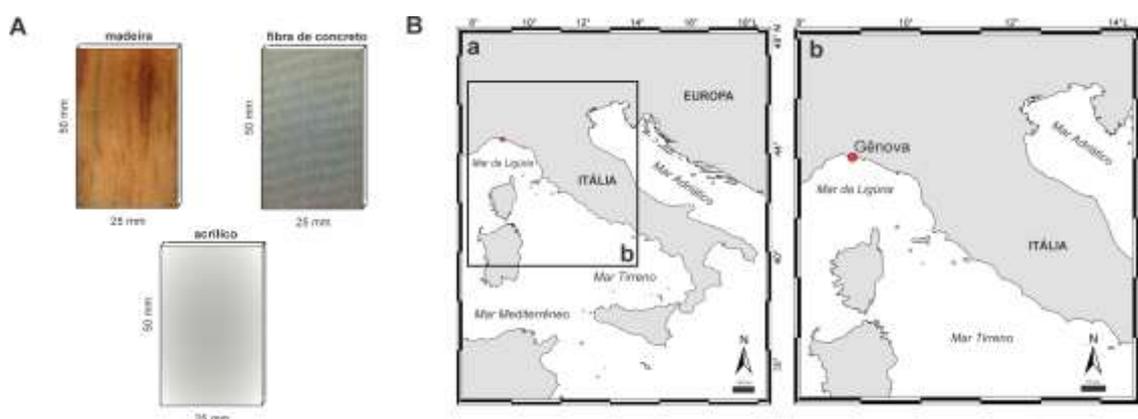


Figura 21. **A.** Substratos de madeira-compensado naval, fibra de concreto e acrílico utilizados no experimento de campo, realizado **B:** na Estação Marinha Experimental do Istituto di Scienze Marine de Gênova, Itália (Mar Mediterrâneo).

Todos os substratos foram removidos entre as duas etapas do experimento, sendo imediatamente imersos individualmente em 50 mL de solução salina estéril (0,9 %). Um substrato (antes e após a remoção das redes) foi destinado à avaliação da comunidade em MEV, seguindo a metodologia de Freitas *et al.* (2010). Três substratos (antes e após a remoção das redes) foram destinados à avaliação dos micro-organismos após desprendimento do material da superfície em suspensão em vórtex (Cecchinato meste – 414/20) por 30 s, seguido de banho de ultra-som (FALC LBS1) por 2 min e novamente em vórtex por 30 s.

Alíquotas de 2 mL da suspensão foram fixadas com formaldeído estéril (concentração final 4 %) e depositadas em tubo de reação, sendo armazenadas no escuro sob refrigeração (8° C) para posterior contagem de bactérias em citômetro de fluxo (BD FACSVerse™). Estimativas de tamanho (μm), biovolume (μm^3) e biomassa (pg C cel^{-1}) bacteriana foram realizadas seguindo a metodologia já descrita anteriormente no Capítulo I.

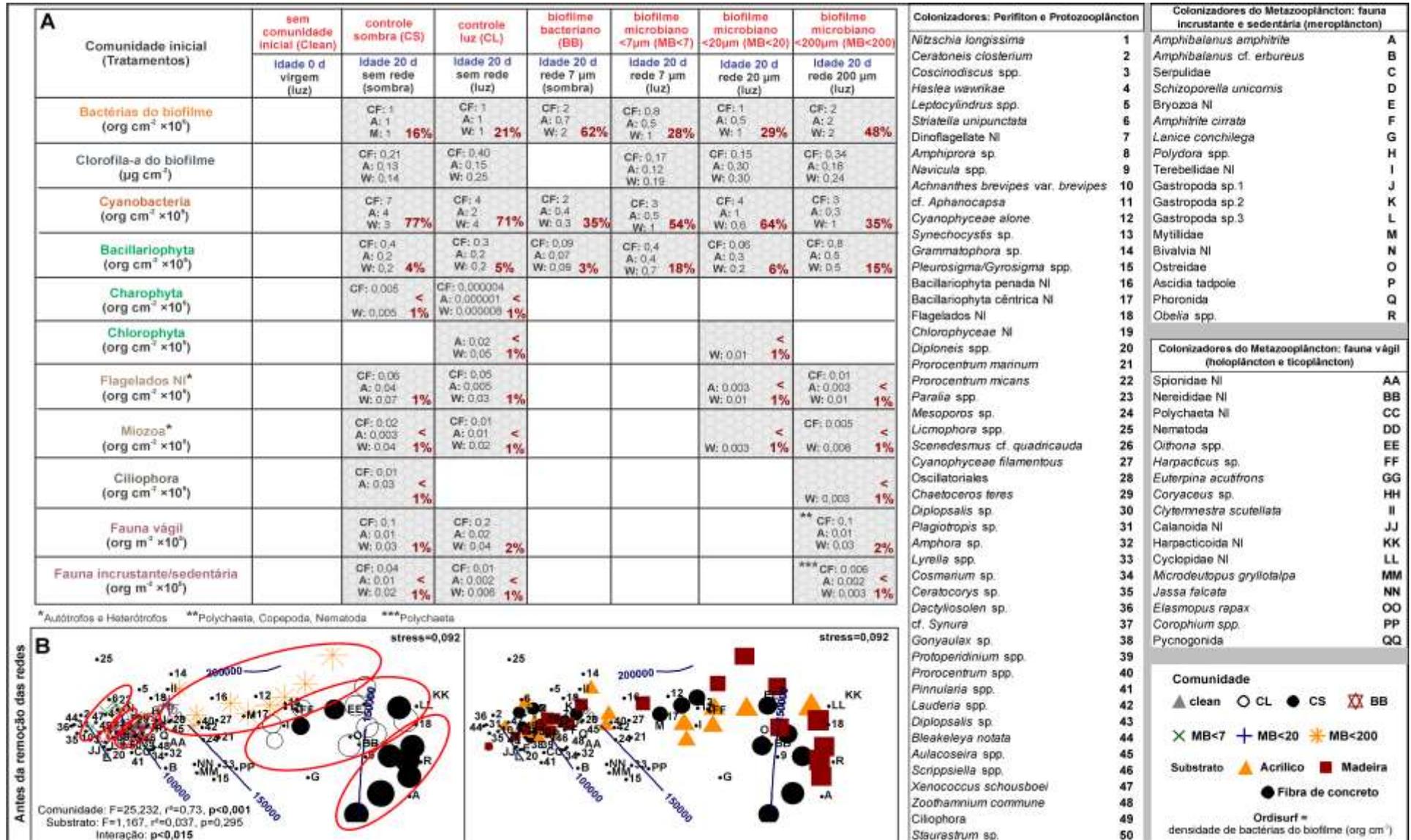


Figura 22. **A:** tratamentos utilizados no experimento, **B:** Ordenação (MDS) com índice de similaridade de Bray-Curtis com 999 permutações, comprovando as diferenças entre as comunidades iniciais, mas não entre os diferentes materiais. Símbolos maiores correspondem a densidades maiores e os círculos as diferenças observadas. CF = fibra de concreto, A = acrílico, W = madeira.

Alíquotas de 20 mL foram filtradas em filtros (GF/F Watman), os quais foram congelados e posteriormente imersos em 4,5 mL de acetona a 90 %, sendo realizada a estimativa da concentração de clorofila-*a* em Espectrofotômetro (Shimadzu UV-160A) (metodologia adaptada de Ballester & Luiz 2003, APHA 2012). O restante da solução foi fixado com lugol (1 %) para realizar a estimativa da densidade e identificação do perifíton e do protozooplâncton em câmara de Sedgwick-Rafter sob microscópio estereoscópico (Olympus BX41).

Tabela 13. Tratamentos utilizados para avaliar o processo inicial de colonização em substrato consolidados.

Material do substrato	Comunidade microbiana inicial	Condição de Luz/Sombra	Idade da comunidade microbiana	Tempo de colonização do zooplâncton (horas)
FC fibra de concreto	Clean sem comunidade	luz	0 (sem rede)	96
	CS controle sombra	sombra	20 (sem rede)	480 + 96
A acrílico	CL controle luz	luz	20 (sem rede)	480 + 96
M madeira	BB biofilme bacteriano < 7µm	sombra	20 (com rede)	96
	BM<7 biofilme microbiano <7µm	luz	20 (com rede)	96
	BM<20 biofilme microbiano <20µm	luz	20 (com rede)	96
	BM<200 biofilme microbiano <200µm	luz	20 (com rede)	480 (restrito) + 96

Três substratos (antes e após a remoção das redes) foram fixados com formaldeído a 4 % e destinados à avaliação da colonização do zooplâncton. Primeiramente, a comunidade incrustada foi identificada e contabilizada em microscópio estereoscópico (Zeiss Discovery. V8), posteriormente os substratos em suspensão foram processados em vórtex e ultra-som (mesma metodologia para desprendimento de micro-organismos) a fim de suspender a fauna vágil e sedentária, sendo 10 mL da amostra analisadas em câmara de Bogorov. Fotografias dos substratos também foram tomadas em Microscopia Óptica (Olympus BX41) e em MEV.

O potencial do zooplâncton em colonizar as superfícies foi estimado através de coletas diárias após a remoção das redes de proteção dos substratos. Para a coleta utilizou-se uma bomba de sucção (OSIP SPA 5000) e uma rede de 80 µm de malha, sendo coletados 750 litros de água por amostragem. Posteriormente, o material coletado foi analisado (alíquotas de 1-5 % da amostra) em câmara de Bogorov sob microscópio estereoscópico.

7.2.3 Análises estatísticas

Os dados foram analisados através de Modelos Lineares Generalizados (GLM) para comparar a densidade das bactérias, a concentração de clorofila-*a*, a densidade de perifíton/protozooplâncton, bem como o assentamento do zooplâncton entre os diferentes substratos e as idades e composições do biofilme microbiano, utilizando o software livre R (2017). O teste *post-hoc* Tukey seguiu as análises. O Escalonamento Multidimensional Não-métrico (MDS) foi realizado usando a similaridade de Bray-Curtis para a $\sqrt[3]{\text{Densidade}+1}$. Foram aplicadas Análises de Variância com Permutação (PERMANOVA) usando a similaridade de Bray-Curtis (9999 permutações) para detectar diferenças na composição da comunidade entre os tratamentos, enquanto o índice de contribuição (IC) da espécie foi calculado pelo teste de Porcentagem de Similaridade (SIMPER). Já a diversidade de invertebrados assentados foi calculada pelo índice de Shannon-Wiener (H'). Uma análise de Correlação foi aplicada para avaliar a relação entre a densidade de grupos microbianos e a densidade de meroplâncton estabelecido nos substratos.

7.3 Síntese dos Resultados

7.3.1 Experimento laboratorial – Brasil

A densidade de bactérias associadas ao biofilme (org cm^{-2}) aumentou em relação à sua idade ($p < 0,001$). Entre as idades, diferenças foram observadas entre 0, 5 e 20 dias. Diferenças significativas ($p < 0,001$) na densidade de bactérias foram também observadas entre o aço e a madeira, sendo o segundo substrato detentor da maior densidade. A interação entre os dois fatores também apresentou significância ($p < 0,002$). As bactérias associadas ao substrato de madeira apresentaram um tamanho maior quando comparado ao substrato de aço. Houve um aumento na densidade de bactérias planctônicas no meio de cultivo em relação ao tempo de exposição ($p < 0,001$).

Para a comunidade de invertebrados, a idade do biofilme influenciou no aumento do número de taxa ($\text{org } 25\text{cm}^{-2}$) e da densidade (org m^{-2}), tanto para a fauna vágil associada ($p < 0,002$), quanto para o meroplâncton ($p < 0,001$). No entanto, para a

fauna associada esta diferença não apresentou um padrão. O tipo de substrato não influenciou na colonização do metazooplâncton.

Os organismos registrados foram bivalves (*Brachidontes* sp. e *Cassostrea* cf. *rhizophorae*), gastrópodes (Littorinidade), cirripédios (*Amphibalanus improvisus*), e copépodos (*Paracalanus* sp., *Halicyclops* sp., *Euterpina acutifrons*)

O potencial do zooplâncton não refletiu na íntegra os invertebrados assentados. A densidade de bivalves foi o que conferiu uma maior densidade de organismos com 20 dias de idade de biofilme. A idade do biofilme microbiano também resultou em uma diferença na composição de invertebrados em ambos os tipos de substrato ($p < 0,001$).

7.3.2 Experimento de campo – Itália

Os tratamentos estabelecidos foram representados por sete comunidades microbianas iniciais distintas ($p < 0,001$) (ver Figura 21, Tabela 13), sendo caracterizadas por diferentes composições de organismos. Os Controles (CS e CL) foram representados por bactérias, perifíton (principalmente cf. *Aphanocapsa* e *Nitzschia longissima*), protozooplâncton (principalmente flagelados não identificados (NI) e *Mesosporos* sp.), além de metazooplâncton (principalmente Sepulidae - CS e Nematoda - CL). A comunidade MB<200 foi representada por bactérias, perifíton (principalmente penadas NI e *Synechocystis* sp.), protozooplâncton (principalmente *Prorocentrum marinum*, possível mixotrofia Hoppenrath *et al.* (2013)) e zooplâncton (principalmente *Euterpina acutifrons*). MB<7 foi representado por bactérias e perifíton (principalmente cf. *Aphanocapsa* e *Leptocylindrus* ssp.), enquanto MB<20 por bactérias, perifíton (principalmente cf. *Aphanocapsa* e *Leptocylindrus* ssp.) e protozooplâncton (principalmente flagelados NI). O tratamento BB foi composto basicamente por bactérias heterotróficas e cianobactérias (cf. *Aphanocapsa*). No entanto algumas diatomáceas foram registradas (principalmente *Leptocylindrus* ssp.). Antes da remoção das redes não foram observadas diferenças na composição da comunidade entre os substratos ($p = 0,295$).

Ao final do experimento com 24 dias (após a remoção das redes e mais 96 horas de exposição), a densidade de bactérias do biofilme, bem como a densidade e o número de taxa de perifíton e protozooplâncton foram afetadas pela composição da comunidade

inicial e pelo tipo do substrato ($p < 0,001$). Para as bactérias, as comunidades CL, CS, MB<200 e BB apresentaram as maiores densidades, enquanto para o perifíton e protozooplâncton o CL, CS, MB<200 e MB<7. Os substratos de madeira e fibra de concreto apresentaram a maior adesão de organismos, no entanto as bactérias foram mais abundantes no primeiro e o perifíton/protozooplâncton no segundo substrato. A concentração de clorofila-*a* do biofilme apresentou diferenças somente em relação à comunidade ($p < 0,001$), sendo os menores valores observados para os substratos Clean e BB.

Baciolariophyta, Cyanophyceae e Flagelados NI apresentaram diferenças de densidade em relação às comunidades microbianas iniciais ($p < 0,004$), sendo os menores valores médios registrados nos tratamentos Clean e BB, enquanto MB<20 e MB<200 apresentaram as maiores densidades de Baciolariophyta. Já os tratamentos CL, MB<7 e MB<200 de Cyanophyceae, enquanto o CL e MB<20 de Flagelados NI. Os demais taxa de perifíton e protozooplâncton não apresentam diferenças em suas densidades em relação a comunidade inicial ($p > 0,094$).

Baciolariophyta apresentou uma maior colonização em substratos de madeira ($p < 0,016$). Por outro lado, Cyanophyceae em substratos de fibra de concreto ($p < 0,001$), Flagelados NI e Chlorophyta em madeira e fibra de concreto, igualmente. Enquanto Charophyta, Miozoa, Ciliophora e Ochlorophyta não mostraram diferenças entre os diferentes materiais testados ($p > 0,054$). Cyanophyceae e Baciolariophyceae apresentaram correlação positiva e significativa com a densidade de bactérias heterotrófica de biofilme, independentemente do material avaliado.

Tanto a comunidade inicial quanto o tipo de substrato influenciaram no assentamento dos metazooplâncton incrustante e sedentário (meroplâncton) que apresentaram as maiores densidades e números de taxa no CL, CS e BB ($p < 0,001$) e a menor nos substratos Clean ($p < 0,001$), sendo a madeira mais atrativa que o acrílico e a fibra de concreto.

Em relação à densidade de colonização dos metazooplâncton vágil (holoplâncton e ticoplâncton), tanto a densidade quanto o número de taxa foram influenciados pela comunidade inicial ($p < 0,001$) e pelo tipo de substrato ($p < 0,001$). As maiores densidades foram registradas para CL, CS MB<7, sendo os substratos de madeira mais atrativos.

Nematoda, *Obelia* spp., Polychaeta vágil e incrustante apresentaram a maior colonização nos CL e CS ($p < 0,001$). As demais comunidades iniciais não apresentaram diferenças significativas. Gammaridae apresentou a maior densidade de organismos no CL, enquanto Cirripedia em CL, CS e BB ($p < 0,001$). Em todos estes taxa, os substratos “clean” apresentaram a menor densidade de colonização. Em relação ao tipo de substrato, também foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$). Substratos de madeira foram mais atrativos para Copepoda, Nematoda e *Obelia* spp., enquanto que a madeira e a fibra de concreto de forma equivalente para Mollusca e Polychaeta vágil.

Após a remoção das redes, foram verificadas diferença de composição do perifíton e protozooplâncton. Controle luz, substratos virgens e BB foram diferentes entre si e entre as demais comunidades. No entanto, Controle sombra e MB<20 ($p = 0,068$); MB<20 e MB<200 ($p = 0,054$); MB<200 e MB<7 ($p = 0,081$) foram similares entre si. A composição do perifíton e protozooplâncton variou em relação ao tipo de substrato ($p < 0,001$), sendo a madeira e a fibra de concreto mais atrativas que o acrílico, padrão também observado para a densidade de bactérias.

Foram também observadas diferença de composição do metazooplâncton incrustante, sedentário e vágil em relação a comunidade microbiana inicial ($p < 0,001$). Para a comunidade incrustante e sedentária, os substratos expostos ao CL, CS, Clean e BB foram diferentes entre si e entre as demais comunidades ($p < 0,001$). No entanto, MB<7 foi similar a MB<20 ($p = 0,494$) e MB<200 ($p = 0,065$). As maiores densidades de bactérias do biofilme estiveram também relacionadas as maiores densidades e ocorrências de assentamento de espécies meroplânctônicas (Controles e BB). Enquanto que a composição (número de taxa e densidade) de perifíton e protozooplâncton não afetaram este assentamento, com exceção das cianobactérias. A composição do meroplâncton assentado variou também em relação ao tipo de substrato ($p < 0,001$).

Para o metazooplâncton vágil foram observadas diferenças de composição entre o CL, CS e as demais comunidades ($p < 0,001$). Embora, os tratamentos Clean, BB, MB<7, MB<20 e MB<200 tenham apresentado uma composição similar ($p > 0,135$). A densidade de bactérias parece não afetar a colonização da fauna vágil. Quanto ao tipo de substrato, a composição dos colonizadores pertencentes ao metazooplâncton vágil foi semelhante entre a fibra de concreto e o acrílico ($p = 0,135$), embora a madeira tenha sido preferida para a colonização em relação a ambos ($p < 0,001$).

A densidade de colonização de metazooplâncton incrustante, sedentário e vágil apresentou correlação positiva e significativa com a densidade de bactérias heterotróficas associadas e cianobactérias associadas ao biofilme, sendo dependente do material de substrato. As espécies que mais contribuíram (IC) para as diferenças entre os tratamentos foram a microalga cf. *Aphanocapsa* (Cyanophyceae), e os invertebrados Serpulidae (Polychaeta incrustante) e Nematoda.

O meroplâncton apresentou a maior densidade quando comparado aos organismos ticoplanctônicos e hoplanctônicos na avaliação do potencial de metazooplâncton na colonização dos substratos. O número de taxa de metazooplâncton refletiu a sua colonização, de forma diferente do observado no experimento laboratorial, embora o estabelecimento não tenha sido proporcional à quantidade de meroplâncton na coluna de água.

7.4 Conclusão

- (i) A idade do biofilme microbiano influencia a densidade de bactérias associadas ao substrato, bem como parece influenciar positivamente o assentamento do metazooplâncton incrustante e sedentário (meroplâncton), independentemente do material do substrato;
- (ii) O material do substrato se mostrou um fator importante para o estabelecimento de organismos (bactérias, perifíton e metazooplâncton), sendo a madeira (compensado naval) e a fibra de concreto mais atrativos que o aço (ASTM-36) e o acrílico;
- (iii) A presença e densidade de bactérias heterotróficas do biofilme, bem como a idade do biofilme bacteriano parecem ser mais importantes que a composição da comunidade de perifíton e protozooplâncton para o assentamento do metazooplâncton incrustante e sedentário (meroplâncton), embora a densidade de cianobactérias (Cyanophyceae) também apresente uma correlação positiva e significativa com este assentamento, dependendo do material do substrato;

- (iv) A densidade de colonização do metazooplâncton vágil (holoplâncton e ticoplâncton) parece ser afetada pela densidade de cianobactérias e diatomáceas, dependendo do material do substrato;
- (v) O potencial de colonização do zooplâncton em termos de número de taxa pode (*i.e.*, experimento de campo) ou não (*i.e.*, experimento laboratorial) refletir a colonização, embora a proporcionalidade (quantidade) não seja observada, indicando que fatores externos influenciam na colonização.

(ver resumo referente ao artigo completo em processo de finalização para submissão ao periódico Marine Ecology Progress Series no APÊNDICE XI, página 207)

8. DISCUSSÃO GERAL

Quando se trabalha com microbiologia aquática, é esperada uma grande variabilidade nos dados obtidos, sendo necessária, muitas vezes, a utilização de um número maior de réplicas para minimizar este efeito. No entanto, um número maior de réplicas reflete em um maior tempo de análise e em um maior custo econômico. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas precisas, rápidas e baratas são muito importantes para esta área da ciência. Baseado nos resultados obtidos nesta Tese (**CAPÍTULO I**), a citometria de fluxo preenche estes requisitos, sendo uma ótima ferramenta para estimativas de densidade bacteriana de ambientes aquáticos. De acordo com Gasol & Giorgio (2000), Jochem (2001) e Kerstens *et al.* (2015), a citometria de fluxo é uma metodologia rápida, precisa e promissora para a quantificação de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme, proporcionando novos conhecimentos sobre a estrutura bacteriana e o funcionamento das comunidades microbianas. Além disso, o método é simples, exigindo poucas manipulações de amostras. No entanto, para a utilização de citômetro de fluxo é necessária uma suspensão de células individuais (Nebe-von-Caron 2000, Kerstens *et al.* 2015), que pode ser obtida, no caso de amostras de biofilme, por desprendimento de células de uma superfície utilizando um ultra-som (Oliveira *et al.* 2006), o qual comprovamos ser um procedimento eficiente para o desprendimento das células bacterianas e rompimento da MPE.

A diferença no tamanho das bactérias entre o citômetro de fluxo e as microscopias, provavelmente se deve ao padrão utilizado (esferas). Gasol & Giorgio (2000) observaram que as esferas maiores ($>2 \mu\text{m}$) são menos eficazes do que esferas menores para o estudo de populações de bactérias em citômetro de fluxo. Neste trabalho, foram utilizadas esferas de $6 \mu\text{m}$ (tamanho conferido em MEV: $5,62 \pm 0,18 \mu\text{m}$). No entanto, mesmo os valores das medidas não sendo iguais, a biomassa bacteriana aproximou as três metodologias e houve uma correlação positiva entre todas as medidas obtidas nas três metodologias.

No **CAPÍTULO II**, foi testada a influência de diferentes fatores físicos, químicos e biológicos presentes em conchas de moluscos vazias para a colonização de organismos associados ao processo de bioincrustação, sendo observada uma preferência destes organismos por determinadas características. Os dados sugerem que o

assentamento de metazooplâncton é intensificado por (i) alta densidade de bactérias do biofilme; (ii) alto grau de textura (ornamentação) interna e externa; (iii) exposição ao meio (modo de vida superficial epifaunal e infaunal raso); (iv) superfícies oxidadas de cor ocre; (v) tamanho da superfície (<50 mm² ou >1.351 mm²) e (vi) mineralogia calcítica. A textura das conchas influenciou tanto a colonização do zooplâncton (será discutida em seguida) como de bactérias. No entanto, acreditamos que o biofilme de bactérias exerça um efeito maior sobre o estabelecimento de invertebrados do que a textura do substrato, dados os valores de correlação observados, embora, os dados obtidos não sejam suficientes para esta conclusão.

Para testar a hipótese de que existe uma relação entre as bactérias do biofilme e a colonização do metazooplâncton, é necessária a obtenção de um meio com e outro sem bactérias. Desta forma, a presente Tese apresentou resultados (**CAPÍTULO III**) sobre a aplicação de antimicrobianos como procedimento para inibição de bactérias planctônicas e de bactérias associadas ao biofilme em meio marinho controlado.

Quando os antimicrobianos: penicilina, estreptomicina, neomicina e nistatina são aplicados em combinação no meio de cultivo aumentamos o espectro de ação contra bactérias e fungos (Pappas & Hoffmann 1952, Kinne 1977, Agostini 2014, Agostini *et al.* 2016). No entanto, este amplo espectro não pode causar danos aos organismos não alvo, o que foi verificado no atual trabalho em experimentos de resistência com diferentes organismos marinhos (*Conticribra weissflogii*, *Isochrysis galbana*, *Prorocentrum micans*, *Dunaliella tertiolecta*, *Amphibalanus improvisus*, *A. amphitrite*, *Tigriopus fulvus fulvus* e *Acartia tonsa*), presumindo que se uma determinada substância não causar a morte destes organismos bioindicadores, esta mesma substância não causará, em teoria, mortalidade de outros organismos de nível trófico igual ou superior.

A maior inibição bacteriana ocorreu com 12 horas de exposição. De acordo com Agostini *et al.* (2016) a meia-vida de antibióticos nos sistemas marinhos é curto, sendo necessária reposição. Uma reposição a cada 12 horas (T_{12x12}) para os antibióticos e a cada cinco dias para o antifúngico mostrou-se eficiente. No entanto, acreditamos que dependendo do objetivo do experimento/cultivo, os outros tratamentos de reposição (a cada, 24 ou 36 ou 48 ou 72 horas) podem ser uma opção, pois a reposição mais espaçada diminui as mudanças na qualidade da água em relação ao cultivo controle (sem antimicrobianos).

Por outro lado, observamos que há uma perda de eficiência dos antimicrobianos ao longo do tempo, mesmo com reposição a cada 12 horas. Assim, o experimento de teste de hipótese deve ser curto (próximo a 10 dias) para garantir a menor densidade bacteriana possível até o final do experimento.

Quanto às alterações observadas na qualidade da água de cultivo com antimicrobianos, justifica-se pela remoção do bacterioplâncton do sistema, afetando os ciclos biogeoquímicos (Amblard *et al.* 1998, Kirchman 2000). Além disso, a proporção de amônia aumenta com a excreção de zooplâncton (Hernández-León *et al.* 2008), acúmulo e decomposição de matéria orgânica (Hargreaves & Tucker 2004), assim como, se o pH e a temperatura do meio aumentam ou se a salinidade diminui (Timmons *et al.* 2002).

O problema na acumulação de nutrientes (*i.e.*, amônia) está no efeito tóxico para os organismos. Uma solução pode ser (i) uma alta taxa de renovação de água para equilibrar a concentração total de nitrogênio amoniacal (Aquafarmer 2004), (ii) remoção de matéria orgânica (Hargreaves & Tucker 2004), através de sifonagem, (iii) controle de pH, temperatura e salinidade (Timmons *et al.* 2002), bem como (iv) o uso de aeradores (YSI 2010).

Os experimentos demonstraram uma alta inibição de bactérias planctônicas quando comparadas com as bactérias do biofilme. Segundo Patel (2005), a concentração inibitória mínima de antibióticos no biofilme bacteriano pode ser até 1.000 vezes maior que para bactérias planctônicas.

A aplicação de antimicrobianos para obter um meio de cultura com um mínimo de biofilme já era conhecida. Muitos autores usaram essas substâncias para testar o papel do biofilme no assentamento dos invertebrados: Müller (1969), Fitt *et al.* (1987), Hofmann & Brand (1987), Neumann (1979), Avelin Mary *et al.* (1993), Chen & Run (1989), Bao *et al.* (2007), Roberts *et al.* (2007), Wang *et al.* (2012) e Yang *et al.* (2013). No entanto, nestes trabalhos, somente foram utilizados antibióticos, sendo reconhecido o problema gerado por fungos em sistemas sem bactérias (Leaño *et al.* 2005, Tang *et al.* 2006a, Agostini 2014, Agostini *et al.* 2016), ainda, não houve reposição destas substâncias no meio de cultivo, o que poderia ter afetado os resultados dependendo do tempo de experimento, pois a meia-vida dos antibióticos nos sistemas aquáticos é curta (Capítulo III, Agostini *et al.* 2016).

Além disso, esses experimentos envolveram uma espécie observada individualmente e não inserida em uma comunidade, bem como, dados toxicológicos sobre os antibióticos utilizados em espécies não alvo ou possíveis mudanças na qualidade da água (acumulação de amônia) não foram apresentados. Enquanto que a combinação de 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 + 0,005 g.L⁻¹ de nistatina, proposta nesta Tese para o teste de hipóteses envolvendo o papel do biofilme na comunidade marinha, foi avaliada em relação à eficiência, aos efeitos na comunidade alvo e não alvo, bem como, à metodologia de aplicação para garantir a maior inibição bacteriana possível ao longo do tempo.

Desta forma, foi possível realizar o experimento de colonização a fim de testar a hipótese sobre o papel do das bactérias associadas ao biofilme marinho na sucessão ecológica durante o processo de bioincrustação (**CAPÍTULO IV**).

A maior abundância de meroplâncton ocorre geralmente na primavera, relacionada à floração do fitoplâncton (Highfield *et al.* 2010, Kuklinski *et al.* 2013, Stübner *et al.* 2016) e às condições físicas e químicas que favorecem a sobrevivência das larvas (Pradillon *et al.* 2007). Nesta estação, o meroplâncton normalmente domina numericamente a comunidade zooplânctônica (Michelsen *et al.* 2017). No atual estudo, o potencial meroplânctônico das amostras do PELD e do navio Altair foi maior na primavera, como o esperado; no entanto, na primavera de 2015, o sul do Brasil estava sob forte influência de um El Niño (Australian Government Bureau of Meteorology 2015), que afetou a pluviosidade e conseqüentemente a salinidade da água. Assim, a abundância e o número de taxa do meroplâncton foi inferior ao esperado para este período o que refletiu no assentamento durante o experimento, não apresentando muitos grupos em altas densidades com potencial de colonização das superfícies utilizadas, o que não impediu que a hipótese fosse testada.

Houve um padrão de sucessão ecológica bem definido durante o experimento, sendo as bactérias as colonizadoras primárias, responsáveis por modificar o ambiente de modo a torná-lo mais adequado (Connell & Slatyer 1977, Jenkins & Martins 2010) ao estabelecimento do perifíton e do protozooplâncton (colonizadores secundários), os quais formam uma comunidade tridimensional, como observado por Round (1971). As diatomáceas foram mais abundantes e diversas no perifíton em comparação a outras

microalgas, como já observado na literatura (Ko & Hur 2011). O meroplâncton assentado (colonizadores terciários) pareceu responder à variação de densidade e composição de organismos já estabelecidos (bactérias, perifíton e protozooplâncton) nas superfícies ao longo do tempo, como verificado por Keough & Raimondi (1995, 1996).

As bactérias não só resistiram à tinta anti-incrustante, como também apresentaram um crescimento equivalente ao observado nos substratos naturais. De acordo com Cooney & Tang (1999), Valkirs *et al.* (2003), Camps *et al.* (2014), este padrão é comum quando as superfícies pintadas, mesmo com biocidas, estão estáticas. Esta característica pode ser associada à produção da MPE. Os biofilmes marinhos estabelecidos em tintas anti-incrustantes podem resultar em um aumento de 100 % da produção de MPE (Woods *et al.* 1988, Fang *et al.* 2002). Ou ainda à resistência bacteriana (Flach *et al.* 2017).

Camps *et al.* (2014) observaram que a colonização de diatomáceas é afetada pelo revestimento biocida à base de cobre, corroborando o trabalho atual, que observou uma menor concentração de clorofila-*a* em substratos com tinta anti-incrustante quando comparada a superfícies naturais, embora muitas espécies de diatomáceas também tenham sido registradas nos substratos com anti-incrustante. Em relação ao assentamento do meroplâncton, Bao *et al.* (2010) observaram que as tintas anti-incrustantes à base de cobre afetam a incrustação de invertebrados, sendo o mesmo padrão observado para a fauna vágil associada à bioincrustação (Perrett *et al.* 2006).

Neste trabalho, a inibição do biofilme utilizando antimicrobianos foi mais eficaz para evitar o estabelecimento do perifíton, protozooplâncton e meroplâncton do que a pintura anti-incrustante, provavelmente devido à inibição do biofilme bacteriano.

Estudos anteriores demonstraram que a densidade de biofilmes bacterianos pode mediar o estabelecimento de perifíton, protozooplâncton e invertebrados (Neal & Yule 1994a,b, Fukami *et al.* 1997, Sekar *et al.* 2004, Yang *et al.* 2013, Wang *et al.* 2012, Freckelton *et al.* 2017). Em contrapartida, conforme Daume *et al.* 1999, Harder *et al.* (2002), Gallardo & Buen (2003), Dahms *et al.* (2004), Patil & Anil (2005), Ko & Hur (2011), Shimeta *et al.* (2012) e Watson (2015) a presença de perifíton/protozooplâncton é o principal fator que induz a colonização de invertebrados no substrato.

Watson (2015) verificou a importância do comportamento, da morfologia e das preferências de predação do protozooplâncton à dinâmica de colonização dos

invertebrados. A relação positiva observada entre protozooplâncton e larvas meroplânctônicas podem estar associadas à alteração da densidade de bactérias no biofilme, causada pelo controle *top-down* exercido por ciliados, favorecendo o estabelecimento do perifíton através da disponibilidade do nicho. Os flagelados e ciliados heterotróficos (protozooplâncton) são os principais predadores bacterianos na maioria dos sistemas aquáticos (Hahn & Höfle 2001).

Todos os grupos, com exceção de bactérias e do protozooplâncton, mostraram maior assentamento em superfícies horizontais do que em verticais, demonstrando que distintas orientações afetam a comunidade de organismos associada a substratos consolidados (Ács & Kiss 1991a,b, Connell 1999, Glasby 2000, Kralj *et al.* 2006). No entanto, esta preferência pode estar relacionada a sedimentação passiva de organismos, principalmente da fauna vágil e sedentária que permanece associada ao substrato devido a orientação, sendo frequente o registro de ovos e embriões (como observado para misídeos) de organismos zooplânctônicos, não ficando claro se este estabelecimento ocorreu pela deposição de ovos de forma ativa pelos adultos ou passiva. Embora, de qualquer forma, estes organismos correspondam a uma associação biológica com as superfícies, incorporando o processo de bioincrustação, bem como o acoplamento planctônico-bentônico.

Sobre a textura entre 0,2 e 20 μm das superfícies, o presente trabalho não observou diferenças na densidade e na composição dos organismos. Embora, na literatura, essa característica seja importante para a colonização (Hill & Thomason 1998, Bernsson *et al.* 2000a, Schumacher *et al.* 2007, Scardino *et al.* 2008, Sweat & Johnson 2013). Alguns trabalhos verificaram que a maior colonização de perifíton e de invertebrados estava associada a superfícies texturizadas quando comparadas com superfícies lisas (Bernsson *et al.* 2000a,b, Sekar *et al.* 2004), enquanto outros observaram que a adesão de organismos nos substratos diminuiu com o aumento da rugosidade superficial (Souza & Ferragut 2012, Sweat & Johnson 2013).

Em geral, a textura superficial pode induzir ou repelir a colonização de perifíton e do meroplâncton dependendo do seu tamanho. De acordo com Callow *et al.* (2002), Scardino *et al.* (2008) e Myan *et al.* (2013), as texturas ligeiramente maiores do que o tamanho das larvas/espores induzem a colonização, que foi o caso das conchas de *Anadara brasiliiana*, proporcionando um local mais seguro para a adesão e refúgio

contra as forças hidrodinâmicas (Myan *et al.* 2013, Scardino *et al.* 2008). Os mesmos autores observaram que topografias entre 1 e 100 mm geralmente favorecem o estabelecimento da fauna incrustante. No presente trabalho, a microtextura utilizada compreendeu tamanhos entre 2 e 20 μm , provavelmente muito pequena para observar uma influência na colonização de organismos (perifíton, protozooplâncton e invertebrados).

Muitas espécies de perifíton de água doce foram registradas durante o experimento associadas aos substratos. Este padrão está relacionado com a presença de um sangradouro ao lado do navio Altair, que contribuiu para baixar a salinidade, favorecendo o crescimento de espécies de água doce. Decidimos quantificar todas as microalgas associadas aos substratos, incluindo as espécies fitoplanctônicas, pois estes organismos contribuem para a acumulação biológica em substratos consolidados e provam o acoplamento bentônico-planctônico (Schnack-Schiel & Isla 2005, Griffiths *et al.* 2017).

Sobre os parâmetros físico-químicos avaliados, os resultados comprovam condições similares entre os meios de cultivo expostos a diferentes situações dos substratos. Os diferentes valores observados para as situações com antimicrobianos e pintura anti-incrustante não são considerados tóxicos.

Apesar da existência de uma relação positiva entre a presença de bactérias de biofilme e o assentamento dos demais colonizadores, não está claro se é o biofilme bacteriano que induz o estabelecimento do meroplâncton ou se é a comunidade de perifíton/protozooplâncton. Uma hipótese é que as bactérias estejam induzindo a colonização do perifíton/protozooplâncton e estes estejam induzindo o assentamento dos invertebrados. Desta forma, o meroplâncton assentaria em reposta às bactérias do biofilme indiretamente, e ao perifíton/protozooplâncton diretamente.

O **CAPÍTULO V** permitiu testar esta hipótese através da avaliação dos efeitos de diferentes idades de biofilme, composições de comunidades microbianas (bactérias, perifíton e protozooplâncton), bem como diferentes materiais para o estabelecimento do metazooplâncton no substrato, comprovando que o assentamento do meroplâncton está diretamente relacionado à presença e à densidade de bactérias do biofilme, bem como à idade do biofilme bacteriano, apesar da densidade de cianobactérias também exercer um papel significativo, dependendo do material do substrato, sendo, desta forma, a

comunidade perifítica e protozooplânctônica menos importante para o assentamento larval. Este resultado entra em desacordo com alguns trabalhos (Daume *et al.* 1999, Gallardo & Buen 2003, Dahms *et al.* 2004, Railkin 2004, Patil & Anil 2005, Ko & Hur 2011, Shimeta *et al.* 2012, Watson 2015) que observaram a importância do perifíton (principalmente diatomáceas) e/ou do protozooplâncton na colonização de invertebrados incrustantes e sedentários no substrato, possivelmente pela ausência de uma avaliação a nível de comunidade, generalizando resultados observados para algumas espécies.

Ko & Hur (2011) por exemplo, observaram que nove espécies de microalgas bentônicas testadas individualmente aumentaram a taxa de assentamento e metamorfose de larvas de abalone (*Haliotis discus hannai* Ino, 1953). Da mesma forma que Shimeta *et al.* (2012) observaram o dobro de assentamento do serpulídeo *Spirobranchus taeniatus* (Lamarck, 1818) na presença de ciliados.

A preferência dos organismos por determinados materiais já foi observada em muitos trabalhos (O'Connor & Richardson 1996, Glasby 2000, Su *et al.* 2007, Burt *et al.* 2009, Cangussu *et al.* 2010, Chung *et al.* 2010, Vedaprakash *et al.* 2013). O motivo das diferenças observadas geralmente está associado à topografia, à cor e à molhabilidade das superfícies, sendo substratos heterogêneos e hidrofóbicos mais atrativos, como observado para a madeira (maior heterogeneidade) e a fibra de concreto (coloração mais escura). O acrílico apresentou a menor colonização, quando comparado a madeira, a fibra de concreto e ao aço. No **CAPÍTULO IV**, foi utilizado o acrílico para o experimento laboratorial, e ao final dos 12 dias foi observada pouca colonização, o que provavelmente está relacionado a falta de afinidade com esta superfície por parte das larvas como observado no **CAPÍTULO V**, somado ao baixo potencial de colonização registrado. A escolha do acrílico no experimento laboratorial está associada à superfície atóxica deste material.

De acordo com nossos resultados dos **CAPÍTULOS II, IV e V**, o potencial larval é importante, mas o assentamento do meroplâncton não é proporcional, no tempo e no espaço, à disponibilidade de organismos na coluna de água. Pineda (1994) e Pineda (2000) sugerem que o assentamento dos invertebrados depende de uma série de fatores, incluindo o suprimento larval. No entanto, estudos de recrutamento demonstram grande variabilidade espacial e temporal no potencial das larvas e no padrão de colonização

(Gaines & Roughgarden 1987), produzindo uma ausência de correlação entre o assentamento e a disponibilidade do meroplâncton (Pineda *et al.* 2010). Outros estudos (Olivier *et al.* 2000, Porri *et al.* 2006, Lopez & Coutinho 2008, Rilov *et al.* 2008) também não encontraram correlação entre o meroplâncton disponíveis e a intensidade de assentamento, levando a crer que fatores extrínsecos (*i.e.*, características do substrato) estejam atuando.

A compreensão da dinâmica da bioincrustação marinha, envolvendo os fatores físicos, químicos e biológicos que levam a um determinado organismo colonizar uma determinada superfície, permite que as informações obtidas possam ser empregadas em técnicas e metodologias a fim de evitar a colonização de organismos em substratos consolidados artificiais específicos, tendo o presente estudo não somente uma aplicação ecológica como também biotecnológica como apresentado na justificativa.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- (i) O citômetro de fluxo permite a estimativa de densidade de bactérias tanto planctônicas quanto associadas ao biofilme de uma forma equivalente estatisticamente e mais rápida que as microscopias de epifluorescência e eletrônica de varredura, garantindo o melhor custo-benefício, no entanto as estimativas de tamanho celular bacteriano são superestimadas, devendo ser utilizada a microscopia em paralelo. Desta forma, a **H₁** foi parcialmente aceita;
- (ii) A textura, tamanho, orientação (fatores físicos), a cor, a composição/material e a presença de tinta anti-incrustante (fatores químicos) e a presença de biofilme bacteriano (fator biológico) foram os fatores mais correlacionados à colonização do metazooplâncton em substratos consolidados, aceitando parcialmente a **H₂**.
- (iii) A utilização da combinação de antimicrobianos (antibióticos e antifúngico) permitiu o teste de hipótese, sem causar danos agudos aos organismos não alvo, sendo a **H₃** aceita;
- (iv) Existe uma relação positiva entre a densidade de bactérias associadas ao biofilme e a sucessão ecológica, envolvendo o estabelecimento de perifíton e de meroplâncton no substrato consolidado, confirmando a **H₄**;
- (v) O assentamento do metazooplâncton incrustante e sedentário (meroplâncton) no substrato consolidado está relacionado à densidade de bactérias heterotróficas associadas ao biofilme, bem como à idade e a composição do biofilme microbiano, sendo biofilmes mais maduros, com uma maior contribuição de bactérias na composição quando comparado à contribuição do perifíton, mais atrativos, embora a densidade de cianobactérias exerça um papel secundário para este assentamento, confirmando a **H₅**.

10. CONCLUSÃO GERAL

A presença de tinta anti-incrustante, bem como a exposição ao meio e o tempo de exposição foram fatores importantes para a colonização do metazooplâncton, no entanto já era esperado que superfícies pintadas apresentassem uma menor colonização do metazooplâncton, devido ao efeito tóxico do óxido cuproso presente na tinta Supermarine ABC 095 (Renner), da mesma forma que era esperado que superfícies mais expostas ao meio apresentassem uma maior taxa de assentamento de invertebrados e que a sucessão ecológica ocorresse em relação ao tempo de exposição dos substratos no meio.

O potencial do zooplâncton é importante quando relacionado à composição dos taxa, no entanto, comprovamos que fatores externos (químicos, físicos e biológicos) relacionados ao substrato afetam mais a colonização.

Dentre os fatores físicos, químicos e biológicos testados, a textura ($>20 \mu\text{m}$), a orientação (horizontal), o material (madeira e fibra de concreto), a composição da superfície no caso das conchas de moluscos utilizadas como substratos (calcíticas e biominerálicas), o tamanho ($<50 \text{ mm}^2$ ou $>1.351 \text{ mm}^2$), a cor (ocre-amarelada) do substrato, bem como a densidade, idade e composição do biofilme bacteriano são os fatores que apresentaram maior influência para a colonização do metazooplâncton durante o processo de bioincrustação. Já dentre os fatores supracitados, o biofilme bacteriano exerceu o efeito mais significativo, sendo maiores densidades de bactérias heterotróficas, seguidas da densidade de cianobactérias, relacionadas à ocorrência da sucessão ecológica e à maior taxa de assentamento de invertebrados, o que pode ser ainda intensificado ou reduzido quando os fatores físicos (textura, orientação, tamanho do substrato) e químicos (material, composição, cor do substrato) estão interagindo conjuntamente.

11. PERSPECTIVAS

- (i) Analisar molecularmente (Metagenômica) a comunidade bacteriana (16S) e fúngica (ITS), avaliando a sucessão ecológica entre estes micro-organismos, bem como relacioná-los com o assentamento de perifíton, protozooplâncton e invertebrados durante a sucessão ecológica;
- (ii) Testar inibidores bacterianos naturais (metabólitos secundários de plantas e animais) com a intenção de inibir a colonização de perifíton, protozooplâncton e invertebrados;
- (iii) Utilizar a combinação de antimicrobianos como ferramenta para outros estudos ecológicos envolvendo perguntas sobre o papel de bactérias na comunidade aquática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARZUA, S., JAKUBOWSKI, S. 1995. Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biofouling and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Mar Ecol, Progress Series*, Amelinghausen, 123: 301-312.
- ABSALÃO, R.S. 1993. *Colonização primária e sequência de substituições, em substrato artificial, na comunidade epibêntica da Baía da Guanabara, RJ, Brasil*. 230f. Tese de doutorado (Zoologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ÁCS, É., K. T. KISS, 1991a. Investigation of periphytic algae in the Danube at God (1669 river km, Hungary). *Archiv fu'r Hydrobiologie Supplement 89 – Algological studies* 62: 47–67.
- ÁCS, É., K.T. KISS, 1991b. Neuere Methode zu den Untersuchungen des Donauperiphytons. 29. Arbeitstagung der IAD, Kiew pp 37–40.
- ACT. *Biofouling prevention technologies for coastal sensors/sensor platforms*. In: ACT WORKSHOP IN BIOFOULING, 2003, Solomous. Workshop Proceedings... Salomous, Alliance for Coastal Technologies, 2003. Disponível em: <http://www.whoi.edu/cms/files/ACT_WR03-05_Biofouling_26023.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2011.
- AGOSTINI, V.O. 2014. *Avaliação dos efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de plâncton marinho*. 124f. Dissertação de Mestrado (Oceanografia Biológica) – Universidade Federal do Rio Grande.
- AGOSTINI, V.O., MACEDO, A.J., MUXAGATA, E.M. 2016. Evaluation of antibiotics as a methodological procedure to inhibit free-living and biofilm bacteria in marine zooplankton culture. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 88(1):733-746.
- AGOSTINI, V.O., OZORIO, C.P. 2016. Colonization record of *Isognomon bicolor* (Mollusca: Bivalvia) on pipeline monobuoys in the Brazilian south coast. *Marine Biodiversity Records*, 9:84.
- AGOSTINI, V.O., RITTER, M.N., MUXAGATA, E., OZORIO, C.P. 2017. *Invertebrados associados a substratos consolidados*. In: Machado, C.P. (Org.).

- Ensino de Ciências: práticas e exercícios para a sala de aula. Caxias do Sul, RS: Educs. 214 p.
- ALABBAS, F. M., BHOLA, S.M., SPEAR, J.R., OLSON, D.L., MISHRA, B. 2013. The shielding effect of wild type iron reducing bacterial flora on the corrosion of linepipe steel. *Engineering Failure Analysis*, 33: 222–235.
- ALSHARIF, R., GODFREY, W. 2002. Bacterial Detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry. BD Biosciences, San Jose, CA. 6 p.
- AMBLARD, C., BOISSON, J.C., BOURDIER, G., FONTVIEILLE, D., GAYTE, X., SIME-NGANDO, T. 1998. Microbial ecology in aquatic Systems: a review from viruses to protozoa. *Science*, 11: 145-162.
- AMBRIZ-AVIÑA, V., CONTRERAS-GARDUÑO, J.A., PEDRAZA-REYES, M. 2014. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *BioMed Research International*, 14 p.
- ANDERSON, J.A., EPIFANIO, C.E. 2009. Induction of metamorphosis in the Asian shore crab *Hemigrapsus sanguineus*: Characterization of the cue associated with biofilm from adult habitat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, , 382: 34.
- ANTUNES, A.L., TRENTIN, D.S., BONFANTI, J.W., PINTO, C.C., PEREZ, L.R., MACEDO, A.J., BARTH, A. 2010. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 118: 873–877.
- APHA - American Public Health Association. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22^o ed. Washington.
- AQUAFARMER. 2004. The farming of Arctic charr. Technical Institute of Iceland, the Holar University College and The Aquaculture Development Centre of Ireland. November 2007 – January 2008; <http://www.holar.is/~aquafarmer/>
- AVELIN MARY, S.R., VITALINA MARY, S.R., RITTSCHOF, D., NAGABHUSHANAM, R. 1993. Bacterial barnacle interaction: potential of using juncellins and antibiotics to alter structure of bacterial communities. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 2155-2167
- AUSTRALIAN GOVERNMENT BUREAU OF METEOROLOGY. 2015. <http://www.bom.gov.au/climate/enso/>. Acessado em novembro de 2015.

- AZIS, P.K.A., AL-TISAN, I., SASIKUMAR, N. 2001. Biofouling potential and environmental factors of seawater at a desalination plant intake. *Desalination*, 135: 69–82.
- BAO, W.Y., SATUITO, C.G., YANG, J-L., KITAMURA, H. 2007. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Mar Biol.*, 150: 565–574.
- BALLESTER, E.L.C., LUIZ, E. 2003. Influência do biofilme no crescimento de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivados em sistemas de berçário. *Atlântica*, 25(2).
- BD FACS VERSE. 2011. Apostila do operador. 156 p.
- BEECH, I.B., SUNNER, J. A., HIRAOKA, K. 2005. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology*, [s.l.], 8(3): 157-168.
- BERNTSSON, K.M., JONSSON, P.R., LEJHALL, M., GATENHOLM, P. 2000a. Analysis of behavioural rejection of micro-textured surfaces and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, , 251: 59-83.
- BERNTSSON, K.M., ANDREASSON, H., JONSSON, P.R., LARSSON, L., RING, K., PETRONIS, S., GATENHOLM, P. 2000b. Reduction of barnacle recruitment on micro-textured surfaces: Analysis of effective topographic characteristics and evaluation of skin friction. *Biofouling*, 16: 2, 245-261.
- BERS, A.V., WAHL, M. 2004. The influence of natural surface microtopographies on fouling. *Biofouling*, 20(1): 43-51.
- BIDLE, K.D., BRZEZINSKI, M.A., LONG, R.A., JONES, J.L., AZAM, F. 2003. Diminished efficiency in the oceanic silica pump caused by bacteria-mediated silica dissolution. *Limnology and Oceanography* 48(5): 1855–1868.
- BOULOS, L., PRÉVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J., DESJARDINS, R. 1999. LIVE/DEAD[®] BacLightE: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77–86

- BOUVIER, T., TROUSSELLIER, M., ANZIL, A., COURTIES, C., SERVAIS, P. 2011. Using Light Scatter Signal to Estimate Bacterial Biovolume by Flow Cytometry. *Cytometry*, 44: 188–194.
- BOYLES, T.H., WASSERMAN, S. 2015. Diagnosis of bacterial infection. *SAMJ*, 105(5).
- BRIDIER, A., BRIANDET, R., BOUCHEZ, T., JABOT, F. 2014. A model-based approach to detect interspecific interactions during biofilm development. *Biofouling*: 30: 761-771.
- BROMLEY, R.G., HEINBERG, C. 2006. Attachment strategies of organisms on hard substrates: A palaeontological view. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 232: 429– 453.
- BUMBEER, J.A., ROCHA, R.M. 2012. Detection of introduced sessile species on the near shore continental shelf in southern Brazil. *Zoologia*, 29(2): 126–134.
- BURRELL, T.J., MAAS, E.W., HULSTON, D.A., LAW, C.S. 2015. Bacterial abundance, processes and diversity responses to acidification at a coastal CO₂ vent. *FEMS Microbiol Lett* 362(18): fmv154.
- BURT, J., BARTHOLOMEW, A., BAUMAN, A., SAIF, A., SALE, P.F. 2009. Coral recruitment and early benthic community development on several materials used in the construction of artificial reefs and breakwaters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 373:72-78.
- CALLOW, M.E. 2000. Algal biofilms. In: EVANS LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic; p. 189–209.
- CALLOW, M.E., JENNINGS, A.R., BRENNAN, A.B., SEEGERT, C.E., GIBSON, A., WILSON, L., FEINBERG, A., BANEY, R., CALLOW, J.A. 2002. Microtopographic cues for settlement of zoospores of the green fouling alga *Enteromorpha*. *Biofouling*, 18: 237–245.
- CALLOW, J.A., CALLOW, M.E. 2011. Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nat Commun.* 2:244.
- CAMPBELL, A.H., MERITT, D.W., FRANKLIN, R.B., BOONE, E.L., NICELY, C.T., BROWN, B.L. 2011. Effects of age and composition of field-produced biofilms on oyster larval setting, *Biofouling*, 27:3, 255-265.

- CAMPS, M., BARANI, A., GREGORI, G., BOUCHEZ, A., BERRE, B.L., BRESSY, C., BLACHE, Y., BRIANDA, J-F. 2014. Antifouling Coatings Influence both Abundance and Community Structure of Colonizing Biofilms: a Case Study in the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16): 4821–4831.
- CANGUSSU, L.C., ALTVATER, L., HADDAD, M.A., CABRAL, A.C., LINZMEIERMHEYSE, H., ROCHA, R.M. 2010. Substrate type as a selective tool against colonization by non-native sessile invertebrates. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3):219-231.
- CARL, C., POOLE, A.J., SEXTON, B.A., GLENN, F.L., VUCKO, M.J., WILLIAMS, M.R., WHALAN, S., NYS, R.de. 2012. Enhancing the settlement and attachment strength of pediveligers of *Mytilus galloprovincialis* by changing surface wettability and microtopography. *Biofouling*, 28(2): 175-186.
- CÉLINE, L., LAUREEN, B., CHRISTINE, D., CLAUDE, C., HÉLÉNE, A. 2014. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 105.
- CHARACKLIS, W.G. 1990. *Microbial biofouling*. In: CHARACKLIS, W.R., MARSHALL, K.C. (Eds) *Biofilms*. Wiley, New York, pp 523–584.
- CHEN, C.P., RUN, J.Q. 1989. Larval growth and bacteria-induced metamorphosis of *Arachnoides placenta* (L.) (Echinodermata: Echinoidea). In: RYLAND, J.S., TYLER, P.A. (Eds) *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms*. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark, pp 55-59
- CHO, B.C., AZAM, F. 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332:441–443.
- CHUNG, H.C., LEE, O.O., HUANG, Y-L., MOK, S.Y., KOLTER, R., QIAN, P-Y. 2010. Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *The ISME Journal*, 1–12.
- COENYE, T., NELIS, H.J. 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 83: 89–105.

- CONNELL, J.H., SLAYTER, R.O. 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *American Naturalist*, 111, 1119–1144.
- CONNELL, S.D. 1999. Effects of Surface Orientation on the Cover of Epibiota. *Biofouling*, 14(3): 219-226.
- CONOVER, R.J. 1967. Reproductive cycle, early development, and fecundity in laboratory populations of the copepod *Calanus hyperboreus*. *Crustaceana*, 13: 61-72.
- COONEY, J.J., TANG, R.J. 1999. Quantifying effects of antifouling paints on microbial biofilm formation. *Methods Enzymol*, 310: 637 – 645
- COSTA, E., PIAZZA, V., GAMBARDELLA, C., MORESCO, R., PRATO, E., BIANDOLINO, F., CASSIN, D., BOTTER, M., MAURIZIO, D., D'ADAMO, R., FABBROCINI, A., FAIMALI, M., GARAVENTA, F. 2016. Ecotoxicological effects of sediments from Mar Piccolo, South Italy: toxicity testing with organisms from different trophic levels. *Environ Sci Pollut Res Int*, 12755-69.
- COUTINHO, R. 2006. Avaliação crítica das causas da zonação dos organismos bentônicos em costões rochosos. *Oecologia Brasiliensis*, 1: 259-271.
- COZZI, S., CANTONI, C. 2006 Partition nitrogen uptake in phytoplankton and bacteria using bactericidal agents and light dependent incubations. *Periodicum biologorum*, 108: 145-150.
- CRESWELL, L. 2010. Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed. SRAC Publication, Nº: 5004, 16 pp.
- DAHMS, H.U., DOBRETSOV, S., QIAN, P.-Y. 2004. The effect of bacterial and diatom biofilms on the attachment of the bryozoan *Bugula neritina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313: 191–209.
- DAHMS, H.U., HARDER, T., QIAN, P.Y. 2007. Selective attraction and reproductive performance of a harpacticoid copepod in a response to biofilms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341: 228-238.
- DAUME, S., BRAND-GARDNER, S., WOELKERLING, W.J. 1999. Preferential settlement of abalone larvae: diatom films vs. non-geniculate coralline red algae. *Aquaculture*, 174: 243–254.

- DAVEY, H.M., KELL, D.B. 1997. Fluorescent Brighteners: Novel Stains for the Flow Cytometric Analysis of Microorganisms Hazel M. *Cytometry*, 28:311–315.
- DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., BOSSIER, P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections, luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol*, 25: 472-479.
- DELORENZO, M.E., LEWITUS, A.J., SCOTT, G.I., ROSS, P.E. 2001. Use of metabolic inhibitors to characterize ecological interactions in an estuarine microbial food web. *Microbial Ecology*, 42: 317-327.
- DELUPIS, G.D.DI, MACRI, A., CIVITAREALE, C., MIGLIORE L. 1992. Antibiotics of zootechnical use: Effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, 22: 53–60.
- DOBRETSOV, S., QIAN, P-Y. 2006. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms. *J Exp Mar Biol Ecol.*, 333: 263–274.
- DOBRETSOV, S., ABED, R.M.M., TEPLITSKI, M. 2013a. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling*, 29:4, 423-441.
- DROOP, M.R. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *British Phycological Bulletin*, 3: 295-297.
- DWORJANYN, S.A., PIROZZI, I. 2008. Induction of settlement in the sea urchin *Tripneustes gratilla* by macroalgae, biofilms and conspecifics: A role for bacteria? *Aquaculture*, 274: 268–274.
- EPSTEIN, N. 1981. Fouling: technical aspects. In: SOMERSCALES EFC, KNUDSEN JG (eds) Fouling of heat transfer equipment. Hemisphere, Washington, pp 31–53.
- ERWIN, P.M., SONG, B.A., SZMANT, M. 2008. Settlement behavior of *Acropora palmata* planulae: effects of biofilm age and crustose coralline algal cover. In: RIEGL, B., DODGE, R.E. (Eds.). 11th International coral reef symposium proceedings. Nova Southeastern University National Coral Reef Institute, Davie, Florida.
- FAIMALI, M., GARAVENTA, F., TERLIZZI, A., CHIANTORE, M., CATTANEO-VIETTI, R. 2004. The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement. *J Exp Mar Biol Ecol.* 306(1): 37-50.

- FANG, H.H.P., XU, L.C., CHAN, K.Y. 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Res*, 36: 4709 – 4716.
- FARAPONOVA, O., GIACCO, E., BIANCOLINO, F., PRATO, E., PRETE, F. DEL, VALENTI, A., SARCINA, S., PASTERIS, A., MONTECAVALLI, A., COMIN, S., CESCA, C., FRANCESE, M., CIGAR, M., PIAZZA, V., FALLENI, F., LACCHETTI, I. 2016. *Tigriopus fulvus*: The interlaboratory comparison of the acute toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124: 309–314.
- FARJALLA V.F., LAQUE, T., SUHETT, A.L., AMADO, A.M., ESTEVES, F. de A. 2005. Diel variation of bacterial abundance and productivity in tropical coastal lagoons: the importance of bottomup factors in a short-time scale. *Acta Limnol. Bras.*, 17(4): 373-383.
- FELIP, M., ANDREATTA, S., SOMMARUGA, R., STRASKRÁBOVÁ, V., CATALAN, J. 2007. Suitability of Flow Cytometry for Estimating Bacterial Biovolume in Natural Plankton Samples: Comparison with Microscopy Data. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4508–4514
- FINLEY, D. 2012. Biofiles: cell culture contamination. *Sigma-Aldrich*, (1): 24 p.
- FINNEY, D.J. 1971. Probit Analysis, third ed. Cambridge University Press, London, England.
- FINNEY, D.J. 1978. Statistical Method in Biological Assay, third ed. Charles Griffin & Co. Ltd, London, England.
- FITRIDGE, I., DEMPSTER, T., GUENTHER, J., DE NYS, R. 2012. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28: 649–669.
- FITT, W.K., HOFMANN, D.K., WOLK, M., RAHAT, M. 1987. Requirement of exogenous inducers for metamorphosis of axenic larvae and buds of *Cassiopea andromeda* (Cnidaria Scyphozoa). *Mar Biol*, 94: 415-422.
- FLACH, C.F., PAL, C., SVENSSON, C.J., KRISTIANSSON, E., ÖSTMAN, M., BENGTSSON-PALME, J., TYSKLIND, M., LARSSON, D.G. 2017. Does antifouling paint select for antibiotic resistance? *Sci Total Environ*, 1590-591:461-468.
- FLEMMING, H-C. 2011. Microbial Biofouling: Unsolved Problems, Insufficient Approaches, and Possible Solutions. In: FLEMMING, H.C. et al. (Eds.), Biofilm

- Highlights, Springer Series on Biofilms 5, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 81-109.
- FLEMMING, H-C., WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews: Microbiology*, 8: 623-633.
- FOUILLAND, E., GOSELIN, M., RIVKIN, R.B., VASSEUR, C., MOSTAJIR, B. 2007. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *Journal of Plankton Research*, 29: 369-376.
- FOX, C.H., JOHNSON, F.B., WHITING, J., ROLLER, P.P. 1985. Formaldehyde Fixation, *J Histochem & Cytochem*, 33:845-853.
- FUKAMI, K., NISHIJIMA, T., ISHIDA, Y. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia*, 358: 185–191.
- FRECKELTON, M-L., NEDVED, B.T., HADFIELD, M.G. 2017. Induction of Invertebrate Larval Settlement; Different Bacteria, Different Mechanisms? *Scientific Reports*, 7: 42557
- FREITAS, V.daR., SAND, S.T., SIMONETTI, A. B. 2010. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. *Revista de Odontologia da UNESP* 39(4): 193-200.
- GAINES, S., ROUGHGARDEN, J. 1987. Fish in offshore kelp forests affect recruitment to intertidal barnacle populations. *Science*, 235: 479-481.
- GALLARDO, W.G., BUEN, S.M.A. 2003. Evaluation of mucus, Navicula, and mixed diatoms as larval settlement inducers for the tropical abalone *Haliotis asinine*. *Aquaculture*, 221(1–4): 357–364.
- GAMA, B.A.P.da; PEREIRA, R.C., COUTINHO, R. 2009. A bioincrustação marinha. In: PEREIRA, R.C., SOARES-GOMES, A. (Orgs.). *Biologia Marinha*. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, p. 299-318.
- GAMBARDELLA, C., COSTA, E., PIAZZA, V., FABBROCINI, A., MAGI, E., FAIMALI, M., GARAVENTA, F. 2015. Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 111: 1e9.

- GANESAN, A.M., ALFARO, A.C., BROOKS, J.D., HIGGINS, C.M. 2010. The role of bacterial biofilms and exudates on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae. *Aquaculture*, 306:388–392.
- GANT, V.A., WARNES, G., PHILLIPS, I., SAVIDGE, G.F. 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J Med Microbiol* 39:1475-154.
- GARAVENTA, F., GAMBARDELLA, C., DI FINO, A., PITTORE, M., FAIMALI, M., 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology*, 19: 512e519.
- GASOL, J.M., GIORGIO P. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.*, 64(2): 197-224.
- GLASBY, T.M. 2000. Surface composition and orientation interact to affect subtidal epibiota. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, , 248: 177- 190.
- GLASBY, TM., CONNELL, SD. 2001. Orientation and position of substrata have large effects on epibiotic assemblages. *Mar Ecol Prog Ser*, 214: 127–135.
- GOLLNER, S., ZEKELY, J., DOVER, C.L.Van., GOVENAR, B., BRIS, N.LE, NEMESCHKAL, H.L., BRIGHT, M. 2006. Benthic copepod communities associated with tubeworm and mussel aggregations on the East Pacific Rise. *Cah. Biol. Mar.*, 47: 397-402.
- GRIBBEN, P.E., MARSHALL, D.J., STEINBERG, P.D. 2006. Less inhibited with age? Larval age modifies responses to natural settlement inhibitors. *Biofouling*, 22(2): 101-106.
- GRIFFITHS, J.R., KADIN, M., NASCIMENTO, F.J.A., TAMELANDER, T., TÖRNROOS, A., BONAGLIA, S., BONSDORFF, E., BRÜCHERT, V., GÅRDMARK, A., JÄRNSTRÖM, M., KOTTA, J., LINDEGREN, M., NORDSTRÖM, M.C., NORKKO, A., OLSSON, J., WEIGEL, B., ŽYDELIS, R., BLECKNER, T., NIIRANEN, S., WINDER, M. 2017. The importance of benthic–pelagic coupling for marine ecosystem functioning in a changing world. *Global Change Biology*, 23: 2179–2196.

- GUPTA, V., JOHNSON, W., SHAFIEIAN, P., RYU, H., ALUM, A., ABBASZADEGAN, M., HUBBS, S., RAUCH-WILLIAMS, T. 2009. Riverbank filtration: comparison of pilot scale transport with theory. *Environ Sci Technol.* 43:669–676.
- GUILLARD, R.R.L. 1975. *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In: SMITH, W.L., CHANLEY, M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- GUILLARD, R.R.L., HARGRAVES, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycology*, 32: 234-236.
- GUILLARD, R.R.L., RYTHER, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229e239.
- GURUNG, T.B., KAGAMI, M., URABE, T.Y.J. 2001. Relative importance of biotic and abiotic factors affecting bacterial abundance in Lake Biwa: an empirical analysis. *Limnology*, 2:19–28.
- HADFIELD, M.G. 2011. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Ann Rev Mar Sci.*, 3: 453-470.
- HADFIELD, M.G., NEDVED, B.T., WILBUR, S., KOEHL, M.A.R. 2014. Biofilm cue for larval settlement in *Hydroides elegans* (Polychaeta): is contact necessary? *Mar. Biol.*, 161: 2577.
- HAHN, M.W., HÖFLE, M.G. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 113–121.
- HAMDAN, L., JONAS, R. 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.
- HAMER, J.P., WALKER, G., LATCHFORD, J.W. 2001. Settlement of *Pomatoceros lamarkii* (Serpulidae) larvae on biofilmed surfaces and the effect of aerial drying. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, , 26: 113–131.
- HARDER, T., LAM, C., QIAN, P.-Y., 2002. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 229: 105–112.

- HARGREAVES, J.A., TUCKER, C.S. 2004. Managing Ammonia in Fish Ponds. Southern Regional Aquaculture Center n°. 4603.
- HARRISON, J.J., CERI, H., YERLY, J., STREMICK, C.A., HU, Y., MARTINUZZI, R., TURNER, R.J. 2006. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol. Proced.* 8(1): 194-215.
- HEIDELBERG, J.F. HEIDELBERG, K.B., COLWELL, R.R. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay Bacterioplankton Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(11): 5488–5497.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, S., FRAGA, C., IKEDA, T. 2008. A global estimation of mesozooplankton ammonium excretion in the open ocean. *Journal of Plankton Research*, 30(5): 577-585.
- HERZENBERG, L.A., TUNG, J., MOORE, W.A., HERZENBERG, L.A., PARKS, D.R. 2006. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Natural Immunity* 7(7): 681–685.
- HIGHFIELD, J.M., ELOIRE, D., CONWAY, D.V.P., LINDEQUE, P.K., ATTRILL, M.J., SOMERFIELD, P.J. 2010. Seasonal dynamics of meroplankton assemblages at station L4. *Journal of Plankton Research*, 32(5): 681–691.
- HILLS, J.M., THOMASON, J.C. 1998. The effect of scales of surface roughness on the settlement of barnacle (*Semibalanus balanoides*) cyprids, *Biofouling*, 12(1-3): 57-69.
- HOFMANN, D.K., BRAND, U. 1987. Induction of metamorphosis in the symbiotic scyphozoan *Cassiopea andromeda*: role of marine bacteria. *Symbiosis*, 4: 99-116
- HOORMAN, J.J. 2011. *The Role of Soil Bacteria: FACT SHEET* Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University Extension. 4 p.
- HOPPENRATH, M., CHOMÉRAT, N. HORIGUCHI, T., SCHWEIKERT, M., NAGAHAMA, Y., MURRAY S. 2013. Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae)—A proposal and review. *Harmful Algae*, 27: 1–28.
- HOSEIN, I.K., HILL, D.W., JENKINS, L.E., MAGEE, J.T. 2002. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 90S–97S.

- HOWES, E.L., BEDNARSEK, N., BUDENBENDER, J., COMEAU, S., DOUBLEDAY, A., GALLANGER, S.M., HOPCROFT, R.R, LISCHKA, S., MAAS, A.E., GATTUSO, J-P. 2014. Sink and swim: a status review of thecosome pteropod techniques. *Journal of Plankton Research*, 36(2): 299-315.
- JARRET, J.N. 2003. Seasonal variation in larval condition and post-settlement performance of the barnacle *Semibalanus balanoides*. *Ecol.*, 84(2): 384-390.
- JENKINS, S.R., HAWKINS, S.J. 2003. Barnacle larval supply to sheltered rocky shores: a limiting factor? *Hydrobiologia*, The Hague, 503(1/3): 143–151.
- JENKINS, S.R., MARTINS, G.M. 2010. Succession on Hard Substrata. In: DÜRR, S., THOMASON, J.C. (Eds). A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, Oxford, UK. 456 p.
- JIN, Y., ZHANG, T., SAMARANAYAKE, Y.H., FANG, H.H.P., YIP, H.K., SAMARANAYAKE, L.P. 2005. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, 159: 353–360.
- JOCHEM, F.J. 2001. Morphology and DNA content of bacterioplankton in the western Gulf of Mexico: Analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 25: 179–194.
- JOHNSON, W.S., ALLEN, D.M. 2012. *Zooplankton of the Atlantic and Gulf Coasts: A Guide to Their Identification and Ecology*. Baltimore, Johns Hopkins University Press. 472 p.
- ICRAM, 2001. *Metodologie analitiche di riferimento. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio*. Servizio Difesa Mare, Roma.
- ISO 14669 – International Organization for Standardization. 1999. *ISO 14669, water quality: determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)*. Geneva.
- ISO 10253 – International Organization for Standardization. 2006. *Water Quality and Marine Algal Growth Inhibition Test with Skeletonema costatum and Phaeodactylum tricornerum*. Geneva.
- KEOUGH, M.J., RAIMONDI, P.T. 1995. Responses of settling invertebrate larvae to bioorganic films: effects of different types of biofilm. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 185: 235-253.

- KEOUGH, M.J., RAIMONDI, P.T. 1996. Responses of settling invertebrate larvae to bioorganic films: effects of large-scale variation in films. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 207: 59–78.
- KEPNER, R.L.Jr., PRATT, J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 58: 603–615.
- KERSTENS, M., BOULET, G., VAN KERCKHOVEN, M., CLAIS, S., LANCKACKER, E., DELPUTTE, P., MAES, L., COS, P. 2015. A flow cytometric approach to quantify biofilms. *Folia Microbiol.*, 60: 335–342.
- 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, pp. 579-1293.
- KIRCHMAN, D.L. 2000. *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss 542 p.
- KONSTANTINOOU, I.K., ALBANIS, T.A. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.*, 30: 235-248.
- KO, S.K., HUR, S.B. 2011. Effects of Microalgal Species on the Settlement and Survival of *Haliotis discus hannai* Larvae. *Fish Aquat. Sci.*, 14(4): 339-345.
- KRALJ, K., PLENKOVIC´-MORAJ, A., GLIGORA, M., PRIMC-HABDIJA, B., S´IPOS, L. 2006. Structure of periphytic community on artificial substrata: influence of depth, slide orientation and colonization time in karstic Lake Visovac´ko, Croatia. *Hydrobiologia*, 560:249–258.
- KUKLINSKI, P., BERGE, J., MCFADDEN, L., DMOCH, K., ZAJACZKOWSKI, M., NYGÅRD, H., PIWOSZ, K., TATAREK, A. 2013. Seasonality of occurrence and recruitment of Arctic marine benthic invertebrate larvae in relation to environmental variables. *Polar Biol.*, 36: 549–560.
- LALLI, C.M., PARSONS, T.R. 1997. *Biological Oceanography: An Introduction*. 2° ed. Oxford, Pergamon Press, 301 pp.
- LANDOULSI, J., COOKSEY, K., DUPRES, V. 2011. Review: interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion. *Biofouling.*, 27: 1105–1124.

- LAU, S.C.K., THIYAGARAJAN, V., CHEUNG, S.C.K., QIAN, P-Y. 2005. Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology*, 38: 41–51.
- LEAÑO, E.M., LIO-PO, G.D., NADONG, L.A., TIRADO, A.C., SADABA, R.B., GUANZON, JR. N.G. 2005. Mycoflora of the ‘green water’ culture system of tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquatic Research*, 36: 1581-1587.
- LEER-ANDERSEN, M., LARSSON, L. 2003. An experimental/ numerical approach for evaluating skin friction on fullscale ships with surface roughness. *J. Mar. Sci. Technol.*, 8: 26–36.
- LENZ, J. 2000. *Introduction*. In: HARRIS, R.P., WIEBE, P.H., LENZ, J., SKJOLDAL, H.R., HUNTLEY, M. (Eds.), ICES Zooplankton Methodology Manual, Academic Press, pp. 1-32.
- LOPES, L.F.P., AGOSTINI, V.O., MUXAGA, E. 2017. Could some procedures commonly used in bioassays with the copepod *Acartia tonsa* Dana 1849 distort results? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, xxx (2017) xxx-xxx.
- LÓPEZ, M.S., COUTINHO, R. 2008. Acoplamento Plâncto-Bentos: o papel do suprimento larval na estrutura das comunidades bentônicas de costões rochosos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(4): 575-601.
- MAMPEL, J., SPIRIG, T., WEBER, S.S., HAAGENSEN, J.A.J., MOLIN, S., HILBI, H. 2006. Planktonic Replication Is Essential for Biofilm Formation by *Legionella pneumophila* in a Complex Medium under Static and Dynamic Flow Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4): 2885-2895.
- MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.J., BABARRO, J.M.F., LAHOZ, F., SANSÓN, M., MARTÍN, V.S., NORTE, M., FERNÁNDEZ, J.J. 2015. From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenyl phosphonium salts. *PLoS ONE*, 10(4): e0123652.
- MESSANO, L.V.R., SATHLER, L., REZNIK, L.Y., COUTINHO, R. Biocorrosão marinha: interface entre a bioincrustação, processos eletroquímicos e ciência dos materiais. *Revista Pesqueira Naval*, 21: 32-43, 2008.
- MICHELSSEN, H.K., SVENSEN, C., REIGSTAD, M., NILSSEN, E.M., PEDERSEN, T. 2017. Seasonal dynamics of meroplankton in a high-latitude fjord. *Journal of Marine Systems*, 168: 17–30.

- MIDDELBURG, J.J., NIEUWENHUIZE, J. 2000a. Uptake of dissolved nitrogen in turbid, tidal estuaries. *Marine Ecology Progress-Series*, 192: 79-88.
- MIDDELBURG, J.J., NIEUWENHUIZE, J. 2000b. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate-rich Thames estuary. *Marine Ecology Progress-Series*, 203: 13-21.
- MOLINA-CÁRDENAS, C.A., SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M.deI.P., LICEA-NAVARRO, F. 2016. Decreasing of bacterial content in *Isochrysis galbana* cultures by using some antibiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(1): 101-112.
- MOLINO, P.J., WETHERBEE, R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, 24(5): 365–379.
- MUDRYK, Z.J., PODGÓRSKA, B. 2006. *Scanning electron microscopy investigation of bacterial colonization of marine beach sand grains*. Baltic Coastal Zone No. 10. Institute of Biology and Environmental Protection Pomeranian Pedagogical University Słupsk.
- MUNROE, D.M., NODA, T., IKEDA, T. 2010. Shore level differences in barnacle (*Chthamalus dalli*) recruitment relative to rock surface topography. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 392: 188–192.
- MÜLLER, W.A. 1969. Auslösung der Metamorphose durch Bakterien bei den Larven von *Hydractia echinata*. *Zool Jb Abt Anat* 86: 84-95.
- MURTHY, P.S., VENKATESAN, R. 2009. *Industrial biofilms and their control*. In: FLEMMING, H-C., MURTHY, P.S., VENKATESAN, R., COOKSEY, K.C. (Eds) *Marine and industrial biofouling*. Springer, Heidelberg, pp 65–101
- MYAN, F.W.Y., WALKER, J., PARAMOR, O. 2013. The interaction of marine fouling organisms with topography of varied scale and geometry: a review. *Biointerphases*, 8:30.
- NEAL, A.L., YULE, A.B. 1994a. The interaction between *Elminius modestus* Darwin cyprids and biofilms of *Deleya marina* NCMB 1877. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 176: 123-139.
- NEAL, A.L., YULE, A.B. 1994b. The tenacity of *Elminius modestus* and *Balanus perforatus* cyprids to bacterial films grown under different shear regimes. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 74: 251-257

- NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P.J., HEWITT, C.J., POWELL, J.R., BADLEY, R.A. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 97-114.
- NEU, T.R., KUHLICKE, U., LAWRENCE, J.R. 2002. Assessment of Fluorochromes for Two-Photon Laser Scanning Microscopy of Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 901-909.
- NEUMANN, R. 1979. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in the planula larvae of *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa, Rhizostomeae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1: 21-28.
- NORLAND, S. 1993. *The relationship between biomass and volume of bacteria*. In: KEMP, P.F., SHERR, B.F., SHERR, E.B., COLE, J.J. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. USA: Lewis Publishers. 777 p.
- O'CONNOR, N.L., RICHARDSON, D.L. 1994. Comparative attachment of barnacle cyprids (*Balanus amphitrite* Drawin, 1854; *B. improvisus* Drawin, 1854; & *B. eburneus* Gould, 1841) to polystyrene and glass substrata. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 183: 213-225.
- O'CONNOR, N.L., RICHARDSON, D.L. 1996. Effects of bacterial films on attachment of barnacle (*Balanus improvisus* Drawin) larvae: laboratory and field studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 206: 69-81.
- OLIVIER, F., TREMBLAY, T., BOURGET, E., RITTSCHOF, D., 2000. Barnacle settlement: field experiments on the influence of larval supply, tidal level, biofilm quality and age on *Balanus amphitrite* cyprids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199: 185–204.
- OLIVEIRA, S.S., WASIELESKY JUNIOR, W.F.B., BALLESTER, E.L.C., ABREU, P.C.O.V.de. 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, 2006.
- OPHUS, M. 2014. *Bacterial Community Dynamics in a Biofilter exposed to a Micropollutant*. Norwegian University of Science and Technology. 123 p.

- OVERHOLTZER, M., MAILLEUX, A.A., MOUNEIMNE, G., NORMAND, G., SCHNITT, S.J., KING, R.W., CIBAS, E.S., BRUGGE, J.S. 2007. A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell*, 131: 966–979.
- OZKAN, A., BERBEROGLU, H. 2013. Adhesion of algal cells to surfaces. *Biofouling*, 29(4): 469-482.
- PAPPAS, G.D., HOFFMAN, H. 1952. The use of antibiotics for obtaining bacteria-free cultures of euglena. *Ohio Academy of Science*, 52: 102-105.
- PERRETT, L.A., JOHNSTON, E.L., POORE, A.G.B. 2006. Impact by association: direct and indirect effects of copper exposure on mobile invertebrate fauna. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 326: 195–205.
- PATEL, R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437: 41-47.
- PATIL, J., ANIL, A.C. 2005. Influence of diatom exopolymers and biofilms on metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 301: 231–245.
- PEREIRA, JR.D.J., FIGUEIREDO, H.C.P., CARNEIRO, D.O., LEAL, C.A.G. 2006. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciência e Agrotecnologia*, 30: 1190-1195.
- PETRONE, L., ALDRED, N., EMAMI, K., ENANDER, K., EDERTH, T., CLARE, A.S. 2015. Chemistry-specific surface adsorption of the barnacle settlement-inducing protein complex. *Interface Focus*, 5(1): 20140047.
- PIAZZA, V., FERIOLI, A., GIACCO, E., MELCHIORRE, N., VALENTI, A., DELPRETE, F., BIANDOLINO, F., DENTONE, L., FRISENDA, P., FAIMALI, M. 2012. A standardization of *Amphibalanus (Balanus) amphitrite* (Crustacea, Cirripedia) larval bioassay for ecotoxicological studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 134–138.
- PICOT, J., GUERIN, C.L., LE VAN KIM, C., BOULANGER, C.M. 2012. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64: 109–130.
- PINEDA, J. 1994. Spatial and temporal patterns in barnacle settlement along a southern California rocky shore. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 107: 125–138.

- PINEDA, J. 2000. Linking larval settlement to larval transport: assumptions, potentials, and pitfalls. *Oceanography E. Pacif.*, 1: 84–105.
- PINEDA, J., PORRI, F., STARCZAK, V., BLYTHE, J. 2010. Causes of decoupling between larval supply and settlement and consequences for understanding recruitment and population connectivity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 392: 9–21.
- PORRI, F., MCQUAID, C.D., RADLOFF, S., 2006. Spatio-temporal variability of larval abundance and settlement of *Perna perna*: differential delivery of mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 315, 141–150.
- PORTER, K.G., FEIG, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943–948.
- PRADILLON, F., SCHMIDT, A., PEPLIES, J., DUBILIER, N. 2007. Species identification of marine invertebrate early stages by whole-larvae in situ hybridisation of 18S ribosomal RNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 333: 103–116.
- PRINGAULT, O., TESSON, S., ROCHELLE-NEWALL, E. 2009. Respiration in the light and bacterio-phytoplankton coupling in a coastal environment. *Microbial Ecol.* 57(2): 321-334.
- QUAID, C.D.Mc, MILLER, K. 2010. *Larval supply and dispersal*. In: DÜRR, S., THOMASON, J.C (Orgs.). *Biofouling*. Ames: Wiley-Blackwell, p. 16-24.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAILKIN, A.I. 2004. *Marine biofouling: colonization process and defenses*. CRC, Boca Raton, FL. 316 p.
- REGALLA, JR.C., LAITANO, K.S. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas téc. Facimar*, 6: 153-163.
- RINGELBERG, J., VAN GOOL, E. 1998. Do bacteria, not fish, produce 'fish kairomone'? *Journal of Plankton Research*, 20(9): 1847-1852.
- RILOV, G., DUDAS, S.E., MENGE, B.A., GRANTHAM, B.A., LUBCHENCO, J., SCHIEL, D.R. 2008. The surf zone: a semi-permeable barrier to onshore recruitment of invertebrate larvae? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 361: 59–74.

- ROBERTS, R.D., KAWAMURA, T., HANDLEY, C.M. 2007. Factors affecting settlement of abalone (*Haliotis iris*) larvae on benthic diatom films. *Journal of Shellfish Research*, 26: 323-334.
- RODLAND, D.L., KOWALEWSKI, M., SIMÕES, M.G., CARROLL, M. 2004. Colonization of a “Lost World”: encrustation patterns in modern subtropical brachiopod assemblages. *Palaios*, 19(4): 381-395.
- RODRIGUEZ, S.R., OJEDA, F.P., INESTROSA, N.C. 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 97: 193-207.
- ROUND, F. 1971. Benthic marine diatoms. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 9: 83–139.
- RUNGE, J.A., ROFF, J.C. 2000. *The measurement of growth and reproductive rates*. In: HARRIS, R.P., WIEBE, P.H., LENZ, J., SKJOLDAL, H.R., HUNTLEY, M. (Eds.). *Zooplankton Methodology Manual*. Academy Press, USA, 684 p.
- SARMENTO, V.C., LAGE, L.M., SANTOS, P.J.P. 2012. Copepoda Harpacticoida community of a rocky shore under the influence of upwelling (Arraial do Cabo, southeastern Brazil). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 92(5): 1117–1126.
- SATUITO, C.G., SHIMIZU, K., FUSETANI, N. 1997. Studies on the factors influencing larval settlement in *Balanus amphitrite* and *Mytilus galloprovincialis*. *Hydrobiologia*, 358: 275–280.
- SCARDINO, A.J., GUENTHER, J., DE NYS, R. 2008. Attachment point theory revisited: the fouling response to a microtextured matrix. *Biofouling*, 24(1): 45-53.
- SCHEER, B.T. 1945. The development of marine fouling communities. *Biological Bulletin*, 89: 103-112.
- SCHNACK-SCHIEL, S.B., ISLA, E. 2005. The role of zooplankton in the pelagic–benthic coupling of the Southern Ocean. *Sci. Mar.*, 69(Suppl. 2): 39–55.
- SCHULTZ, M.P. 2007. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling*, 23: 331–341.
- SCHULTZ, M.P., BENDICK, J.A., HOLM, E.R., HERTEL, W.M. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27(1): 87-98.
- SHAPIRO, H.M., NEBE-VON-CARON, G. 2004. Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods Mol. Biol.*, 263: 33-44.

- SHIMETA, J., CUTAJAR, J., WATSON, M.G., VLAMIS, T. 2012. Influences of biofilm-associated ciliates on the settlement of marine invertebrate larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 449: 1-12.
- SEKAR, R., VENUGOPALAN, V.P., SATPATHY, K.K., NAIR, K.V.K., RAO, V.N.R. 2004. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia*, 512: 109–116.
- SNEED, J.M., SHARP, K.H., RITCHIE, K.B., PAUL, V.J. 2014 The chemical cue tetrabromopyrrole from a biofilm bacterium induces settlement of multiple Caribbean corals. *Proc. R. Soc. B.*, 281: 20133086.
- SCHUMACHER, J.F., ALDRED, N., CALLOW, M.E., FINLAY, J.A., CALLOW, J.A., CLARE, A.S., BRENNAN, A.B. 2007. Species-specific engineered antifouling topographies: correlations between the settlement of algal zoospores and barnacle cyprids, *Biofouling*, 1 – 11.
- SBRILLI, G., LIMBERTI, A., CALDINI, G., CORSINI, A., 1998. *Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico*. ARPAT Firenze, pp. 1e191.
- SIMU, K., HOLMFELDT, K., ZWEIFEL, U.L., HAGSTRÖM, A. 2005. Culturability and Coexistence of Colony-Forming and Single-Cell Marine Bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8): 4793–4800.
- SJÖSTEDT, J., MARTINY, J.M.H., MUNK P., RIEMANN, L. 2014. Abundance of Broad Bacterial Taxa in the Sargasso Sea Explained by Environmental Conditions but Not Water Mass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(9): 2786-2795.
- SOMSUEB, S., OHNO, M., LARGO, D.B. 2000. Colonization of fouling invertebrate community on suspended man-made structures of varying slope angles. *Bulletin of Marine Sciences and Fisheries*, 20(20): 45-50.
- SOUZA, M.L.de, FERRAGUT, C. 2006. Influence of substratum surface roughness on periphytic algal community structure in a shallow tropical reservoir. *Acta Brasiliensia limnologica*, 24(4): 397-407.
- SPENCER, C.P. 1952. On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 31: 97-106.
- STEEN, H.B., LINDMO, T. 1979. Flow cytometry: A high-resolution instrument for everyone. *Science*, 204: 403–404.

- STEINBERG, P.D., DE NYS, R., KJELLEBERG, S. 2002. Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology*, 28(10): 1935-1951.
- STÜBNER, E.I., SØREIDE, J.E., REIGSTAD, M., MARQUARDT, M., BLACHOWIAK-SAMOLYK, K., 2016. Year-round meroplankton dynamics in high-Arctic Svalbard. *J. Plankton Res.*, 38(3): 522–536.
- SU, Z., HUANG, L., YAN, Y., LI, H. 2007. The effect of different substrates on pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker) larvae settlement. *Aquaculture*, 271: 377–383.
- SUN, J., LIU, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, 25(11): 1331-1346.
- TANG, K.W., FREUND, C.S., SCHWEITZER, C.L. 2006a. Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68: 499-508.
- TANG, K.W., HUTALLE, K.M.L., GROSSART, H.-P. 2006b. Microbial abundance, composition and enzymatic activity during decomposition of copepod carcasses. *Aquatic Microbial Ecology Journal*, 45: 219–227.
- TARTAROTTI, B., TORRES, J.J. 2009. Sublethal stress, Impact of solar UV radiation on protein synthesis in the copepod *Acartia tonsa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 375: 106–113.
- TAYLOR, P.D., WILSON, M.A. 2003. Palaeoecology and evolution of marine hard substrate communities. *Earth-Sci. Rev.*, 62(1–2): 1-103.
- TEBBEN, J., TAPIOLAS, D.M., MOTTI, C.A., ABREGO, D., NEGRI, A.P., BLACKALL, L.L., STEINBERG, P.D., HARDER, T. 2011. Induction of Larval Metamorphosis of the Coral *Acropora millepora* by Tetrabromopyrrole Isolated from a *Pseudoalteromonas* Bacterium. *PLoS ONE*, 6(4): e19082.
- TEIXEIRA, V. L. 2010. *Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil*. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia. – Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde), 134 p.
- TEIXEIRA, P.F., SONIA, M.K., AVILA, T.R., CARDOZO, A.P., BERSANO, J.G.F., BIANCHINI, A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *An. Acad. Bras. Cienc.*, 82(2): 333-339.

- THRONDSSEN, J. 1978. *Preservation and storage*. In: SOURNIA, A. (Eed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, pp. 69–74.
- THIYAGARAJAN, V., MURTHY, P.S., NANCHARAI AH, Y.V., VENUGOPALAN, V.P., NAIR, K.V.K. & SUBRAMONIAM, T. 1999. Influence of biofilms on the larval settlement of *Balanus reticulatus* Utinomi (Cirripedia: Crustacea). *Biofilm*, 4: Paper 1.
- THYJAGARRAN, V., LAU, S.C.K., CHEUNG, S.C.K., QIAN, P.Y. 2006. Cypris habitat selection facilitated by microbial films influences the vertical distribution of subtidal barnacle *Balanus trigonus*. *Microb. Ecol.*, 51: 431-440.
- TIGHE-FORD, D.J., POWER, M.J.D., VAILE, D.C. 1970. Laboratory rearing of barnacle larvae for antifouling research. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 20: 393-405.
- TIMMONS, M.B., EBELING, J.M., WHEATON, F.W., SUMMERFELT, S.T., VINCI, B.J. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*, 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY 14850, USA. 800 p. NRAC Publication No. 01-002.
- TODD, C.D. 2003. Assessment of a trap for measuring larval supply of intertidal barnacles on wave-swept, semi-exposed shores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 290(2): 247– 269.
- TOUPOINT, N., MOHIT, V., LIHOSSIER, I., BOURGOUGNON, N., MYRAND, B., OLIVIER, F., LOVEJOY, C., TREMBLAY, R. 2012. Effect of biofilm age on settlement of *Mytilus edulis*. *Biofouling*, 28(9): 985-1001
- TOONEN, R.J., PAWLIK, J.R. 2001. Settlement of the gregarious tube worm *Hydroides dianthus* (Polychaeta: Serpulidae). Testing the desperate larva hypothesis. *Mar Ecol Progress Series*, 224(4992): 115-131.
- TROTTE T, A., FOUILLAND, E., LEBOULANGER, C., LANOUGUÈRE, E., BOUVY, M. 2011. Use of inhibitors for coastal bacteria and phytoplankton, Application to nitrogen uptake measurement. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93: 151-159.
- TUNGARAZA, C., BRION, N., ROUSSEAU, V., BAEYENS, W., GOEYENS, L. 2003. Influence of bacterial activities on nitrogen uptake rates determined by the application of antibiotics. *Oceanologia*, 45: 473–489.

- UNABIA, C.R.C., HADFIELD, M.G. 1999. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaeta *Hydroides elegans*. *Mar. Biol.*, 133: 55-64.
- UNICHIM 2396. 2014. *Qualità dell'acqua – Determinazione della tossicità le-tale a 24h, 48h e 96h diesposizione com naupli di Tigriopus fulvus (Fischer, 1860) (Crustacea: Copepoda)*.
- US EPA. 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. In: *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T), p. 275. EPA-821-R-02e012.
- VALKIRS, A.O., SELIGMAN, P.F., HASLBECK, E., CASO, J.S. 2003. Measurement of copper release rates from antifouling paint under laboratory and in situ conditions: implications for loading estimation to marine water bodies. *Mar. Pollut. Bull.*, 46: 763 – 779.
- VASUDEVAN, R. 2014. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3): 00014.
- VEDAPRAKASHA, L., DINESHRAMB, R., RATNAMB, R., LAKSHMIB, K., JAYARAJ K., MAHESH BABUB, S., VENKATESANB, R., SHANMUGAMA, A. 2013. Experimental studies on the effect of different metallic substrates on marine biofouling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106: 1– 10.
- VERNER-JEFFREYS, D.W., SHIELDS, R.J., BRICKNELL, I.R., BIRKBECK, T.H. 2004. Effects of different water treatment methods and antibiotic addiction on larval survival and gut microflora development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk-sac larvae. *Aquaculture*, 232: 129-143.
- VEUGER, B., MIDDELBURG, J., BOSCHKER, H., NIEUWENHUIZE, J., RIJSWIJK, P., ROCHELLE-NEWALL, E., NAVARRO, N. 2004. Microbial uptake of dissolved organic and inorganic nitrogen in Randers Fjord. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61: 507-515.
- VIDELA, H.A. 2002. *Prevention and control of biocorrosion*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49: 259-270.
- WAHL, M. 1989. Marine Epibiosis: Fouling and antifouling some basics aspects. *Mar. Ecol. Progress Series*, 58: 175- 189.

- WANG, C., BAO, W-Y., GU, Z-Q., LI, Y-F., LIANG, X., LING, Y., CAI, S-L., SHEN, H-D., YANG, J-L. 2012. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to natural biofilms. *Biofouling*, 28(3): 249-256.
- WALBERG, M., GAUSTAD, P. AND STEEN, H.B. 1996. Rapid flow cytometric assessment of mecillinam and ampicillin bacterial susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 1063–1075.
- WATSON, M.G. 2015. The role of ciliated protozoan in the dynamics of marine invertebrate settlement. Tese de Doutorado em Filosofia. RMIT University. 170 p.
- WHALAN, S., WAHAB, M.A.A., SPRUNGALA, S., POOLE, A.J., NYS, R. 2015. Larval Settlement: The Role of Surface Topography for Sessile Coral Reef Invertebrates. *PLoS One*, 10(2): e0117675.
- WHALAN, S., WEBSTER, N.S. 2014 Sponge larval settlement cues: the role of microbial biofilms in a warming ocean. *Sci. Rep.* 4: 4072.
- WHEELER, P.A., KIRCHMAN, D.L. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnology and Oceanography* 31: 998-1009.
- WIECZOREK, S.K., CLARE, A.S., TODD, C.D. 1995. Inhibitory and facilitatory effects of microbial films on settlement of *Balanus amphitrite* amphitrite larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119: 221-228.
- WIECZOREK, S.K., TODD, C.D. 1997. Inhibition and facilitation of bryozoan and ascidian settlement by natural multi-species biofilm: effects of film age and the roles of active and passive larval attachment. *Marine Biology*, 128: 463-473.
- WOOD, A.M., EVERROAD, R.C., WINGARD, L.M., 2005. *Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures*. In: ANDERSEN, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press. 596 pp.
- WOODS, D.C., FLETCHER, R.L., JONES, E.B.G. 1988. *Microfouling film composition, thickness, and surface roughness on ship trial antifouling paints*. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N., EGGINS, H.O.W. (Eds.). *Biodeterioration 7: Selected papers presented at the 7th International Biodeterioration Symposium*. London: Elsevier. pp 49 – 56.

- YANG, L., ZHOU, Y., ZHU, S., HUANG, T., WU, L., YAN, X. 2012. Detection and quantification of bacterial autofluorescence at the single-cell level by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer. *Anal Chem.*, 84(3): 1526-32.
- YANG, J-L., SHEN, P-J., LIANG, X., LI, Y-F., BAO, W-Y., LI, J-L. 2013. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms. *Biofouling*, 29(3): 247-259.
- YEBRA, D.M., SØREN, S., JOHANSEN, K.D. 2004. Antifouling Technology-Past, Present and Future Steps towards Efficient and Environmentally Friendly Antifouling Coatings. *Prog. Org. Coat.* 50: 75–104.
- YETKA, J.E., WIEBE, W.J. 1974. Ecological application of antibiotics as respiratory inhibitors of bacterial populations. *Journal of Applied Microbiology*, 28: 1033-1039.
- YOUNQLOOD, J.P., ANDRUZZI, L., SENARATNE, W., OBER, C.K., CALLOW, J.A., FINLAY, J.A., CALLOW, M.E. 2003. New materials for marine biofouling resistance and release: semifluorinated and pegylated block copolymer bilayer coatings. *Polym. Mat. Sci. Eng.*, 88: 608-609.
- YSI. 2010. Understanding ammonia in aquaculture ponds. Acessado em: júlio de 2016. Disponível em: <http://www.yisi.com/media/pdfs/>
- YU, X.J., HE, W.H., LI, H.X., YAN, Y., LIN, C.X. 2010. Larval settlement and metamorphosis of the pearl oyster *Pinctada fucata* in response to biofilms. *Aquaculture*, 306: 334–337.
- ZARITSKY, A. 1975. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 54: 243–248.
- ZHANG, R., NEU, T.R., ZHANG, Y., BELLENBERG, S., KUHLCHE, U., LI, Q., SAND, W., VERA, M. 2015. Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99: 7343–7356.
- ZHAO, B., ZHANG, S., QIAN, P.Y., 2003. Larval settlement of the silveror goldlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson) in response to natural biofilms and chemical cues. *Aquaculture*, 220: 883–901.

APÊNDICE I

**“Protocolo em citômetro de fluxo para estimativas de
abundância e tamanho de bactérias planctônicas e
associadas a biofilmes em amostras marinhas:
comparação com dados de microscopia”**

Artigo submetido ao periódico

Progress in Oceanography

Status: em revisão

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Protocolo em citômetro de fluxo para estimativas de abundância e tamanho de bactérias planctônicas e associadas a biofilmes em amostras marinhas: comparação com dados de microscopia

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3*}, LETÍCIA TERRES RODRIGUES⁴, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB), Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

⁴Laboratório de Cultivo Celular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Em ambientes aquáticos, as bactérias heterotróficas são um componente importante, e a estimativa de sua abundância e biomassa é fundamental para a compreensão do seu papéis ecológico dentro da cadeia alimentar. Embora o microscópio nos tenha tornado conscientes da existência do mundo das bactérias a partir do século XVII, somente após a descoberta do citômetro de fluxo no século 20 que se tornou possível implementar estudos detalhados desses organismos a um nível de celular. O objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes técnicas: Epifluorescência (corada com laranja de acridina) (MEF), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Citometria de Fluxo (CF) (sem marcador e com diferentes marcadores: laranja de acridina, DAPI, iodeto de propídio e SYTO9) para estimar a densidade e o tamanho das bactérias tanto planctônicas quanto associadas a biofilmes sob diferentes exposições/idades. Além disso, foi avaliado se o procedimento de ultra-som é uma técnica eficiente para desprender o biofilme das superfícies. Para isso, água marinha natural não filtrada foi incubada em laboratório durante 12 dias. Substratos de madeira (12 cm²) foram depositados na cultura para permitir o crescimento do biofilme. Aos 6 e 12 dias de exposição, alíquotas (1 mL) e substratos foram removidos para estimar a densidade e o tamanho das bactérias planctônicas (ind. mL⁻¹) e do biofilme (ind. cm⁻²) (após o procedimento de ultra-som) com 10 pseudoreplicados para cada comunidade e tratamento. O procedimento de ultra-som foi eficiente no desprendimento do biofilme marinho dos substratos (até 94 %). A análise de citometria de fluxo (sem marcador) permitiu de uma maneira rápida e confiável a quantificação de bactérias marinhas planctônicas e associadas a biofilmes em comparação ao uso de diferentes metodologias, EFM e SEM. A microscopia (EFM e SEM) fornece tamanhos de bactérias planctônicas e de biofilmes mais precisas do que a citometria de fluxo, embora haja uma correlação positiva ($r = 0,972$; $p < 0,001$) entre os tamanhos de bactérias das três metodologias. Desta forma, o CF permite análises bacterianas quantitativas mais rápidas e econômicas quando comparada às microscopias.

Palavras-chave: bacterioplâncton; BDFacsVerseTM; microscopia de epifluorescência; bactérias heterotróficas; microscopia eletrônica de varredura.

APÊNDICE II

“What determines sclerobiont colonization on marine mollusk shells?”

Artigo submetido ao periódico

PLOS ONE

Status: publicado

(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745>)

RESEARCH ARTICLE

What determines sclerobiont colonization on marine mollusk shells?

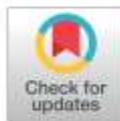
Vanessa Ochi Agostini^{1,2*}, Matias do Nascimento Ritter^{3,4*}, Alexandre José Macedo^{4,5}, Erik Muxagata^{1†}, Fernando Erthal^{5‡}

1 Laboratório de Zooplâncton, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Geociências, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **5** Departamento de Paleontologia e Estratigrafia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* mnr Ritter@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Ochi Agostini V, Ritter MdN, José Macedo A, Muxagata E, Erthal F (2017) What determines sclerobiont colonization on marine mollusk shells? PLoS ONE 12(9): e0184745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745>

Editor: Sébastien Duperron, UPMC, FRANCE

Received: November 4, 2016

Accepted: August 30, 2017

Published: September 13, 2017

Copyright: © 2017 Ochi Agostini et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was partially supported by the FAPERGS (1982-2551/13-7). Additional funds were covered by the CNPq (141217/2014-6 to VOA and 140568/2014-0 to MNR), and by the International Ocean Discovery Program (CAPES-0195/2016-02-BEX to MNR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Empty mollusk shells may act as colonization surfaces for sclerobionts depending on the physical, chemical, and biological attributes of the shells. However, the main factors that can affect the establishment of an organism on hard substrates and the colonization patterns on modern and time-averaged shells remain unclear. Using experimental and field approaches, we compared sclerobiont (i.e., bacteria and invertebrate) colonization patterns on the exposed shells (internal and external sides) of three bivalve species (*Anadara brasiliana*, *Mactra isabelleana*, and *Amarilladesma mactroides*) with different external shell textures. In addition, we evaluated the influence of the host characteristics (mode of life, body size, color alteration, external and internal ornamentation and mineralogy) of sclerobionts on dead mollusk shells (bivalve and gastropod) collected from the Southern Brazilian coast. Finally, we compared field observations with experiments to evaluate how the biological signs of the present-day invertebrate settlements are preserved in molluscan death assemblages (incipient fossil record) in a subtropical shallow coastal setting. The results enhance our understanding of sclerobiont colonization over modern and paleoecology perspectives. The data suggest that sclerobiont settlement is enhanced by (i) high(er) biofilm bacteria density, which is more attracted to surfaces with high ornamentation; (ii) heterogeneous internal and external shell surface; (iii) shallow infaunal or attached epifaunal life modes; (iv) colorful or post-mortem oxidized shell surfaces; (v) shell size (<50 mm² or >1,351 mm²); and (vi) calcitic mineralogy. Although the biofilm bacteria density, shell size, and texture are considered the most important factors, the effects of other covarying attributes should also be considered. We observed a similar pattern of sclerobiont colonization frequency over modern and paleoecology perspectives, with an increase of invertebrates occurring on textured bivalve shells. This study demonstrates how bacterial biofilms may influence sclerobiont colonization on biological hosts (mollusks), and shows how ecological

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

relationships in marine organisms may be relevant for interpreting the fossil record of sclerobionts.

Introduction

The biological remains of invertebrates and vertebrates (shells, carapace, skeletons, and bones) may act as colonization surfaces for invertebrates, especially on continental shelves covered by unconsolidated substrates. Similarly, those remains act as colonization islands in these environments and provide a supply of invertebrate larvae, which are essential for population persistence in such regions. These biological remains are dominated by mollusk shells that can remain for long time intervals at the sediment-water interface due to their relatively high durability (or in a safe zone of the taphonomically-active, [1]). Thus, mollusk shells provide a valuable archive of current and past generations of organisms and preserve the biological signals despite the time-averaging of generations and taphonomic bias ([2] and references therein).

The intriguing relation in sclerobiont colonization (encrustation and bioerosion caused by epi- and endobiont organisms, respectively, [3]) between a host and its colonizers has been widely debated by several studies concerning the modern marine environments as well as those related to the fossil record (e.g., [4–9] and references therein). On a paleontological perspective, the encrusting communities on hard substrates changed throughout the Phanerozoic (since the Ordovician when were first expressed [9]), which provides a straightforward record of competition and interactions (e.g., [10]). As a large proportion of sclerobiont species possess highly preservable skeletons, they exhibit relatively good fossilization potential and retain the spatial structure of the encrusting communities [9]. Additionally, the ecological and taphonomical relationships of modern encrusting organisms have been the focus of numerous studies (e.g., [11–13], and references therein). Ancient biological interactions have also been explored to understand the evolutionary relationships modulated by predation [14–16], and how encrustation and bioerosion affect the interpretation of the fossil record (e.g., [8; 17–19] and references therein).

The invertebrates associated with sclerobiont colonization can be found in the zooplankton community and are mostly represented by organisms with a meroplanktonic life-cycle (i.e., barnacles, some mollusks). Meroplankton spend part of their lives in the water column as larvae drifting with ocean currents and the other part as adults in benthic or nektonic environments [20]. Holoplanktonic (i.e., some copepods) and thycoplanktonic (i.e., amphipods) invertebrates can also be recorded on hard substrates and are classified as vagile or fouling companion fauna [21–24].

There are many studies that have compared sclerobiont colonization patterns between different taxa and substrates [11]. However, there is still no consensus on the main factors that can affect invertebrate colonization on biological substrates such as shells, carapaces, and bones. However, the surface texture has frequently been cited [25–31] together with biological factors, such as competition by recourses [32, 33], conspecific presence [34, 35], and ecological inter-specific interactions [11, 36], to induce or repulse settlement. Experimental arrays conducted on non-biological hard substrates such as steel and concrete have demonstrated that invertebrate settlement might be positively [37–39] or negatively [39–41] influenced by bacterial biofilm. These biofilms are composed of multiple species of bacteria attached to a substratum covered by an extracellular polymeric matrix, and their development can change the

attractiveness of a hard substrate to periphyton, protozooplankton, seaweed and invertebrates [11, 42–44].

In this study, an experimental approach was used to compare the zooplankton and bacterial biofilm colonization potentials on the shell of three species of bivalves with different external textures. Furthermore, we evaluated the encrustation and bioerosion of a marine subtropical deposit to assess the possible selectivity of sclerobionts in the fouling process on time-averaged shells (accumulation of non-contemporaneous individuals in an assemblage; see review in [2]), which simulated the upper limit of the taphonomically active zone (TAZ) [1]. The goals were to assess the main factors that affect the colonization process on shells and observe how much of the biological signal from present-day invertebrate larvae settlement is preserved in the empty molluscan shells (death assemblage–incipient fossil record) over ecological and paleoecological perspectives.

Materials and methods

Ethics statement

“Concheiros Beach” is located on the coast of Southern Brazilian, and is not included in the list of sites of natural interest protected by law. Endangered mollusk taxa have not been reported at the sampled location. Consequently, the field study did not involve endangered or protected species. Live molluscan specimens were not collected in this study, and special permits were not required to obtain empty shell material for scientific research in the study area. This study is supported by the “Biofouling process under subtropical coastal conditions”, project supervised by Dr. Erik Muxagata and approved by PROPESP/FURG (<http://www.propesp.furg.br>) (process 673520/2013, 06/2013 to 06/2017). The collect of zooplankton is permitted under the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade)* permanent authorization number 1907371. The data from this study have been archived as a PLoS One online-access appendix (S1, S2 and S3 Data).

Experiment observations: Zooplankton colonization

Shells of *Anadara brasiliiana* (Lamarck, 1819), *Macra isabelleana* d'Orbigny 1846 and *Amarilladesma mactroides* (Reeve, 1854) (S1 Fig) were chosen for this experiment since they were abundant and had distinct external textures with similar colors (white = natural or reduced color). All shells (36 specimens, 12 of each species) were gathered from Concheiros Beach, RS, Brazil (Fig 1B). The shells were immersed in sterile water in the laboratory, and three pulses of 20 kHz of a Cole-Parmer[®] 4710 ultrasonic homogenizer were applied for 15 seconds on each side of the shell [45] to detach the biofilm. Each shell was previously observed under a dissecting microscope (Olympus BH-2) to ensure that there were no unique marks (i.e., predation, bioerosion, encrustation, fragmentation), and categorized using their external ornamentation (0 = *A. mactroides*; 2 = *M. isabelleana*; 3 = *A. brasiliiana*) using criteria taken from the literature (references in Table 1).

Later, the shells were placed in six bowls (20 cm in diameter, 18 cm in height) filled with estuarine water (filtered through 20 µm mesh) to a height of 10 cm and kept at a constant salinity (23±2), temperature (25°C) and photoperiod (14L:10D). These conditions were chosen to simulate the current subtropical conditions found in this region. A 5 cm-thick layer of natural estuarine sediment was included as substrate at the bottom of each bowl to simulate the reintroduction of the shells to the upper part of the taphonomically active zone [1]. The shells were inserted in the sediment (~2 cm) in a way that allowed both the internal (concave) and the external (convex) sides to be exposed to the six replicates, and the shells were arranged in an interleaved manner (S2 Fig). The sizes of the shells belonging to the same species were similar,

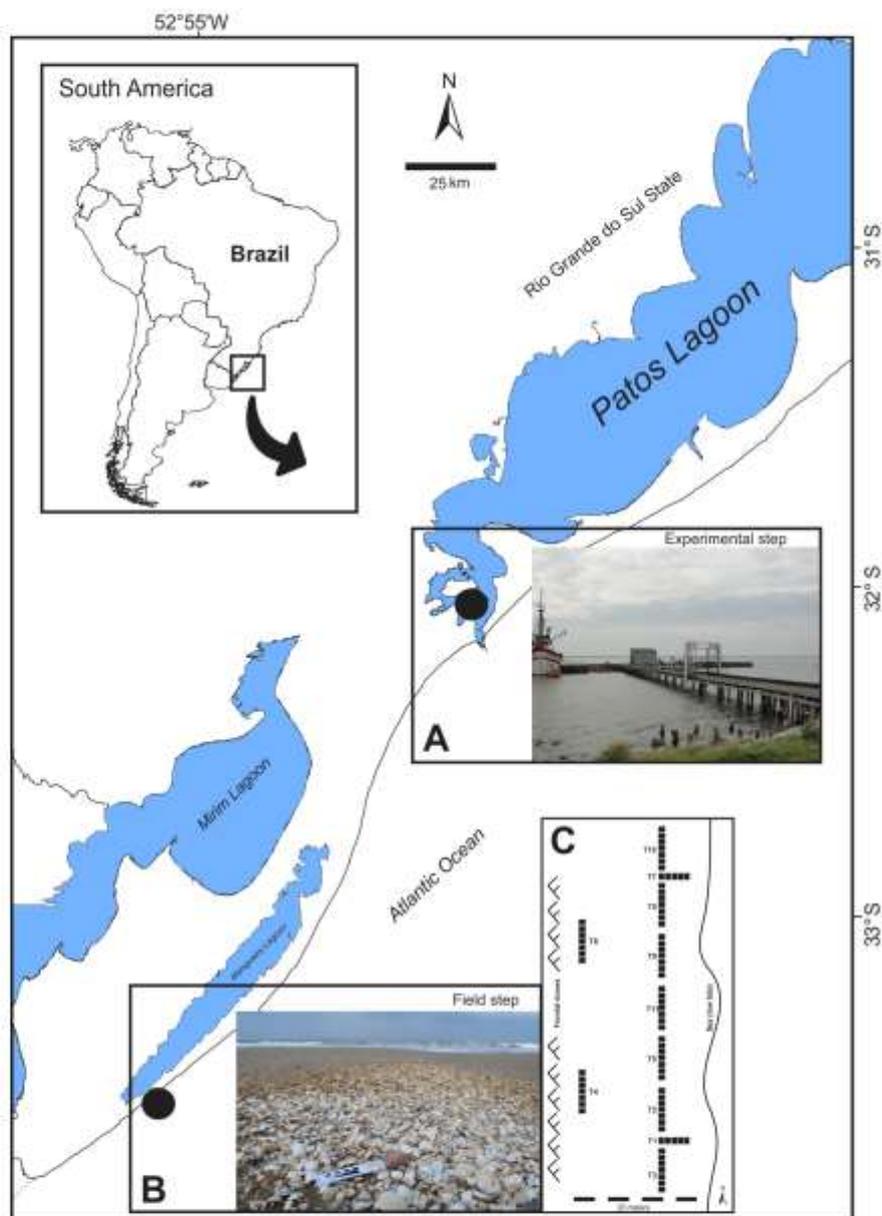


Fig 1. Study area on the southern Brazilian coast. (A) Patos Lagoon estuary where the experimental step was conducted. (B) "Concheiros Beach" where the samples were collected.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g001>

Table 1. Categorical variables measured in this study.

Ecological variables	Key	More information/ Methodology
Class	0 = Gastropoda; 1 = Bivalvia	Rios [47]
Surface size class (mm ²)	<50; 51–150; 151–450; 451–1350; >1350	Rodland et al. [19]
Habitat of origin	0 = deep infaunal; 1 = shallow infaunal; 2 = attached infaunal; 3 = free-living epifaunal	Rios [47], Mikkelsen and Bieler [48]
Mineralogy	1 = calcite; 2 = aragonite; 3 = bimineralic	Mikkelsen and Bieler [48]
Sclerobionts (bioerosion or encrustation)	0 = absent; 1 = present; 1.1 = drill; 1.2 = sponge; 1.3 = worm; 1.4 = bryozoan; 1.5 = 'fungae'; 1.6 = polychaete; 1.7 = bivalve; 1.8 = barnacle; 1.9 = foraminifera; 1.10 = algae; 1.11 = hydrozoan; 1.12 = unidentified	Lecinsky et al. [49]
Secondary color (or color alteration) ^a	0 = color lost; 1 = natural; 2 = oxidized color; 3 = reduced color	Callender et al. [4] and Best [50]
External ornamentation (complexity degree)	0 = absent; 1 = low; 2 = average; 3 = high	Carl et al. [30]
Internal ornamentation	0 = absent; 1 = present	Carl et al. [30]

^aoxidized colors (cream, yellow, ochre, and red); reduced colors (white, gray, and black)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.t001>

but the sizes were different among species (21 to 22 mm² for *A. mactroides*, 7 to 8 mm² for *A. brasiliensis* and 9 to 10 mm² for *M. isabelleana*). Thus, the zooplankton colonization density on shells was standardized to 25 mm². Once a week, the seawater was partially renewed (50%), and the zooplankton community was also replaced. A supply of fresh plankton for the experimental study was collected from the channel the Patos Lagoon estuary, which is located in Rio Grande on the southern Brazilian coast (32°08'53"S– 52°06'03"W) (Fig 1A). Two samples were collected using a conventional conical plankton net (200 µm of mesh) equipped with a flowmeter. After collection, the plankton samples were filtered through a 500 µm mesh net to remove the large planktonic predators. One sample was split into six equal parts (Motoda splitter) and placed into the bowls, while the other sample was fixed (formaldehyde 4%) to analyze the potential of the zooplankton to colonize the shells.

To assess the zooplankton potential (the relationship between the invertebrates present in the water column and the colonizers on available substrates), the composition in each zooplankton sample was estimated from aliquots (1–5% of the sample) counted on a Bogorov chamber, and the results were compared to the occurrence on the shells. A General Linear Model (GLM) analysis was performed to evaluate the differences between the density of the settled zooplankton and the richness of the bivalve shell species and the exposed shell side (internal and external). A post hoc Tukey test followed the analyses. A simple regression was applied to evaluate the correlation between the settled zooplankton densities on the different shells textures.

Experiment observations: Microbial biofilm colonization

To evaluate shell colonization by bacterial biofilms, five shells of each bivalve species (*A. brasiliensis*, *M. isabelleana* and *A. mactroides*) were sterilized (see the section Experiment Observations: zooplankton colonization section) and attached to a pier located in the channel of the Patos Lagoon estuary (Fig 1B) during the austral summer of 2014 (salinity 23±2, temperature 25°C and photoperiod 14L:10D) (S2 Fig). The sizes of the shells were the same as those used in the laboratory experiment. The shells were recovered after five weeks of exposure and immersed in a sterile formaldehyde 4% solution (50 ml) to fix the biofilm. In the laboratory,

the biofilm was detached using three pulses of 20 kHz for 15 seconds on each side of the shells with a Cole-Parmer[®] 4710 ultrasonic homogenizer [45].

The biofilm bacteria density (bact cm⁻²) was estimated using a flow cytometer (BD FACS-Verse[™]). The comparative sizes (μm) and complexities of the cells were measured using a Forward Light Scatter (FSC-A) and a Light Side Scatter (SSC-A), using spherical beads as the pattern [51–53]. However, the precise value of bacteria cell size was also estimated using epifluorescence microscopy, which is considered a more accurate technique than flow cytometry [54]. A total of 100 bacterial cells were measured for each bivalve species. The bacterial biomass (pg C cell⁻¹) was calculated using the allometric biovolume (μm³) conversion factors proposed by Norland [55] and Sun and Liu [56].

To evaluate the microbial community, the biological material in suspension obtained from each shell was filtered (1 mL) through polycarbonate filters (darkened with Irgalan Black), stained with acridine orange (1%) and viewed under an epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan) at 1000X magnification. The bacterial morphotypes were classified according to Zaritski [57]. The observations of the presence or absence of fungi and periphyton followed the same methodology.

The GLM analysis was performed to evaluate the biofilm bacterial density on the different bivalve shells. The model was adapted to the Poisson distribution with a "log" link function. Post hoc Tukey tests followed the analyses. Simple and multiple regressions were applied to evaluate the correlation between the settled zooplankton density and the biofilm bacteria density on the different shell textures.

Field observations: Mollusk assemblages

To quantify the biofouling on the time-averaged mollusk assemblages, samples were collected from Concheiros Beach (Fig 1B; 33°32'6" S–53°5'37" W) on the Southern Brazilian coast in December 2013. This locality is well known to have dense bioclastic concentrations formed by shells mobilized from the inner continental shelf during storm events. Five to seven replicate quadrats (300 x 300 cm) were delimited, and the uppermost 5-cm sediment layer was collected. A total of 11 transects were sampled. Two transects were placed at a distance of 20 meters from the lowest sea level height in the upper supralittoral zone parallel to the shoreline; two were placed in the intertidal area perpendicular to the coastline, and the remaining seven transects were placed in the lower supralittoral zone parallel to the shore (Fig 1C).

All shell remains collected from each quadrat were identified and stored in plastic bags and taken to the laboratory, where they were washed in fresh water and sieved using 500 μm meshes. Host and fouling organisms were identified to the lowest possible taxonomic level according to Roland et al. [5], Brett et al. [8, 7], Rios [47], Buckup and Bond-Buckup [58], Lopes [59], Barclay et al. [60]. Host organisms were characterized according to their (i) life modes (deep infauna, shallow infauna, free-living epifauna, or attached epifauna), (ii) ornamentation complexity, both internal (present or absent) and external, with complexity varying from absent, little, average to high, (iii) predominant mineralogy (aragonite, calcite, bimineralic) and (iv) categorical color (natural, reduced, oxidized) (Table 1). The marks left by fouling organisms were also considered (bioerosion); they were identified and quantified under a stereoscopic microscope to determine presence or absence, coverage percentage, and the location of the colonization on the shell (internal or external). Taphonomic analyses were also carried out on all shells (S3 and S4 Data, S1 Table).

The area-size and shell data were transformed into categorical variables used to observe the occurrence frequency (%) of sclerobionts (bioerosion + encrustation) between different life modes, shell sizes, colors, ornamentations, and mineralogy. The GLM analysis was carried out

to test for significant differences. The model was adapted to the data using a binomial/multinomial distribution with a "logit" link function. Post hoc Tukey tests followed the analyses. A Spearman rank correlation was performed to verify the relationship between the different categorical variables and identify any possible covariances among them. All analyses were carried out in R [61].

Results

Experiment observation: Zooplankton colonization

The meroplanktonic components represented 25% ($3,434 \text{ organisms m}^{-3}$) of the zooplankton samples collected from the channel in the Patos Lagoon estuary. Holoplankton components represented 74% of the samples and thycoplankton represented 1%. However, the meroplankton contained a higher number of groups than the other components (Fig 2A). The dominant meroplanktonic organisms were gastropods ($339 \pm 426 \text{ org m}^{-3}$), followed by bivalves ($190 \pm 228 \text{ org m}^{-3}$), barnacles ($139 \pm 87 \text{ org m}^{-3}$), hydromedusae ($29 \pm 36 \text{ org m}^{-3}$),

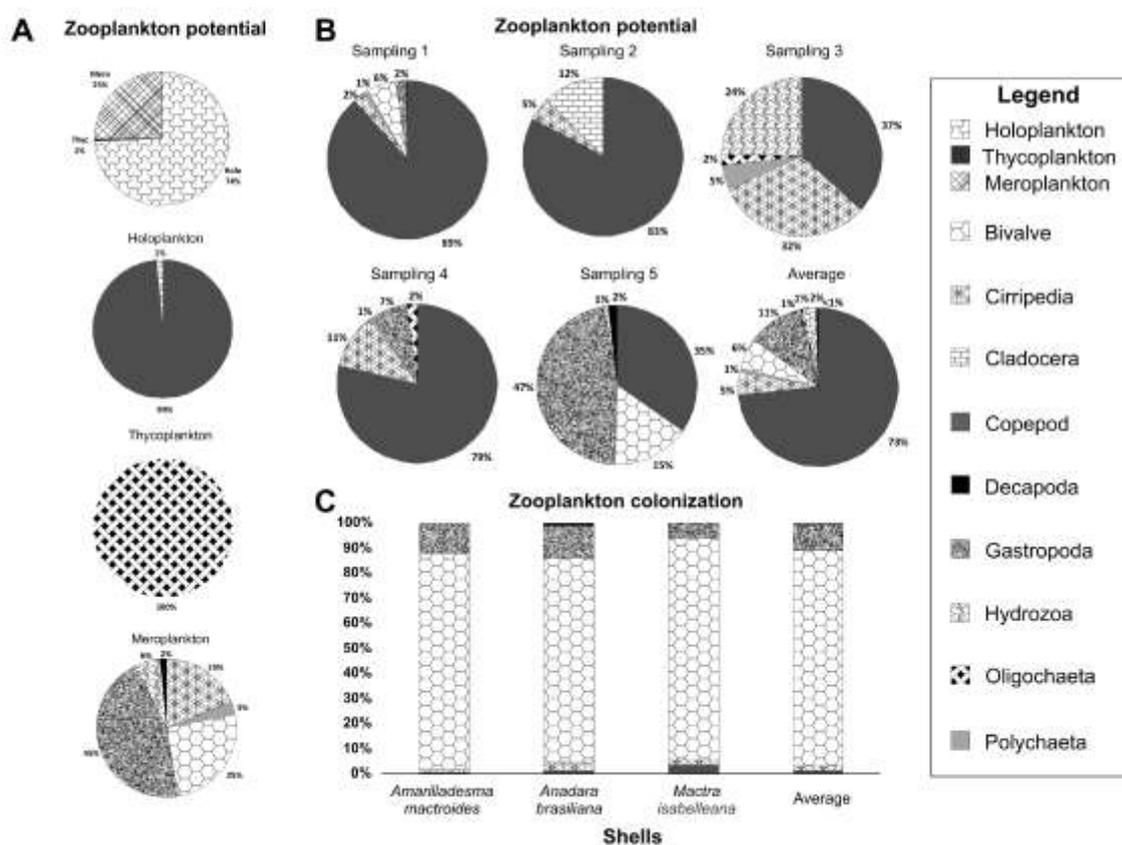


Fig 2. Zooplankton potential colonization on shells. (A) Total occurrence frequency (%) of holoplankton, thycoplankton, and meroplankton in zooplankton samples. (B) Zooplankton potential on sampled colonizing shells. (C) Settled zooplankton (%) on shells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g002>

polychaetes ($22 \pm 22 \text{ org m}^{-3}$) and decapods ($10 \pm 17 \text{ org m}^{-3}$). During the experiment, the natural zooplankton community changed their composition, although copepods always represented the highest fraction (Fig 2B). Slight differences in the settled zooplankton composition on shells were observed between the different substrates. Bivalves, gastropods, and barnacles were all present on all shells. However, decapods were only recorded on *Anadara brasiliiana*, while copepods were only recorded on *A. brasiliiana* and *Mactra isabelleana* shells, and hydrozoan polyps were only found on *Amarilladesma mactroides* (Fig 2C). On the shells, we observed significant differences in the zooplankton colonization density ($p < 0.001$) (Fig 3A). However, the richness was not affected ($p = 0.243$) (Fig 3B). No differences in the colonization on the internal and external sides of shells were observed (density $p = 0.280$; richness $p = 0.111$), although this factor may affect the invertebrate settlement density when interacting with the substrate ($p < 0.041$). *A. brasiliiana* followed by *M. isabelleana* showed higher densities and richness values of the zooplankton colonization on average compared to *A. mactroides* (Fig 3). A positive ($r = 0.806$) and significant ($F_{(1,13)} = 24.132$; $p < 0.001$) correlation between zooplankton colonization density and the different external ornamentation was observed, with higher ornamentation values being more attractive.

Overall, regardless of the invertebrate's composition, differences between the zooplankton colonization of the internal and external surfaces of *A. brasiliiana* shells were observed. The inner surface had the highest average richness and was composed of primarily sedentary and vagile invertebrates. For all shell species, the sedentary and vagile fauna showed the highest density on the inner surfaces (Fig 3C).

Experiment observation: Microbial biofilm colonization

Significant differences ($p < 0.001$) were observed in the bacterial densities (bact cm^{-2}) of the various bivalve species: *A. brasiliiana* had the highest biofilm bacteria density ($16.3 \times 10^6 \pm 2.885$) followed by *M. isabelleana* ($4.6 \times 10^6 \pm 32.951$) and *A. mactroides* ($1.2 \times 10^6 \pm 473.448$) (Fig 4A). A positive ($r = 0.896$) and significant ($F_{(1,13)} = 49.278$; $p < 0.001$) correlation between the biofilm bacteria density and the different external ornamentations of the shells was observed.

The bacterial biofilm community showed variations in cell sizes throughout the experiment (Fig 4B). *Amarilladesma mactroides* had larger bacterial cells ($-0.7 \mu\text{m}$) than the other shells. Bacteria from *A. brasiliiana* and *M. isabelleana* showed an average cell size of -0.63 and $-0.67 \mu\text{m}$, respectively. However, the SSC-A axes from the cytometer graphs (see Fig 4B) revealed that the bacteria cells on *A. brasiliiana* and *M. isabelleana* shells were more complex than the bacteria cells found on *A. mactroides* shells. Higher average bacterial biovolume (μm^3) and biomass (pg C cell^{-1}) values were noted on *A. mactroides* at 13.18 and 0.114, respectively. *Anadara brasiliiana* and *M. isabelleana* had bacterial biovolumes of 11.87 and 12.62 μm^3 , respectively, and biomasses of 0.112 and 0.113 pg C cell^{-1} , respectively. Bacterial rods and coccus shapes were observed on *A. mactroides* while bacterial coccus and diatoms (cf. *Nitzschia*) were observed on *M. isabelleana* and *A. brasiliiana*. Filamentous fungi were also recorded on *A. brasiliiana* (Fig 4C). A positive ($r = 0.878$) and significant ($F_{(2,27)} = 28.352$; $p < 0.001$) correlation between settled zooplankton density, biofilm bacteria density and external shell ornamentation was observed (S4 Fig).

Field observations: Mollusk assemblages

Of the 1,965 time-averaged mollusk shells (58 gastropods and 1,907 bivalves) collected from Concheiros Beach, only 828 showed sclerobionts (encrustation or bioerosion). Encrusting organisms were recorded on only 87 shells, but traces of these organisms were apparent on 741 shells. A significant difference was observed on the total sclerobiont colonization between

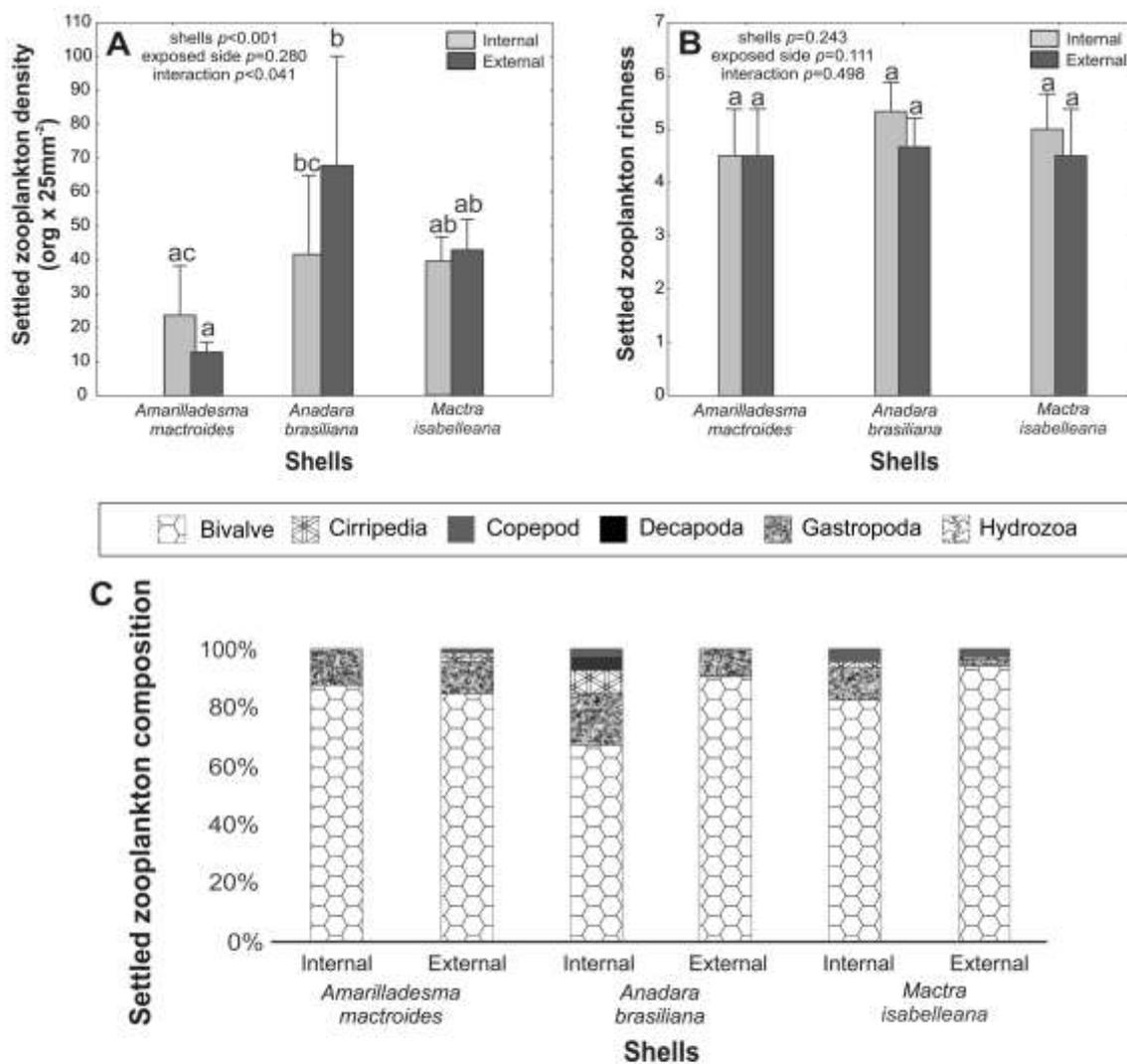


Fig 3. Zooplankton colonization on shells. (A) The colonization density on the internal and external surfaces of different shells. (B) The richness of colonizers on internal and external surfaces. (C) Settled zooplankton composition (%) on different shells sides. The vertical lines denote the 95% confidence intervals (standard error*1.96), and the lowercase letters indicate similarities (the same letters) or significant differences (different letters) between the shells (Tukey test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g003>

the Bivalvia and Gastropoda classes ($p < 0.001$). Table 2 presents a complete list of the bivalve and gastropod species with their relative abundances.

The sclerobiont colonization was significantly different between the Gastropoda ($p < 0.001$) (Fig 5A) and Bivalvia species ($p < 0.001$) (Fig 5B). The shells of *Crepidula* spp. and *Glycymeris* spp. exhibited the highest number of sclerobionts among the Gastropoda and Bivalvia,

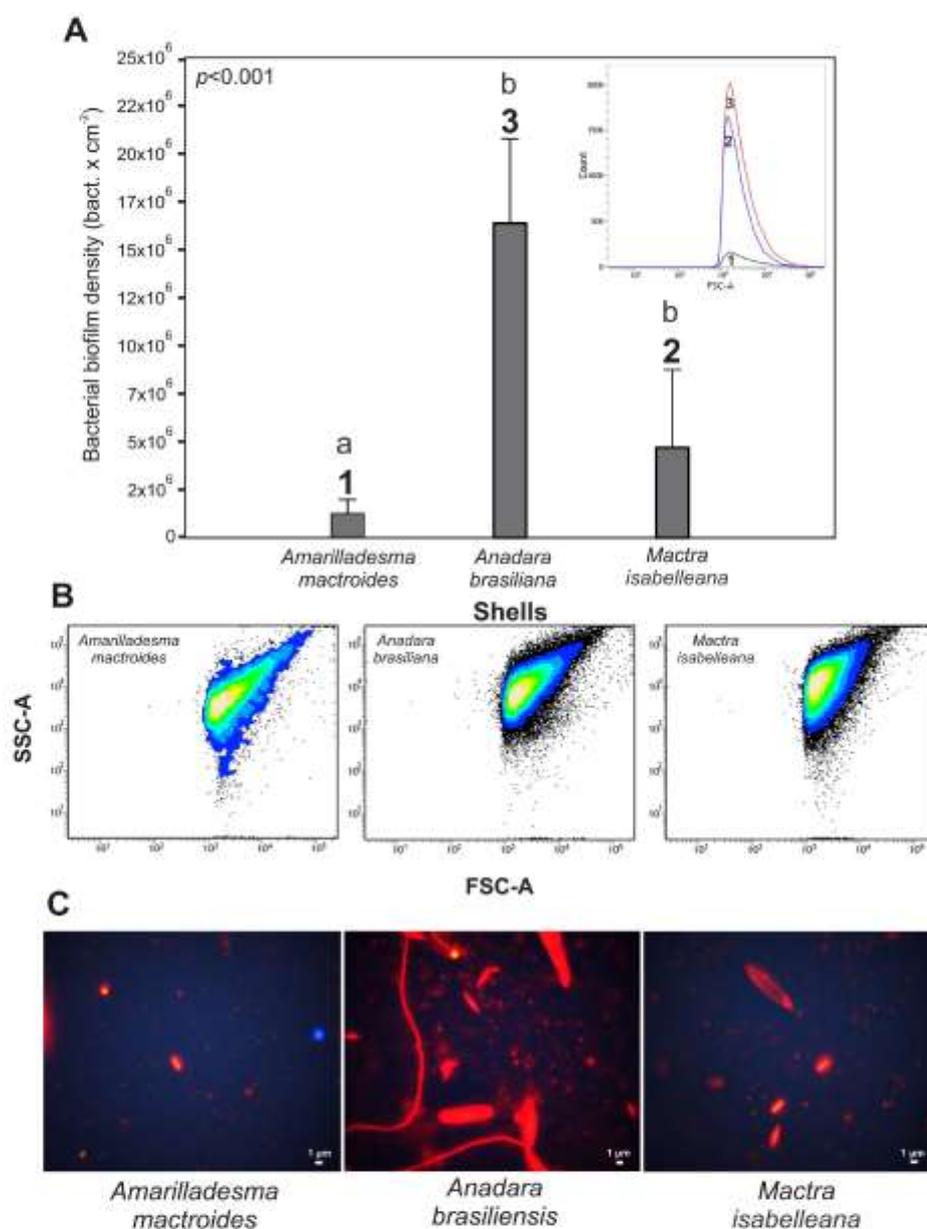


Fig 4. Biofilm community on shells. (A) Bacterial biofilm density (bact cm⁻²) on different shells. (B) The relative size (FSC-A) and complexity (SSC-A) of the bacterial cells measured by a flow cytometer. Each point represents a bacterial cell. The lighter colors (central part) are related to higher density cells with a determined feature (size × complexity) being characterized as one population. (C) Microorganism communities stained with acridine orange under epifluorescence microscopy (1000X). The vertical lines denote the 95% confidence intervals (standard error* 1.96), and the lowercase letters indicate similarities (the same letters) or significant differences (different letters) between the shells (Tukey test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g004>

Table 2. Categorical classification of external ornamentation, mineralogy (1 = calcite; 2 = aragonite; 3 = bimineralic) and frequency of occurrence (FO) data.

Taxonomic classification	External ornamentation	Mineralogy	FO (%)
GASTROPODA			
<i>Pisania</i> sp.	3	2	31
<i>Buccinanops cochlidium</i>	1	2	1
<i>Sinum</i> sp.	0	2	5
<i>Adelomelon brasiliense</i>	1	2	3
<i>Crepidula protea</i>	1	2	3
<i>Olivancillaria urceus</i>	0	2	2
<i>Epitonium georgettinum</i>	3	2	2
Unidentifiable	not applicable	not applicable	32
BIVALVIA			
<i>Macra</i> sp.	2	1	45.8
<i>Pitar</i> sp.	1	1	10.6
<i>Glycymeris</i> sp.	2	1	4.7
<i>Perna perna</i>	2	3	4.4
<i>Ostrea</i> sp.	2	2	1.6
<i>Anadara brasiliense</i>	3	1	1.4
<i>Amiantis purpurata</i>	2	1	0.8
<i>Donax</i> sp.	1	1	0.8
<i>Crassostrea</i> sp.	2	2	0.7
<i>Chlamys</i> sp.	3	2	0.3
<i>Amarilladesma mactroides</i>	0	1	0.1
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	2	3	0.1
<i>Laevicardium</i> sp.	1	1	0.1
<i>Pholas</i> sp.	2	1	0.1
Unidentifiable	not applicable	not applicable	28.5

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.t002>

respectively. Shells from the gastropods *Epitonium* sp. and *Sinum* sp., as well as the bivalves *Amarilladesma mactroides*, *Brachidontes* sp., *Laevicardium* sp., and *Perna perna*, showed no encrusting or bioeroding organisms.

The life modes and host sizes significantly ($p < 0.048$) influenced the occurrence of sclerobiont colonization (encrusters and bioeroders) on gastropods (Fig 6A and 6C) and bivalves ($p < 0.001$) (Fig 6B and 6D). The shallow infaunal and attached epifaunal mollusks showed greater levels of colonization, which contrasted with the deep infaunal bivalves, which had fewer sclerobionts. Apparently, color alteration of the substrate affects sclerobiont colonization on gastropod ($p < 0.050$; Fig 6E) and bivalve ($p < 0.001$; Fig 6F) shells, as the oxidized (cream, yellow, ochre, or red) shells were preferentially colonized.

The varying levels of external ornamentation in Gastropoda did not show any remarkable influence on sclerobiont colonization ($p = 0.581$) (Fig 7A). In contrast, the ornamentation of bivalve shells seems to be a key factor controlling the colonization process. Shells with average and high degrees of external ornamentation complexity have significantly ($p < 0.001$) more sclerobionts than the bivalve shells with low degrees ornamentation complexity (Fig 7B), and the same pattern was recorded on the internal surfaces, ($p < 0.001$; Fig 7C). The shell mineralogy also influenced colonization, with significantly more encrustation and bioerosion occurring on bivalve shells composed predominantly of calcite ($p < 0.001$; Fig 7D).

Despite these vital roles of these differences, most of the factors analyzed are covariates (Table 3). Size is a key factor, which is significantly correlated with all variables, including

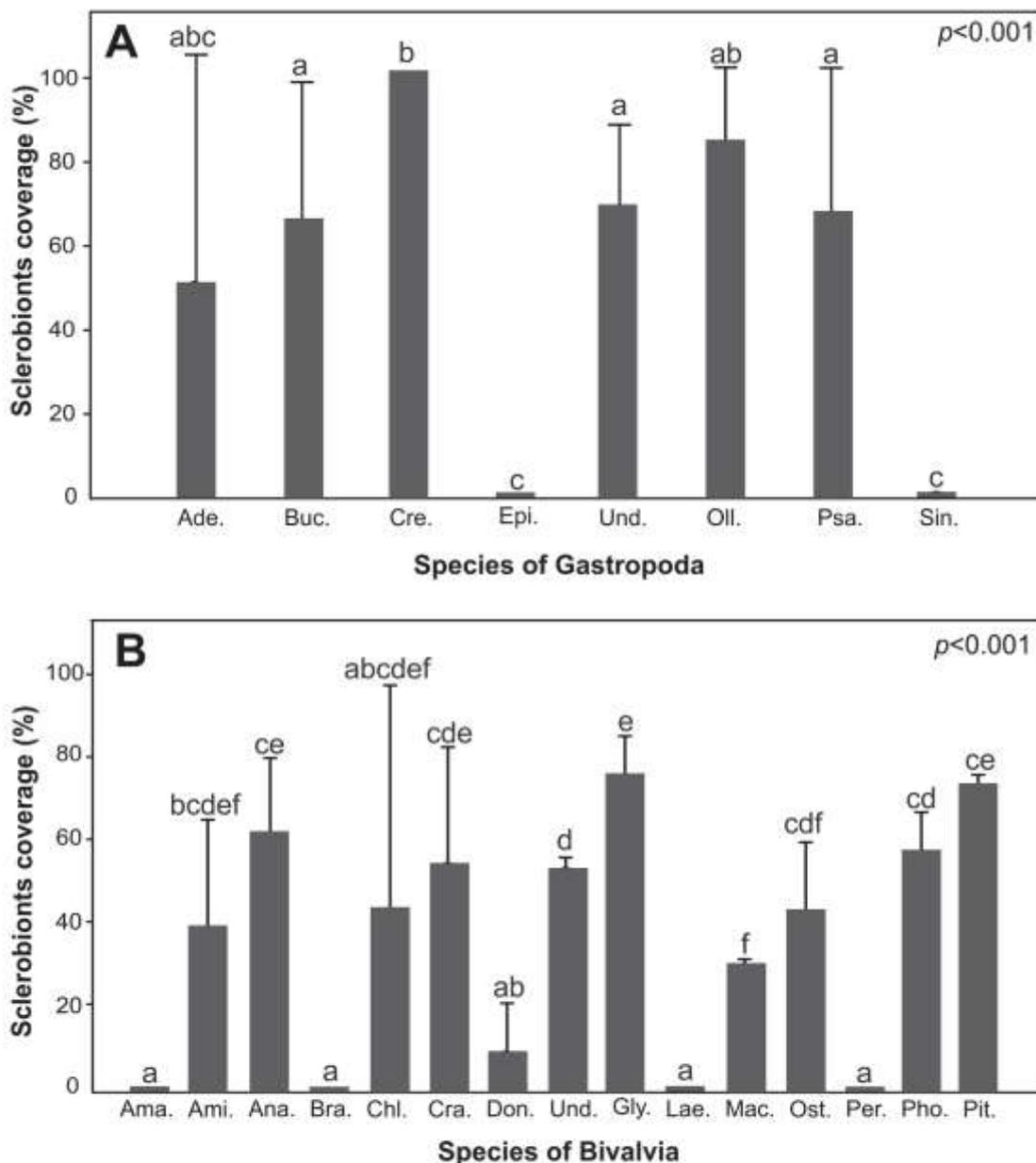


Fig 5. Sclerobionts coverage on mollusks. (A) Gastropoda genera: Ade.: *Adelomelon*, Buc.: *Buccinanops*, Cre.: *Crepidula*, Epi.: *Epitonium*, Oll.: *Olivancillaria*, Psa.: *Psania*, Sin.: *Sinum*. (B) Bivalvia genera: Ama.: *Amatilloidesma*, Ami.: *Amiantis*, Ana.: *Anadara*, Bra.: *Brachidontes*, Chl.: *Chlamys*, Cra.: *Crassostrea*, Don.: *Donax*, Gly.: *Glycymeris*, Lae.: *Laevicardium*, Mac.: *Macra*, Ost.: *Ostrea*, Per.: *Perna*, Pho.: *Pholas*, Pit.: *Pitar*. Und.: Unidentifiable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g005>

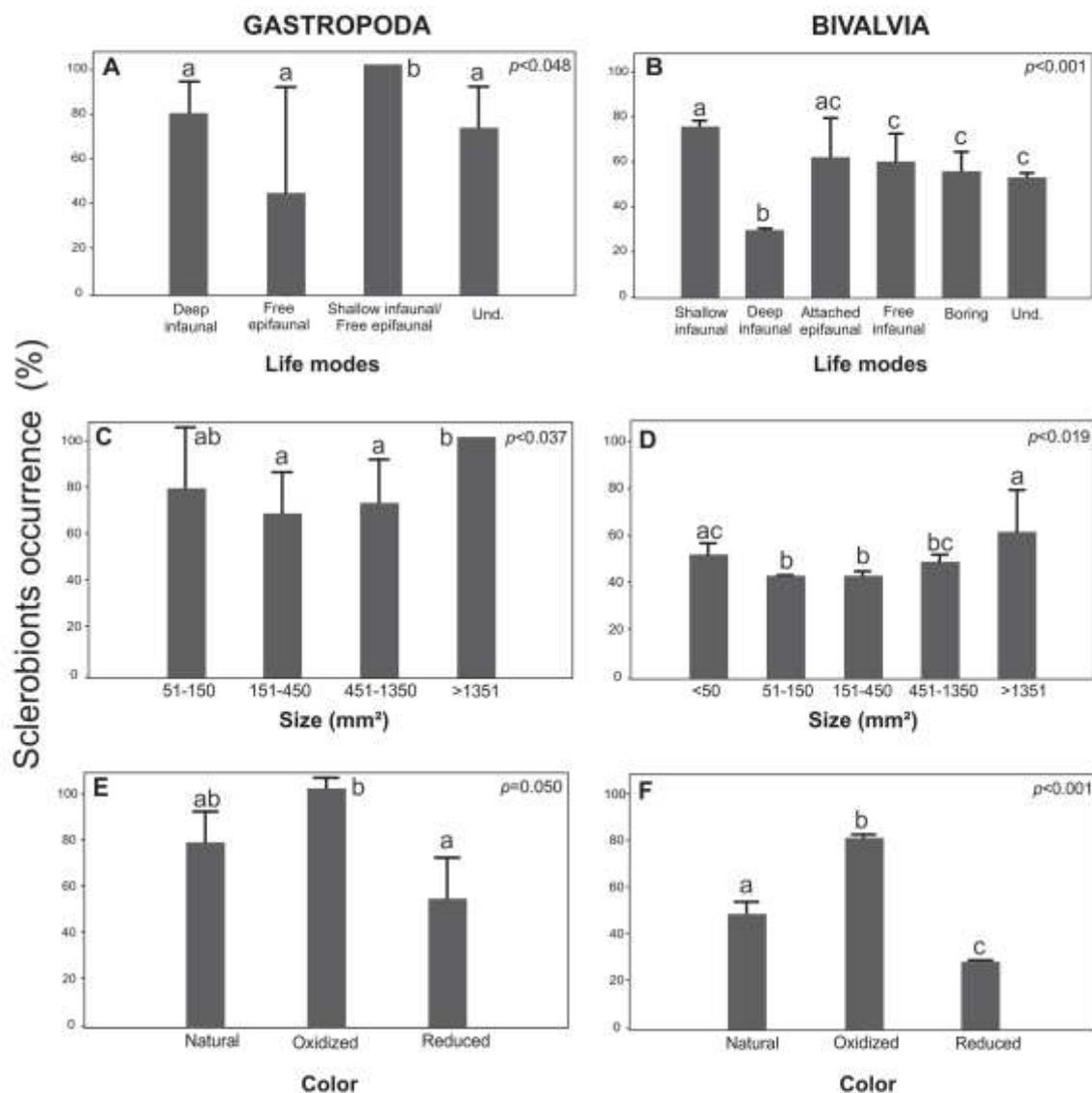


Fig 6. The occurrence of sclerobionts exposed to distinct life modes, sizes, and colors of the host substrates. (A) Gastropod life modes. (B) Bivalvia life modes. (C) Gastropod sizes (D) Bivalvia sizes. (E) Gastropod color. (F) Bivalvia color. Und.: Unidentifiable. The vertical lines denote the 95% confidence intervals (standard error* 1.96), and the lowercase letters indicate similarities (the same letters) or significant differences (different letters) between the factors evaluated (Tukey test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g006>

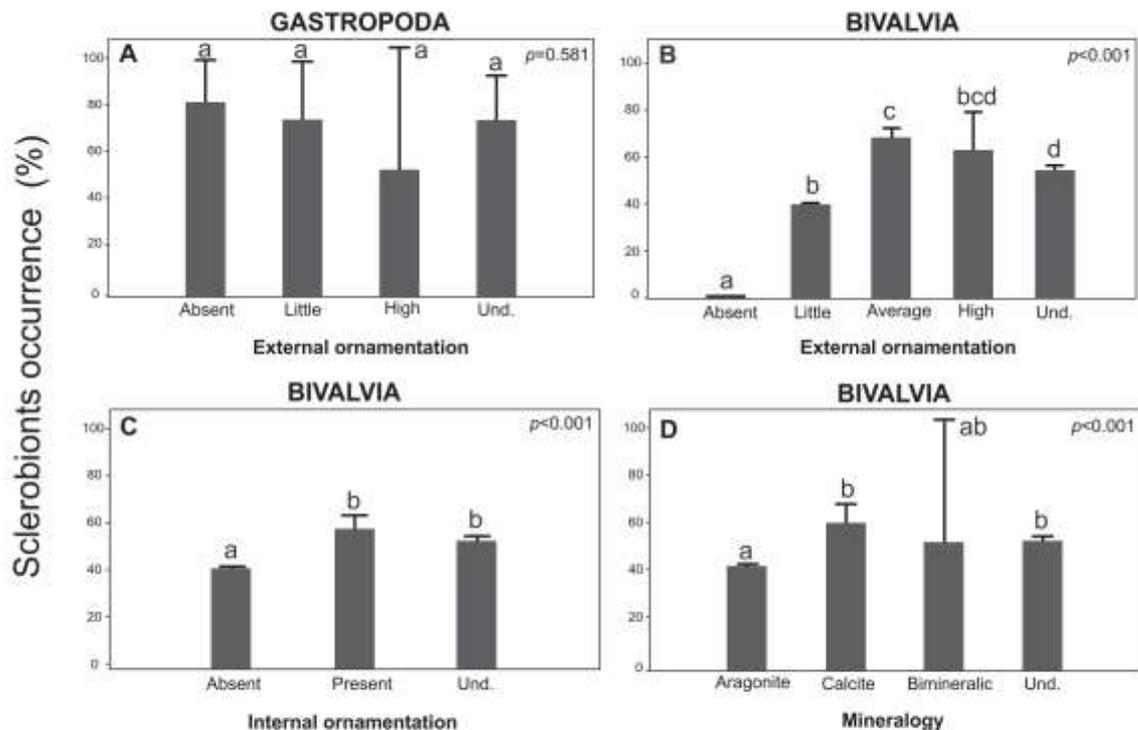


Fig 7. The occurrence of sclerobionts exposed to distinct ornamentation and mineralogy of the host substrates. (A) Gastropod external ornamentation. (B) Bivalvia external ornamentation. (C) Bivalvia internal ornamentation. (D) Bivalvia mineralogy. Und.: Unidentifiable. The vertical lines denote the 95% confidence intervals (standard error*1.96), and the lowercase letters indicate similarities (the same letters) or significant differences (different letters) between the factors (Tukey test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g007>

taphonomic damage. Size is positively correlated with color and total taphonomic grade, while it is negatively correlated with external ornamentation and mineralogy. Thus, for both gastropods and bivalves, a higher average colonization was observed on shells larger than 1,351 mm² (gastropods $p < 0.037$; bivalves $p < 0.019$), while no significant differences were observed in the smaller size classes (51–150 mm² for gastropods and <50 mm² for bivalves). When bioerosion

Table 3. Spearman rank correlations between the shell factors evaluated (Table 1), and the total taphonomic grade (TTG) (see also S1 Table).

VARIABLES	Size	Color	External ornamentation	Mineralogy	TTG
Life mode	$r = -0.460$	$r = -0.001$	$r = 0.768$	$r = 0.871$	$r = 0.162$
	$p < 0.001$	$p < 0.938$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Size		$r = 0.116$	$r = -0.407$	$r = -0.445$	$r = -0.111$
		$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Color			$r = 0.070$	$r = -0.015$	$r = 0.454$
			$p = 0.002$	$p < 0.509$	$p < 0.001$
External ornamentation				$r = 0.866$	$r = 0.376$
				$p < 0.001$	$p < 0.001$

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.t003>

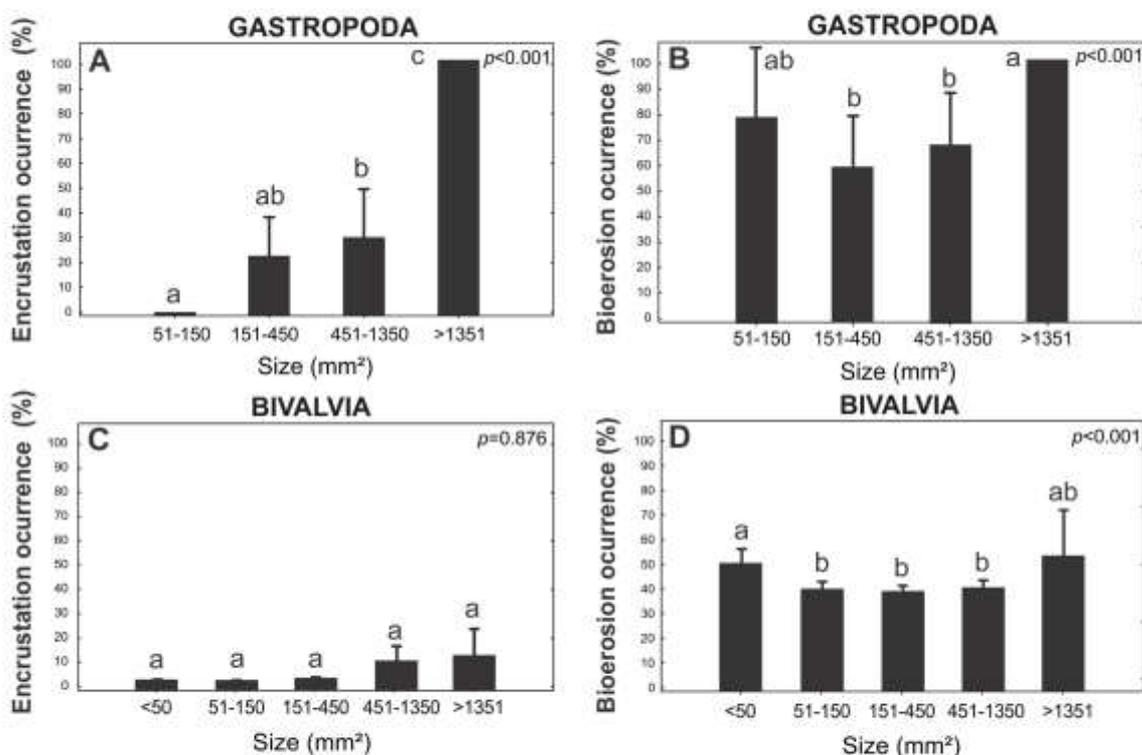


Fig 8. Sclerobiont occurrence on different shell size. (A) Encrustation occurrence on Gastropoda. (B) Bioerosion occurrence on Gastropoda. (C) Encrustation occurrence on Bivalvia. (D) Bioerosion occurrence on Bivalvia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g008>

of the molluscan size classes was analyzed separately from encrustation, this pattern remained the same. However, encrustation occurred preferentially on large (>1351 mm²) gastropod shells ($p < 0.001$), but no significant difference was observed for bivalve shells ($p = 0.876$) (Fig 8). The size frequency distributions of each taxonomic group (S3 Fig) and the taphonomic outcomes (S5, S6, S7 and S8 Figs) are displayed in the supplementary data.

Several sclerobiont taxa were found colonizing the shells; *Ostrea equestris* Say, 1834; serpulid polychaetes; *Phragmatopoma caudata* Krøyer in Mörch, 1863; *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854); *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1767) eggs; *Crassostrea* spp.; *Pododesmus rudis* (Broderip, 1834), mytilid byssus; seaweed; Hydrozoa; Foraminifera; Bryozoa; and bioeroding Bryozoa, Porifera, Polychaeta and Bivalvia (Fig 9).

Discussion

Are zooplankton and biofilm bacteria colonization affected by different shells?

The zooplankton richness potential corresponded to the settled organisms on the shells, with the meroplanktonic larvae being the most representative (Fig 2A, 2B and 2C). However, the settlement quantity did not reflect the meroplankton supply. As previous studies have

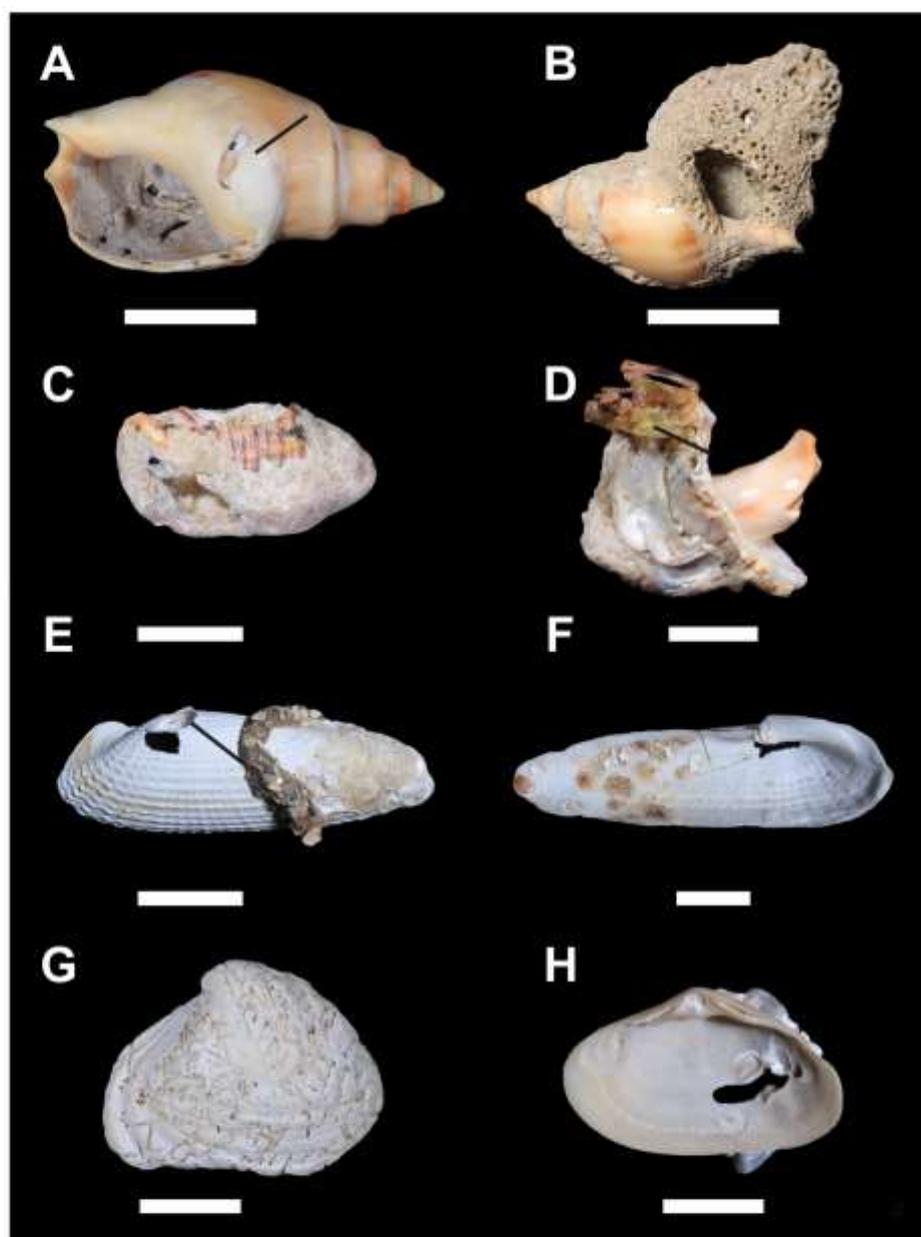


Fig 9. Some examples of sclerobionts that colonized molluscan shells gathered from Concheiros Besch, on the Southern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. (A) The inside of a *Buccinanops* gastropod that contained sclerobionts, such as serpulid polychaete, bryozoans, and an oyster. On the external side of the shell, there is evidence of bioerosion by *Spionidea polychaeta* (arrow). (B) A gastropod shell with a sand structure made by the polychaete *Phagnatopoma caudata*. (C) A gastropod covered by bryozoans. (D) A fragment of a gastropod that was fouled by eggs of the bivalve *Stramonita*

haemastoma (arrow). (E) An external view of a *Pholas* bivalve shell with encrusting Ostreidae and bryozoans and a sediment-tube made by a polychaete (arrow). (F) Internal view of another *Pholas* shell with several oysters (*Ostrea equestris*) and bryozoans. (G) External view of an *Anadara brasiliiana* bivalve shell with a boring sponge. (H) Internal view of a *Mactra* bivalve shell encrusted by Ostreidae. The hole was made by a sponidea polychaete. Scale bars: 10 mm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.g009>

demonstrated, larvae are attracted to light during settlement [62, 63]. Therefore, due to the glass walls of the bowls used in our study, some larvae (i.e., barnacles) settled on the glass, thereby reducing the colonization potential on the shells.

Additionally, one meroplanktonic group that was available in the water column, the polychaetes, did not settle on the shells. This phenomenon may relate to the spatial competition with other groups that are more efficient in the settlement process [64], preference for other substrate types [46] or orientations [65], absence of conspecifics [66] or even succession of ecological needs [67], all of which can also explain the different group colonization between the bivalve shells species. For example, Marshall and Keough [68] observed that smaller larvae attach faster and are less selective than larger ones, and once one organism is present, it may influence the active choice of the substrate by others using chemical signaling.

In the experimental approach, the highest encrustation density was observed on *Anadara brasiliiana* shells, which was probably due to the larger number of microhabitats available for zooplankton colonization compared to *Amarilladesma mactroides* and *Mactra isabelleana* shells. According to Carl et al. [30], surface microtopography can either induce or repel the larval settlement of many marine organisms. We observed higher invertebrate colonization on bivalve shells with texture (Fig 7). The microtopography had a strong effect in mytilids, where 400 μm (lower heterogeneity) textures enhanced the settlement at a rate of >90%. On the other hand, larger or smaller topographies led to a much-reduced colonization, which corroborated the work of Berntsson et al. [26, 27] who showed that microtopographies between 30 and 45 μm inhibited colonization by barnacle cyprids (Cirripedia) by up to 92%. This pattern might explain the absence of sclerobiont colonization on the shells of the *Epitonium* spp. gastropod, which have a high topography (ridges a few μm away from each other). Additionally, this genus is an epifaunal predator that spends time buried in the sand between feedings (i.e., partially infaunal). Intrinsic shell features, such as lower morphological heterogeneity (external ornamentation), may also account for this phenomenon.

The presence of sclerobionts on shell interiors is related to post-mortem colonization [5], which confirms the importance of this kind of substrate on sandy shelves. The encrusting taxon richness showed no differences among shells, possibly because larvae can settle on any surface type. The higher settlement densities of encrusting species recorded on *A. brasiliiana* shells suggest that larvae have a stronger affinity to heterogeneous substrates (presence of microtopographies), and consider the external surface of the shell. In contrast, vagile/sedentary species were recorded at higher densities on shell interiors. The concave position (internal area exposed) of molluscan shells may provide protection to settling organisms since they do not attach firmly to the substrate when compared to encrusting forms.

The substrate texture can also affect the bacteria colonization [69, 70]. Thus, a similar pattern was observed regarding the shells external ornamentation when the bacterial biofilms were analyzed. A positive relationship was observed between bacteria and settled zooplankton on bivalve shells. Heterogeneous substrata (e.g., *A. brasiliiana* shells) exhibit higher bacteria densities. It is known that surface roughness increases bacterial adhesion [71], as surface features are essential to microbiological binding to a surface [72] and bacterial attachment is independent of groove size and is greatest in the valley areas of the grooves [73]. However, in the current study, the observed bacterial densities values for the three bivalve species are within an

order of magnitude, being further studies needed to corroborate this pattern. Additionally, a more complex microbial community, with diatoms and fungi were also observed on *A. brasili-ana*, indicating a more mature biofilm, with greater bacterial biomass compared to those present on *A. mactroides* and *M. isabelleana* shells. The small differences in the bacterial sizes observed on the shells of *A. mactroides*, *M. isabelleana*, and *A. brasili-ana* can be explained by the space competition (related to bacterial density) between bacteria cells, which allows for the various size increments of the bacteria cells [74]. Thus, the higher the bacterial density, the smaller the bacterial size.

The relationship between bacterial biofilms and the colonization of invertebrates on hard substrates (e.g., vessels, pipelines, piers) is already known [25, 76; 42]. This relationship, however, has not been proposed for settlement on shells. Contrary to the statement on biofilm production Rodland et al. [18], the formation of a polymeric matrix over the internal and external surface of a shell may attract zooplankton, and consequently enhance the colonization probabilities of sclerobiotic organisms (S4 Fig). According to Tamburri et al. [77], some oyster larvae species prefer natural substrates (e.g., other oyster shells) covered with biofilms for settlement. In addition, old shells are probably less attractive to larvae for settlement rather than fresh shells, as described as the "fresh shell syndrome" by Brett et al. [7].

The shell texture influenced both the zooplankton and the bacteria colonization. However, we believe that the bacteria biofilm exerts a greater effect on the settlement of invertebrates ($r = 0.828$; $r^2 = 0.687$) than the substrate texture ($r = 0.806$; $r^2 = 0.660$), given the correlation values obtained.

Is the experimental sclerobiont colonization pattern preserved on mollusk assemblages?

The taphonomic alteration on mollusk beach assemblages could be a substantial bias concerning the preservation of sclerobiont frequency [50]. However, the sclerobiont colonization in dead (as in fossil) molluscan shells appears to remain almost intact despite the taphonomic biases [9, 18]. Thus, taphonomic alteration in our data also does not play a significant role in sclerobiont colonization preservation on hosts (S5, S6, S7 and S8 Figs).

Sclerobiont colonization was more intense on shells with oxidized color, which was likely due to their taphonomic alteration (see Tables 1 and 3). Except for this study, information about the effect of the color of the substrate on bacteria and zooplankton colonization has been limited. Dobretsov et al. [78] investigated the effects of substratum color (black and white) on the formation of micro and macrofouling communities and verified that higher densities were observed on black hosts. Yule and Walker [79] and Monteforte and Garcia-Gasca [80] described the same patterns in barnacles and oysters, respectively. These findings can be explained as a result of the negative phototaxis of larvae [81], or the quantity of energy (absorbed or reflected) and the consequent temperature of the substratum [78]. These works emphasized the importance of substratum color on the formation of micro and macrofouling communities, as corroborated in this study (see Fig 6E and 6F). In the experimental approach, we only tested the colonization on white (reduced or natural colors) shells, which proved that the sclerobiont colonization could occur even in this situation. However, these results do not confirm the preference by oxidized shells from a modern perspective.

These shells have therefore revealed a complex taphonomic profile of preservation: oxidized shells were related to ancient shorelines and shallow areas [82]. Thus, most of the oxidized shells were produced by subaerial exposure during the sea level oscillations that have occurred since the Last Glacial Maximum [82]. Hence, this pattern might be related to the durability of the shells in the TAZ [1], which should increase the probabilities of larvae settlement, posterior

encrustation and bioerosion. However, the relationship between color and temporal mixing has not been empirically demonstrated. Furthermore, high frequency of encrustation is not inevitably related to the colonization window time (but see Rodland et al. [18]). Thus, our results indicate that oxidized color exhibited higher frequencies of encrustation and bioerosion, or shells with color alterations were more prone to preserve the encrusters/bioeroders on their shells than those displaying reduced colors.

The mollusk assemblages are time-averaged and display the present-day ages up to ~56 kyrs on the adjacent inner shelf (but, the Holocene shells are numerically dominant; [83]). Thus, these shells have experienced different time-windows regarding the sclerobiont colonization process. Obviously, the larvae pool has not been constant or taxonomically homogenous along the time-averaging windows present in these death assemblages. Although encrustation is considered an instantaneous event (snapshot) (limited-exposure scenario *sensu* Rodland et al. [18]), older shells do not exhibit the current higher encrustation intensities or richness when compared to younger shells [18]. However, it is difficult to determine at what moment in this time-averaging window each sclerobiont settled since it is theoretically possible to find an almost infinite number of non-contemporaneous organisms. However, long-term experiments have shown that encrustation is established mainly in the first year, and the addition of new taxa decreases with time [7].

Additionally, due to the “fresh shell syndrome” [7], shells attain much of their potential coverage in the first few months; then the possibility of time-averaging of the biotic communities is probably reduced. Thus, even the settling process is a geologically instantaneous event, and the temporal acuity is limited to the host age, due to the analytical time-averaging [84]. Theoretically, any shell in a death assemblage possesses the same colonization potential when available at the seafloor, regardless of its age and taphonomic condition. Therefore, we believe that these factors will have a null effect when the encrustation on shells with a wide age range [83] is empirically tested.

The surface area plays a different role on colonization, as seen in Fig 6 and corroborates the findings in Rodland et al. [18]. We observed no differences between the shells with small (<50 mm² for bivalves and 150 mm² for gastropods) and large areas (greater than 1351 mm²) when considering encrustation and bioerosion together, or these factors separately (Fig 8). When considering encrustation, the pattern observed for gastropods was the same as that detected by Rodland et al. [5], where larger shells exhibited more severe encrustation. However, larger bivalve shells are not necessarily susceptible to greater colonization because of their larger surface areas. On the other hand, it remains unknown to what degree encrustation affects smaller or fragmented shells, as this evidence may be erased due to taphonomic processes that occur during the (wide) time-averaging window, as noted by Rodland et al. [18]. In addition, it was difficult to state that bioerosion acted directly on small shells and fragments; larger bioclasts may be bioeroded, encrusted and further fragmented, thereby losing their encrusters and only retaining their record of bioerosion. This phenomenon may explain why either smaller (fragmented shells) or larger sizes displayed the greater frequencies of sclerobiont colonization (Fig 6C and 6D). In the experiment, all shells were smaller than 50 (mm²), which made a comparison impossible. However, the highest invertebrate densities and richness values were found on the smallest *A. brasiliensis* shells while the biggest shells (*A. mactroides*) had the lowest colonization, which was explained by their lack of external texture related to their life mode (covariables).

As shell size plays a major role in sclerobiont colonization, the significant correlation of shell size with all other factors highlights that size class is negatively correlated with taphonomic damage (Table 3). However, bigger shells showed slightly higher alterations than small

shells (S5 Fig). Thus, since sclerobiont colonization is higher in bigger shells with slightly higher taphonomic bias, it confirms that taphonomic alteration does not negatively influence the preservation of sclerobiont traces on shells. Meanwhile, small fragments also displayed high intensities of sclerobionts. This finding is probably due to the fragmentation of the colonized bigger shells.

Regardless of these biases, the *Anadara* shells had the third highest occurrence of sclerobionts (%) (Fig 5A), thus, reinforcing the results of this experiment. Therefore, shell size is one of the most crucial factors [19], with external ornamentation also playing a secondary role, as experimentally demonstrated. It is difficult to account for this key element (except for shell size) since mineralogy and life modes are also correlated with external ornamentation. Remarkably, calcitic bivalves are more prone to encrustation or bioerosion. This difference may be due to the high occurrences of Ostreidae colonization by other species of the same family. Additionally, the occurrence of sclerobionts is greater in shallow infaunal species rather than epifaunal species. Some of the shallow infaunal bivalve species, such as *Glycymeris* and *Pitar*, showed a higher frequency of sclerobionts than *Amarilladesma*, a deep infaunal and relatively unornamented bivalve. Nevertheless, veneroid and myoid bivalves evolved siphons in the early Mesozoic and invaded the deep infauna [85] and are well represented in this study by the relatively ornamented genus *Pholas*. However, the shells of *Pholas* displayed an occurrence of sclerobionts comparable to *Anadara* shells, an epifaunal bivalve. Counter-intuitively, the mode of life and the mineralogy are unlikely to play key processes alone. In the experiment, we observed bacteria and zooplankton colonization on all bivalve shells, and all of these shells also show aragonite mineralogy.

Interestingly, after the Marine Mesozoic Revolution (MRV) [86], bivalves declined in the sediment column, which is well known as an infaunalization trend due to gastropod predation [87, 88]. Meanwhile, external ornamentation probably also reflects the mode of life on infaunal bivalves, which enhances its stability near the sediment-water interface [89]. External ornamentation also showed a positive correlation with a taphonomic alteration (Table 3, S5 Fig). This correlation may be an indication of a megabias in the fossil record, as relatively more ornamented species do not have higher preservability [90], but they also presented greater occurrence of sclerobionts, thus diminishing their preservability potential due to bioerosion. This finding could indicate that either shallow infaunal bivalve species are more prone to be not preserved or that sclerobiont colonization is a negatively taphonomical bias that reduces the preservability of those species. However, encrustation could be a positive bias, which increases the preservability of ornamented species. Thus, sclerobiont colonization could be a two-way bias in the fossil record needing more attention in the future.

Bivalve and gastropod shells showed differences in the factors that affected the sclerobiont occurrence. For example, a larger external texture on the gastropod shells did not proportionally reflect a greater colonization observation, nor did its mineralogy. One of the hypotheses in this study proposed a relationship between these factors and other factors (mode of life, color, taphonomic damage). These factors were hypothesized to that overlap with one another as covariates affecting the invertebrate colonization. The other hypothesis raised is related to the use of gastropod shells as housing for the vagile fauna (i.e., hermit crabs). Shell used as housing for vagile fauna are in constant movement, thereby preventing meroplankton settlement. This pattern is already observed for different substrates and is associated with hydrodynamic stress [91]. According to Walker [92], crab-inhabited shells show more encrusting organisms which could also be explained by the possible alterations caused by the hermit crabs on the gastropod shells that repel sclerobiont colonization.

Conclusions

1. Zooplankton colonizes different shells, but the density and richness values are affected by the attributes of *Amarilladesma mactroides*, *Anadara brasiliana*, and *Macra isabelleana* shells. Additionally, fouling invertebrates seem to be more associated with the external shell sides, while vagile and sedentary fauna are more associated with the internal side.
2. The external shell texture seems to directly affect the bacteria biofilm density, as most ornate surfaces are more attractive. Zooplankton colonization seems to respond directly to bacteria density, the microbial biofilm community, and consequently to the external ornamentation of the shells.
3. Shell size is one of the most significant variables regarding sclerobiont colonization, as previous studies have documented. External ornamentation also plays at least a secondary role, as experimentally demonstrated. However, all factors may have a covarying effect on sclerobiont occurrence on the shells.
4. The sclerobiont occurrence patterns observed for bivalves do not apply in the same way to gastropods (external ornamentation and life mode), which is probably related to other factors that were not evaluated.
5. Similar sclerobiont patterns were also found in experimental and assemblage deposit observations, despite the taphonomic biases. These observations allowed us to infer that an experiment might be used to explain the paleontological patterns. However, as our study has covered only three bivalve species experimentally, broader studies are still necessary.

Supporting information

S1 Data. Raw data on zooplankton abundance used in the analyses in this study.
(XLSX)

S2 Data. Biofilm density data used in this paper.
(XLSX)

S3 Data. Taphonomic scores of all shells from "Concheiros" Beach, Southern Brazil. The table presents the raw data of the taphonomic scores of 1,965 shells (58 gastropods and 1,907 bivalve shells) used in this paper. See also [S4 Data](#) and [S1 Table](#).
(CSV)

S4 Data. A more detailed description of the methods used (taphonomic analyses).
(DOCX)

S1 Table. Taphonomic protocol utilized in this study.
(DOCX)

S1 Fig. Species employed in the study screening for different external textures. (A) *Amarilladesma mactroides* (Reeve 1854), external view. (B) *Amarilladesma mactroides*, internal view. (C) *Macra isabelleana* d'Orbigny 1846, external view. (D) *Macra isabelleana*, internal view. (E) *Anadara brasiliana* (Lamarck 1819), external view. (F) *Anadara brasiliana*, internal view. Scale bars: 5 cm.
(TIF)

S2 Fig. Experimental diagrams employed in both the laboratory and the experimental field steps of the current study. (A) Zooplankton colonization experiment. Each bowl (20 cm in

diameter, 18 cm in height) was filled with estuarine water up to a height of 10 cm and kept at a constant salinity (23 ± 2), temperature (25°C), and photoperiod (14L:10D). These conditions were preferred to simulate the subtropical conditions found in this region. A 5 cm-thick layer of natural sediment was included as substrate at the bottom of each bowl to simulate the upper limit of the taphonomically active zone. (B) The field experiment in the channel of the Patos Lagoon estuary in Southern Brazilian.

(TIF)

S3 Fig. Size-frequency distributions for each mollusk class collected. (A) Gastropoda. (B) Bivalvia.

(TIF)

S4 Fig. Multiple regression analysis between bacterial density (bact cm^{-2}) and zooplankton colonization density ($\text{org } 25 \text{ cm}^{-2}$) regarding the external ornamentation of shells.

(TIF)

S5 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) of intrinsic measured variables in Bivalvia. The box plots are showing interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. (A) Size class. (B) External ornamentation. (C) Mineralogy. (D). Life mode. All p -values were obtained from the Kruskal-Wallis Test. Und.: undetermined.

(TIF)

S6 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) of the intrinsically measured variables in Gastropoda. The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. (A) Size class. (B) Life mode. (C) External ornamentation. All p -values were obtained from the Kruskal-Wallis Test. Und.: undetermined.

(TIF)

S7 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) among Bivalvia species. The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. Bivalvia genera: Ama.: *Amalarilloidesma*, Ami.: *Amiantis*, Ana.: *Anadara*, Bra.: *Brachidontes*, Chls.: *Chlamys*, Cra.: *Crassostrea*, Don.: *Donax*, Gly.: *Glycymeris*, Lac.: *Laevicardium*, Mac.: *Maetra*, Ost.: *Ostrea*, Per.: *Perna*, Pho.: *Pholas*, Pit.: *Pitar*. Und.: Unidentifiable. p -value was obtained from the Kruskal-Wallis Test.

(TIF)

S8 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) among Gastropod species. The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. Gastropoda genera: Ade.: *Adelomelon*, Buc.: *Buccinanops*, Cre.: *Crepidula*, Epi.: *Epitonium*, Oli.: *Olivancillaria*, Psa.: *Psania*, Sin.: *Sinum*. (B). p -value was obtained from the Kruskal-Wallis Test.

(TIF)

Acknowledgments

The authors thank Michal Kowalewski and Claudio De Francesco for their useful comments and discussion on the earlier version of the manuscript. We also would like to thank Flávio Lopes (UFRGS), who took the photographs in Fig 9.

Author Contributions

Conceptualization: Vanessa Ochi Agostini.

Formal analysis: Vanessa Ochi Agostini.

Investigation: Vanessa Ochi Agostini, Matias do Nascimento Ritter.

Methodology: Vanessa Ochi Agostini, Matias do Nascimento Ritter.

Visualization: Vanessa Ochi Agostini, Matias do Nascimento Ritter.

Writing – original draft: Vanessa Ochi Agostini, Matias do Nascimento Ritter.

Writing – review & editing: Vanessa Ochi Agostini, Matias do Nascimento Ritter, Alexandre José Macedo, Erik Muxagata, Fernando Erthal.

References

- Olszewski TD. Modeling the influence of taphonomic destruction, reworking, and burial on time-averaging in fossil accumulations. *Palaios* 2004; 19: 39–50, [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2004\)019<0039:MTIOTD>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2004)019<0039:MTIOTD>2.0.CO;2)
- Kidwell SM. Time-averaging and fidelity of modern death assemblages: building a taphonomic foundation for conservation paleobiology. *Palaeontology* 2013; 56: 487–522, <https://doi.org/10.1111/pala.12042>
- Taylor PD., Wilson MA. Palaeoecology and evolution of marine hard substrate communities. *Earth Sci Rev* 2003; 62: 1–103, [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(02\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(02)00131-9)
- Callender WR, Staff GM, Parsons-Hubbard KM, Powell EN, Rowe GT, Walker SE, Brett CE, Raymond A, Carlson DD, White S, Heise EA. Taphonomic trends along a foreereef slope: Lee Stocking Island, Bahamas. I. Location and Water Depth. *Palaios* 2002; 17: 50–65, [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2002\)017<0050:TTAAFS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2002)017<0050:TTAAFS>2.0.CO;2)
- Rodland DL, Kowalewski M, Simões MG, Carroll M. Colonization of a “Lost World”: encrustation patterns in modern subtropical brachiopod assemblages. *Palaios* 2004; 19: 381–395, [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2004\)019<0381:COALWE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2004)019<0381:COALWE>2.0.CO;2)
- Bromley RG, Heinberg C. Attachment strategies of organisms on hard substrates: A palaeontological view. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 2006; 232: 429–453, <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.07.007>
- Brett CE, Parsons-Hubbard KM, Walker SE, Ferguson C, Powell EN, Staff G, Ashton-Alcox KA, Raymond A. Gradients and patterns of sclerobionts on experimentally deployed bivalve shells: synopsis of bathymetric and temporal trends on a decadal time scale. *Palaeogeogr Palaeoclim Palaeoecol* 2011; 321: 278–304, 635 <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.05.019>
- Brett CE, Smrecak TT, Hubbard KP, Walker SE. Marine sclerobiofacies: encrusting and endolithic communities on shells through time and space. In: Talent JA, editor. *Earth and Life: global biodiversity, extinction intervals and biogeographic perturbations through time*. Springer Netherlands; 2012, pp. 129–157, https://doi.org/10.1007/978-90-481-3428-1_5
- Taylor PD. Competition between encrusters on marine hard substrates and its fossil record. *Palaeontology* 2016; 59: 481–497, <https://doi.org/10.1111/pala.12239>
- Liow LH, Di Martino E, Voje KL, Rust S, Taylor PD. Interspecific interactions through 2 million years: are competitive outcomes predictable? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2016; 283: 20160981, <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0981> PMID: 27581885
- Freckleton M-L, Nedved BT, Hadfield MG. Induction of invertebrate larval settlement; different bacteria, different mechanisms? *Sci Rep* 2017; 7: 42557, <https://doi.org/10.1038/srep42557> PMID: 28195220
- Taylor PD, Wilson MA. A new terminology for marine organisms inhabiting hard substrates. *Palaios* 2002; 17: 522–525, [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2002\)017<0522:ANTFMO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2002)017<0522:ANTFMO>2.0.CO;2)
- Santos A, Mayoral E. Bioerosion versus colonisation on Bivalvia: A case study from the Upper Miocene of Cacela (southeast Portugal). *Geobios* 2008; 41: 43–59, <https://doi.org/10.1016/j.geobios.2007.01.009>
- Kelley PH, Hansen TA. The fossil record of drilling predation on bivalves and gastropods. In: Kelley PH, Kowalewski M, Hansenn TA, editors. *Predator—Prey Interactions in the Fossil Record*. Kluwer Academic/Plenum Press; 2003, pp. 113–139, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0161-9_6
- Harper EM. Assessing the importance of drilling predation over the Palaeozoic and Mesozoic. *Palaeogeogr Palaeoclim Palaeoecol* 2003; 201: 185–198, [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(03\)00624-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(03)00624-2)
- Klompmaaker AA, Kowalewski M, Hurlley JW, Finnegan S. Increase in predator-prey size ratios throughout the Phanerozoic history of marine ecosystems. *Science* 2017; 356: 1178–1180, <https://doi.org/10.1126/science.aam7468> PMID: 28619943

17. Kowalewski M. The fossil record of predation: an overview of analytical methods. In: Kowalewski M, Kelley PH, editors. *The Fossil Record of Predation*. New Haven: The Paleontological Society; 2002, pp. 3–42.
18. Rodland DL, Kowalewski M, Carroll M, Simões MG. (2006) The temporal resolution of epibiont assemblages; are they ecological snapshots or overexposures? *J Geol* 2006; 114: 313–324, <https://doi.org/10.1086/501221>
19. Rodland DL, Simões MG, Krause RA, Kowalewski M. Stowing away on ships that pass in the night: sclerobiont assemblages on individually dated bivalve and brachiopod shells from a subtropical shelf. *Palaeos* 2014; 29: 170–183, <https://doi.org/10.2110/pala.2013.033>
20. Johnson WS, Allen DM. *Zooplankton of the Atlantic and Gulf Coasts: A Guide to Their Identification and Ecology*. Baltimore, Johns Hopkins University Press; 2012. 472 p.
21. Tsuchiya M. Faunal structures associated with patches of mussels on East Asian coasts. *Helgol Mar Res* 2002; 56: 31–36, <https://doi.org/10.1007/s10152-001-0099-2>
22. Gollner S, Zekely J, Van Dover C, Govenar B, Le Bris N, Nemeschkal HL, Bright M. Benthic copepod communities associated with tubeworm and mussel aggregations on the East Pacific Rise. *Cah. Biol. Mar.* 2006; 47: 397–402, <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3611/>
23. Abdallah LGB, Chargui T, Abidli S, Trigui N, Menif E. Associated and digenean fauna of the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured on shellfish tables in the lagoon of Bizerta (Tunisia). *Transit. Waters Bull.* 2012; 6: 20–33, <https://doi.org/10.1285/i1825229Xv6n1p20>
24. Sarmiento VC, Lage LM, Santos PJP. Copepoda Harpacticoida community of a rocky shore under the influence of upwelling (Arriai do Cabo, southeastern Brazil). *J Mar Biol Assoc U.K.* 2012; 92: 1117–1126, <https://doi.org/10.1017/S0025315411001718>
25. Hills JM, Thomason JC. The effect of scales of surface roughness on the settlement of barnacle (*Semibalanus balanoides*) cyprids. *Biofouling* 1998; 12: 57–69, <https://doi.org/10.1080/08927019809378346>
26. Berntsson KM, Jonsson PR, Lejhall M, Gatenholm P. Analysis of behavioural rejection of micro-textured surfaces and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. *J Exp Mar Bio Ecol* 2000; 251: 59–83, [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00210-0) PMID: 10958901
27. Berntsson KM, Andreasson H, Jonsson PR, Larsson L, Ring K, Petronis S, Gatenholm P. Reduction of barnacle recruitment on micro-textured surfaces: analysis of effective topographic characteristics and evaluation of skin friction. *Biofouling* 2000; 16: 245–261, <https://doi.org/10.1080/08927010009378449>
28. Bers AV, Wahl M. The influence of natural surface microtopographies on fouling. *Biofouling* 2004; 20: 43–51, <https://doi.org/10.1080/08927010410001655533> PMID: 15079892
29. Scardino AJ, Guenther J, De Nys R. Attachment point theory revisited: the fouling response to a micro-textured matrix. *Biofouling* 2006; 24: 45–53, <https://doi.org/10.1080/08927010701784391> PMID: 18066730
30. Carl C, Poole AJ, Sexton BA, Glenn FL, Vucko MJ, Williams MR, Whalan S, Nys R. Enhancing the settlement and attachment strength of pediveligers of *Mytilus galloprovincialis* by changing surface wettability and microtopography. *Biofouling* 2012; 28: 175–186, <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.682676> PMID: 22332795
31. Whalan S, Wahab MAA, Sprungala S, Poole AJ, Nys R. Larval settlement: the role of surface topography for sessile coral reef invertebrates. *PLoS One* 2015; 10: e0117675, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117675> PMID: 25871562
32. Ferguson N, White CR, Marshall DJ. Competition in benthic marine invertebrates: the unrecognized role of exploitative competition for oxygen. *Ecology* 2013; 94: 126–135, <https://doi.org/10.1890/12-0795.1> PMID: 23600247
33. Agostini VO, Ozorio CP. Colonization record of *Isognomon bicolor* (Mollusca: Bivalvia) on pipeline monobuoys in the Brazilian south coast. *Marine Biodiversity Records* 2016; 9:84, <https://doi.org/10.1186/s41200-016-0061-2>
34. Dreanno C, Kirby RR, Clare AS. 2007. Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. *J Exp Mar Bio Ecol* 2007; 351: 276–282, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.07.003>
35. Petrone L, Aldred N, Emami K, Enander K, Ederth T, Clare AS. Chemistry-specific surface adsorption of the barnacle settlement-inducing protein complex. *Interface Focus* 2015; 5: 20140047, <https://doi.org/10.1098/rsfs.2014.0047> PMID: 25657832
36. Ko SK, Hur SB. Effects of microalgal species on the settlement and survival of *Halofotis discus hanna* larvae. *Fish Aquat Sci* 2011; 14: 339–345, <https://doi.org/10.5657/FAS.2011.0339>
37. Hadfield MG. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Ann Rev Mar Sci* 2011; 3: 453–470, <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142753> PMID: 21329213

38. Khandeparker L, Kumar KS. Significance of biofilm proteins in modulating cyprid metamorphosis of *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica). *Mar Ecol* 2011; 32: 509–520, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2011.00439.x>
39. Tait K, Havenhand J. Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol. Ecol* 2013; 22: 2588–602, <https://doi.org/10.1111/mec.12273> PMID: 23506419
40. Faimali M, Garaventa F, Terlizzi A, Chiantore M, Cattaneo-Vietti R. The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement. *J Exp Mar Biol Ecol* 2004; 306: 37–50, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.019>
41. Dobretsov S, Abed RMM, Teplitski M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* 2013; 29: 423–441, <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.778042> PMID: 23574279
42. Bao W, Satuito C, Yang J-L, Kitamura H. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Mar Biol* 2007; 28: 249–256, <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0383-4>
43. Mieszkin S, Callow ME, Callow JA. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. *Biofouling* 2013; 29: 1097–1113, <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.828712> PMID: 24047430
44. Martín-Rodríguez AJ, Babarro JMF, Lahoz F, Sansón M, Martín VS, Norte M, Fernández JJ. From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenyl phosphonium salts. *PLoS One* 2015; 10: e0123652, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123652> PMID: 25897858
45. Oliveira SS, Wasielesky JRW, Ballester ELC, Abreu PC. Caracterização da assembleia de bactérias nificantes pelo método "Fluorescent in situ Hybridization" (FISH) no biofilme e água de larvicultura do Camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica* 2006; 28: 33–45.
46. Azevedo FBB, Carloni GG, Carvalheira LV. Colonization of benthic organisms on different artificial substratum in Ilha Grande bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Arch Biol Techn* 2006; 49: 263–275, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000300012>
47. Rios EC. Compendium of Brazilian Sea Shells. Rio Grande: Evangraf; 2009, 668 p.
48. Mikkelsen PM, Bieler R. Seashells of Southern Florida: living marine mollusks of the Florida Keys and adjacent regions. Bivalves. New Jersey: Princeton University; 2008, 503 p.
49. Lesclinsky HL, Edinger E, Risk MJ. Mollusc shell encrustation and bioerosion rates in a modern epeiric sea: taphonomy experiments in the Java Sea, Indonesia. *Palaios* 2002; 17: 171–191, [https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2002\)017<0171:MSEABR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2002)017<0171:MSEABR>2.0.CO;2)
50. Best MMR. Contrast in preservation of bivalve death assemblages in siliciclastic and carbonate tropical shelf settings. *Palaios* 2008; 23: 796–809, <https://doi.org/10.2110/palo.2005.p05-076r>
51. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat. Immunol* 2006; 7: 681–685, <https://doi.org/10.1038/n0706-681> PMID: 16785881
52. Bouvier T, Troussellier M, Anzil A, Courties C, Servais P. Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. *Cytometry* 2001; 44: 188–194, [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010701\)44:3<188::AID-CYTO1111>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010701)44:3<188::AID-CYTO1111>3.0.CO;2-C) PMID: 11429769
53. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 2012; 64: 109–130, <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0> PMID: 22271369
54. Heldal M, Norland S, Bratbak G, Riemann B. Determination of bacterial cell number and cell volume by means of flow cytometry, transmission electron microscopy, and epifluorescence microscopy. *J Microbiol Methods* 1994; 20: 255–263, [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)90050-7)
55. Norland S. The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ, editors. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. USA: Lewis Publishers; 1993, 777 p.
56. Sun J, Liu D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 2003; 25: 1331–1346, <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
57. Zaritski A. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. *J Theor Biol* 1975; 54: 243–248, [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(75\)80129-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(75)80129-9) PMID: 1207136
58. Backup L, Bond-Backup G. Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999, 647 p.
59. Lopes RP. Bioerosion and bioincrustation in body fossils from the Coastal Plain of Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. In: Netto RG, Carmona NB, Tognoli FMW, editors. *Ichology of Latin America—*

- Selected Papers. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Paleontologia; 2012, pp. 179–194 (Monografias 2).
60. Barclay KM, Schneider CL, Leighton LR. Palaeoecology of Devonian sclerobionts and their brachiopod hosts from the Western Canadian Sedimentary Basin. *Palaeogeog Palaeoclim Palaeoecol* 2013; 383–384: 79–91, <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.05.007>
 61. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2017 (www.R-project.org).
 62. Chia FS, Koss R. Fine structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *J. Morphol* 1979; 160: 275–297, <https://doi.org/10.1002/jmor.1051600303>
 63. Svane I, Dolmer P. Perception of light at settlement: a comparative study of two invertebrate larvae, a scyphozoan planula and a simple ascidian tadpole. *J Exp Mar Biol Ecol* 1995; 187: 51–61, [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00171-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)00171-9)
 64. Jenkins SR, Hawkins SJ. Barnacle larval supply to sheltered rocky shores: a limiting factor? *Hydrobiologia* 2003; 503: 143–151, <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008496.68710.22>
 65. Glasby TM. Surface composition and orientation interact to affect subtidal epibiotia. *J Exp Mar Biol Ecol* 2000; 248: 177–190, [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00169-6) PMID: 10771301
 66. Keough MJ. Responses of settling invertebrate larvae to the presence of established recruits. *J Exp Mar Biol Ecol* 1998; 231: 1–19, [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00073-2)
 67. Absalão RS. Colonização primária e sequência de substituições, em substrato artificial, na comunidade epibentônica da Baía da Guanabara, RJ, Brasil. Ph.D. Thesis, Universidade de São Paulo; 1993, 230 p.
 68. Marshall DJ, Keough MJ. Variation in the dispersal potential of non-feeding invertebrate larvae: the desperate larva hypothesis and larval size. *Mar Ecol Prog Ser* 2003; 255: 145–153, <https://doi.org/10.3354/meps255145>
 69. Hsu LC, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 2703–2712, <https://doi.org/10.1128/AEM.03436-12> PMID: 23416997
 70. Feng G, Cheng Y, Wang S-Y, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *NPJ Biofilms Microbiomes* 2015; 1: 15022, <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.22> PMID: 26721236
 71. Vladkova T. Surface modification approach to control biofouling. In: Flemming H-S, Murthy PS, Venkatesan R, Cooksey K, editors. *Marine and Industrial Biofouling*. Heidelberg: Springer Berlin; 2008, pp. 135–163. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69796-1_7
 72. Whitehead KA, Rogers D, Colligon J, Wright C, Verran J. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006; 51: 44–53, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.003> PMID: 16822658
 73. Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *J Colloid Interface Sci* 1998; 208: 23–33, <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5717> PMID: 9820746
 74. Jürgens K, Pemthaler J, Schalla S, Amann R. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1241–1250 PMID: 10048890
 75. Unabia CRC, Hadfield MG. Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar Biol* 1999; 133: 55–64, <https://doi.org/10.1007/s002270050442>
 76. Dobretsov S, Qian P-Y. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms. *J Exp Mar Biol Ecol* 2006; 333: 263–274, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.01.019>
 77. Tamburni MN, Luckenbach MW, Breitburg DL, Bonniwell SM. Settlement of *Crassostrea ariakensis* larvae: effects of substrate, biofilms, sediment and adult chemical cues. *J Shellfish Res* 2008; 27: 601–608, [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[601:SOCALE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[601:SOCALE]2.0.CO;2)
 78. Dobretsov S, Abed RM, Woolstra CR. The effect of surface colour on the formation of marine micro and macrofouling communities. *Biofouling* 2013; 29: 617–627, <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.784279> PMID: 23697809
 79. Yule AB, Walker G. The temporary adhesion of barnacle cyprids—effects of some differing surface characteristics. *J Mar Biol Assoc U.K.* 1984; 64: 429–439, <https://doi.org/10.1017/S0025315400030101>
 80. Monteforte M, Garcia-Gasca A. Spat collection studies on pearl oysters *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia, Pteridae) in Bahía de La Paz, South Baja California, Mexico. *Hydrobiologia* 1994; 291: 21–24, <https://doi.org/10.1007/BF00024236>

81. Visscher JP, Luce RH. Reactions of the cyprid larvae of barnacles to light with special reference to spectral colors. *Biol Bull* 1928; 54: 336–350. <https://doi.org/10.2307/1537021>
82. Corrêa ICS, Ponzi VRA. Depósitos de calcário biodetrítico das regiões 654 do Albardão e Mostardas na plataforma interna do Rio Grande do Sul. Recife: Anais do XXX Congresso Brasileiro de Geologia 2; 1978, pp. 851–866.
83. Ritter M.N., Erthal F., Kosnik M., Coimbra J.C., Kaufman D.S. Spatial variation in the temporal resolution of subtropical shallow-water molluscan death assemblages. *Palaio* 2017; <https://doi.org/10.2110/palo.2017.003>
84. Kowalewski M, Bambach RK. The limits of paleontological resolution. In: Harries PJ, editor. *Approaches in high-resolution stratigraphic paleontology*. New York: Springer Science; 2003, pp. 1–48 (Topics in Geobiology 21). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9053-0_1
85. Stanley SM. Post-Paleozoic adaptive radiation of infaunal bivalve molluscs: a consequence of mantle fusion and siphon formation. *J Paleontol* 1968; 42: 214–29.
86. Vermeij GJ. The Mesozoic marine revolution: evidence from snails, predators, and grazers. *Paleobiology* 1977; 3: 245–58.
87. Madin JS, Alroy J, Aberhan M, Fürsich FT, Kiessling W, Kosnik MA, Wagner PJ. Statistical independence of escalatory ecological trends in Phanerozoic marine invertebrates. *Science* 2006; 312:897–900. <https://doi.org/10.1126/science.1123591> PMID: 16690862
88. Bush AM, Bambach RK. Paleoeologic megatrends in marine metazoan. *Annu Rev Earth Planet Sci* 2011; 39: 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-040809-152556>
89. Stanley SM. Relation of shell form to life habits of the Bivalvia (Mollusca). *GSA Memoirs* 1970; 125: 1–282.
90. Behrensmeier AK, Fürsich FT, Gastaldo RA, Kidwell SM, Kosnik MA, Kowalewski M, Plotnick RE, Rogers RR, Alroy J. Are the most durable shelly taxa also the most common in the marine fossil record? *Paleobiology* 2005; 31: 607–623. [https://doi.org/10.1666/0094-8373\(2005\)031\[0607:ATMDST\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0094-8373(2005)031[0607:ATMDST]2.0.CO;2)
91. Cáceres-Martínez J, Robledo JAF, Figueras A. Settlement and post-larvae behaviour of *Mytilus galloprovincialis*: field and laboratory experiments. *Mar Ecol Prog Ser* 1994; 112: 107–117. <https://doi.org/10.3354/meps112107>
92. Walker SE. Taphonomy of modern and fossil intertidal gastropod associations from Isla Santa Cruz and Isla Santa Fe, Galapagos Islands. *Lethaia* 1995; 28: 371–382. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1995.tb01829.x>

SUPPLEMENTARY DATA

S4 Data. A more detailed description of the methods used (taphonomic analyses).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s004>

All shells observed herein (n= 1965) were assigned damage states using a categorical scoring system established and modified from previous workers (Best 2008; Ritter et al. 2013 and references therein) (SI Table 1, SI Data 3). For taphonomic analysis, specimens were observed under low (10-20 X) magnification using a stereoscopic microscope, and binned for variables describing fragmentation, fine-scale surface alteration, and color alteration (SI Table 1). Many terms for fine-scale surface alteration have been applied, but ones used here are descriptive and do not allude to a one only process (Best 2008 and references therein). In our protocol, consequently, fine-scale alteration denotes various degrees of degradation of original luster; it may be due to any combination of microboring and other microbioerosion, partial dissolution of mineral crystallites, maceration of shell organic matrix, and physical abrasion, which need a scanning electron microscope (SEM) to distinguish (Best 2008).

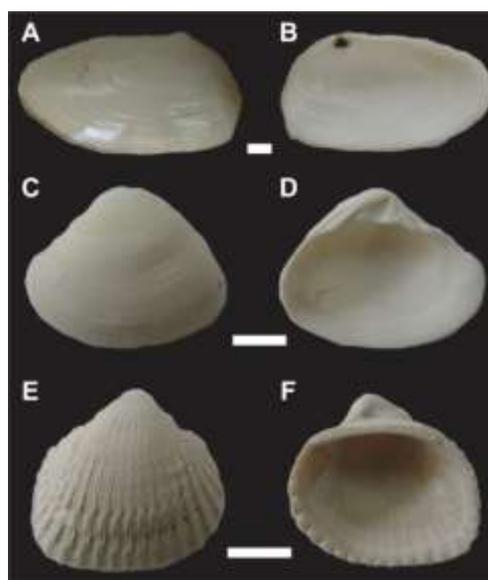
Preceding analysis, the taphonomic profile (scoring damage for each signature on each shell) was standardized, dividing the row sum by the maximum value (equal to numbers of taphonomic attributes counted). Thus, the taphonomic profile for each shell will be ranged between 0 (pristine) and 100 percentage of damage (maximum taphonomic alteration). In order to test for differences in the standardized taphonomic damage among variables, we performed the Kruskal-Wallis Test.

S1 Table. Taphonomic protocol utilized in this study.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s005>

Taphonomic attribute		Scores	More information
Fragmentation		0 = absent 1 = present	Zuschin et al. (2003)
Fine-scale alteration	surface (FSA)	0 = pristine 1 = present 1.1 = small pits 1.2 = large pits 1.3 = small and large pits 1.4 = holes 1.5 = small pits and holes 1.6 = large pits and holes 1.7 = small and large pits and holes	Best (2008) and Ritter et al. (2013)
Secondary color* (or color alteration)		0 = color lost; 1=natural; 2 = oxidized color; 3 = reduced color.	Best (2008)

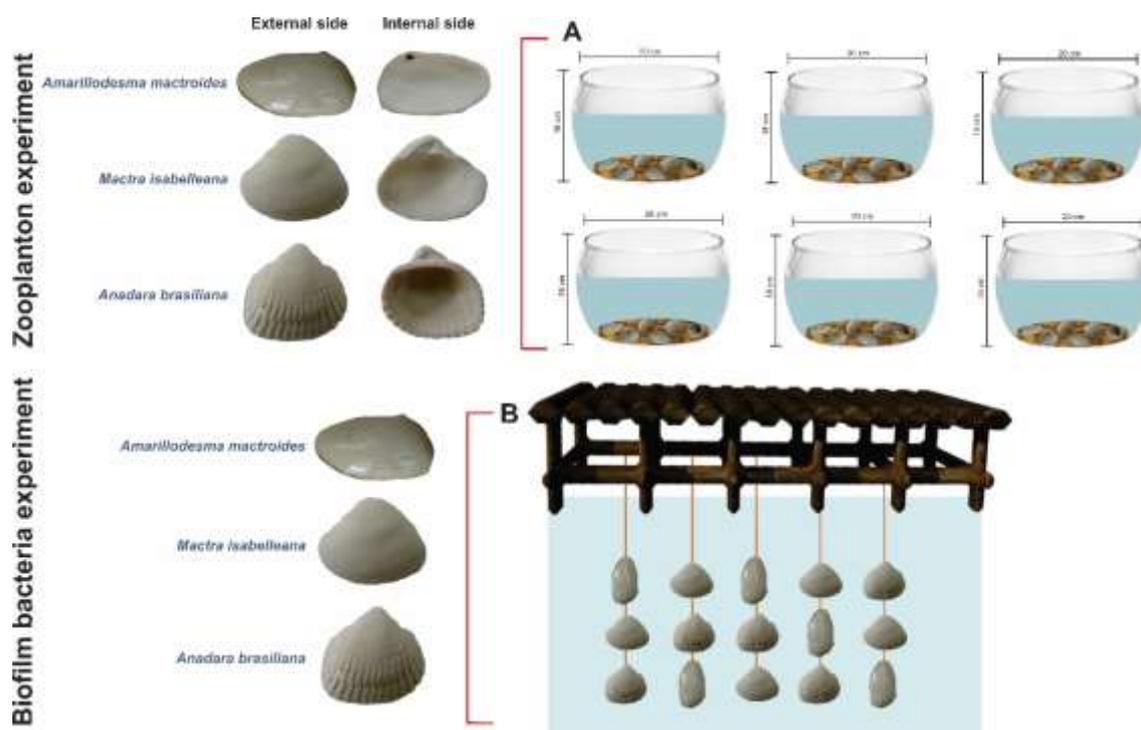
*oxidized color (cream, yellow, ocher and red); reduce color (white, gray and black)



S1 Fig. Species employed in the study screening for different external textures.

(A) *Amarilladesma mactroides* (Reeve 1854), external view. (B) *Amarilladesma mactroides*, internal view. (C) *Mactra isabelleana* d'Orbigny 1846, external view. (D) *Mactra isabelleana*, internal view. (E) *Anadara brasiliiana* (Lamarck 1819), external view. (F) *Anadara brasiliiana*, internal view. Scale bars: 5 cm.

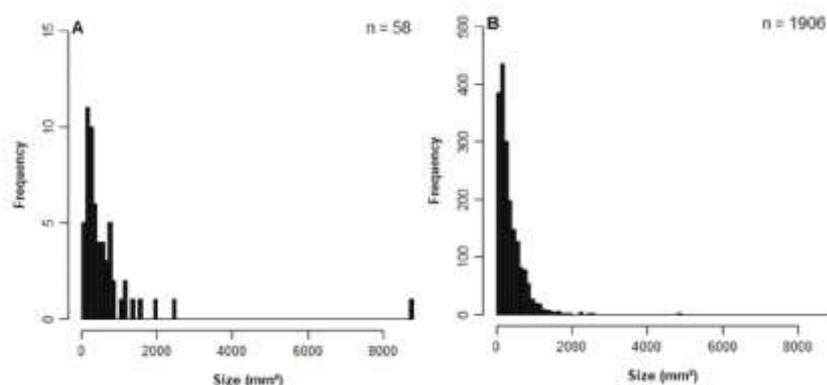
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s006>



S2 Fig. Experimental diagrams employed in both the laboratory and the experimental field steps of the current study.

(A) Zooplankton colonization experiment. Each bowl (20 cm in diameter, 18 cm in height) was filled with estuarine water up to a height of 10 cm and kept at a constant salinity (23 ± 2), temperature (25°C), and photoperiod (14L:10D). These conditions were preferred to simulate the subtropical conditions found in this region. A 5 cm-thick layer of natural sediment was included as substrate at the bottom of each bowl to simulate the upper limit of the taphonomically active zone. (B) The field experiment in the channel of the Patos Lagoon estuary in Southern Brazilian.

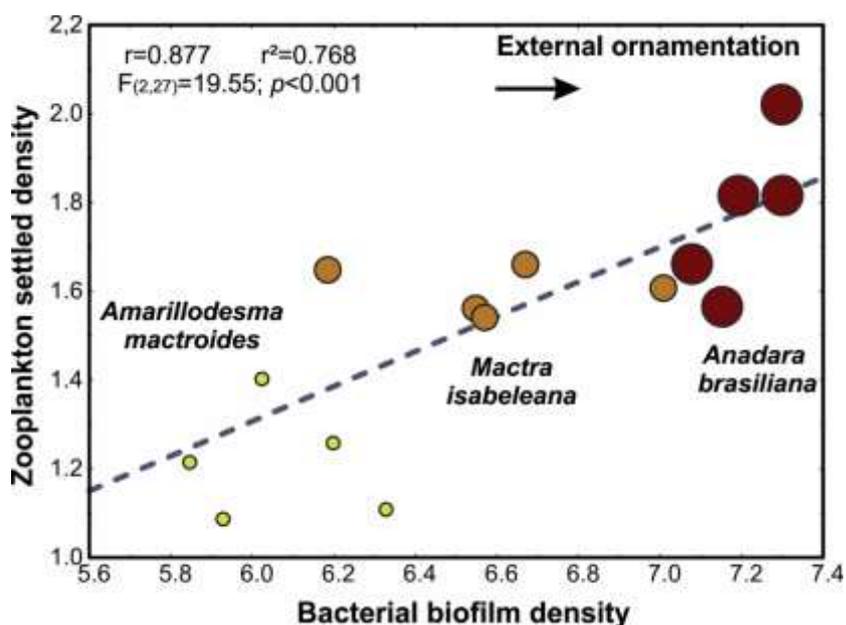
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s007>



S3 Fig. Size-frequency distributions for each mollusk class collected.

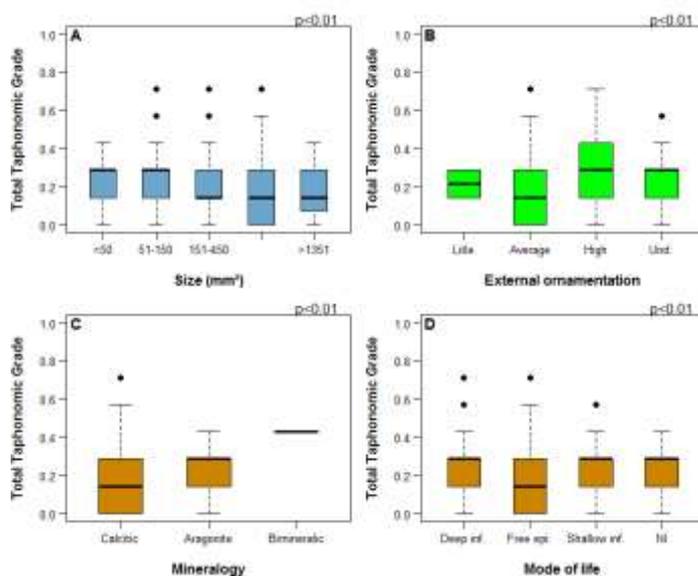
(A) Gastropoda. (B) Bivalvia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s008>



S4 Fig. Multiple regression analysis between bacterial density (bact cm⁻²) and zooplankton colonization density (org 25 cm⁻²) regarding the external ornamentation of shells.

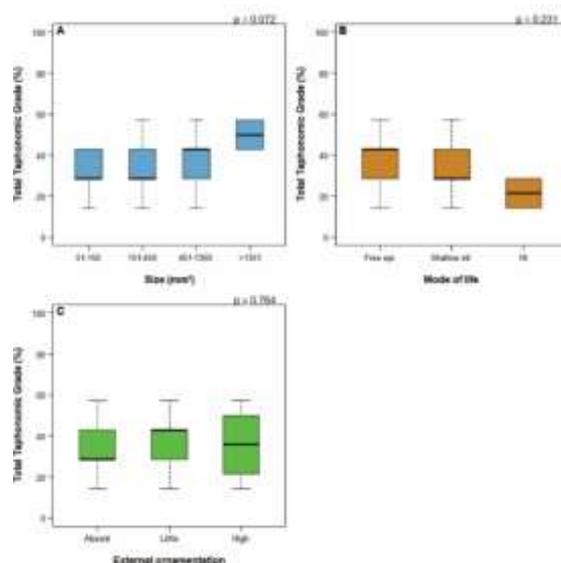
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s009>



S5 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) of intrinsic measured variables in Bivalvia.

The box plots are showing interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. (A) Size class. (B) External ornamentation. (C) Mineralogy. (D). Life mode. All p -values were obtained from the Kruskal-Wallis Test. Und.: undetermined.

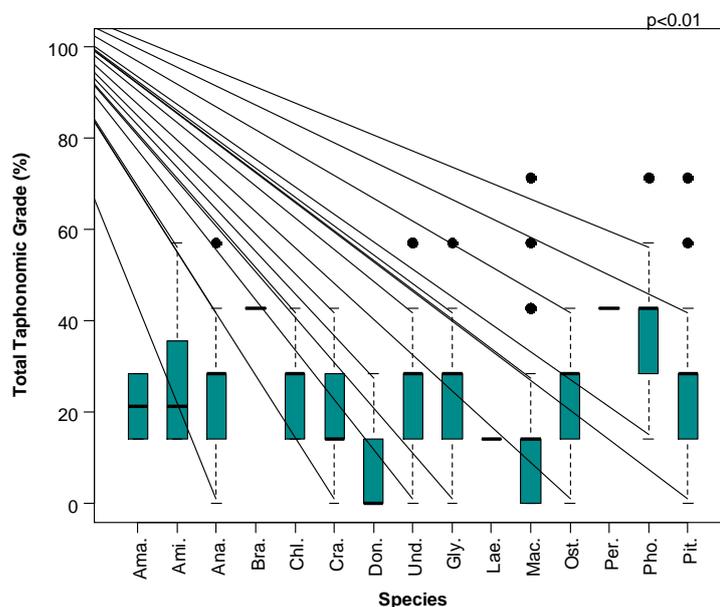
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s010>



S6 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) of the intrinsically measured variables in Gastropoda.

The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. (A) Size class. (B) Life mode. (C) External ornamentation. All p-values were obtained from the Kruskal-Wallis Test. Und.: undetermined.

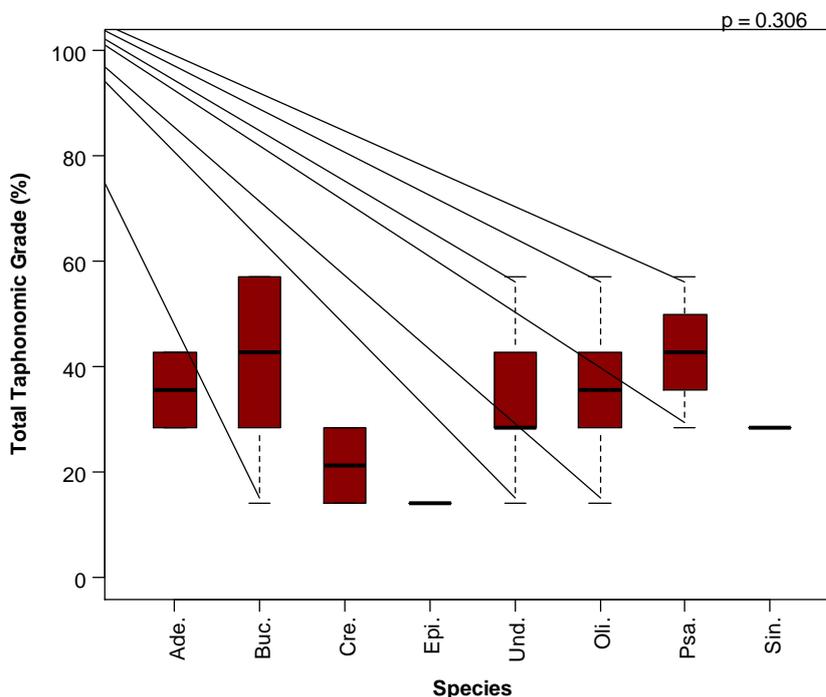
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s011>



S7 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) among Bivalvia species.

The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. Bivalvia genera: Ama.: *Amarillodesma*, Ami.: *Amiantis*, Ana.: *Anadara*, Bra.: *Brachidontes*, Chls.: *Chlamys*, Cra.: *Crassostrea*, Don.: *Donax*, Gly.: *Glycymeris*, Lae.: *Laevicardium*, Mac.: *Mactra*, Ost.: *Ostrea*, Per.: *Perna*, Pho.: *Pholas*, Pit.: *Pitar*. Und.: Unidentifiable. p-value was obtained from the Kruskal-Wallis Test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s012>



S8 Fig. Total taphonomic grade (percentage damage index) among Gastropod species. The box plots are showing the interquartile range, the 95% confidence intervals and the outliers. Gastropoda genera: Ade.: *Adelomelon*, Buc.: *Buccinanops*, Cre.: *Crepidula*, Epi.: *Epitonium*, Oli.: *Olivancillaria*, Psa.: *Psania*, Sin.: *Sinum*. (B). p -value was obtained from the Kruskal-Wallis Test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184745.s013>

References

- Best, M.M.R., 2008, Contrast in preservation of bivalve death assemblages in siliciclastic and carbonate tropical shelf settings: *Palaios*, v. 23, p. 796–809, doi: 10.2110/palo.2005.p05-076r.
- Ritter, M.N., Erthal, F., and Coimbra, J.C., 2013, Taphonomic signatures in molluscan fossil assemblages from the Holocene lagoon system in the northern part of the coastal plain, Rio Grande do Sul State, Brazil: *Quaternary International*, v. 305, p. 5–14, doi:10.1016/j.quaint.2013.03.013.

APÊNDICE III

“Uma revisão sobre os efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de organismos planctônicos: uma ferramenta para experimentos ecológicos”

Artigo submetido ao periódico

Latin American Journal of Aquatic Research

Status: em revisão

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG (campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Uma revisão sobre os efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de organismos planctônicos: uma ferramenta para experimentos ecológicos

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3*}; LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES^{1,3};
ALEXANDRE JOSÉ MACEDO²; ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Muitas perguntas sobre o papel dos organismos planctônicos permanecem sem resposta por causa da dificuldade de se obter um meio onde bactérias e fungos não estão presentes. Além disso, o excesso de carga microbiana em cultivos de fitoplâncton e zooplâncton pode causar competição por nutrientes ou doenças, respectivamente, e conseqüentemente a morte dos organismos de interesse. Por este motivo, analisamos vários métodos utilizados para obter cultivos planctônicos axênicos, com a utilização de inibidores metabólicos específicos, como agentes antibióticos e antifúngicos. De 1940 a 2016, a maioria dos trabalhos com antimicrobianos foi relacionada a cultivos de microalgas e crustáceos, sendo os antimicrobianos penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina, neomicina e nistatina os mais utilizados. Os estudos que aplicaram agentes antimicrobianos em cultivos planctônicos foram principalmente focados em poder cultivá-los e também responder a questões sobre o papel das bactérias nas comunidades aquáticas. Embora a maioria dos trabalhos não tenha testado previamente a eficácia e os efeitos do antimicrobianos em organismos não alvo. Portanto, esta revisão procurou determinar o uso correto de antimicrobianos em cultivos de organismos planctônicos para prevenir o crescimento bacteriano e fúngico, sem causar danos aos organismos não alvo, podendo auxiliar na implementação de experimentos científicos orientados onde a inibição de bactérias e/ou fungos seja necessária.

Palavras-chave: antibióticos; antifúngico; aquicultura; bactérias; fungos; teste de hipóteses.

APÊNDICE IV

“Evaluation of antibiotics as a methodological procedure to inhibit free-living and biofilm bacteria in marine zooplankton culture”

Artigo submetido ao periódico

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Status: publicado

(<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150454>)



Evaluation of antibiotics as a methodological procedure to inhibit free-living and biofilm bacteria in marine zooplankton culture

VANESSA O. AGOSTINI^{1,2*}, ALEXANDRE J. MACEDO² and ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton, Universidade Federal do Rio Grande/FURG, Instituto de Oceanografia/IO, Av. Itália, s/n, Km 8, Campus Carreiros, CP 474, 96203-900 Rio Grande, RS, Brasil

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil

Manuscript received on June 24, 2015; accepted for publication on August 13, 2015

ABSTRACT

There is a problem with keeping culture medium completely or partially free from bacteria. The use of prokaryotic metabolic inhibitors, such as antibiotics, is suggested as an alternative solution, although such substances should not harm non-target organisms. Thus, the aim of this study was to assess the effectiveness of antibiotic treatments in inhibiting free-living and biofilm bacteria and their half-life in artificial marine environment using the copepod *Acartia tonsa* as bioindicator of non-harmful antibiotic combinations. Regarding to results, the application of 0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹ neomycin sulphate showed great potential for use in marine cultures and scientific experiments without lethal effects to non-target organisms. The effect of this combination starts within the first six hours of exposure and reduces up to 93 % the bacterial density, but the half-life is short, requiring replacement. No adverse changes in water quality were observed within 168 hours of exposure. As a conclusion, we can infer that this treatment was an effective procedure for zooplankton cultures and scientific experiments with the aim of measuring the role of free-living and biofilm in the marine community.

Key words: *Acartia tonsa*, antimicrobials, experiment, marine culture, toxicity.

INTRODUCTION

Scientific laboratory experiments are often voided by the presence of bacteria in the medium, which may be responsible for biased or dubious results (Spencer 1952). The real importance/contribution of microorganisms in cultures is difficult to be mea-

sured because conditions totally (axenic) or partially (semi-axenic) free of bacteria are hardly attainable for long periods. In this context, an efficient method for the inhibition/destruction of bacteria without harming non-target organisms still needs to be developed to allow hypothesis testing and to assess their real contribution/role in the community.

Yetka and Wiebe (1974) proposed the use of prokaryotic inhibitors, such as antibiotics, as a tool for inhibiting bacteria in water and thus allowing for scientific experiments. Subsequently, several

Correspondence to: Vanessa Ochi Agostini

E-mail: nessaochi@gmail.com

*Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica/PPGOB, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico /CNPq

authors have reported success using these substances to quantify bacterial respiration (Pringault et al. 2009), bacterial growth (Wheeler and Kirchmann 1986), and nitrogen assimilation (Fouilland et al. 2007), as well as to understand aquatic trophic interactions (DeLorenzo et al. 2001).

The use of inhibitors to prevent bacterial activity can improve our knowledge in experiments that assess their activities, such as those aimed to distinguish the absorption of nitrogen between phytoplankton and bacteria (Tungaraza et al. 2003). Inhibitors can also exclude competition among groups benefiting from the growth of a particular group free from bacteria (Droop 1967), and improve or accelerate the development of aquatic species such as invertebrates and fish larvae (Conover 1967, Tighe-Ford et al. 1970, Walne 1974).

Antibiotics have been used for a long time to control bacterial diseases in aquaculture, but massive use of these substances without care or control resulted in a limitation or even ban of these substances in some countries where production was intended for human consumption (Defoirdt et al. 2007). Nevertheless, with proper care, this procedure could be used in scientific experiments aimed at systems without bacterial contamination, such as semi-intensive cultivation of organisms for population studies (Tighe-Ford et al. 1970), to identify/measure the development stages/rates of crustaceans (Rice and Ingle 1975, Harms 1986), and for hypothesis testing by checking the contribution of bacteria to the community (Yetka and Wiebe 1974, Veuger et al. 2004).

Combinations of antibiotics such as penicillin and streptomycin have been widely used in cultivation with positive survival and growth results in the species of interest (Spencer 1952), with some authors adding neomycin (Droop 1967, Agostini 2014) and chloramphenicol (Droop 1967), thus increasing the efficiency in inhibiting bacterial growth. On the other hand, the individual application of oxytetracycline hydrochloride

has shown significant results in the reduction of bacterial diseases in fish (Pereira Jr. et al. 2006).

For the use of antibiotics on a large scale, such as intensive fish ponds and carcinoculture, it is necessary to estimate the real effect of such substances on the microbiological community, preferably after conducting an assessment of their effects on non-target organisms known as bioindicator with great sensitivity, such as copepods and mysids (Resgalla and Laitano 2002, Ihara et al. 2010).

The copepod *Acartia tonsa* Dana Calanoida 1849 certainly meets this premise: along with having a wide distribution, short life cycle and easy cultivation, it still has high sensitivity and is recommended for use in acute toxicity tests (ISO 1499 1999).

In addition, copepods are an important link in the aquatic food chain, playing a key role as primary consumers as well as secondary producers, generating the interest of the economic sector to be used in aquaculture as live food for fish larvae (Drillet et al. 2006, Olivotto et al. 2008, 2009, Buttino et al. 2012).

Thus, the aim of this study was to assess the effectiveness of different antibiotic treatments in inhibiting free-living and biofilm bacteria associated with organisms and surfaces and their half-life in the marine zooplankton cultures.

MATERIALS AND METHODS

This study was divided into two stages: the first was to assess the survival of the of copepod *Acartia tonsa* with different combinations of antibiotics, and the second was to estimate the half-life and efficacy for the combination of antibiotics with the best survival results for the copepod *A. tonsa* obtained in the first step of the experiment on the inhibition of free-living and biofilm bacteria.

To evaluate the survival of *A. tonsa* to antibiotics, we used 60 experimental units (EU) represented by five treatments with twelve replicates each. Table I shows all treatments used in the experiments.

TABLE I
Summary of all combinations tested in each treatment (T).

Abbreviation	Composition
Control	untreated
T1	0.75 g L ⁻¹ penicillin G potassium + 0.75 g L ⁻¹ streptomycin sulphate (modified of Spencer 1952)
T2	0.025 g L ⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L ⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L ⁻¹ neomycin sulphate (Agostini 2014)
T3	0.63 g L ⁻¹ penicillin G potassium + 0.3 g L ⁻¹ streptomycin sulphate + 0.05 g L ⁻¹ neomycin sulphate + 0.01 g L ⁻¹ chloramphenicol (Droop 1967)
T4	0.02 g L ⁻¹ oxytetracycline hydrochloride (Pereira Jr. et al. 2006)

Adults of the copepod *Acartia tonsa* that were used in the experiments were obtained from zooplankton samples collected from horizontal tows performed at the surf zone of Cassino Beach, Rio Grande, RS, Brazil. All samples were collected with a 30 cm cylinder-conical plankton net fitted with a 200 micron mesh. In the laboratory, *Acartia tonsa* specimens were identified according Bradford-Grieve (1999) and separated, with the aid of Pasteur pipettes and a dissecting microscope (Olympus SZ40), from the rest of the community. All *Acartia* specimens were checked according to Sabatini (1990) to verify the development stage they were in (*i.e.*, copepodites VI males and females) and acclimated for 30-hours in similar conditions to which they were collected (salinity 30, temperature 25 °C and with a photoperiod 14:10 (light:dark)), so that any organism that had been injured or debilitated by the stress generated during collection could die or be removed. After acclimation, 3 adults (*i.e.*, Copepodite VI), without distinction of sex, were placed in experimental units (EU) with 60 mL (density of 1 org 20 mL⁻¹) (Gorbi et al. 2012) of the same conditions to which where they were acclimated. Copepods were fed daily with the diatom *Conticribra (=Thalassiosira) weissflogii* Stachura-Suchoples and Williams (2009) at a concentration of 20,000 cell mL⁻¹ (Teixeira et al. 2010). The culture medium of each EU was completely renewed every 24 hours to ensure the effect of the antimicrobial agent used. To evaluate the impact of treatments on copepod

survival, the number of copepods was recorded every 24 hours for 3 days (Delupis et al. 1992).

The second stage was conducted in six EU represented by two treatments containing 120 mL of culture medium, with three replicas each: control (without antibiotic) and T2) 0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹ neomycin sulphate. Six substrates of wood (20 × 20 mm) that had been cleaned with 70 % ethyl alcohol were placed in each EU. To prevent biofilm colonization on only one side of the wooden substrates, the EU were shaken five times a day. All EU were kept at a salinity of 30, temperature of 25 °C and photoperiod of 14:10 inside a BOD incubator (Marconi 403), reflecting the same conditions as the previous experiment. To assess the beginning effects of the antibiotics as well as the half-life in artificial sea medium, the experiment was static, with antibiotics being applied only once.

To estimate the density of free-living and biofilm bacteria, three aliquots of the medium (1 mL) and of three substrates immersed in Mili-Q water (after detachment) were taken after 6, 12, 24, 72, 120 and 168 hours of exposure to the treatments. Free-living bacteria were deposited directly inside Eppendorf tubes and preserved with 4 % buffered formaldehyde. Biofilm had to be detached from the wooden substrates using three pulses of 20 kHz for 15 seconds on each side of the substrate (Oliveira et al. 2006) with the aid of a Cole-Parmer® ultrasound (series 4710 - ultrasonic homogenizer). Detached biofilm was then placed

inside Eppendorf tubes and fixed with 4 % buffered formaldehyde. Both samples were then stored in the dark at 8 °C until analysis.

Free-living (org mL^{-1}) and biofilm (org cm^{-2}) bacterial density was estimated with a flow cytometer (BD FACSVerserTM) at the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). To ensure the reliability of data, part of the samples were visually counted under epifluorescence microscope, applying the same methodology for the evaluation of the microbial community described below, and were subsequently compared with the counts obtained in cytometer, resulting in equivalent bacterial densities. The size (μm) and complexity of the cells were measured using the mode of Forward Light Scatter (FSC-A) and Light Side Scatter (SSC-A) parameters using 6 μm latex beads (Invitrogen®) as standard (Herzenberg et al. 2006, Bouvier et al. 2011, Picot et al. 2012). The bacterial cell biovolume (μm^3) estimation and conversion to bacterial cell biomass (pg C^{-1}) were made using the allometric conversion factor of Sun and Liu (2003) and Norland et al. (1987), respectively.

For the evaluation of the microbial community, biological material (of water and substrate) obtained from EU was filtered on polycarbonate filters (darkened with Irgalan Black), stained with Acridine Orange (1 %) and viewed under epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan) at 100 X magnification. Bacterial morphotypes were classified according to Zaritski (1975). Fungi were observed and quantified by the same method.

Water samples of 100 mL were collected from each treatment at 6, 72 and 168 hours of exposure to determine the amount of phosphate (PO_4), ammonium (NH_4^+), nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-), and filtered through 0.2 μm glass fibre filters (Whatman GF/C) and frozen in polycarbonate bottles at -18°C to evaluate the water quality and estimate possible changes caused by the antibiotics. Nutrients (PO_4 , NO_2^- and NO_3^-) were analysed following the methodology described by Strickland and Parsons

(1972), and ammonium (NH_4^+) analysis followed the Blue Indophenol method (UNESCO 1983).

After analysis, antibiotics were stored in sealed containers and collected by the Engineering and Environmental Services, SANIPLAN^C.

All data were analysed with parametric statistics. Two-way ANOVA was used to test the survival results of *Acartia tonsa* over time, and the comparative density results of microorganisms between treatments at different exposure times. A post-hoc Tukey test followed the analyses.

RESULTS

Significant *Acartia tonsa* survival rates between treatments ($F_{(12,220)}=12.618$; $p<0.001$) were found (Fig. 1). T1 and T3 treatments caused the death of all organisms within the first 24 hours of exposure. In contrast, T2 and T4 treatments showed no significant differences from the control (100 % survival) in the same period of observation. After 48-hours, 8, 17 and 25 % mortality was observed in the control, T2, and T4, respectively, but without significant differences between them. At the end of the experiment (72-hours of exposure), no statistical difference was observed between the control and the two treatments. Survival at the end of the experiment was 83, 83 and 75 %, respectively, for the control, T2 and T4.

From the *Acartia tonsa* survival results presented, the treatment for T2 (0.025 g L^{-1} penicillin G potassium + 0.08 g L^{-1} streptomycin sulphate + 0.04 g L^{-1} neomycin sulphate) was selected to check its potential for inhibiting free-living and biofilm bacteria.

In figure 2, it can be observed that the T2 treatment showed a lower density of free-living bacteria (org mL^{-1}) compared with the control only in the first few hours of exposure, where a significant difference was detected at 6 and 12 hours ($p<0.001$) (Fig. 2a). As for the biofilm bacteria (org cm^{-2}), it was observed that the selected treatment significantly inhibited bacterial colonization in

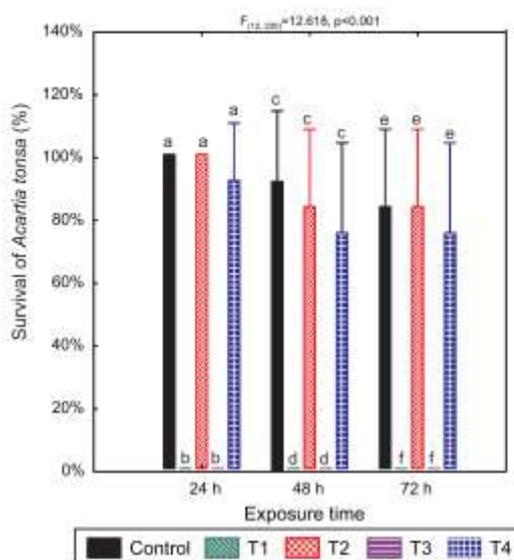


Figure 1 - Two-way ANOVA indicating the survival of *Acartia tonsa* exposed to different treatments (Control, T1, T2, T3 and T4) after 24, 48 and 72 hours, where control = treatment without antibiotics; T1 = 0.75 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.75 g L⁻¹ streptomycin sulphate; T2 = 0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹ neomycin sulphate; T3 = 0.63 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.3 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.05 g L⁻¹ neomycin sulphate + 0.01 g L⁻¹ chloramphenicol; T4 = 0.02 g L⁻¹ oxytetracycline hydrochloride. Bars represent confidence intervals (95 %) and lowercase letters indicate similarities or statistical differences between treatments for each time evaluated.

12, 24 and 120 hours ($p < 0.001$) with an average bacterial reduction of 78 % throughout the duration of the experiment (Fig. 2b).

For free-living bacteria, a reduction of 88 % was observed in the density with 6 hours of exposure (org mL^{-1}) while in the biofilm, the reduction was 75 % (org cm^{-2}). The highest inhibitory effect in relation to control of biofilm and free-living bacteria occurred at 12 (93 %) and 6 hours (88 %) of exposure, respectively.

Differences in morphotypes and bacteria size were found in the bacterial community composition when the control was compared with those found under the influence of treatment T2, especially in the first 24 hours of the experiment. In the control, free-living bacteria were represented by coccobacilli forms (Fig. 3a), while in the T2 treatment, rods were the dominant form with different sizes (Fig. 3b). The bacterial biofilm found in the control and T2 were described to be of the coccus form with similar sizes (Fig. 4).

In the biofilm of the control, it was possible to observe the recalcitrance of the attached bacteria even after the detachment process with ultrasound. It was also possible to observe the extracellular polymeric matrix and transport channels, whereas

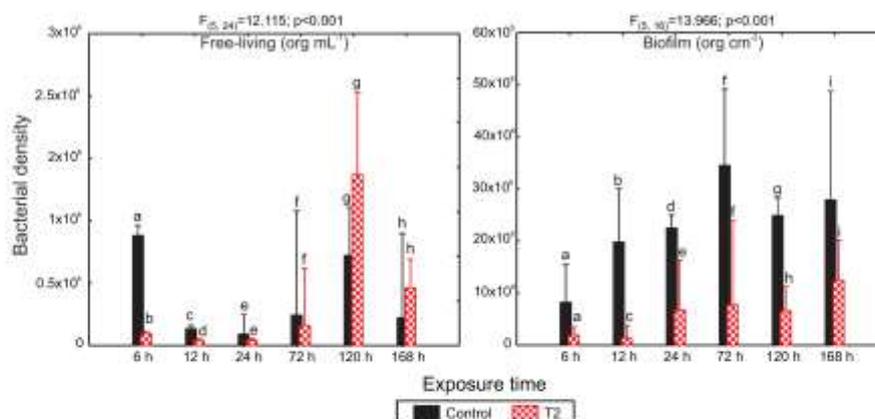


Figure 2 - Two-way ANOVA indicating average free-living (a) and biofilm (b) bacteria density exposed to control (without antibiotics) and T2 (0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹ neomycin sulphate) over 168 hours. The bars represent the confidence intervals (95 %), and lowercase letters represent similarities or statistical differences between treatments for each time evaluated.

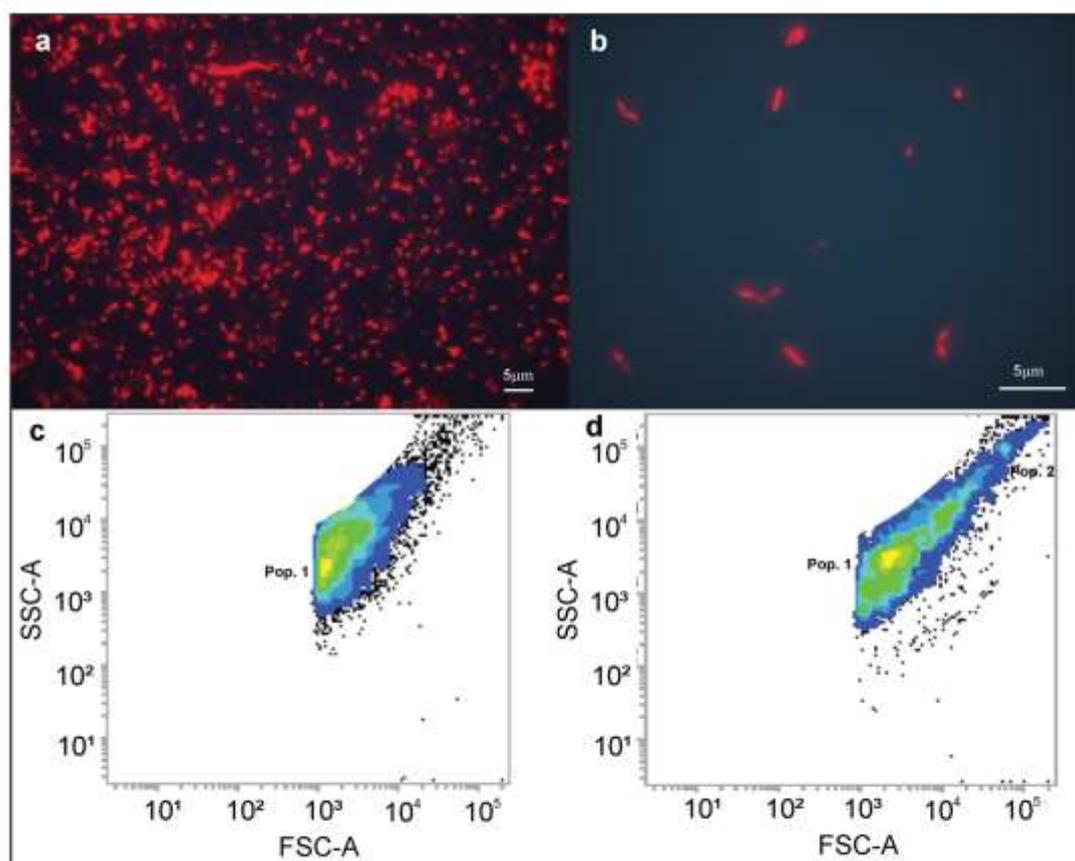


Figure 3 - Comparison of free-living bacterial communities between control (a) and T2 (b) with the evaluation of the population of bacteria by flow cytometer after 10,000 acquired events on control (c) and T2 (d). Lighter colours are related to higher density cells. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

in the T2 treatment, the bacteria were well dispersed and individualized.

After 6 hours of exposure, the time of greater free-living bacterial inhibition by the T2 treatment, a higher biomass was noted for this treatment (0.127 pg C⁻¹) compared to control (0.120 pg C⁻¹). The free-living bacteria showed an average biovolume (μm³) and biomass (pg C⁻¹) of 26.157 e 0.120 for the control and 35.108 and 0.123 at the T2, respectively.

The relative size (FSC-A) and complexity (SSC-A) of the cells of the free-living bacteria with 6 hours of exposure (Figs. 3c and 3d) were also evaluated. It was possible to detect differences

between the control and T2, such as the presence of a second population forming in the antibiotic treatment (Fig. 3d).

The free-living bacterial community also showed variations in cell size throughout the experiment. The control was represented by bacteria relatively smaller than average (~ 1.39 μm) compared with those observed at the T2 (~ 1.86 μm), and with lower average cell complexity (Figs. 3c and 3d).

For the biofilm bacteria, after 12 hours of exposure, the same SSC-A was observed between the control and T2, but the bacteria found on the medium without antibiotics had a higher mean cell

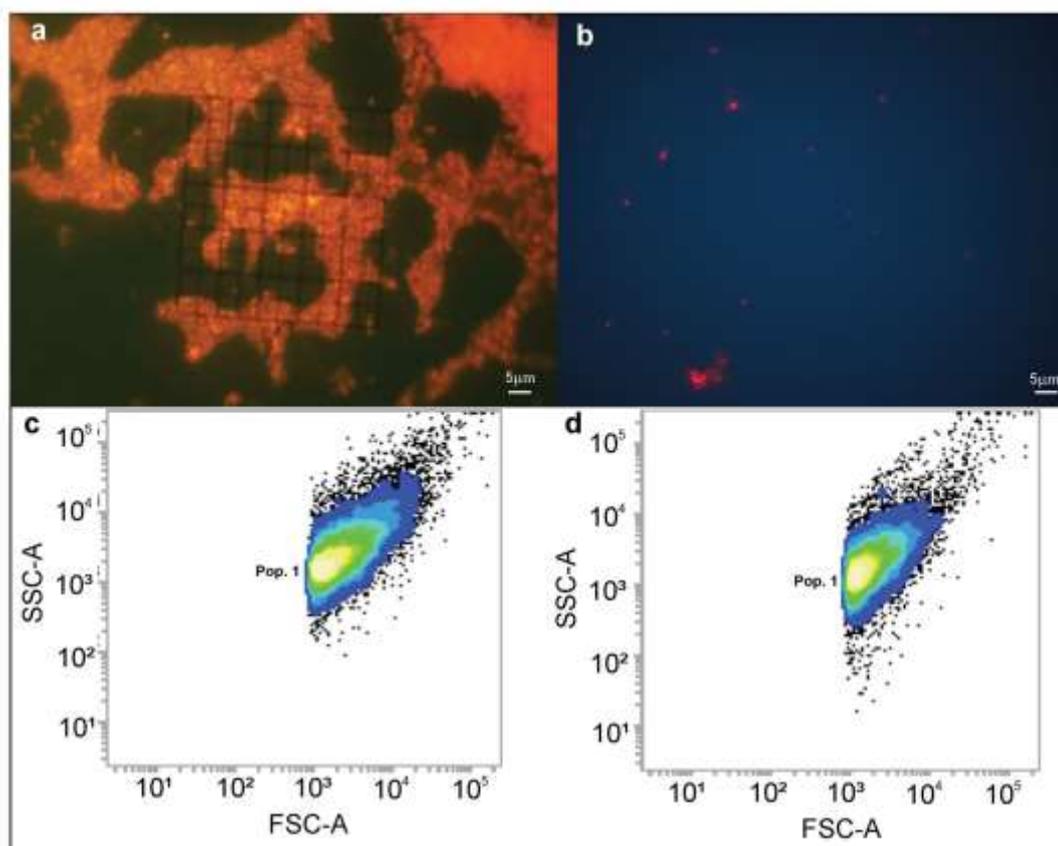


Figure 4 - Comparison of biofilm bacterial communities between control (a) and T2 (b) with the evaluation of the population of bacteria by flow cytometer after 10,000 acquired events on control (c) and T2 (d). Lighter colours are related to higher density cells. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

complexity. In the FSC-A, similar sizes were found in the control and T2 (~ 1.11 μm) (Figs. 4c, d).

After 12 hour exposure, the time for higher biofilm bacterial inhibition by the T2 treatment, it was observed that the bacterial biofilm had an average biovolume and biomass of 20.926 and 0.118, respectively, for both treatments.

At 72 hours, fungi of the Deuteromycota group was observed in the substrate (spores), while in the water column its presence was less significant and was mostly in the form of hyphae. Nevertheless, due to the absence of reproductive structures (that are essential for the taxonomic identification genera/species), it was not possible

to reach a lower taxonomic level, with only conidia of *Fusarium* sp. being observed in both biofilm and the water column. However, it was a single individual filament (hyphae), and each displayed a reproductive structure (spore).

Figure 5 shows a comparison of relative fungal and bacterial density. Free-living and adherent fungi were not observed in the control at any exposure time or in the T2 at 6, 12 or 24 hours. An increase of bacteria in the biofilm between 24 and 72 hours of exposure was observed in T2 in both conditions. The free-living community showed significantly more bacteria than fungi at 72 hours and 168 hours of exposure ($F_{(1,4)}=23.755$; $p=0.016$;

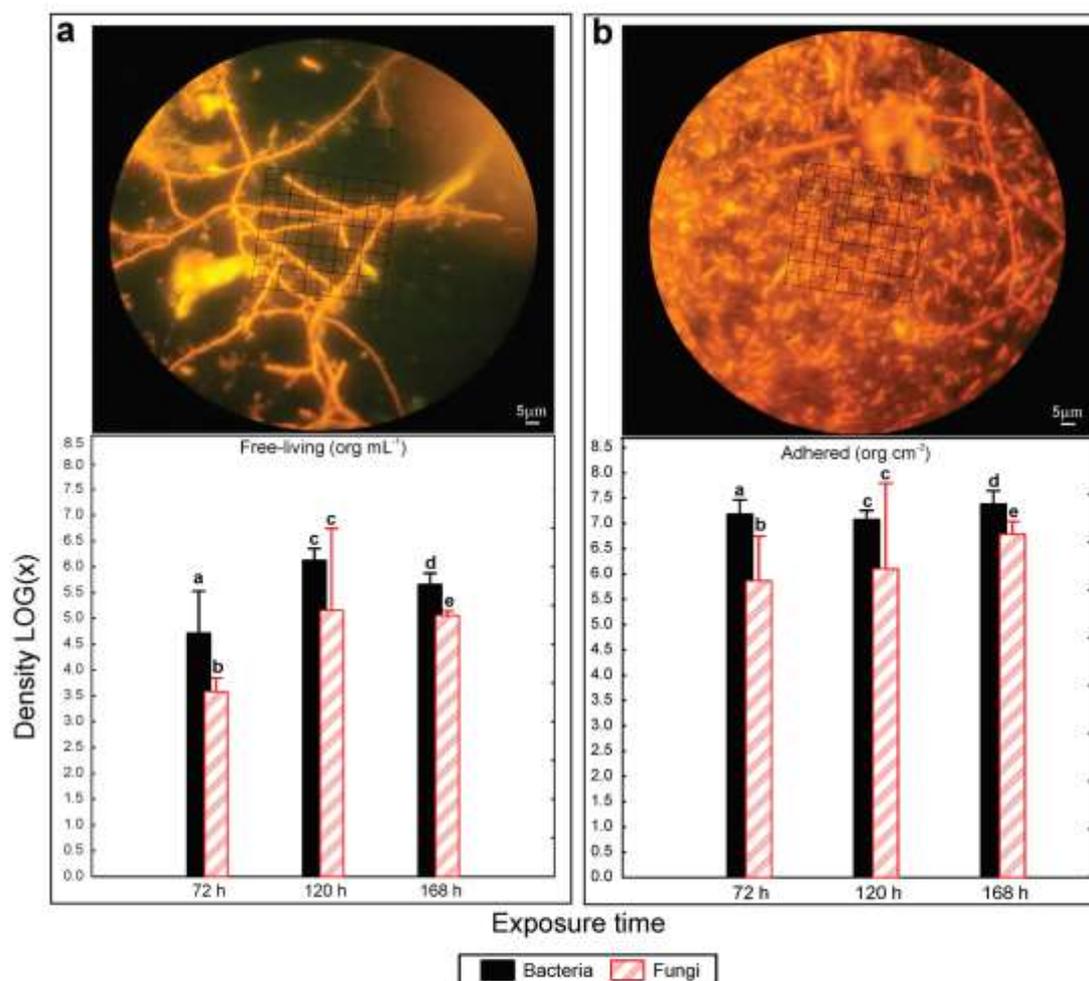


Figure 5 - Two-way ANOVA indicating density of free-living (org mL⁻¹) (a) and adhered (org cm⁻²) microorganisms (b). Top figures are pictures, while bar graphs compare the density of bacteria and fungi after 72, 120 and 168 hours of exposure to T2. The bars represent the confidence intervals (95 %) and lowercase letters indicate similarities or statistical differences between treatments for each time evaluated.

$F_{(1,4)}=50.539$; $p=0.002$, respectively), while at 120 hours, no significant difference was observed in either population ($F_{(1,4)}=6.082$; $p=0.069$). However, the average bacterial density was higher than that of fungi for all times evaluated.

Regarding the biofilm community, a similar trend was observed with significantly higher bacterial density at 72 hours and 168 hours ($F_{(1,4)}=152.640$;

$p=0.001$; $F_{(1,4)}=121.150$; $p<0.001$, respectively) and no difference was observed in either population at 120 hours of exposure ($F_{(1,4)}=6.883$; $p=0.058$).

In relation to nutrients, there was only a slight variation of nitrite between the control (0.001 ± 0.00 mg L⁻¹) and the T2 (0.000 ± 0.00 mg L⁻¹) with 168 hours of exposure, but without any significant difference.

DISCUSSION

The T2 and T4 treatments, based on the proportions proposed respectively by Agostini (2014) and Pereira Jr. et al. (2006), each represent a treatment with a combination of antibiotics (penicillin G potassium, streptomycin sulphate and neomycin sulphate) or a single substance (oxytetracycline hydrochloride). The two treatments did not show significant differences in the survival of *Acartia tonsa* when compared with the control. Nevertheless, T2 showed a slightly higher average survival, similar to that found in the control, than T4. Since Kinne (1977) reported that a combination of antibiotics should be more effective than a single substance to prevent the excessive growth of microorganisms, and due to time constraints, the T2 was selected for the next experiment instead of T4.

Apart from T4, the T1, T2 and T3 treatments are mainly based on different concentrations of the same antibiotics, and surprisingly T1 and T3 treatments caused the death of all organisms. If we take a closer look at the concentrations used, it is clear that T1 and T3 are based on a much higher concentration of antibiotics used than T2 and T4, and this could be making the culture medium toxic to the copepods.

Despite the fact that the combination tested on T1 had been previously used (Spencer 1952, Borojevic 1966, Harms 1986, Roberts et al. 2007, Pringault et al. 2009, Trotted et al. 2011), the concentration used had never been tested on invertebrate cultures. Spencer (1952) used 0.32 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.83 g L⁻¹ streptomycin sulphate in microalgae culture, however, the concentration of penicillin used in the current study for T1 was higher, which might have caused toxicity for the copepods. The T3 treatment, apart from the higher concentration used and the addition of chloramphenicol, also had not been tested on invertebrate cultures, but only with diatoms (Droop 1967). Those results only reassure the classic

toxicology maxim "*Sola dosis facit venenum*" (From Latin: The dose makes the poison") attributable to Paracelsus (1493–1541), who said "all things are poison and nothing is without poison; only the dose makes a thing not a poison," indicating that a substance can be harmless or poisonous depending on the dose.

According to Sherr et al. (1986), antibiotics used in the aquatic environments should have broad-spectrum inhibition without affecting non-target organisms. Based on this requirement, T1 and T3 are not recommended for use in scientific experiments where harmful effects to non-target organisms are not acceptable.

The use of the combination of penicillin + streptomycin sulphate + neomycin sulphate in different concentrations has been widely used to evaluate the assimilation of nitrogen in natural aquatic communities (Middelburg and Nieuwenhuize 2000a, b, Veuger et al. 2004, Cozzi and Cantoni 2006) and trophic interactions (DeLorenzo et al. 2001). However, none of these studies tested the effects of these antibiotics on sensitive non-target organisms, such as the copepod *Acartia tonsa*.

The use of *A. tonsa* for ecotoxicological tests and marine pollution studies have been suggested since 1977 (Lee 1977) because they are sensitive organisms and, therefore, useful as biological indicators (Carotenuto et al. 2002, Medina and Barata 2003, Ihara et al. 2010, Gorbi et al. 2012). The sensitivity of the copepod *A. tonsa* to different toxic substances such as metals, antibiotics, insecticides, antifouling products, and surfactants has been demonstrated by acute and chronic bioassays (Sosnowski and Gentile 1978, Lanzky and Halling-Sørensen 1997, Barata et al. 2002, Medina et al. 2002). For this reason, the International Organization for Standardization (ISO 14699 1999) proposed the use of the copepod *A. tonsa* as a sensitive species for acute toxicological tests. Thus, it is assumed that if this copepod is resistant

to a substance, other organisms in the marine community should also be resistant. Treatment with antibiotics may increase the survival, growth and lifetime of crustaceans (Fisher and Nelson 1978, Pelletier and Chapman 1996); for this reason, we believe that the survival results observed in T2, similar to those found in the control, could be an indication that the use of antibiotics in long term cultures could reduce the lethal damage caused by microorganisms.

When the T2 combination was tested to evaluate its bacterial inhibition potential, it was observed that it significantly inhibited bacterial biofilm compared with the control in almost all exposure times. Regarding free-living bacteria, this treatment only significantly inhibited bacterial growth at 6 and 12 hours. In general, all antimicrobial agents are most effective to kill rapidly growing cells (Paraje 2011). Our results indicate that the inhibition effects of the antibiotics used in this experiment in the free-living bacteria started before 6 hours, reaching its inhibitory peak within 12 hours and lasting for approximately 72 hours. However, when comparing only the efficiency of T2 without the control, we observed that for free-living bacteria, greater inhibition efficiency occurs at 12 hours of exposure, as observed for the bacteria biofilm. The contrast observed between the treatment and control of the free-living bacteria may be due to depletion of nutrients, such as phosphorus and nitrogen (Smith and Paire 2004), by the high-density observed in the control with 6 hours of exposure. This high density considerably diminishes in the control with 12 hours of exposure, masking the effect of antibiotics when compared with the control.

If we consider the concentration observed at the control at 6 hours as the initial bacterial concentration, it is observed that there is a decrease in the amount of bacteria within 24 hours, and at 72 hours there is a trend of bacterial increase. For the biofilm community, the greatest density reduction occurred at 12 hours and then the effect decreased.

After 72 hours, it was significantly reduced, suggesting that either the antibiotic effects ceased or they developed resistance to the combination used. Antibiotics act as inducers for the expression of bacterial genes encoding drug resistance mechanisms (Butaye et al. 2003). However, there is the possibility that antibiotic resistance varies between regions and environments, mainly depending on the selection pressure imposed by the ecosystem (Pereira Jr. et al. 2006) or time of exposure of the bacteria to the antibiotic (Ali Abadi and Lees 2000). It is likely that the single dose administered could explain the increase in bacterial density observed in this study.

Analysing the results, it is clear that there is a delay of several hours to obtain the highest inhibition efficiency of bacteria (between 7 and 12 hours). We believe that the antibiotics loses its full effect between 25 and 71 hours after the initial ministration because it is clear that there is an increase in bacterial density after 24 hours of exposure when compared with the control. However, we also need to note that a community response delay to this loss effect should also be taken into account.

The species of bacteria found in the water column are the same ones found in the biofilm. The transition from the water column to biofilm occurs in response to environmental changes and involves multiple regulatory networks that translate signals to the concerned expression change genes (Abel-Aziz and Aeron 2014). Bacteria are capable of multicellular behaviours (associations) that benefit the bacterial community as a whole. This association can be viewed as a survival mechanism, in which bacteria are benefited by the facilitated acquisition of nutrients and biocidal protection (Paraje 2011). Therefore, it is likely that the inhibition effect of antibiotics should affect biofilm bacteria later when compared with the free-living bacteria.

One of the most important aspects of biofilm formation is to increase the strength of

the constituents of microbes to antibiotics. The structural nature of the biofilm and the characteristics of sessile cells produce antimicrobial resistance, which leads to a protected environment against adverse conditions and host defences (Costerton et al. 2003). On the other hand, free-living bacteria are usually susceptible to antibiotics; however, the minimum inhibitory concentration of antibiotics in bacterial biofilm can be up to 1,000 times higher than that for the free-living bacteria (Patel 2005).

For biomass, it was observed that the free-living bacteria in the treatment with antibiotics showed a higher amount of carbon. Thus, we believe that T2 selected a population that was allowed to grow either because they were more resistant to antibiotics or due a lack of competition because most of the bacterial community was inhibited by the treatment.

We speculate that the fungi observed in this work was favoured by the reduction of bacteria under the effect of the combination of the different prokaryote inhibitors used. Fisher and Nelson (1978) found that the elimination of bacteria adhered to a substrate with antibiotics restricts the connection of other microorganisms, such as fungi. However, in the current research, fungi occurred with 72 hours of exposure in both communities, contradicting the earlier study. The presence of fungi could be masking the real end of the effect of the antibiotics in this artificial marine system because it is known that competition between those microorganisms occurs and the use of a fungicide should be taken into account in future studies.

DeLorenzo et al. (2001) successfully used the combination of 0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹ neomycin sulphate + 0.5 g L⁻¹ cycloheximide as a specific eukaryote inhibitor of fungi. However, the use of this combination should be tested before application to marine cultures to check its effects on non-target organisms and their efficiency in inhibiting fungi because it was reported that this

fungicide can cause mortality on microalgae and protozoa (Lampen and Arnow 1961).

Within 168 hours, a lower amount of nitrite was observed in T2 when compared to the control, which can be related to the absence of nitrifying bacteria (*Nitrosomonas* and *Nitrobacter*) (Chen et al. 2006) caused by the action of antibiotics. This result contradicts the findings of Silva et al. (2012), who found that nitrite was significantly higher in the treatment with antibiotic, but did not affect the development of *Penaeus* (= *Farfantepenaeus*) *brasiliensis* Latreille 1817.

Klavei and Matthews (1994) noted that the use of antibiotics in farming can completely inhibit the nitrification process within seven days, which could lead to an accumulation of toxic ammonium and nitrite. Nitrite, for example, can cause a lag in the growth and survival of cultured organisms (Lin and Chen 2003) in high concentrations, and for this reason must be controlled.

Based on the results of this experiment, we suggest some possible modifications on future considerations depending on the conditions available: (i) addition of a fungi inhibitor; (ii) diminish the sampling time to 3 for 24 hours, to determine with greater accuracy the start and end of the effect a new dosage (probably between 6 and 24 hours); (iii) the chemical parameters must be observed because nitrite and ammonium can reach toxic levels in aquatic systems.

Thus, the treatment used in this experiment can be considered an effective methodological tool for scientific experiments about the role of bacteria in marine communities.

CONCLUSION

With the data obtained at the end of the experiment, we determined the absence of negative effects on non-target organism and efficiency in the inhibition of free-living and biofilm bacteria using a combination of 0.025 g L⁻¹ penicillin G potassium + 0.08 g L⁻¹ streptomycin sulphate + 0.04 g L⁻¹

neomycin sulphate diluted in sea water. This treatment seems to be a solution for cultures where there is a need to decrease the free and adhered bacterial density without the absolute necessity of inhibiting growth completely. It was found that the onset of action occurs within the first six hours of exposure and that the time where the greatest reduction in bacterial density occurred was 12 hours.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support of the Marine Phytoplankton and Microorganisms Lab of the Federal University of Rio Grande, to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also want to thank the Veterinarian Alice Meirelles Leite for the help in supplying the prescriptions for the antibiotics and Waldemar Appolinário Amaral and Priscila Teixeira-Amaral for help in the development of the experiment.

RESUMO

Existe um problema em se manter meios de cultivos completa ou parcialmente livres de bactérias. O uso de inibidores metabólicos de procariontes, tais como antibióticos, é sugerido como uma solução alternativa, no entanto tais substâncias não podem prejudicar os organismos não alvo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de tratamentos com antibióticos na inibição de bactérias livres e associadas ao biofilme e a sua meia-vida em meio marinho artificial, usando o copépode *Acartia tonsa* como organismo bioindicador de combinações de antibióticos não prejudiciais. Em relação aos resultados, 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 apresentou grande potencial de aplicação em cultivos e experimentos científicos marinhos sem causar efeitos letais a organismos não alvo. O efeito desta combinação inicia dentro das primeiras seis horas de exposição e reduz em até 93% a densidade bacteriana, mas a sua meia-vida é curta, necessitando reposição. Não ocorreram alterações

adversas na qualidade da água de cultivo no prazo de 168 horas de exposição. Como conclusão, este tratamento foi um procedimento eficaz para cultivos de zooplâncton e em experimentos científicos com o objetivo de mensurar o papel de bactérias livres e associadas ao biofilme na comunidade marinha.

Palavras-chave: *Acartia tonsa*, antimicrobianos, experimento, cultivos marinhos, toxicidade.

REFERENCES

- ABEL-AZIZ SM AND AERON, A. 2014. Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. SAJ Biotechnol 1(1): 105.
- AGOSTINI VO. 2014. Avaliação dos efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de plâncton marinho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica. Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. 124 p. (Unpublished).
- ALI ABADI FS AND LEES, P. 2000 Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. Int J Antimicrob Agents 14: 307-313.
- BARATA C, MEDINA M, TELFER T AND BAIRD DJ. 2002. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: Stage-specific short tests versus life-table tests. Arch Environ Contam Toxicol 43: 373-378.
- BOROJEVIC R. 1966. Étude expérimentale de la différenciation des cellules de l'éponge au cours de son développement. Devl Biol 14: 130-153.
- BOUVIER T, TROUSSELLIER M, ANZIL A, COURTIES C AND SERVAIS P. 2011. Using Light Scatter Signal to Estimate Bacterial Biovolume by Flow Cytometry. Cytometry 44: 188-194.
- BRADFORD-GRIEVE, JM. 1999. To replace Fiches d'identification du Zooplankton No. 12. In: Lindley JA (Ed), ICES Identification Leaflets for Plankton, 181, Copenhagen, 19 p.
- BUTAYE P, CLOECKAERT A AND SCHWARZ S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 22: 205-210.
- BUTTINO I, IANORA A, BUONO S, VITIELLO V, MALZONE MG, RICO C, LANGELLOTTI A, SANSONE G, GENNARI L AND MIRALTO A. 2012. Experimental cultivation of the mediterranean calanoid copepod *Temora stylifera* and *Centropages typicus* in a pilot re-circulation system. Aquaculture 43: 247-259.
- CAROTENUTO Y, IANORA A, BUTTINO I, ROMANO G AND MIRALTO A. 2002. Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? J Exp Mar Biol Ecol 276: 49-66.
- CHEN S, LING J AND BLANCHETON JP. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. Aquacult Eng 34: 179-197.

- CONOVER RJ. 1967. Reproductive cycle, early development, and fecundity in laboratory populations of the copepod *Calanus hyperboreus*. *Crustaceana* 13: 61-72.
- COSTERTON W, VEEH R, SHIRTLIFF M, PASMORE M, POST C AND EHRLICH G. 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112: 1466-1477.
- COZZI S AND CANTONI C. 2006. Partition nitrogen uptake in phytoplankton and bacteria using bactericidal agents and light dependent incubations. *Period Biol* 108: 145-150.
- DEFOIRDT T, BOON N, SORGELOOS P, VERSTRAETE W AND BOSSIER P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25: 472-479.
- DELORENZO ME, LEWITUS AJ, SCOTT GI AND ROSS PE. 2001. Use of metabolic inhibitors to characterize ecological interactions in an estuarine microbial food web. *Microb Ecol* 42: 317-327.
- DELUPIS GDDI, MACRI A, CIVITAREALE C AND MIGLIORE L. 1992. Antibiotics of zootechnical use: Effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicol* 22: 53-60.
- DRILLET G, JØRGENSEN NOG, SØRENSEN TF, RAMLOV H AND HANSEN BW. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquac Research* 37: 756-772.
- DROOP MR. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br Phycol Bull* 3: 295-297.
- FISHER WS AND NELSON RT. 1978. Application of antibiotics in the cultivation of Dungeness Crab, *Cancer magister*. *J Fish Res Board Can* 35: 1343-1349.
- FOUILLAND E, GOSSELIN M, RIVKIN RB, VASSEUR C AND MOSTAJIR B. 2007. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *J Plankton Res* 29(4): 369-376.
- GORBI G ET AL. 2012. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ Toxicol Chem* 31: 2023-2028.
- HARMS J. 1986. Effects of temperature and salinity on larval development of *Elminius modestus* (Crustacea, Cirripedia) from Helgoland (North Sea) and New Zealand. *Helgoländer Meeresun* 40: 355-376.
- HERZENBERG LA, TUNG J, MOORE WA, HERZENBERG LA AND PARKS DR. 2006. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7(7): 681-685.
- IHARA PM, PINHO GLL AND FILLMANN G. 2010. Avaliação do Copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *J Braz Soc Ecotoxicol* 5(1): 27-32.
- ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 1999. ISO 14669:1999, Water Quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Geneva.
- KINNE O. 1977. Research cultivation. In: Kinne O (Ed), *Marine ecology: a comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal Waters*. J Wiley & Sons, Ltd., Germany, p. 579-1293.
- KLAVEI AL AND MATTHEWS RA. 1994. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture* 123: 237-247.
- LAMPEN, JO AND ARNOW, P. 1961. Inhibition of algae by nystatin. *J Bacteriol* 82: 247-251.
- LANZKY PF AND HALLING-SØRENSEN B. 1997. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere* 35: 2553-2561.
- LEE W. 1977. Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Mar Poll Bull* 8: 258-259.
- LIN YC AND CHEN JC. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224: 193-201.
- MEDINA M AND BARATA C. 2003. Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda:Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture* 229: 203-213.
- MEDINA M, BARATA C, TELFER T AND BAIRD DJ. 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch Environ Contam Toxicol* 42: 17-22.
- MIDDELBURG JJ AND NIEUWENHUIZE J. 2000a. Uptake of dissolved nitrogen in turbid, tidal estuaries. *Mar Ecol-Prog Ser* 192: 79-88.
- MIDDELBURG JJ AND NIEUWENHUIZE J. 2000b. Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate-rich Thames estuary. *Mar Ecol-Prog Ser* 203: 13-21.
- NORLAND S, HELDAL M AND TUMYR O. 1987. On the relation between dry matter and volume of bacteria. *Microbial Ecol* 13(2): 95-101.
- OLIVOTTO I, AVELLA AM, BUTTINO I, BORRONI M, CUTIGNANO A AND CARNEVALI O. 2009. Calanoid copepod administration improve yellow tail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture: biochemical and molecular implications. *AAFL Bioflux* 2: 355-367.
- OLIVEIRA SS, WASIELESKY JRW, BALLESTER ELC AND ABREU PC. 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.
- OLIVOTTO I, BUTTINO I, BORRONI M, MALZONE MG AND CARNEVALI O. 2008. The use of the mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture* 284: 211-216.
- PARAJE M. 2011. Antimicrobial resistance in biofilms. In: Mendez-Vilas A (Ed), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, p. 736-744.

- PATEL R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res* 437: 41-47.
- PELLETIER JK AND CHAPMAN JW. 1996. Use of antibiotics to reduce variability in amphipod mortality and growth. *J Crust Biol* 16: 291-294.
- PEREIRA JRDJ, FIGUEIREDO HCP, CARNEIRO DO AND LEAL CAG. 2006. Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. *Ciênc Agrotec Lavras* 30(6): 1190-1195.
- PICOT J, GUERIN CL, LE VAN KIM C AND BOULANGER CM. 2012. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64: 109-130.
- PRINGAULT O, TESSON S AND ROCHELLE-NEWALL E. 2009. Respiration in the light and bacterio-phytoplankton coupling in a coastal environment. *Microbial Ecol* 57(2): 321-334.
- RESGALLA JR C AND LAITANO KS. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc Facimar* 6: 153-163.
- RICE AL AND INGLE RW. 1975. The larval development of *Carcinus maenas* (L.) and *C. mediterraneus* Czerniavsky (Crustacea, Brachyura, Portunidae) reared in the laboratory. *Bulletin of the British museum* 28(3): 103-107.
- ROBERTS RD, KAWAMURA T AND HANDLEY CM. 2007. Factors affecting settlement of abalone (*Haliotis iris*) larvae on benthic diatom films. *J Shellfish Res* 26: 323-334.
- SABATINI ME. 1990. The developmental stages (Copepodids I to VI) of *Acartia tonsa* Dana, 1849 (Copepoda Calanoida). *Crustaceana* 59: 53-61.
- SHERR B, SHERR E, ANDREW T, FALLON R AND NEWELL S. 1986. Trophic interactions between heterotrophic Protozoa and bacterioplankton in estuarine water analysed with selective metabolic inhibitors. *Mar Ecol-Prog Ser* 32: 169-179.
- SILVA EFB, FRÔES CN, SOUZA DM, SOARES R, PEIXOTO S, WASIELESKY W AND BALLESTER ELC. 2012. Uso de probióticos na produção de pós-larvas de camarão-rosa. *Pesq Agropec Bras* 47(6): 869-874.
- SMITH EM AND PRAIRE YT. 2004. Bacterial metabolism and growth efficiency in lakes: the importance of phosphorus availability. *Limnol Oceanogr* 49: 137-147.
- SOSNOWSKI SL AND GENTILE JH. 1978. Toxicological comparison of natural and cultured population of *Acartia tonsa* to cadmium, copper and mercury. *J Fish Res Board Can* 35: 1366-1369.
- 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.
- STRICKLAND JDH AND PARSONS TR. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd ed., Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Bulletin, p. 167-311.
- SUN J AND LIU D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 25(11): 1331-1346.
- TEIXEIRA PF, SONIA MK, AVILA TR, CARDOZO AP, BERSANO JGF AND BIANCHINI A. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *An Acad Bras Cienc* 82(2): 333-339.
- TIGHE-FORD DJ, POWER MJD AND VAILE DC. 1970. Laboratory rearing of barnacle larvae for antifouling research. *Helgoland Wiss Meer* 20: 393-405.
- TROTTE A, FOULLAND E, LEBOULANGER C, LANOUGÈRE E AND BOUVY M. 2011. Use of inhibitors for coastal bacteria and phytoplankton: Application to nitrogen uptake measurement *Estuar Coast Mar Sci* 93: 151-159.
- TUNGARAZA C, BRION N, ROUSSEAU V, BAEYENS W AND GOEYENS L. 2003. Influence of bacterial activities on nitrogen uptake rates determined by the application of antibiotics. *Oceanologia* 45(3): 473-489.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides 12, 337 p.
- VEUGER B, MIDDELBURG J, BOSCHKER H, NIEUWENHUIZE J, RIJSWIJK P, ROCHELLE-NEWALL E AND NAVARRO N. 2004. Microbial uptake of dissolved organic and inorganic nitrogen in Randers Fjord. *Estuar Coast Shelf S* 61: 507-515.
- WALNE PR. 1974. Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years: Experience at Experience at Conwy-llod. England, Fishing News Books Limited, 189 p.
- WHEELER PA AND KIRCHMAN DL. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol Oceanogr* 31: 998-1009.
- YETKA JE AND WIEBE WJ. 1974. Ecological application of antibiotics as respiratory inhibitors of bacterial populations. *Appl Microbiol* 28: 1033-1039.
- ZARITSKI A. 1975. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. *J Theor Biol* 54: 243-248.

APÊNDICE V

“Insights sobre a inibição do biofilme bacteriano e fungos aderidos de cultivos de plâncton marinho utilizando uma nova combinação de antimicrobianos”

Artigo submetido ao periódico

International Aquatic Research

Status: submetido

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG (campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Insights sobre a inibição do biofilme bacteriano e fungos aderidos de cultivos de plâncton marinho utilizando uma nova combinação de antimicrobianos

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,3}, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Caixa Postal, 474, CEP: 96203-900 - Rio Grande, RS, Brasil

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Faculdade de Farmácia and Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Resumo

A presença de pequenas quantidades de matéria orgânica em cultivos de organismos planctônicos leva a aumento de 10 a 1000 vezes no bacterioplâncton em menos de 24 h. A presença desses micro-organismos, bem como do micoplâncton, pode causar danos ao fito e ao zooplâncton. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito da penicilina + estreptomicina + neomicina (antibióticos) em combinação com nistatina (antifúngico), selecionando a melhor concentração deste tratamento. Para isso, foi avaliado os seus efeitos em diferentes organismos planctônicos marinhos: bacterioplâncton (inibição), micoplâncton (inibição), *Conticribra weissflogii* (crescimento), *Acartia tonsa* (produção de pelotas fecais e ovos, sobrevivência) e *Amphibalanus improvisus* (sobrevivência e assentamento). Entre os organismos testados, *A. tonsa* foi considerada o organismo mais sensível. O tratamento com 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 resultou em maior produção de ovos e pelotas fecais por *A. tonsa*, bem como um maior crescimento de *C. weissflogii*. Concentrações de 0,025 e 0,005 g L⁻¹ de nistatina podem ser usadas em conjunto com os antibióticos sem prejudicar organismos não alvo, porém deve ser evitada uma concentração acima de 0,05 g L⁻¹ d, uma vez que podem ser tóxicas para as espécies testadas. Com esta combinação antimicrobiana, reduzimos em até 95% a densidade bacteriana do biofilme em cultivos com 12 horas de exposição, bem como para evitamos o crescimento de fungos.

Palavras-chave: antibióticos; antifúngico; holoplâncton; meroplancton; fitoplâncton; zooplâncton.

APÊNDICE VI

“Efeito de antimicrobianos no crescimento do bacterioplâncton e do micoplâncton em cultivos de *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854) (Cirripedia - Crustacea): influência da salinidade e da exposição ao ar”

Artigo submetido ao periódico

Marine Ecology

Status: submetido

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG (campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Efeito de antimicrobianos no crescimento do bacterioplâncton e do micoplâncton em cultivos de *Amphibalanus improvisus* (Darwin, 1854) (Cirripedia - Crustacea): influência da salinidade e da exposição ao ar

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3}, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Cirripédios são crustáceos meroplânctônicos com importância ecológica e econômica. O cultivo laboratorial destes crustáceos, como *Amphibalanus improvisus*, tem sido estabelecido para responder a uma série de questões sobre sua biologia e ecologia. No entanto, a cultura de invertebrados promove o crescimento de micro-organismos, que podem dominar o sistema e, eventualmente, causar a mortalidade dos invertebrados, sendo sugerido o uso de antimicrobianos combinados com técnicas assépticas para inibir bactérias e fungos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de antimicrobianos sobre o crescimento de bacterioplâncton e micoplâncton em cultivos de cipris de *A. improvisus* em diferentes salinidades (1, 15, 25) com e sem exposição ao ar (abertas e cobertas com filme PVC, respectivamente). Com os dados obtidos, observamos a ausência de efeitos negativos na sobrevivência e assentamento do cirripédio *A. improvisus* e a eficiência de inibição de micro-organismos tanto planctônicos quanto associados ao biofilme usando a combinação de 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 + 0,005 g L⁻¹ de nistatina. Este tratamento parece ser uma solução para evitar o crescimento bacteriano e fúngico em cultivos marinhos com salinidade acima de 25 e sua eficácia é consideravelmente aumentada em cultivos cobertos com filme PVC.

Palavras-chave: antibiótico; antifúngico; bactérias; Cirripedia; meroplâncton; nistatina.

APÊNDICE VII

**“Diminuição da densidade de bactérias e fungos em
cultivos de microalgas marinhas utilizando
antimicrobianos”**

Artigo em processo de finalização para submissão ao
periódico

Journal of Applied Phycology

Status: em preparação

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Diminuição da densidade de bactérias e fungos em cultivos de microalgas marinhas utilizando antimicrobianos

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,3,4}, CAROLINA ANTUARTE ISLABÃO², LUCÉLIA BORGES², ALEXANDRE JOSÉ MACEDO³, ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

³Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Cultivos de fitoplâncton em altas densidades apresentam cargas elevadas de matéria orgânica que estimulam o crescimento do bacterioplâncton oportunista e do micoplâncton. Assim, é sugerido a aplicação de antimicrobianos nos cultivos para inibir a competição das microalgas com bactérias e fungos. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de duas combinações de antimicrobianos nos cultivos de *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyta), *Isochrysis galbana* (Haptophyta) e *Prorocentrum micans* (Miozoa). Foram avaliados os efeitos sobre o crescimento e o biovolume das microalgas, bem como sobre as bactérias e fungos planctônicos e associados ao biofilme ao longo do tempo. O experimento teve duração de 7 dias e foi representado por três tratamentos: controle (sem antimicrobianos); T_A (penicilina + estreptomicina + neomicina); e T_{A+N} (penicilina + estreptomicina + neomicina + nistatina) com quatro repetições cada. Os tratamentos com antimicrobianos não causaram diminuição no crescimento de microalgas em comparação com o controle e tanto o T_A quanto T_{A+N} foram bem-sucedidos na inibição de bactérias planctônicas e associadas ao biofilme quando comparados com meio sem antimicrobianos, com exceção de bactérias de biofilme no cultivo de *P. micans*. A inibição bacteriana mais elevada foi observada com 24 ou com 72 horas de exposição para todas as microalgas. Pelo menos um dos tratamentos com antimicrobianos afetou o biovolume de todas as espécies de microalgas testadas, sendo assim recomendamos aplicar o tratamento T_{A+N} para *C. weissflogii* e T_A para *I. galbana*. Para *P. micans*, ambos os tratamentos com antimicrobianos afetaram negativamente o biovolume. Quanto aos fungos, o tratamento T_{A+N} foi o mais eficaz para a sua inibição até 168 horas, sendo o cultivo de *C. weissflogii* mais resistente à contaminação por fungos que os cultivos de *I. galbana* e *P. micans*. Desta forma, ambos os tratamentos podem ser aplicados em cultivos de fitoplâncton dependendo do obtivo de estudo.

Palavras-chave: antibiótico; antifúngico; fitoplâncton; *Conticribra*; *Isochrysis*; *Prorocentrum*

APÊNDICE VIII

“Ensaio ecotoxicológico laboratorial para avaliação dos efeitos antimicrobianos em organismos marinhos”

Artigo em processo de finalização para submissão ao
periódico

Chemistry and Ecology

Status: em preparação

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Ensaio ecotoxicológicos laboratoriais para avaliação dos efeitos antimicrobianos em organismos marinhos

VANESSA OCHI AGOSTINI^{A,B,C,D}, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO^B, ERIK MUXAGATA^A, VERONICA PIAZZA^D, CHIARA GAMBARDELLA^D, FRANCESCA GARAVENTA^D, MARCO FAIMALI^D

^aLaboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

^bLaboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB), Bolsista do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES).

^dInstitute of Marine Science (ISMAR) – Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) – Via de Marini, 6, 16149 Genova, Italy.

Resumo

Os antimicrobianos podem ser uma alternativa para reduzir a carga inicial de bactérias e fungos em cultivos aquáticos; No entanto, a aplicação destas substâncias deve ser feita com cuidado para evitar efeitos tóxicos. Nós investigamos o potencial de toxicidade de penicilina, estreptomicina, neomicina e nistatina em cultivos marinhos, analisando os efeitos agudos em diferentes níveis tróficos. A microalga *Dunaliella tertiolecta* e os náuplios II dos crustáceos *Tigriopus fulvus fulvus* e *Amphibalanus amphitrite* foram expostos a diferentes concentrações de antimicrobianos, sendo avaliados diferentes parâmetros: crescimento de algas, mortalidade dos copépodo e mortalidade e alteração de velocidade de natação dos cirripédios. Todos os parâmetros foram capazes de sublinhar um efeito dose-dependente. Os resultados mostraram que, entre as espécies modelo e os parâmetros considerados, a resposta comportamental observada em *A. amphitrite* (EC₅₀48h) foi o parâmetro mais sensível. No entanto, os antibióticos penicilina, estreptomicina e neomicina não apresentaram efeitos toxicológicos, mesmo em altas concentrações (500 mg L⁻¹). Por outro lado, para o antifúngico nistatina foi possível calcular o IC₅₀, LC₅₀ e EC₅₀. Assim, estes antimicrobianos podem ser utilizados em cultivos marinhos sozinhos ou em combinação, no entanto, o antifúngico deve ser utilizado com precaução em baixas concentrações (até 5 mg L⁻¹).

Palavras-chave: toxicidade aguda; bioensaio; *Amphibalanus amphitrite*; *Dunaliella tertiolecta*; *Tigriopus fulvus fulvus*.

APÊNDICE IX

**“Potencial de aplicação de antimicrobianos em
experimentos científicos marinhos e sua manutenção
no sistema”**

Artigo em processo de finalização para submissão ao
periódico

Methods in Ecology and Evolution

Status: em preparação

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Potencial de aplicação de antimicrobianos em experimentos científicos marinhos e sua manutenção no sistema

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3}, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB). Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

Os antimicrobianos podem ser uma solução para o estabelecimento de cultivos e experimentos científicos com o intuito responder a perguntas sobre o papel das bactérias na comunidade aquática, uma vez que não causam danos aos organismos não alvo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial dos antimicrobianos sozinhos e em combinação na inibição de bactérias e fungos de sistemas marinhos artificiais, sem causar mortalidade em organismos não alvo. Este estudo foi dividido em três experimentos para: (i) avaliar a eficiência individual de (g L^{-1}) 0,025 de penicilina, 0,08 de estreptomicina, 0,04 de neomicina e 0,005 de nistatina durante 24 h; (ii) avaliar a sobrevivência do copépodo *Acartia tonsa*, a inibição de micro-organismos planctônicos e associados ao biofilme e a qualidade da água exposta a diferentes tempos de reposição da combinação de antimicrobianos (a cada 12, 24, 36, 48 e 72 horas) composta pelas substâncias supracitadas; (iii) avaliar a erradicação do biofilme usando o teste de cristal de violeta. A penicilina apresentou a menor densidade bacteriana média em relação ao controle ($p < 0,003$). Observou-se que o copépodo *A. tonsa* é resistente a todos os tratamentos de reposição de antimicrobianos ($p > 0,059$). Para bactérias planctônicas e associadas ao biofilme, de 12 h a 204 h de exposição, todas as frequências de reposição apresentaram inibição quando comparadas ao controle ($p < 0,003$). A maior inibição bacteriana ocorreu com 12 h de exposição para bactérias planctônicas (92 %) e associadas a biofilmes (93 %) no tratamento representado pela reposição a cada 12 h ($T_{12 \times 12}$) em comparação ao controle, mas apresentou um aumento de amônia, nitrito e ortofosfato no meio ao longo do tempo. O tratamento não erradica o biofilme já formado. Concluímos que esses antimicrobianos combinados podem ser uma solução para inibir a contaminação por bacterioplâncton e micoplâncton em cultivos marinhos, bem como usado como procedimento para testar o papel desses micro-organismos na comunidade marinha quando o biofilme ainda não foi formado.

Palavras-chave: antibiótico; antifúngico; bacterioplâncton; ecologia marinha; micoplâncton; teste de hipóteses

APÊNDICE X

“Relação entre o biofilme bacteriano marinho e o estabelecimento de perifíton, protozooplâncton e metazooplâncton no processo inicial de bioincrustação”

Artigo em processo de finalização para submissão ao
periódico

Marine Ecology Progress Series

Status: em preparação

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Relação entre o biofilme bacteriano marinho e o estabelecimento de perifíton, protozooplâncton e metazooplâncton no processo inicial de bioincrustação

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3,5}, CACINELE MARIANA DA ROCHA⁴,
ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹, VERONICA PIAZZA⁵,
FRANCESCA GARAVENTA⁵, MARCO FAIMALI⁵

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB), Bolsista do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES).

⁴Laboratório de Análise de Águas e Sedimentos Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Instituto de Biociências (IB) - Avenida Tramandaí, 976, Bairro Centro, CEP 95625-000, Imbé, RS, Brasil.

⁵Institute of Marine Science (ISMAR) – Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) – Via de Marini, 6, 16149 Genova, Italy.

Resumo

Este trabalho apresenta a influência do tempo, textura, orientação, presença de biofilme bacteriano, tinta anti-incrustação (óxido cuproso) e potencial zooplanctônico no estabelecimento de perifíton, protozooplâncton e metazooplâncton em substratos consolidados com base em um experimento laboratorial desenvolvido durante 12 dias na Primavera. Para este fim, substratos acrílicos foram colocados em 18 unidades experimentais (20 L) com água do mar e plâncton coletados diretamente do ambiente. Os substratos foram expostos a diferentes situações (natural, pintura anti-incrustante e antimicrobianos), orientações (vertical e horizontal) e texturas (lisa e texturizada) totalizando 12 tratamentos. A comunidade foi avaliada com 12, 72, 144, 216 e 288 horas de exposição. Todas as comunidades (bactéria do biofilme, perifíton, zooplâncton) estabelecida nos substratos de acrílicos apresentaram diferenças na densidade e composição de organismos em relação ao aumento do tempo de exposição ($p < 0,001$) e às diferentes situações do substrato ($p < 0,001$). A situação natural apresentou a maior diversidade de organismos, seguido pelos que utilizavam tinta anti-incrustante. A situação com antimicrobianos (inibição do biofilme bacteriano) apresentou a menor densidade de organismos colonizadores. As superfícies horizontais foram mais atrativas para o estabelecimento do perifíton e do meroplâncton ($p < 0,001$), enquanto a textura não foi um fator importante para a colonização desses organismos. Observou-se uma correlação positiva (0,914) e significativa ($p < 0,001$) entre a densidade das bactérias do biofilme, a concentração de clorofila-*a* do biofilme e a densidade do meroplâncton estabelecido, atestando a influência positiva do biofilme bacteriano na continuidade da sucessão ecológica nos processos de bioincrustação.

Palavras-chave: antimicrobianos, substrato duro, meroplâncton, microalgas, assentamento em substratos consolidados.

APÊNDICE XI

“Acoplamento planctônico-bentônico: efeito da idade do biofilme, material do substrato e composição do biofilme microbiano na colonização de metazooplâncton”

Artigo em processo de finalização para submissão ao
periódico

Marine Ecology Progress Series

Status: em preparação

Para acessar o texto completo solicitar versão impressa disponível na biblioteca da FURG
(campus Carreiros) ou contatar a autora (voagostini@gmail.com)

Acoplamento planctônico-bentônico: efeito da idade do biofilme, material do substrato e composição do biofilme microbiano na colonização de metazooplâncton

VANESSA OCHI AGOSTINI^{1,2,3,4}, ALEXANDRE JOSÉ MACEDO², ERIK MUXAGATA¹, VERONICA PIAZZA⁴, CHIARA GAMBARDELLA⁴, FRANCESCA GARAVENTA⁴, MARCO FAIMALI⁴

¹Laboratório de Zooplâncton - Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Instituto de Oceanografia (IO) – Av. Itália, s/n km 8, campus Carreiros, CP 474, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

²Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia - Av. Ipiranga, 2752, Bairro Azenha, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica (PPGOB), Bolsista do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES).

⁴Institute of Marine Science (ISMAR) – Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) – Via de Marini, 6, 16149 Genova, Italy.

Resumo

A escolha do local de assentamento por invertebrados pode ser modulada por diferentes fatores e o material do substrato e a idade, densidade e composição do biofilme microbiano podem desempenhar um papel importante neste processo. Desta forma, o objetivo do atual trabalho foi testar se existe uma relação entre a colonização do metazooplâncton e a idade, densidade e composição de biofilmes microbianos estabelecidos em diferentes materiais, expostos a condições laboratoriais e de campo. Foram desenvolvidos dois experimentos para observar os fatores que induzem a colonização de metazooplâncton. O primeiro foi realizado em condições de laboratório para testar a influência da idade do biofilme (0, 5, 10 e 20 dias) e diferentes materiais (madeira e aço). O segundo foi realizado em um ambiente natural (Mar Mediterrâneo, Itália), onde o efeito da composição de diferentes comunidades microbianas em substratos madeira, fibra de concreto e acrílico foi avaliado. Em ambos os experimentos, o potencial de colonização de metazooplâncton também foi estimado. A idade do biofilme afetou a colonização do metazooplâncton, sendo o biofilme mais maduro mais atrativo e caracterizado por uma maior densidade de bactérias quando comparado a biofilmes mais jovens. A madeira e a fibra de concreto foram os substratos mais atrativos para a colonização quando comparados ao aço e ao acrílico. A densidade bacteriana do biofilme é mais importante do que a composição da comunidade de perifíton e protozooplâncton para o assentamento do meroplâncton, embora a densidade de cianobactérias também apresente uma correlação positiva e significativa com este assentamento, dependendo do substrato. Embora, o potencial de zooplâncton em termos de taxa possa ou não refletir à colonização no substrato, a proporcionalidade não é observada, confirmando que fatores externos podem influenciar o processo de bioincrustação, como as características do substrato e a comunidade residente.

Palavras-chave: bactérias, bioincrustação, meroplâncton, perifíton, substrato consolidado.