

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

**PRODUÇÃO SECUNDÁRIA BASEADA NO
CRESCIMENTO DE CRUSTÁCEOS:
ASPECTOS METODOLÓGICOS**

TATIANA RAMOS AVILA

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: Adalto Bianchini

**RIO GRANDE
Março 2011**

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho muitas pessoas foram importantes, contribuindo cada uma à sua maneira para o meu crescimento pessoal e profissional. Assim, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Adalto Bianchini pela orientação, por ter acreditado que eu seria capaz de desenvolver o trabalho e possibilitado que eu o fizesse.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho pelas idéias iniciais do projeto que foi desenvolvido.

Ao Abel, por toda a ajuda nos experimentos, pela amizade e por não desistir!

A todos os amigos do Laboratório de Zooplâncton, sem os quais contar náuplios seria muito menos divertido!

À minha família, pelo apoio e torcida pelo meu sucesso.

Às minhas amigas, Daniela, Liane, Maíra, Ana Lupe e Gisele, porque amigas são essenciais na pré-escola... e também no Doutorado!

Aos amigos da Escola Tao Tien Ti, principalmente ao Professor Rodrigo e aos colegas Diego, Rodrigo Minotauro e Matheus, porque o que você faz fora da FURG é tão importante quanto o que você dentro, para que o trabalho seja concluído da melhor maneira possível!

Ao João Carlos Esvael pelos ensinamentos e grande ajuda no meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. John Dower por disponibilizar o laboratório para os experimentos realizados durante o estágio sanduiche.

Aos membros da Banca Examinadora: Professores Dr. Carlos Bemvenuti, Dr. Carolus Maria Vooren, Dr. Erik Muxagata, Dr. Luiz Loureiro e Professora Dra. Virginia pelas sugestões.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos, nível Doutorado e bolsa Doutorado Sanduíche.

PREFÁCIO

A estrutura desta tese está dividida em uma parte “GERAL” que inclui as seções Introdução, Material e Métodos, Síntese dos Resultados e Conclusões, bem como os “APÊNDICES”, onde estão descritos três artigos científicos formatados de acordo com as revistas onde serão publicados. O Apêndice I está relacionado com o estudo das propriedades da quitobiase de crustáceos zooplancônicos. O Apêndice II descreve o desenvolvimento do método enzimático (quitobiase) para determinação da produção zooplancônica em estuários em comparação com resultados obtidos através de modelos matemáticos. Por sua vez, o Apêndice III está relacionado à análise de coorte e produção de ovos para estudos de biologia e crescimento de copépodes.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Análises da quitobiase	14
2.1.1. Coleta de Animais para análise das propriedades da Quitobiase.....	14
2.1.2. Fonte da enzima	15
2.1.3. Ensaio enzimático	16
2.1.4. Propriedades da enzima	16
2.1.5. Calibração do ensaio enzimático	17
2.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos	17
2.2.1. Análises baseadas em amostras de zooplâncton	17
2.2.2. Produção de crustáceos através da quitobiase	19
2.2.3. Relação da variação de peso seco (ΔB) x atividade da enzima (CBA)...	15
2.2.4. Quitobiase para determinação da produção em campo	21
2.2.5. Ensaio enzimáticos	21
2.3. Experimentos com <i>Acartia longiremis</i>	22
2.3.1. Coleta dos animais	22
2.3.2. Efeito da temperatura no crescimento de náuplios	22
2.3.3. Efeito da dieta na produção de ovos	23
2.4. Comparação entre os métodos de estimativa de produção	24
3. RESULTADOS	24
3.1. Propriedades da quitobiase	24
3.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos	25
3.2.1. Biomassa zooplânctônica.....	25
3.2.2. Quitobiase	26
3.2.3. Produção zooplânctônica – comparação de métodos	26
3.3. Experimentos com <i>Acartia longiremis</i>	28
3.3.1. Crescimento em diferentes temperaturas	28
3.3.2. Produção de ovos em diferentes dietas	29
4. CONCLUSÕES	29
4.1. Propriedades da quitobiase.....	29
4.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos	29
4.3. Experimentos com <i>Acartia longiremis</i>	31
4.4. Conclusão geral	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6. LITERATURA CITADA	32
7. APÊNDICE I	39
8. APÊNDICE II	64
9. APÊNDICE III.....	102

RESUMO

O objetivo desta tese foi estimar a produção secundária em ambientes aquáticos, com enfoque no estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS, Brasil). Os crustáceos são dominantes no zooplâncton da região em estudo, sendo utilizados como base das análises realizadas. A produção secundária foi estimada através de modelos matemáticos e do método enzimático. Para a aplicação dos modelos matemáticos, foram realizadas coletas em 5 pontos do estuário nas 4 estações do ano. Os resultados obtidos foram utilizados para estimativa da produção secundária através dos modelos de Huntley & Lopes (1992) e Hirst & Bunker (2003). Durante as coletas, também foram obtidas amostras de água do ambiente para a determinação da taxa de decaimento da atividade da quitobiase, parâmetro utilizado para estimativa da produção secundária através do método enzimático, o qual está baseado na atividade da quitobiase liberada na água durante a muda de crustáceos. Para aplicação deste método, foram realizados experimentos em laboratório para determinar as características da quitobiase do copépode *Acartia tonsa*, principal representante do grupo Copepoda do zooplâncton no estuário da Lagoa dos Patos. Os resultados de produção de carbono obtidos através dos modelos matemáticos e do método enzimático foram comparados. Por fim, foram realizados experimentos utilizando-se metodologias já bem definidas de estimativa de crescimento, como a análise de coorte em náuplios e produção de ovos de adultos de *A. longiremis* coletadas no Saanich Inlet (BC, Canadá), sendo que os resultados obtidos foram comparados àqueles do congênera *A. tonsa*. Os resultados apresentados nesta tese contribuem tanto com dados de produção secundária para o estuário da Lagoa dos Patos, bem como indicam a aplicação do método da quitobiase também em águas estuarinas.

PALAVRAS-CHAVE: Copépode, Quitobiase, Modelos matemáticos, Produção secundária, Taxa de crescimento.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to estimate the secondary production in aquatic environments with focus on the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Brazil). Crustaceans are dominants in the zooplankton of the study area, being employed in the analyses performed. Secondary production was estimated using mathematical models and the enzymatic method. Zooplankton sampling was seasonally performed in 5 sites at the Patos Lagoon estuary for the application of the mathematical methods. Results obtained were used to estimate the secondary production through the models described by Huntley & Lopes (1992) and Hirst & Bunker (2003). During zooplankton collection, water samples were also obtained for determination of the rate of chitobiase activity decay, parameter used in the secondary production estimation employing the enzymatic method. This method is based on the activity of the chitobiase released during the crustacean molting process. For the application of the enzymatic method, laboratory experiments were performed to characterize the chitobiase do the copepod *Acartia tonsa*, major representative of Copepoda in the zooplankton of the Patos Lagoon estuary. Data of carbon production generated using the mathematical models and the enzymatic method were compared. Finally, experiments were performed employing known methodologies based on cohort analysis and egg production in the copepod *A. longiremis* collected at the Saanich Inlet (BC, Canada). Results obtained were compared to those for the congener *A. tonsa*. Results presented in this thesis contribute with secondary production data for the Patos Lagoon estuary and indicate the application of the chitobiase method for estimation of secondary production also in estuarine waters.

KEY WORDS: Chitobiase, Copepod, Growth rate, Mathematical models, Secondary production.

1. INTRODUÇÃO

O estudo ecológico dos ambientes aquáticos depende do conhecimento das taxas de produção de cada compartimento, com as relações tróficas sendo determinantes no fluxo de energia do sistema.

Regiões costeiras são geralmente áreas de alta produtividade e algumas feições geográficas presentes nessas regiões, como estuários e fiordes possuem características que propiciam ainda mais a produção primária, que no ambiente pelágico se reflete na biomassa do zooplâncton (Kocum *et al.* 2002; Danielsdottir *et al.* 2007; Svensen *et al.* 2007), principalmente de copépodes (Kleppel *et al.* 1988; Svensen *et al.* 2007). Estes crustáceos representam um importante elo entre o fitoplâncton e os níveis tróficos superiores em muitos ecossistemas aquáticos (Webber & Roff 1995; Hopcroft & Roff 1996, 1998).

Os estuários são regiões de encontro entre zonas de água doce e marinhas, com a variação de seus fatores físicos e químicos governada por marés, ventos e taxa pluviométrica (Costanza *et al.* 1993). Esta intensa variação, principalmente nos valores de salinidade, leva à seleção das espécies que sobrevivem neste ambiente, as quais caracterizam a baixa diversidade e a freqüente dominância observadas (Costanza *et al.* 1993; Odum *et al.* 1995).

A Lagoa dos Patos (RS) possui superfície de 10.227 km², dos quais aproximadamente 10% é considerada região estuarina, que por sua vez apresenta trocas constantes com o Oceano Atlântico (Asmus 1998). As condições químicas e físicas podem variar entre as enseadas rasas mais protegidas, com menor circulação, e o canal onde as correntes são mais intensas, provocando uma grande variação temporal na diversidade,

abundância e biomassa de organismos planctônicos (Duarte 1986). Por outro lado, as marés astronômicas são de pequena amplitude e não exercem importância relevante nas variações de salinidade do estuário (Herz 1977).

Fiordes são vales formados pelo movimento de glaciares e onde o mar preencheu o espaço antes ocupado pelas placas de gelo. O Saanich Inlet é um fiorde localizado na margem do Oceano Pacífico do Canadá com 65 km² de área de superfície e profundidade máxima de 225 m e salinidade em torno de 30. A produtividade primária pode ser alta principalmente durante a primavera quando diminuem os processos de mistura e as células do fitoplankton ficam mantidos na região luminosa (Anderson & Devol 1973).

Os copépodes do gênero *Acartia* dominam a biomassa na maioria das baías rasas confinadas e lagunas de estuários (Silva *et al.* 2004; Azaiteiro *et al.* 2005; Leandro *et al.* 2007), apresentando grande importância no zooplâncton de estuários tropicais e subtropicais do Atlântico e também de regiões temperadas (Björnberg 1981, Mauchline 1998). Esta dominância pode estar relacionada à capacidade de adaptação dos indivíduos deste gênero a diferentes recursos alimentares, selecionando sobre organismos heterotróficos, quando em condição limitante de disponibilidade dos autotróficos ou na ausência destes (Kleppel 1992; Saiz *et al.* 2007).

No Oceano Atlântico Sul, o copépode *Acartia tonsa* pode ser considerado como sendo um dos principais representantes do grupo no estuário da Lagoa dos Patos. Em condições de alta salinidade, esta espécie representa 98% dos copépodes na região do canal do estuário e mais de 80% no Saco do Justino, na maioria dos meses do ano (Duarte 1986). Por sua vez, *A. longiremis* é com frequência o copépode mais abundante na sua faixa de tamanho no Saanich Inlet (Oceano Pacífico Norte). (Sastri & Dower 2009; McFarlane *et al.* 2010)

Apesar da reconhecida importância ecológica dos copépodes, os métodos aplicados para o estudo da produção secundária destes organismos ainda são bastante discutidos, não havendo uma metodologia considerada padrão. Uma das relações utilizadas para estimar a produção é descrita pela equação $P = B \cdot g$, onde P é a produção, B é a biomassa de copépodes no ambiente e g é a taxa de crescimento (Huntley & Lopes 1992; Kiorboe & Nielsen 1994; Hirst & Bunker 2003; Leandro *et al.* 2007). Dados de biomassa são mais comuns na literatura, porém necessitam da separação dos organismos da amostra total e estimativa do peso dos copépodes em relação ao peso total do zooplâncton (Postel *et al.* 2000).

Com a dominância de copépodes em ambientes marinhos e cladoceras em ambientes dulcícolas, os esforços de pesquisa tem se voltado para estes grupos e produção de ovos peso-específica (Kiorboe and Nielsen 1994; Hirst and McKinnon 2001; Renz *et al.* 2007), o método da análise de coortes (Kang *et al.* 2007; Renz *et al.* 2007), bem como de alguns métodos baseados em modelos fisiológicos (Ikeda *et al.* 2001) tem sido os mais aplicados para estimativas de crescimento. Porém essas taxas costumam ser obtidas através de experimentos em laboratório e os valores são de apenas uma ou algumas espécies presentes no ambiente, tornando o tempo despendido para a aplicação destes métodos um fator que dificulta a estimativa da produção em alta resolução espaço-temporal.

Com o intuito de desenvolver alternativas que possam facilitar o estudo da produção secundária, foram desenvolvidos alguns modelos matemáticos para estimativa de “ g ” baseados em taxas de crescimento publicados por diversos autores para copépodes marinhos (Huntley and Lopes 1992; Hirst and Bunker 2003), e para organismos de água doce (Stockwell and Johannsson 1997), sendo que cada modelo

apresenta diferenças na importância da temperatura, limitação por recurso alimentar e tamanho dos organismos como fatores que influenciam esta taxa.

Outros métodos de produção secundária menos utilizados são aqueles baseados em relações bioquímicas e atividades de enzimas relacionadas ao crescimento (Berges et al. 1990; Biegala and Bergeron 1998). Estudos utilizando atividades enzimáticas necessitam o conhecimento prévio das propriedades da enzima, tendo como base a temperatura e pH ótimos e a constante de especificidade (K_m) entre a enzima e o substrato utilizado. Uma vez conhecidos estes valores, os mesmos podem ser utilizados para determinar a origem de determinada enzima, já que uma mesma enzima proveniente de diferentes organismos pode apresentar ótimos e especificidades distintas (Michaelis & Menten 1913).

Sastri and Dower (2006, 2009), seguindo trabalhos anteriores (Oosterhuis et al. 2000; Espie and Roff 1995) desenvolveram o método baseado na quitobiase liberada na água durante o processo de muda de crustáceos e aplicaram no Saanich Inlet. O método de estimativa de produção secundária através da análise desta enzima se baseia na relação entre peso seco acrescido após a muda do estágio “x” para o estágio “x+1” e a atividade da quitobiase liberada na água, bem como no balanço entre a atividade da enzima liberada por uma população no ambiente e a degradação da mesma ao longo do tempo. Testes realizados em laboratório com cladóceros de água doce (Sastri and Roff 2000) e copépodes marinhos como *Temora longicornis* (Oosterhuis et al. 2000), *Calanus pacificus*, *Metridia pacifica* e *Pseudocalanus spp.* (Sastri and Dower 2006), demonstram haver uma correlação positiva entre a atividade da quitobiase na água e o comprimento e a biomassa dos organismos. As relações entre atividade de enzima e biomassa também se mostrou eficiente para larvas de decápodes e misidáceos (Sastri

and Dower 2009), indicando que o método pode cobrir a produção de todos os crustáceos em período de crescimento na coluna d'água.

Considerando as questões em torno das metodologias aplicadas para estimativa da produção secundária de crustáceos, o presente estudo teve como objetivos: (1) caracterizar a quitobiase do copépode *Acartia tonsa* do estuário da Lagoa dos Patos e determinar o *Km* de espécies de crustáceos abundantes na região; (2) desenvolver em laboratório e padronizar em campo o método da quitobiase para estimativa da produção secundária em ambientes estuarinos, comparando os resultados obtidos com este método com aqueles estimados a partir dos modelos de Huntley & Lopes (1992), Hirst & Bunker (2003) e Stockwell and Johannsson 1997; (3) gerar dados sobre o copépode *Acartia longiremis*, avaliando a taxa de crescimento de náuplios e a produção de ovos em laboratório, bem como caracterizando a quitobiase da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análises da quitobiase

2.1.1. Coleta de animais para análise das propriedades da Quitobiase:

Os indivíduos de *Acartia tonsa*, *Metamysidopsis elongata atlantica*, *Balanus improvisus* e larvas de Decapoda utilizados nos experimentos foram coletados no estuário da Lagoa dos Patos e na zona de arrebentação da Praia do Cassino (Figura 1) entre julho e dezembro de 2008. Por sua vez, os indivíduos de *A. longiremis* foram coletados no Saanich Inlet (BC, Canadá) (Figura 1) em junho de 2010. Todos os

organismos foram coletados através de arrastos horizontais de superfície com rede de plâncton (200 ou 90 μm de malha) e um copo coletor sem abertura para filtração.

Após a coleta, os organismos foram diluídos em água do ambiente, levados ao laboratório, separados da amostra e mantidos em cultivos mono-específicos, à exceção das larvas de Decapoda, as quais não foram identificadas em nível específico.

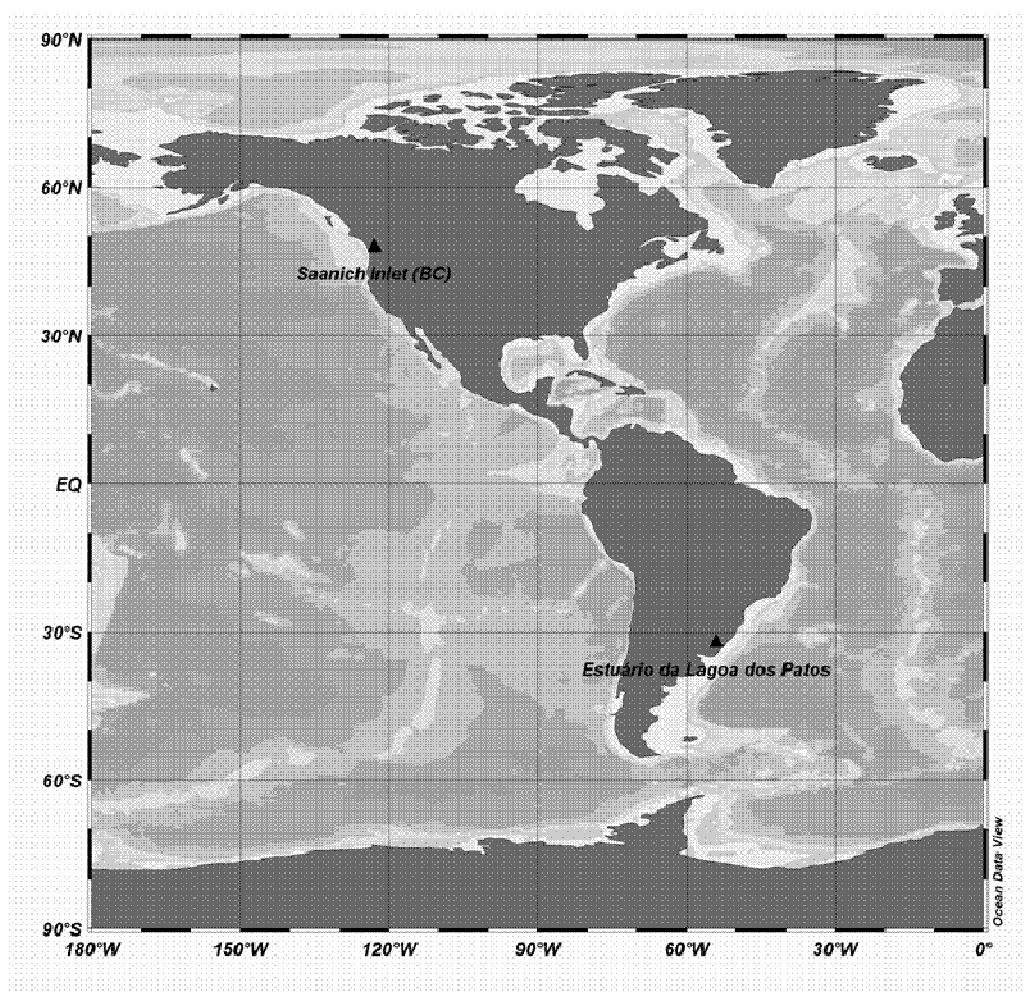


Figura 1: Área de estudo no Brasil (estuário da Lagoa dos Patos) e no Canadá (Saanich Inlet).

2.1.2. Fonte da enzima

Os ensaios enzimáticos foram realizados em solução de diluição (SD), a qual foi composta de água do mar (salinidade 30) autoclavada e filtrada (filtro de polycarbonato; 0,2 μm). A quitobiase testada foi obtida a partir de indivíduos coletados no ambiente, os quais foram homogeneizados em SD com uso de macerador manual. Os homogeneizados foram centrifugados (10 min; 10.000 x g) e o sobrenadante filtrado (filtro de 0,2 μm de malha) e utilizado nos ensaios como fonte de enzima.

2.1.3. Ensaio enzimático

O método descrito por Oosterhuis *et al.* (2000) e Sastri & Dower (2006) foi utilizado para determinar a atividade da quitobiase, com algumas modificações. Metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (MUFNAG, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada na concentração de 250 μM como substrato no ensaio enzimático para testar as influências do pH, temperatura e salinidade na atividade enzimática. Diferentes concentrações do substrato foram utilizadas para a determinação da afinidade da enzima (K_m) pelo respectivo substrato (MUFNAG). Os tubos de teste foram preenchidos com SD e o sobrenadante do homogeneizado de copépodes, bem como o substrato MUFNAG, foram adicionados ao meio de reação. A fluorescência das amostras foi lida (excitação: 360 nm; emissão: 450 nm) em espectrofluorímetro (Hitachi F-2000, Tóquio, Japão) a 25°C, a cada 5 min. O aumento da fluorescência ao longo do tempo refletiu a atividade da quitobiase, a qual foi expressa em quantidade do fluorescente metilumbeliferona (MUF) liberada na reação por hora ($\text{nM.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

2.1.4. Propriedades da enzima

Ensaaios para determinar os ótimos de pH e salinidade para a atividade da quitobiase de *A. tonsa* e o ótimo de temperatura para a atividade da quitobiase de *A. tonsa* e *A. longiremis* foram realizados medindo a atividade da enzima em diferentes valores destes parâmetros.

2.1.5. Calibração do ensaio enzimático

A reação da quitobiase com o substrato (MUFNAG) libera o fluorescente MUF. A atividade da enzima foi então expressa em $\text{nM.MUF.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, transformando os valores de fluorescência dos testes de acordo com uma equação gerada pela curva de calibração realizada a partir de uma série de concentrações do fluorescente (6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 nM de MUF) acrescentado ao diluente (SD) na presença de dimetil sulfóxido. As amostras foram lidas sob as mesmas condições dos testes com a enzima. Uma mesma concentração de MUF gera uma fluorescência diferente de acordo com as características do meio do ensaio. Desta forma, testes foram realizados para determinar a influência do pH e da salinidade na fluorescência do MUF. Para isso, foram adicionados 50 nM de MUF dissolvido em SD em diferentes pHs (4.0-7.7) e salinidades (0-30). Todos os testes de calibração foram realizados a 25°C.

2.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos

2.2.1. Análises baseadas em amostras de zooplâncton

As amostras utilizadas para determinar a abundância de estágios juvenis e a biomassa de copépodes e cladóceros foram coletadas através de arrastos horizontais de superfície em 5 pontos do estuário da Lagoa dos Patos (Barra: mais próximo à saída do

estuário; PF: situada na entrada do Saco da Mangueira; SJN: margem oeste do estuário; 3C: centro do canal de navegação; YAT: Yatch Club), utilizando-se uma rede bongo (aro de 0,3 m de diâmetro; redes de 90 e 200 μ m de malha). Um fluxômetro (Hydro-Bios, Kiel, Alemanha) foi acoplado à boca de cada rede para medida do fluxo de água. Os organismos coletados foram fixados logo após a coleta com solução de formaldeído neutralizado com tetraborato de sódio na concentração final de 4%. Cada ponto de coleta foi amostrado nos dias 25/08/2009, 29/10/2009, 13/01/2010 e 06/04/2010.

No laboratório, alíquotas de cada amostra contendo pelo menos 300 indivíduos foram contadas e identificadas sob microscópio estereoscópico (Olympus BH-2, Center Valley, PA, EUA) e classificadas de acordo com Björnberg (1981), Montú & Gloeden (1986) e Bradford-Grieve *et al.* (1999). As espécies de copépodes Calanoida foram identificadas ao nível de espécie enumeradas por estágios (náuplios, copepoditos e adultos) e os copépodes Cyclopoida e Cladocera foram identificados ao nível de gênero.

A produção dos copépodes de origem marinha foi calculada utilizando-se as taxas de crescimento dos modelos de Huntley & Lopes (1992) e de Hirst & Bunker (2003), enquanto a produção de copépodes e cladóceros de água doce foi calculada a partir do modelo de Stockwell & Johannsson (1997). Para cada ponto de amostragem, os valores da produção de organismos de água doce foram somados aos valores estimados pelos modelos de Huntley & Lopes (1992) e de Hirst & Bunker (2003), sendo referidos nos resultados apenas como “modelo Huntley” (Huntley & Lopes + Stockwell & Johannsson) e “modelo Hirst” (Hirst & Bunker + Stockwell & Johannsson).

A “produção total” (adultos + juvenis) foi calculada somando a biomassa de cada grupo taxonômico. Para esta finalidade, o valor de biomassa adotado correspondeu ao originado pela amostra que apresentou a maior abundância relativa para cada um dos

grupos taxonômicos estudados, desconsiderando a malha da rede utilizada para a coleta. Da mesma forma, a “produção juvenil” foi calculada a partir da soma das biomassas dos estágios juvenis encontrados na amostras. O valor de biomassa adotado para cada estágio correspondeu ao originado pela amostra que apresentou a maior abundância relativa para o respectivo estágio, desconsiderando a malha de rede para coleta.

Para os modelos matemáticos, as biomassas das espécies (Copepoda e Cladocera) mais abundantes nas amostras foram obtidas através de medidas do comprimento corporal e da aplicação de relações entre o comprimento e o peso corporal, de acordo com o grupo taxonômico a que pertenciam (Tabela 1, Apêndice II). Os valores de clorofila-*a* utilizados no modelo de Hirst & Bunker (2003) foram obtidos junto ao banco de dados do Projeto Lagoa, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fitoplâncton do Instituto de Oceanografia da FURG.

2.2.2. Produção de crustáceos através da quitobiase

Para estimar a produção secundária através da análise da atividade da quitobiase presente na água do estuário, utilizou-se a relação determinada por Sastri & Dower (2009) entre a quitobiase medida na água do ambiente (Quitobiase nativa - CBA_{nat}), a taxa de decaimento da atividade da enzima no campo e a relação, determinada em laboratório, entre atividade da quitobiase liberada na muda (CBA) e o acréscimo de biomassa entre o estágio x e $x+1$ (ΔB). A produção secundária ($mg\ C.m^{-3}.dia^{-1}$) foi então determinada a partir da equação $P = \Delta B / T_{cba}$, onde ΔB é a biomassa em carbono acrescida no ambiente durante a mudança de estágio de desenvolvimento e T_{cba} é o tempo em dias necessário para produzir esta biomassa.

2.2.3. Relação da variação de peso seco (ΔB) x atividade da enzima (CBA)

De acordo com registros anteriores da abundância relativa de espécies do zooplâncton no estuário da Lagoa dos Patos, identificou-se o copépode *Acartia tonsa* como principal representante dos crustáceos na área de estudo. Desta forma, a espécie foi utilizada para os experimentos de muda em laboratório.

Para determinar a quantidade de quitobiase liberada na muda de cada estágio de desenvolvimento de *A. tonsa*, exemplares de cada estágio foram incubados em 200 μ l de uma solução de diluição (SD) preparada com água do mar (salinidade 30) autoclavada e filtrada (filtro de policarbonato; 0,2 μ m) para a eliminação de bactérias e outros microorganismos que pudessem influenciar na taxa de degradação enzimática (Oosterhuis *et al.* 2000). A cada 2 h, os copépodes foram observados em microscópio para identificar aqueles que realizaram a muda. A atividade da quitobiase liberada na muda foi medida em amostras de água (150 μ l) do meio em que os indivíduos foram incubados. Tanto o copépode quanto a exúvia foram fixados para posterior medida e cálculo de biomassa através das relações entre o comprimento do cefalotórax e o peso seco (Berggreen *et al.* 1988). O parâmetro ΔB foi calculado pela diferença de peso seco entre o estágio x e $x+1$. Foi aplicada transformação matemática ($\ln$) aos valores de atividade enzimática e de ΔB , sendo ambos os dados utilizados então em uma análise de regressão. A equação $\ln(\Delta B) = a.\ln(\text{CBA}) + b$ foi posteriormente utilizada para determinar a produção secundária no estuário da Lagoa dos Patos substituindo-se o termo CBA pelo valor de CBA_{nat} de cada ponto de coleta e assim determinando-se o valor de ΔB (μ g de peso seco) em um determinado período de tempo. Este período de tempo (T_{cba}) foi determinado a partir da taxa de decaimento da atividade da enzima em campo (Sastri & Dower 2009).

2.2.4. Quitobiase para determinação da produção em campo

Para análise da produção secundária a partir da atividade da quitobiase em campo, foram coletados 300 mL de água superficial em cada um dos 5 pontos de amostragem. As amostras foram filtradas (malha de 30 μm) para a retirada de crustáceos e acondicionadas em frascos de vidro. Alíquotas destas amostras foram filtradas no momento da coleta (filtro estéril; 0,2 μm), congeladas em frascos de vidros e rotuladas como “Quitobiase Nativa” (CBA_{nat}).

O restante da amostra foi utilizado para determinar a taxa de decaimento da atividade enzimática ao longo do tempo. Para este teste, um concentrado da enzima foi obtido através da homogeneização de 50 indivíduos da espécie dominante no ponto de coleta, utilizando-se SD em um tubo de centrífuga. Os homogeneizados foram então centrifugados (5 min; 10.000 x g) e o sobrenadante filtrado (0,2 μm). A enzima concentrada foi adicionada às amostras de água do campo e os frascos mantidos na mesma temperatura da água no ambiente. A partir do início do experimento (tempo zero) até 24 h de teste, foram coletadas amostras dos meios de reação. As alíquotas foram filtradas e congeladas da mesma forma que descrito para a CBA_{nat} . Todas as amostras foram analisadas no mesmo momento. Os valores da atividade enzimática foram transformados (log) e aplicados numa regressão linear contra o tempo para determinar a declividade da reta (k), a qual corresponde à taxa de decaimento da atividade da enzima. Aplicando-se $-1/k$, determinou-se o Tc_{ba} , isto é, o tempo (h) para produção de ΔB . O valor de Tc_{ba} foi dividido por 24 h para expressar os resultados em dias.

2.2.5. Ensaios enzimáticos

A atividade da quitobiase foi determinada seguindo a mesma metodologia descrita nos ensaios de caracterização da enzima.

2.3. Experimentos com *Acartia longiremis*

2.3.1. Coleta dos animais

Os copépodes *A. longiremis* foram coletados no Saanich Inlet com arrastos horizontais de superfície, da mesma forma que aqueles utilizados para a análise da quitobiase. Estes organismos foram transportados ao laboratório, separados individualmente e mantidos em recipientes de vidro contendo água do mar do local de coleta (salinidade 30 e temperatura de 15°C) aerada e filtrada (malha de 40 µm), para manter a comunidade fitoplanctônica que serviu de alimento para os copépodes. Os organismos também foram alimentados com *Isochrysis galbana* (diâmetro de 4,7 µm) cultivada em laboratório.

2.3.2. Efeito da temperatura no crescimento de náuplios

Assim que os copépodes foram separados da amostra e colocados em cultivo mono-específico, estes foram alimentados com a assembléia fitoplanctônica do ambiente e com *I. galbana*. Após 24 h de incubação, os organismos foram filtrados (malha de 150 µm) para que os ovos e náuplios de até 24 h de vida fossem separados dos adultos. Os adultos foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo, enquanto os ovos e náuplios foram utilizados para o experimento de crescimento, conforme descrito abaixo.

Os ovos e náuplios produzidos em 24 h de incubação foram separados em três unidades experimentais compostas por recipientes de vidros (2 L) contendo 1,8 L de água do mar (salinidade 30) filtrada (40 μm) e autoclavada. Uma amostra (50 mL) do meio foi coletada em cada unidade experimental no início do teste (tempo zero) e consecutivamente a cada 24 h durante 10 dias. Uma última amostra foi coletada no 15º dia de experimento. As amostras de cada réplica foram fixadas com formol 4% e os indivíduos contados sob microscópio estereoscópico e medidos sob microscópio óptico usando uma ocular com régua milimétrica. Durante o experimento, os náuplios foram alimentados com 100.000 células de *I. galbana*.ml⁻¹. As células do cultivo de algas e de cada réplica experimental foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração mantida constante durante todo o período de teste.

2.3.3. Efeito da dieta na produção de ovos

Os organismos testados foram utilizados iniciando-se a incubação assim que estes foram coletados (10 réplicas) e 24 h após a coleta (10 réplicas), período no qual os copépodes foram mantidos sob a dieta de teste.

Para os experimentos de produção de ovos, um macho e uma fêmea de *A. longiremis* foram incubados por 24 h em 50 mL de água do mar (salinidade 30), sendo que dez repetições foram feitas para cada tratamento. Os diferentes tratamentos experimentais foram constituídos por diferentes dietas: (1) assembléia de fitoplâncton de Saanich Inlet (BC, Canadá) obtida a partir de água filtrada (40 μm) do ambiente, (2) assembléia de fitoplâncton da praia de Cadboro Bay (BC, Canadá) obtida a partir de água filtrada (40 μm) do ambiente, (3) *Isochrysis galbana* cultivada em laboratório, (4) *Thalassiosira weissflogii* e (5) Instant Algae®: *T. weissflogii* 1200™ (CCMP1051/TWSp)

(~7-20 μm) e Reef Nutrition: *Isochrysis*, *Pavlova*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *T. weissflogii*, *Synechococcus* (~1-15 μm), sendo as dietas 3, 4 e 5 acrescidas ao meio experimental (água do mar filtrada e autoclavada). Após 24 h de incubação, o volume de teste foi filtrado (malha de 40 μm) para reter os adultos e os ovos. Os adultos foram observados para determinação da sobrevivência. A presença e número de ovos e pelotas fecais também foram registrados. Os testes com todos os tratamentos experimentais foram realizados nas temperaturas de 5°C e 15°C.

2.4. Comparação entre os métodos para estimavas de produção

A comparação entre os valores médios da produção total, estimados com base nos modelos matemáticos e no método enzimático foi realizada através de análise de regressão utilizando o software Statistica versão 6.0 (Statsoft, USA)

3. RESULTADOS

3.1. Propriedades da quitobiase

A quitobiase de *A. tonsa* apresentou atividade máxima na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 e relação linear negativa com a salinidade (Apêndice I). Em relação à temperatura, a atividade máxima da quitobiase de *A. tonsa* ocorreu entre 30 e 35°C (Apêndice I), enquanto a de *A. longiremis* entre 35 e 45°C (Apêndice III), sendo ambas inibidas em temperaturas superiores. Para *A. tonsa*, o valor de K_m da quitobiase foi de 20,77 μM de MUFNAG, com inibição em 500 μM do substrato (Apêndice I). Para *A. longiremis*, o valor de K_m foi de 47,05 μM de MUFNAG (Apêndice III). Os valores de K_m para os outros crustáceos da Lagoa dos Patos avaliados no presente estudo foram de 14,67;

18,19; 14,30 e 24,77 μM para adultos de *Metamysidopsis elongata atlântica*, náuplios do Cirripedia *Balanus improvisus*; zoea de Decapoda e megalopa de Decapoda, respectivamente (Apêndice I).

3.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos (Apêndice II)

3.2.1. Biomassa zooplancônica

A biomassa de cada táxon estudado variou entre as coletas nas diferentes estações do ano e entre os pontos de coleta no estuário em uma mesma estação do ano. O copépode *A. tonsa*, responsável por quase 100% da biomassa do zooplâncton durante o inverno, não foi registrado na primavera e verão, quando foi então substituído pelo copépode *Notodiaptomus incompositus* e cladóceros.

Durante o inverno, a biomassa máxima de *A. tonsa* foi de 24,57 mg C.m^{-3} no ponto SJN quando utilizados os dados de amostras coletadas com a rede de 200 μm . Por sua vez, a biomassa mínima foi de 1,3 mg C.m^{-3} no ponto 3C quando utilizados os dados das amostras coletadas com a rede de 90 μm . Registrada novamente no outono, a biomassa máxima de *A. tonsa* foi de 0,915 mg C.m^{-3} no ponto PF quando utilizados os dados das amostras coletadas com a rede de 90 μm . Durante a primavera, *N. incompositus* e cladóceros apresentaram as maiores biomassas (12,038 e 10,016 mg C.m^{-3} , respectivamente). Apesar de serem os grupos com maior biomassa no verão, seus valores não passaram de 2,034 e 1,382 mg C.m^{-3} (Tabela III).

Durante o período de estudo, os valores máximos de biomassa foram registrados durante o inverno (25,29 mg C.m^{-3}) e primavera (24,98 mg C.m^{-3}), com médias de 13,64

e $9,7 \text{ mg C.m}^{-3}$, respectivamente. O valor mínimo foi registrado no outono ($0,07 \text{ mg C.m}^{-3}$), com média de $0,5 \text{ mg C.m}^{-3}$.

3.2.2. Quitobiase

A relação entre a variação da biomassa (ΔB) entre o estágio de desenvolvimento “x” e “x+1” do copépode *A. tonsa* e a atividade da quitobiase liberada na muda (CBA) seguiu a equação $\ln(\Delta B) = 0,8876 + 0,5847 \times \ln(\text{CBA})$ ($r^2=0,98$; $p<0,05$; $n=47$ mudas).

3.2.3. Produção zooplancônica – comparação de métodos

A produção de zooplâncton estimada a partir da quitobiase mostrou uma tendência a acompanhar os valores estimados a partir dos modelos matemáticos, porém os valores encontrados pelo método enzimático foram, de maneira geral, superiores. Tanto os modelos matemáticos quanto o método enzimático mostraram ser capazes de detectar diferenças entre os pontos de amostragem em coletas realizadas no mesmo dia, além da variação da produção entre as coletas realizadas em diferentes estações do ano.

Em relação aos valores calculados pelos modelos matemáticos a partir das amostras das redes, tanto a produção total (adultos + juvenis) quanto a produção somente de juvenis apresentaram, em sua maioria, valores maiores quando foi utilizado o “modelo Huntley” do que quando o “modelo Hirst”. A média da produção seguiu o mesmo padrão da biomassa, com valores superiores sendo estimados a partir dos dados coletados a partir das amostras coletadas com a malha de rede de $200 \mu\text{m}$ em 3 estações do ano, quando comparados com aqueles calculados com os dados obtidos a partir de amostras coletadas com rede de $90 \mu\text{m}$. Neste caso, os valores máximos foram observados no inverno ($4,35 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$), decrescendo nas outras demais estações do

ano, independentemente do modelo ou da malha de rede de coleta utilizada. A média mínima observada foi de $0,05 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ no outono.

Com relação à produção estimada em cada ponto de coleta do estuário utilizando os modelos matemáticos, assim como aquela estimada pelo método enzimático ($12,5 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$), a maior produção total para o “modelo Huntley” foi observada no ponto PF ($9,2 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$) durante a primavera. Para o “modelo Hirst”, a maior produção também foi estimada no ponto PF, porém no verão ($7,9 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$). As menores estimativas de produção em todos os pontos de coleta foram observadas no outono, com valores inferiores a $1 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ para os modelos de Huntley e Hirst e em torno de $2 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ para os dados obtidos pelo método enzimático.

As diferenças observadas entre os valores médios de produção obtidos para as amostras coletadas com as duas redes de diferentes malhas e calculadas com o mesmo modelo chegaram a ultrapassar a diferença observada entre os modelos e a análise com a quitobiase. Na coleta de inverno, onde a média da produção estimada pelo “modelo Huntley” foi $2,55 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ superior na amostra coletada com a rede de $200 \mu\text{m}$ do que com a rede de $90 \mu\text{m}$, a diferença entre o “modelo Huntley” e quitobiase foi de $1,12 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ e entre o “modelo Hirst” e quitobiase foi de $1,34 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$. Nas demais estações do ano, o principal fator responsável pelas diferenças entre as estimativas foi o método utilizado, com a diferença máxima de $4,75 \text{ mg C.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ entre a estimativa pelo método enzimático e pelo “modelo Hirst” na primavera.

A declividade da regressão entre os valores médios da produção estimados com base no “modelo Huntley” e o método da Quitobiase não foi diferente de 1 ($b = 1.12 \pm 0.16$; $n = 20$; $R^2 = 0.73$; $p < 0.001$). Sendo similar o resultado para a análise de regressão entre os dados obtidos para o “modelo Hirst” e o método da Quitobiase ($b =$

1.21 ± 0.26 ; $n = 20$; $R^2 = 0.55$; $p < 0.001$). Em todos os casos, os valores de produção estimados pelo método enzimático foram sistematicamente maiores que aqueles gerados pelos modelos matemáticos. A magnitude desta diferença correspondeu a 1.95 ± 0.58 e $2.494 \pm 0.73 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ para o “modelo Huntley” e o “modelo Hirst”, respectivamente. Esses valores foram derivados a partir do intercepto das curvas de regressão referidas acima.

3.3. Experimentos com *Acartia longiremis* (Apêndice III)

3.3.1. Crescimento em diferentes temperaturas

A abundância relativa de ovos e náuplios (NI-NVI) de *A. longiremis* variaram ao longo dos 15 dias de experimento e a proporção de cada estágio em relação ao tempo de incubação foi diferente em 10 e 15°C. Enquanto os primeiros náuplios foram registrados no 3º dia em 10°C, aproximadamente 50% dos indivíduos eram NI no 2º dia em 15°C. Ao final de 15 dias de experimento, a maior abundância ainda era de ovos em 10°C, sendo que o estágio de desenvolvimento NIV foi o mais freqüente. Por sua vez, não foram registrados ovos em 15°C e NIII, NIV, NV e NVI foram identificados no 15º dia.

Após 15 dias de incubação, o comprimento total médio máximo em 10 e 15°C após 15 dias foi de 180,5 e 216,3 μm , com uma taxa de crescimento (g) de 0,17 e 0,2 dia^{-1} , respectivamente (Fig. 2).

O diâmetro dos ovos de *A. longiremis* foi de 75 μm e o comprimento total médio de NVI foi de 270 μm . Náuplios V e VI só foram registrados na temperatura de 15°C, não havendo diferença entre as médias das medidas de ovos a NIV na comparação entre as duas temperaturas testadas (Fig.3).

3.3.2. Produção de ovos em diferentes dietas

Apesar de produzirem nas primeiras 24 h após a coleta os ovos que foram utilizados nos experimentos de crescimento, nenhuma fêmea produziu ovos durante o período de incubação do casal de copépodes em nenhuma das combinações de temperatura e dieta testadas. Pelotas fecais foram identificadas somente na dieta 3 com *I. galbana* em 15°C, sendo que o valor máximo foi de 10 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹, com valor médio de 3,2 pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹.

4. CONCLUSÕES

4.1. Propriedades da quitobiase

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram uma variação significativa nos valores de afinidade da quitobiase pelo substrato (*K_m*) de diferentes espécies e estágios de desenvolvimento dos crustáceos coletados no estuário da Lagoa dos Patos. Foram também observadas diferenças entre os valores de *K_m* de *A. tonsa* do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS, Brasil) e de *A. longiremis* de Saanich Inlet (BC, Canadá).

Considerando que a quitobiase degrada a quitina e é amplamente encontrada na natureza, os resultados aqui apresentados, aliados àqueles já relatados na literatura, mostram que esta enzima pode estar envolvida em diferentes processos para cada grupo de organismos, estando adaptada para responder à necessidade do grupo em particular.

4.2. Produção de crustáceos no estuário da Lagoa dos Patos

A malha da rede utilizada para amostragem do zooplâncton, o modelo matemático (“Huntley” ou “Hirst”) utilizado para estimar a produção, e o método (modelo matemático ou quitobiase) utilizado para estimar a produção foram os fatores que influenciaram o resultado da análise de produção do zooplâncton.

No presente estudo, os maiores valores de produção estimados usando o método da quitobiase podem ser explicados considerando diferentes aspectos. Está claro que a seletividade da rede influencia diretamente os valores de produção estimados pelos modelos matemáticos como consequência do efeito da seletividade na estimativa de biomassa. Uma “perda de biomassa” pode ter ocorrido se um organismo maior escapou da rede ou se os menores passaram através da malha. Em ambos os casos, valores de biomassa estimados a partir de amostras coletadas com redes podem ser subestimados. Por outro lado, o método enzimático considera toda a quitobiase presente na amostra de água. Assim, é possível que alguns copépodes que tenham contribuído com o total da quitobiase medida na água, tenham morrido ou sido predados após ter liberado a enzima. Além disso, outras fontes de quitobiase, como de crustáceos bentônicos podem também ter contribuído para a superestimação dos valores de produção.

Apesar de não haver metodologia padrão para estimativa de produção secundária de crustáceos, os modelos matemáticos estão entre os mais utilizados nas publicações recentes e, por isto, os dados de produção gerados a partir destes modelos foram utilizados no presente estudo para avaliar os valores obtidos pelo método da quitobiase. Uma vez que os resultados obtidos com o método enzimático seguiram o mesmo padrão que aqueles gerados pelos modelos matemáticos, sugere-se que a quitobiase pode ser utilizada para avaliar a produção secundária em estuários com a mesma eficácia que aquela observada em ambientes marinhos (Sastri & Dower 2009).

4.3. Experimentos com *Acartia longiremis*

As diferentes taxas de crescimento de *A. longiremis* em relação a sua congênere *A. tonsa* observadas nos resultados de crescimento em laboratório indicaram uma temperatura ambiental em que cada espécie é dominante, uma vez que, sob a mesma condição de temperatura, *A. longiremis* apresentou taxas de crescimento inferiores às de *A. tonsa*.

A ausência de produção de ovos em diferentes combinações de dieta e de temperatura demonstra a variedade de preferências físicas e biológicas entre espécies de um mesmo gênero, já que *A. tonsa* se alimenta e se reproduz sob as mesmas condições testadas com *A. longiremis*.

4.4. Conclusão Geral

Observada a importância de estudos sobre a produção secundária de ambientes aquáticos, os resultados apresentados nesta tese contribuem tanto com dados de produção secundária gerados para o estuário da Lagoa dos Patos, bem como indicam a viabilidade de aplicação do método enzimático (quitobiase) para estimativa da produção secundária não somente em ambientes marinhos, mas também em regiões costeiras e estuarinas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um trabalho que tem como objetivo testar novas metodologias passa na maioria das vezes por algumas dificuldades e tem no decorrer do estudo uma série de perguntas que são ou não respondidas ao final de um período.

Devido à grande variabilidade apresentada pelo estuário em estudo, se comparado ao Saanich Inlet onde o método foi primeiramente aplicado, um esforço de laboratório foi necessário antes que a técnica pudesse ser aplicada, cobrindo grande parte do tempo utilizado no desenvolvimento da tese. Assim, a aplicação em campo foi realizada como forma de calibrar a metodologia e não com o objetivo de caracterizar a produção secundária do estuário ao longo do ano.

Os resultados gerados nesta tese são inéditos e indicam que o método de estimativa da produção secundária baseado na atividade da quitobiase pode ser utilizado em estuários, porém ainda existem algumas dúvidas que poderão ser resolvidas com experimentos e coletas futuras. Entre elas está (1) a magnitude da influência da quitobiase gerada por organismos bentônicos na atividade da enzima na coluna d'água; (2) A confirmação do padrão entre a relação dos parâmetros ΔB e atividade da quitobiase de copépodes de água doce, cirripédios e misídeos presentes no estuário da Lagoa dos Patos e (3) maior discussão sobre os valores frequentemente superiores de produção com o método enzimático quando comparado com as estimativas de modelos matemáticos.

Como a praticidade do método enzimático permite que a técnica seja aplicada de forma mais ampla espaço-temporalmente sendo uma vantagem em relação aos métodos mais utilizados atualmente, sugere-se que um esforço de pesquisa seja dispendido a fim de gerar dados em diferentes situações ambientais permitindo conhecer melhor as relações entre a atividade da enzima e o comportamento da mesma em campo, trazendo dados para discutir as questões que ainda não foram respondidas.

6. LITERATURA CITADA

- ANDERSON J J & AH DEVOL. 1973. Deep water renewal in Saanich Inlet, an intermittently anoxic basin. *Est. Coast. Mar. Sci.* 1:1-10.
- AZAITEIRO, UM, SC MARQUES, LMR VIEIRA, MRD PASTORINHO, PAB RÉ, MJ PEREIRA & FMR MORGADO. 2005. Dynamics of the *Acartia* genus (Calanoida: Copepoda) in a temperate shallow estuary (the Mondego estuary) on the west coast of Portugal. *Acta Adriat.*, 46: 7 – 20.
- ASMUS, M. 1998. Capítulo 1 In: SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO. Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. (ed.) Ecoscientia, Rio Grande, 326 p.
- BAARS, M & S OOSTERHUIS. 2005. The *in situ* copepod production in the North Sea, late summer 2005. In: THOMAS, H. CARBOCEAN: Cruise Report of the cruise 64PE239, Texel, NL – Peterhead, UK. 17.08.2005 – 06.09.2009.
- BERGGREEN, U., B HANSEN & T KIØRBOE. 1988. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.*, 99: 341–352.
- BJÖRNBERG, TKS. 1981. Copepoda. In: BOLTOVSKOY, D (ed.). Atlas del Atlántico Sudoccidental: métodos de trabajo con el zooplancton marino. INIDEP, Mar del Plata, Argentina: 587-679.
- BRADFORD-GRIEVE, JM, EL, MARKHASEVA, CEF., ROCHA & B ABIAHY. 1999. Copepoda. In: BOLTOVSKOY D (ed.). South Atlantic Zooplankton. Backhuys Publishers, v.2, Leiden: 869-1098.
- COSTANZA, R, WM KEMP, WR BOYNTON. 1993. Predictability, scale, and biodiversity in coastal and estuarine ecosystems - implications for management. *Ambio* 22: 88-96.

- DANIELSDOTTIR, MG, MT BRETT, GB ARHONDITSIS. 2007. Phytoplankton food quality control os planktonic food web processes. *Hydrobiol.*, 589:29-41.
- DAVID, V, B SAUTOUR, P CHARDY. 2007. Successful colonization of the calanoid copepod *Acartia tonsa* in the oligo-mesohaline area of the Gironde estuary (SW France) – Natural or anthropogenic forcing? *Est. Coast. Shelf. Sci.*, 71: 429 – 442.
- DUARTE, AK. 1986. Distribuição, Abundância e Flutuações Sazonais do Copépodo Calanoide *Acartia tonsa* na Enseada Estuarina Saco do Justino e Canal do Estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil.102p.
- ESPIE, PJ & JC ROFF. 1995. A biochemical index of duration of the molt cycle for planktonic Crustacea based on the chitin-degrading enzyme, chitobiase. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1028-1034.
- HERZ, R. 1977. Circulação das águas de superfície da lagoa dos Patos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo-SP. 317p.
- HIRST, AG & AJ BUNKER. 2003. Growth of marine planktonic copepods: Global rates and patterns in relation to chlorophyll *a*, temperature, and body weight. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 1988-2010.
- HIRST, AG & AD McKINNON. 2001. Does egg production represent adult female copepod growth? A call to account for body weight changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 223:179-199.
- HUNTLEY, ME & MDG LOPEZ. 1992. Temperature-dependent production of marine copepods: a global synthesis. *Amer. Natur.*, 140: 201-242.

- HOPCROFT, RR & JC ROFF. 1996. Zooplankton growth rates: diel egg production in the copepods *Oithona*, *Euterpina* and *Corycaeus* from tropical waters. *J. Plankton Res.*, 18: 789-803.
- HOPCROFT, RR & JC ROFF. 1998. Zooplankton growth rates: the influence of size in nauplii of tropical marine copepods. *Mar. Biol.*, 132: 87-96.
- IKEDA, T, Y KANNO, K OZAKI & A SHINADA. 2001. Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Mar. Biol.*, 139: 587 – 596.
- KANG, H, YJ KANG, C PARK. 2007. Production of *Acartia omorii* (Copepoda:Calanoida) in Ilkwang Bay, southeastern coast of Korea. *Jour. Mar. Syst.*, 67:236 – 244.
- KIØRBOE, T & TG NIELSEN. 1994. Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate, coastal ecosystem. 1. Copepods. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 493-507.
- KLEPPEL, GS, D FRAZEL, RE PIEPER & DV HOLLIDAY. 1988. Natural diets of zooplankton off southern California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 49: 231 – 241.
- KOCUM, E, GJC UNDERWOOD, DB NEDWELL. 2002. Simultaneous measurement of phytoplanktonic primary production, nutrient and light availability along a turbid, eutrophic UK east coast estuary (the Colne Estuary). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 231: 1–12.
- LEANDRO, SM, F MORGADO, F PEREIRA & H QUEIROGA. 2007. Temporal changes of abundance, biomass and production of copepod community in a shallow temperate estuary (Ria de Aveiro, Portugal). *Est. Coast. Shelf. Sci.*, 74: 215 – 222.

- LEANDRO, SM, P TISELIUS, H QUEIROGA. 2006. Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Mar. Biol.*, 150:121–129.
- MAUCHLINE, J. 1998. The biology of Calanoid Copepods. Advances in Marine Biology, Academic Press, London, 710 p.
- MCFARLANE G., J. SCHWEIGERT, J. DETERING, V. HODES. 2010. Diet analysis of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) off the west coast of Vancouver Island, British Columbia from 1997 to 2008 CalCOFI Rep. 51: 169-181.
- MICHAELIS, L. & ML MENTEN, 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung *Biochem. Z.* **49**: 333-369.
- MONTÚ, AM & IM GLOEDEN. 1986. Atlas dos Cladocera e Copepoda (crustacean) do Estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, Brasil). *Nerítica*, 1: 1-134.
- MUZZARELLI, RAA. 1977. Chitinases and related enzymes. In: Muzzarelli, RAA (ed.). Chitin. Pergamon: 155-177.
- ODUM, WE, EP ODUM, HT ODUM. 1995. Nature's pulsing paradigm. *Estuaries* 18: 547 – 555.
- OOSTERHUIS, SS, MA BAARS, WCM KLEIN BRETELER. 2000. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 196:195–206.
- POSTEL, L, H FOCK & W HAGEN. 2000. Chapter 4 : Biomass and abundance. In: HARRIS, RP, PH WIEBE, J LENZ, HR SKJOLDAL, M HUNTLEY. (ed). ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press San Diego, p 83-192.

- RENZ, J, J PETERS, HJ HIRCHE. 2007. Life cycle of *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht (Copepoda, Calanoida) in the Central Baltic Sea: II. Reproduction, growth and secondary production. *Mar. Biol.*, 151:515-527.
- SAIZ, E, A CALBET, D ATIENZA & M ALCARAZ. 2007. Feeding and production of zooplankton in the Catalan Sea (NW Mediterranean). *Prog. in Ocean.*, 74: 313 – 328.
- SASTRI, AR & JC ROFF. 2000. Rate of chitobiase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustácea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57:1965 – 1968
- SASTRI, AR & JF DOWER. 2006. Field validation of an instantaneous estimate of in situ development and growth for marine copepod communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 63: 2639-2647.
- SASTRI, AR & JF DOWER. 2009. Interannual variability in chitobiase-based production rates of the crustacean zooplankton community in the Strait of Georgia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 388: 147–157.
- SILVA, AP, S NEUMANN-LEITÃO, R SCHWAMBORN, LMO GUSMÃO & TA SILVA. 2004. Mesozooplankton of na impacted bay in north eastern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 47:485 – 493.
- STOCKWELL, JD & OE JOHANSSON. 1997. Temperature-dependent allometric models to estimate zooplankton production in temperate freshwater lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 2350-2360.
- SVENSEN, C, D VILIEIE, P WASSMANN, E ARASHKEVICH & T RATKOVA. 2007. Plankton distribution and vertical flux of biogenic matter during high

summer stratification in the Krka estuary (Eastern Adriatic). *Est. Coast. Shelf. Sci.*, 71: 381 – 390

WEBBER MK & JC ROFF. 1995. Annual structure of the copepod community and its associated pelagic environment off Discovery Bay, Jamaica. *Mar. Biol.*, 123: 467-479.

7. APÊNDICE I

Título: Chitobiase of planktonic crustaceans from South Atlantic coast (Southern Brazil): Characterization and influence of abiotic parameters on enzyme activity

Autores: Tatiana Ramos Avila, Anderson Abel de Souza Machado & Adalto Bianchini

Revista: Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

ABSTRACT

Chitobiase is one of the enzymes involved in chitin degradation in nature. It is produced and released by a variety of organisms from bacteria to fish. In crustaceans, it is associated with digestive function and acts on the epidermis during the molting process. In the present study, the influence of water pH, temperature and salinity on maximum chitobiase activity (MCA), as well as the enzyme affinity (K_m) for a substrate, the methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (MUFNAG) was evaluated in the copepod *Acartia tonsa*. K_m values for chitobiases of other crustaceans from the Patos Lagoon estuary and Cassino Beach (Southern Brazil) were also determined. For *A. tonsa*, MCA was observed at pH 5-6 and 30-35°C. The range of pH was quite similar to that reported for other aquatic organisms. However, the range of temperature was lower than that previously reported. For salinity, no previous studies have considered the influence of this parameter on MCA. For *A. tonsa*, MCA was observed in freshwater, showing a significant linear decrease with increasing salinity. Considering that maximum copepod survival and growth rates are observed between 15 and 25 ppt, these findings suggest that the observed enzyme activity in this range of salinity (68 to 47% of that measured in freshwater) is not a limiting factor for *A. tonsa* growth. However, the extremely decreased enzyme activity observed in salinity 30 ppt (33% of that measured in freshwater) suggests that chitobiase activity might be a limiting factor for copepod growth at 30 ppt salinity or higher. K_m values (μ M) determined for all organisms evaluated in the present study (copepod *A. tonsa* = 20.77; mysid *Metamysidopsis elongata atlantica* = 14.67; nauplii barnacle *Balanus improvisus* = 18.19; decapod zoea = 14.30; decapod megalopa = 24.77) were lower than those reported for other crustaceans from Northern Hemisphere. Also, they were much lower

than those of organisms from different taxonomic groups like bacteria and fungi, but much higher than in protozoans and dinoflagelates. These findings suggest that chitobiase might be differentially evolved in each specific group of organism for a better adaptation to cope with its respective environmental needs.

Key words: *Acartia tonsa*; chitobiase; crustaceans; enzyme affinity; zooplankton

INTRODUCTION

Chitin is one of the more abundant polysaccharides in nature. It is part of the exoskeleton of invertebrates like insects and crustaceans. Therefore, enzymes degrading chitin are produced by a variety of organisms for digestion like in bacteria (Vrba et al., 1993), gastropod mollusks (Brendelberger, 1997), fish (Lindsay, 2006), and some omnivore crustaceans (Saborowski and Buchholz 1999). In insects and crustaceans, these enzymes are also involved in molting, thus being necessary for animal growth (Chang, 1993).

Two enzymes play a key role in chitin digestion during crustacean molting. Chitinase degrades chitin in oligosaccharides, including dimers and trimers of N-acetyl-beta-D-glucosamine. In turn, chitobiase (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) degrades these oligosaccharides into monomers (Muzzarelli, 1977), which will be re-absorbed into the new cuticle (Buchholz, 1989).

Due to its importance in the life cycle of crustaceans, chitobiase has been employed in aquatic pollution studies (Zou and Fingerman, 1999a,b; Richards and Hanson, 2008) and as index of planktonic secondary production (Oosterhuis et al., 2000; Sastri and Dower, 2006). Some studies consider the enzyme from tissues of the studied animal, while others are based on the analysis of the free chitobiase in the water (Oosterhuis et al., 2000; Sastri and Dower, 2006). In this compartment, different sources of enzyme might contribute for the observed concentration. Therefore, it is important to characterize the kinetic properties to test the activity of the desired enzyme.

Chitobiases from organisms of different taxonomic groups have been characterized (Zou and Fingerman 1999c; Oosterhuis et al., 2000; O'Connell et al.,

2008). However, chitobiases from zooplanktonic crustaceans are still not well studied. Furthermore, most studies are performed on species from the Northern Hemisphere adapted to temperatures typical from temperate/sub-polar environments (Oosterhuis et al., 2000; Sastri and Dower 2006).

Zooplanktonic organisms are recognized for their importance as the secondary trophic level in food chains. In general, crustaceans dominate assemblies in coastal environments (Sabatini and Martos, 2002). They can be part of the holoplankton, such as copepods and mysids (Wooldridge, 1983), or the meroplankton, such as larvae of Cirripedia and Decapoda (Sekiguchi, 1979).

Among Calanoida copepods, *Acartia tonsa* has a cosmopolitan distribution, contributing for more than 80% of the secondary production in coastal waters in subtropical and temperate zones. It is also important to mention the mysid *Metamysidopsis elongata atlantica*, which can be also found at high densities in these environments because of its patched distribution (Mclachlan, 1990). Larval stages of the barnacle *Balanus improvisus* and of decapods are also very representative during their reproduction period.

In light of this background, the main goal of the present study was to characterize the chitobiase of the holoplanktonic copepod *Acartia tonsa* in relation to the influence of water temperature, pH and salinity on maximum enzyme activity. The enzyme affinity for its substrate (K_m) was also determined and compared for *A. tonsa*, *M. elongata atlantica*, nauplii barnacle *B. improvisus*, and zoea and megalopa of decapods.

MATERIAL AND METHODS

Animal collection and acclimation

Animals were collected in the Patos Lagoon estuary (32° 05'05,16"S; 052°13'04,69"W; Southern Brazil) and at the surf zone in the Cassino Beach (32°12'14,69"S; 052° 10'37,71"W, Southern Brazil), using a 200-µm mesh plankton net fitted with a non-filtering cod end. Collections were performed from July to December 2008. Samples were diluted in water from the sampling site and brought to the laboratory. Adult copepod *A. tonsa*, adult mysid *M. elongata atlantica*, nauplii barnacle *B. improvisus* and larval stages of decapods were sorted out using a stereoscopic microscope and transferred to 5-L glass jars containing filtered (1 µm pore size) seawater at 30 ppt.

Animals were kept under laboratory conditions at fixed temperature (20°C) and photoperiod (12L: 12D) and fed *ad libitum* with a mixture of the diatoms *Thalassiosira weissfloggi* and *Isocrysis galbana* obtained from cultures.

Enzyme source

Chitobiase from crustaceans was obtained using different numbers of organisms, depending on their biomass. For *A. tonsa* and *B. improvisus*, 100 individuals were homogenized in 500 µl of diluent, i.e., autoclaved and filtered (0.2-µm mesh polycarbonate filters) seawater. For *M. elongata atlantica* and Decapoda larvae, 4-10 individuals were used. Animals were homogenized using a **Potter**-Elvehjem tissue grinder with **teflon** pestle. Homogenized were centrifuged (10 min; 10.000 x *g*) and the supernatant was filtered (0.2-µm mesh filter). The filtrate was used as enzyme source.

Calibration of the enzyme assay

Chitobiase reaction with its substrate methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (MUFNAG) generates the fluorescent methylumbelliferone (MUF). Therefore, the enzyme activity was determined by transforming the fluorescence units in nmol MUF using a calibration curve built from a series of MUF (Sigma-Aldrich, USA) concentrations (6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200 nM) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the diluent. The same concentration of MUF can generate a different fluorescence value according to the assay medium conditions. Therefore, tests were performed to determine the influence of medium pH and salinity on MUF fluorescence adding 50 nM of MUF dissolved in the diluent at different pH (4.0-7.7) and salinities (0-30 ppt). All calibration tests were performed at 25°C.

Enzyme assay

Chitobiase activity was measured using the method described by Oosterhuis et al. (2000) and Sastri & Dower (2006) with some modifications. The substrate MUFNAG was used from a 9-mM stock solution prepared in DMSO. For tests, the stock solution was diluted to give a final concentration of 250 μ M MUFNAG. Test tubes were filled with diluent, enzyme source (sample homogenate) and enzyme substrate (MUFNAG). Control tubes were also performed without addition of the enzyme source and/or enzyme substrate. Reaction mixture was transferred to a 96-well microplate and the fluorescence was read (excitation: 360 nm, emission: 450 nm) at 25°C in a spectrofluorometer (Victor 2, Perkin Elmer, USA). Fluorescence was measured every 5 min for up to 1 h. Increase in fluorescence over the reaction period corresponded to the free chitobiase activity, which was expressed as μ mol MUF h⁻¹.

Enzyme characterization

Assays to determine the optimum pH and temperature for maximum enzyme activity were performed with chitinase from *A. tonsa*. A pH range (4.0-7.7) was tested adjusting the pH of the diluent with HCl. These tests were performed at 25°C and salinity 30 ppt. A temperature range (20-45°C) was also tested using a water bath. These tests were run at salinity 30 ppt and pH 7.7, characteristic of the estuarine water where copepods were collected. As *A. tonsa* is a euryhaline copepod, maximum enzyme activity was also measured in a range of water salinity (0-30 ppt) diluting the diluent with distilled water. These tests were performed at 25°C and pH 6.0.

Chitinase affinity values for the substrate (K_m) were determined for *A. tonsa*, *M. elongata atlantica*, *B. improvisus* nauplii, and Decapoda larvae. Homogenates for each group of organism tested were individually prepared and spiked into a series of substrate concentrations (15, 31, 62, 125, 250 e 500 μ M of MUFNAG). These assays were run at 25°C, pH 7.7 and salinity 30 ppt.

Data analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error ($n = 4$). Mean data comparisons were performed through analysis of variance followed by the Tukey test using the software Statistica 7 (StatSoft, USA). Linear or non-linear regression analysis was applied for data modeling using the software SigmaPlot 2001 for Windows version 7.0 (SPSS, USA).

RESULTS

Enzyme assay calibration

MUF fluorescence was influenced by pH and salinity of the reaction mixture. It augmented with increasing pH (Fig. 1A) and salinity (Fig. 1B) following a sigmoid- and hyperbolic-shape curve, respectively. The calibration curve obtained was adjusted to a linear-shape regression ($r^2 = 0,99$) and was applied to transform fluorescence units in μmol of MUF in all K_m assays.

Acartia tonsa chitobiase

A. tonsa chitobiase showed a maximum activity at a pH range of 5.0 – 6.0, decreasing linearly its activity between pH 6.0 and 7.7 (Fig. 2A). The enzyme activity also showed a negative linear relationship as a function of salinity (Fig. 2B). Regarding temperature, maximum chitobiase activity was achieved at 30-35°C, being reduced at higher temperatures (40 and 45°C) (Fig. 2C). The K_m value was 20.77 μM with significant inhibition at 500 μM MUFNAG (Fig. 2D).

Crustacean chitobiases

K_m values changed according to the animal group considered. These values were 14.67, 18.19, 14.30, and 24.77 μM for the adult mysid *M. elongata atlantica* (Fig. 3A), nauplii barnacle *B. improvisus* (Fig. 3B), decapod zoea (Fig. 3C), and decapod megalopa (Fig. 3D), respectively. In all cases, enzyme activity was significantly inhibited at 500 μM MUFNAG.

DISCUSSION

Results from the present study showed that MUF fluorescence resulting from the enzymatic reaction between chitinase and its substrate (MUFNAG) is dependent on water pH and salinity. Therefore, results from tests performed at different reaction conditions need to be corrected for the influence of those parameters (pH and salinity) before comparisons could be made. Calibration curves showed in the present study can be employed for this purpose in the case of studies using the same methodology employed here. However, these studies report the pH of the reaction media but not salinity, complicating such corrections and comparisons.

In the present study, the whole body chitinase activity was evaluated in the copepod *A. tonsa*. Studies performed with Euphausiacea and Decapoda crustaceans have reported the presence of chitinase activity in both epidermis and digestive tract (Saborowski and Buchholz, 1999; Zou and Fingerman, 1999c). The enzyme likely has different functions in these tissues in spite of the fact that they were never evaluated separately. Considering that copepods show omnivore and carnivore food habits, it is suggested that these animals also present chitinase not only in the epidermis for molting, but also in the digestive tract for food digestion.

Chitinase from the epidermis would be associated with the degradation of the chitin present in the crustacean cuticle. Considering the direct contact of the epidermis with the environmental medium, enzyme activity could be influenced by water physicochemical parameters such as pH, salinity and temperature. Therefore, the enzyme kinetics as a function of these abiotic factors could reflect the species adaptation to particular environmental conditions.

Chitinaes from different sources showed a similar response to water pH. In the copepod *A. tonsa*, maximum enzyme activity was observed between pH 5 and 6 (Fig.

2A), as reported for other organisms (Vrba and Macháček, 1994; Oosterhuis et al., 2000), including the copepod *Neocalanus plumchrus* (Sastri and Dower, 2006), different tissues of decapods (Zou and Fingerman, 1999a) and the fungi *Talaromyces emersonii* (Table 1). Other enzymes like amylase in the copepod *Heliodiaptomus viduus* (Dutta et al., 2006) and chitinase of *Artemia* (Funke and Spindler, 1989) also showed maximum activity at pH close to those reported for chitobiase (pH 6.0 and 5.8, respectively).

Despite the excellent pH buffering capacity of seawater, *A. tonsa* can be subjected to pH changes when exposed to the low salinities occurring in estuaries. A decrease in water pH to values close to that for maximum activity of both chitobiase and chitinase should increase copepod growth rate. However, previous studies showed that an increase in CO₂ concentration and a decrease in water pH did not affect survival, body size or growth rate in the copepod *A. tsuensis* (Kurihara and Ishimatsu, 2008). These findings suggest that the increased enzyme activity induced by lowering pH is not paralleled by an increase in copepod growth. This fact could be associated with a shift in energy allocation from growth to other metabolic processes related to animal survival such as respiration, osmoregulation and excretion. A lower ability to take up and process food at low water pH also cannot be ruled out. In fact, a raise in water pH up to 8.5 was shown to increase the filtration rate and grazing in the copepod *Schmackeria dubia* (Changling et al., 2008). Therefore, less food would be obtained at pH 6 than at pH 8.5, i.e., a lower amount of carbon is available for copepod growth at pH 6. These findings indicate that energy availability would be more limiting for *A. tonsa* growth than chitobiase activity, especially at low water pH.

Regarding temperature, maximum activity of *A. tonsa* chitinase was observed at 30 and 35°C. These values are close to those found for the chitinase of the copepod *Temora longicornis* (35 and 40°C) (Baars and Oosterhuis, 2007). Other enzymes from copepods also show maximum activity at a similar range of temperature. For example, maximum activity of aspartate transcarbamylase in the copepod *Calanus helgolandicus* was achieved at 35°C (Bieganski and Bergeron, 1998). Also, the amylase of the copepod *Heliodiaptomus viduus* shows its maximum activity at 30°C (Dutta et al., 2006). However, *A. tonsa* chitinase showed a maximum activity at lower temperatures than those observed for other species from different groups (Table 1) like the cladoceran *Daphnia magna* (45-50°C) (Espie and Roff, 1995), the decapod *Uca pugilator* (50-60°C) (Zou and Fingerman, 1999c) and the fungi *T. emersonii* (75°C) (O'Connell et al., 2008).

The observed similarity of *A. tonsa* and *T. longicornis* in respect to chitinase response to temperature can be explained by the close taxonomic relation between these two copepod species. Also, this could be associated with the similarity of environments where they live. Both species are planktonic and inhabit water with maximum temperatures not exceeding 30°C. On the other hand, the difference between copepods and *U. pugilator* can be explained considering the fact that this crab can be subjected to higher temperatures during the air exposure period associated with the low-tide condition (Wilkins and Fingerman, 1965). Regarding the fungi *T. emersonii*, the extremely high optimum temperature (75°C) for chitinase maximum activity can be explained by the fact that this species is thermophilic (Arora et al., 1991).

According to findings discussed above for *A. tonsa* and other species, changes in chitinase properties seems to be more associated with temperature than pH adaptation.

However, enzyme adaptation as a function of salinity has never previously been evaluated, especially when coastal and estuarine species are considered.

The copepod *A. tonsa* is cosmopolitan, being more abundant in subtropical estuaries. This species is euryhaline, surviving in salinities ranging from 0 to 72 ppt (Cervetto et al., 1999). However, any life stage of *A. tonsa* is not commonly found in environments with predominance of freshwater. Furthermore, nauplii *A. tonsa* show low survival rates in low salinities (Chinnery and Williams, 2004). In fact, larval stages of this copepod show maximum survival rates in salinities ranging from 15 to 25 (Tester and Turner, 1991; Cervetto et al., 1999). Also, it has been shown that growth rates are limited in salinities lower than 15 ppt (Chinnery and Williams, 2004) and higher than 30 ppt (Cervetto et al., 1999). Considering the important role of chitinase in larval molting, it would be expected that maximum chitinase activity could be observed in salinities ranging from 15 to 25 ppt. However, maximum enzyme activity was observed in freshwater, with significant decrease with increasing salinity (Fig. 2B). Despite the significant decrease in chitinase activity as a function of increasing salinity, it is suggested that the observed enzyme activity in the range of 15 to 25 ppt, i.e., 68 to 47% of that measured in freshwater, would not be a limiting factor for *A. tonsa* growth (molting) under these saline conditions. However, the extremely decreased enzyme activity observed in salinity 30 ppt, i.e., only 33% of that measured in freshwater, suggests that chitinase activity might be a limiting factor for copepod growth at 30 ppt salinity or higher.

Since chitinase activity seems not to be the limiting factor for *A. tonsa* growth in low salinities, the reduced growth could be associated with the higher energy expenditure for osmoregulation at these saline conditions. In fact, the copepod *A. tonsa*

shows reduced free amino acid concentration, increased oxygen consumption and increased ammonia excretion as water salinity decreases (Farmer and Reeve, 1978). Taken altogether, findings from the present study and those reported in the literature indicate that optimum salinity for enzyme activity is not related to the environmental salinity for maximum survival and growth (Cervetto et al., 1999).

According to Peters et al. (1998), modifications in enzyme affinity for its substrate (K_m) can be associated with alterations in the enzyme kinetic properties to achieve different catalytic rates in response to changes in environmental conditions. Results from the present study indicate a significant variation in chitinase K_m values among species and life stages of crustaceans (adult copepod *A. tonsa*, adult mysid *M. elongata atlantica*, nauplii barnacle *B. improvisus*, Decapoda zoea, and Decapoda megalopa) collected in the Patos Lagoon estuary and the Cassino Beach. Chitinase K_m values ranged from 14.30 μM for Decapoda zoea to 24.77 μM for Decapoda megalopa. Despite this variation, values were closer amongst themselves than with those reported for organisms from the Northern Hemisphere, which vary from 55 μM for the copepod *T. longicornis* and 203 μM for the hepatopancreas of the crab *U. pugilator* (Table 1).

In fact, K_m values determined for all organisms evaluated in the present study are lower than those reported for crustaceans from the Northern Hemisphere. Chitinase K_m for the copepod *A. tonsa* was found to be 20.77 μM , while it was reported to be 55 μM for the copepod *T. longicornis* (Oosterhuis et al., 2000). Furthermore, the K_m values for chitinases of the mysid *M. elongata atlantica* (14.67 μM) and the meroplanktonic larvae (barnacle nauplii *B. improvisus*, 18.19 μM ; decapod zoea, 14.30 μM ; decapod megalopa, 24.77 μM) were found to be much lower than those for the

chitobiase of the epidermis (190 μM) and hepatopancreas (203 μM) of the decapod crab *U. pugilator* (Zou and Fingerman, 1999c).

Based on the discussed above, differences in K_m values among chitobiases from different crustacean species seem to be related to the habitat occupied by species. This statement is based on the fact that subtropical estuarine species from the South Atlantic analyzed in the present study showed K_m values much lower than other crustacean species from the Northern Hemisphere. As observed for temperature, bigger differences in enzyme properties are found between crustaceans and other organisms from groups more phylogenetically distant like protozoans ($K_m < 0.5 \mu\text{M}$), dinoflagelates ($K_m < 0.2 \mu\text{M}$), and bacteria ($K_m > 100 \mu\text{M}$). Furthermore, it is important to note that the concentration of substrate (500 μM MUFNAG) necessary to achieve 50% of the maximum activity (K_m) for the fungi *T. emersonii* inhibited significantly the chitobiase activity of all crustaceans tested in the present study (Fig. 3).

Considering that chitobiase degrades chitin and is widely found in nature, results from the present study together with those reported in the literature show that this enzyme might be differentially evolved in each specific group of organism for a better adaptation to cope with its respective needs. For the aspartate transcarbamylase, it was shown a lack of genetic alteration from Dipterans to Mammals (Jones, 1980). However, the same pattern was not shown for chitobiase, and differences between the digestive and epithelial actions in insects and crustaceans or its extra corporal action in fungi and bacteria could be the origin of the differences found among each enzyme evaluated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) from Brazil in the scope of the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA) and the International Development Research Centre (IDRC) from Canada. T.R. Ávila is a graduate fellow from the Brazilian CAPES. A. Bianchini is a research fellow from the Brazilian CNPq (Proc. #304430/2009-9) and is supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC.

REFERENCES

- Arora, D.K., Rai B., Mukerji, K.G., Knudsen, G.R., 1991. Handbook of Applied Mycology – Soil and plants – Vol. 1, Marcel Dekker. USA.
- Baars, M.A., Oosterhuis, S.S., 2007. Free chitobiase, a marker enzyme for the growth of crustaceans. NIOZ Annual Report 2006, Royal Netherlands Institute for Sea Research, Texel. pp. 62-64.
- Biegala, L.G., Bergeron, J.P., 1998. Optimal assay conditions for aspartate transcarbamylase (ATCase) activity in mesozooplankton. J. Plankton Res. 20, 1205-1218.
- Brendelberger, H., 1997. Bacteria and digestive enzymes in the alimentary tract of *Radix peregra* (Gastropoda, Lymnaeidae). Limnol. Oceanogr. 42, 1635-1638.
- Buchholz, F., 1989. Molt cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive-tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Polar. Biol. 9, 311-317.

- Cervetto, G., Gaudy, R., Pagano M., 1999. Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 239, 33-45.
- Chang, E.S., 1993. Comparative endocrinology of molting and reproduction: insects and crustaceans. Annu. Rev. Entomol. 38, 161-80.
- Changling, L., Xiaoxia, L., Xianghu, H., Binhe, G., 2008. Effects of temperature, salinity, pH, and light on filtering and grazing rates of a calanoid copepod (*Schmackeria dubia*). Sci. World J. 8, 1219-1227.
- Chinnery, F. E. and Williams, J. A., 2004. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. Mar. Biol. 145, 733-738.
- Dutta, T.K., Jana, M., Pahari, P.R., Bhattacharya, T., 2006. The effect of temperature, pH, and salt on amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida). Turk. J. Zool. 30, 187-195.
- Espie J.P., Roff J.C., 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. Physiol. Zool. 68, 727-748.
- Farmer, L., Reeve, M.R., 1978. Role of the free amino acid pool of the copepod *Acartia tonsa* in adjustment to salinity change. Mar. Biol. 48, 311-316.
- Funke, B., Spindler, K.D., 1989. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia*. Comp. Biochem. Physiol. B 94, 691-695.
- Jones, M.E., 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 49, 253-279.
- Kurihara, H., Ishimatsu, A., 2008. Effects of high CO₂ seawater on the copepod (*Acartia tsuensis*) through all life stages and subsequent generations. Mar. Pollut. Bull. 56, 1086-90.

- Lindsay, J. H., 2006. Seasonal activities of chitinase and chitobiase in the digestive tract and serum of cod, *Gadus morhua* (L.). J. Fish. Biol. 30, 495 - 500.
- Mclachlan, A., 1990. Surf zone fauna. In: Mclachlan, A., Brown, A.C. (eds.), Ecology of Sandy Shores. New York, Elsevier, pp.165-187.
- Muzzarelli, R.A.A., 1977. Chitinases and related enzymes. In: Muzzarelli, R.A.A. (Ed.), Chitin. Pergamon, pp. 155-177.
- O'Connell, E., Murray, P., Piggott, C., Hennequart, F., Tuohy, M., 2008. Purification and characterization of a N-acetylglucosaminidase produced by *Talaromyces emersonii* during growth on algal fucoidan. J. Appl. Phycol. 20, 557-565.
- Oosterhuis, S.S., Baars, M.A., Klein Breteler, W.C.M., 2000. Release of the enzyme chitobiase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 196, 195-206.
- Peters, G., Saborowski, R., Mentlein, R., Buchholz, F., 1998. Isoforms of an N-acetyl-b-D-glucosaminidase from the Antarctic krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production. Comp. Biochem. Physiol. B 120, 743-751.
- Richards, S. M., Kelly, S. E., Hanson M. L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. Arch Environ Contam Toxicol. 54, 637-644.
- Sabatini, M. and Martos, P., 2002. Mesozooplankton features in a frontal area off northern Patagônia (Argentina) during spring 1995 and 1998. Sci. Mar. 66, 215-232.
- Saborowski, R. and Buchholz, F., 1999. A laboratory study on digestive processes in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, with special regard to chitinolytic enzymes. Polar Biol. 21, 295-304.

- Sastri, A.R., Roff, J.C., 2000. Rate of chitobiase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1965-1968.
- Sastri, A.R., Dower, J.F., 2006. Field validation of an instantaneous estimate of in situ development and growth for marine copepod communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63, 2639-2647.
- Sekiguchi, H., 1979. Distribution of larvae of *Pinnixa rathbuni* Sakai (Decapoda: Pinnotheridae) in Ise Bay and its neighbouring coastal waters, Central Japan. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45, 141-146.
- Tester, P., Turner, J.T., 1991. Why is *Acartia tonsa* restricted to estuarine habitats? In: *Proc. Fourth International Conference Copepoda*. Bull. Plankton Soc. Japan, Spec. pp. 603-611.
- Vrba, J., Simek, K., Nedoma, J., Hartman, P., 1993. 4-methylumbelliferyl-P-N-acetylglucosaminide hydrolysis by a high-affinity enzyme, a putative marker of protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3091-3101.
- Vrba, J., Macháček, J. 1994. Release of dissolved extracellular b-N-acetylglucosaminidase during crustacean molting. *Limnol. Oceanogr.* 39, 712-716.
- Wilkins, J.L., Fingerman, M., 1965. Heat tolerance and temperature relationships of the fiddler crab, *Uca pugilator*, with reference to body coloration. *Biol. Bull.* 128, 133-141.
- Wooldridge, T. H., 1983. Ecology of beach and surf-zone mysid shrimps in the Eastern Cape, South Africa, In: Mclachlan, A. and Erasmus, T. (Eds.), *Sandy Beaches as Ecosystems*. W. Junk, The Hague. pp. 449-460.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis

and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. C 122, 115–120.

Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of estrogenic agents on chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Ecotoxicol. Environ. Saf. B. 42, 185-190.

Zou, E., Fingerman, M., 1999c. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the coddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. Mar. Biol. 133, 97-101.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Fluorescence of methylumbelliferone (MUF; 50 nM) as a function of (A) pH [$y = 672.44 + 2560.07/(1+\exp(-(x-6.60)/0.41))$; $r^2 = 0.99$] and (B) salinity [$y = 311.25 + 1573.10x/(16.47+x)$; $r^2 = 0.98$]. Data are expressed as mean $\pm$ standard error ($n = 4$). Different letters indicate significantly different mean values ($p < 0.05$).

Figure 2. Chitobiase activity of the copepod *Acartia tonsa* as a function of (A) pH, (B) salinity, (C) temperature, and (D) substrate (MUFNAG) concentration. ▲: inhibitory concentration. Data are expressed as mean $\pm$ standard error ($n = 4$). Different letters indicate significantly different mean values ($p < 0.05$).

Figure 3. Chitobiase activity of crustaceans as a function of substrate (MUFNAG) concentration. Enzyme affinity for the substrate (K_m) was calculated for (A) adult mysid *Metamysidopsis elongata atlantica*, (B) nauplii barnacle *Balanus improvisus*, (C) Decapoda zoea, and (D) Decapoda megalopa. ▲: inhibitory concentration. Data are expressed as mean $\pm$ standard error ($n = 4$). Different letters indicate significantly different mean values ($p < 0.05$).

Table 1. Chitobiase characteristics of different organisms according to enzyme affinity for substrate (K_m ; μM substrate) and optimum pH (OP pH) and temperature (OP T; $^{\circ}\text{C}$). Temperature used to determine the K_m is also given (K_m T; $^{\circ}\text{C}$). In all studies, methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (MUFNAG) was used as substrate.

Organism	K_m	OP pH	OP T	K_m T	Reference
<i>Bodo saltans</i> and <i>Cyclidium</i> sp. (Protozoa)	< 0.5			15	(1)
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Bacteria)	> 100			15	(1)
Bacteria	> 100			25	(2)
<i>Oxyrrhis marina</i> (Dinophyta)	< 0.2			25	(2)
<i>Talaromyces emersonii</i> (Fungi)	500	5.0	75	50	(3)
<i>Daphnia pulex</i> (Cladocera)	56.7			22	(4)
<i>Daphnia magna</i> (Cladocera)	61.5	5.5	45-50	20	(5)
<i>Uca pugilator</i> (Decapoda) epidermis	190	5-6	50-60	19	(6)
<i>Uca pugilator</i> (Decapoda) hepatopancreas	203	5-6	50-60	19	(6)
<i>Temora</i> (Copepoda)		6	35-40	25	(7)
<i>Temora longicornis</i> (Copepoda)	55	~8	55	25	(2)
<i>Neocalanus plumchrus</i> (Copepoda)		5 - 6		25	(8)
<i>Acartia tonsa</i> (Copepoda)	20.8	5-6	30-35	25	Present study

(1) Vrba et al. (1993); (2) Oosterhuis et al. (2000); (3) O'Connell et al. (2008); (4) Vrba and Macháček (1994); (5) Espie and Roff (1995); (6) Zou and Fingerman (1999c); (7) Baars and Oosterhuis (2007); (8) Sastri and Dower (2006).

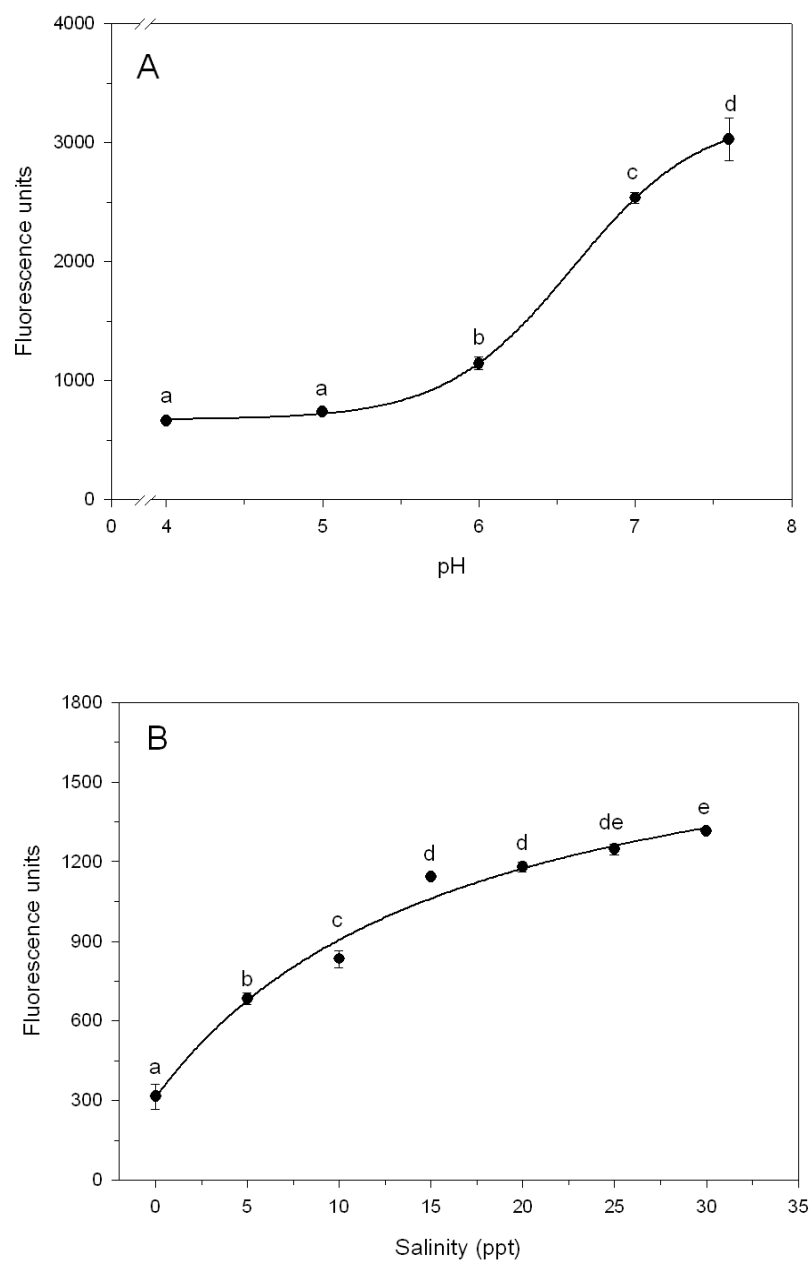


Figure 1

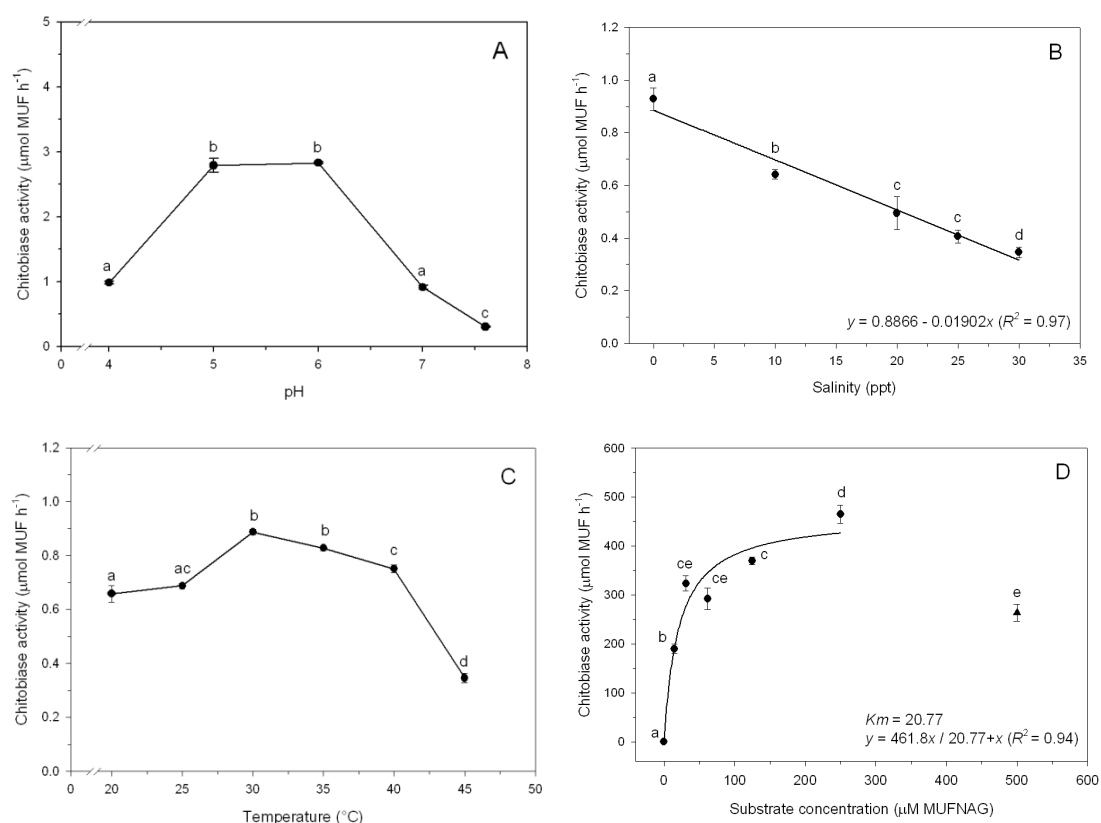


Figure 2

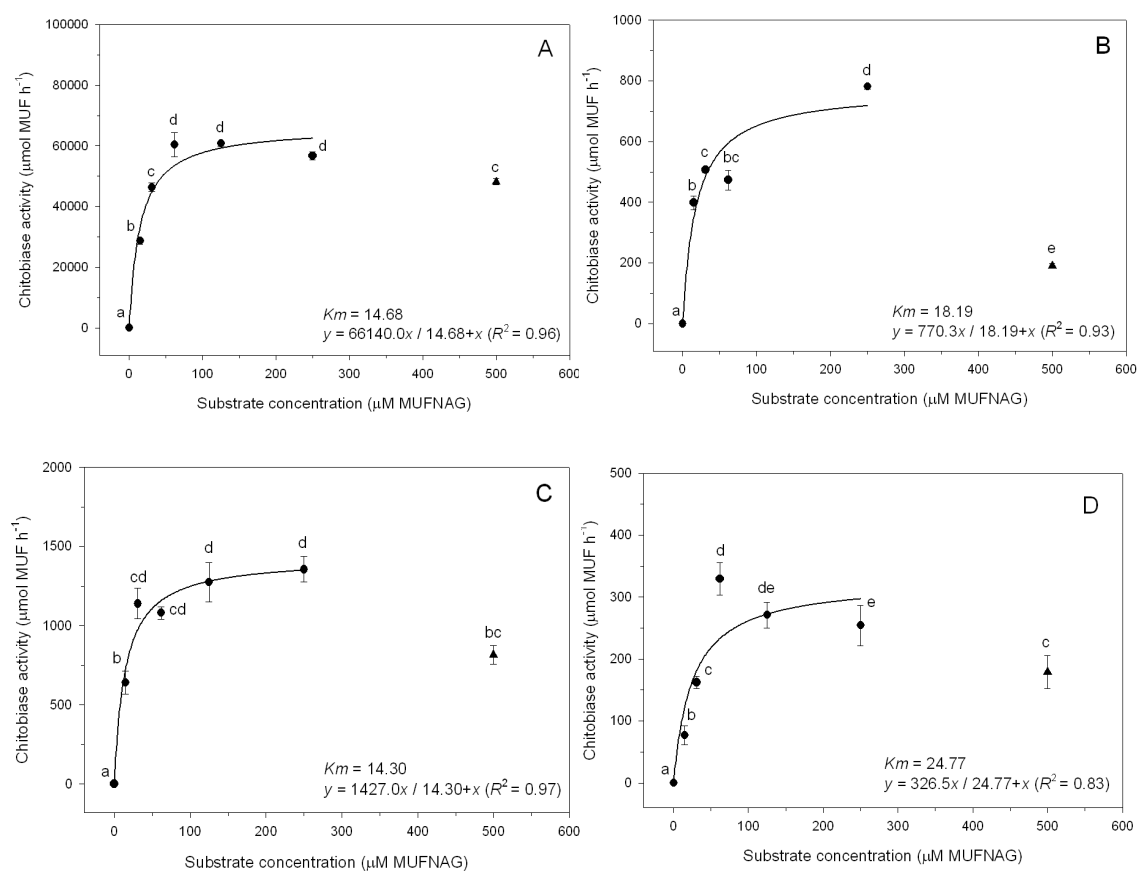


Figure 3

8. APÊNDICE II

Título: Estimation of zooplankton secondary production in estuarine waters:

**Comparison between the enzymatic (chitobiase) method and mathematical models
using crustaceans**

Autores: Tatiana Ramos Avila, Anderson Abel de Souza Machado and Adalto Bianchini

Revista: Limnology and Oceanography

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support is acknowledged to the International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil). A. Bianchini is a research fellow from the Brazilian CNPq (Proc. # 304430/2009-9) and supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC.

ABSTRACT

Sampling was seasonally performed in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil) to estimate zooplankton biomass and production comparing values obtained using traditional mathematical models based on growth and the enzymatic (chitobiase) method. Comparison of data obtained from zooplankton samples collected with 90 and 200- μm mesh nets showed that net selectivity influences the estimative of zooplankton biomass and production. Furthermore, it demonstrated differential dominance of taxa and proportions of developmental stages in samples. Results from analysis using the chitobiase method showed a similar pattern of zooplankton production compared to those obtained with the mathematical models. However, values found were generally higher, with maximum production estimated as 12.5, 9.2 and 7.9 $\text{mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ for the “chitobiase method”, “Huntley model” and the “Hirst model” respectively. These findings indicate the reliability of the enzymatic method in estimating crustacean production also in estuarine environments of changing salinity, as previously demonstrated for marine waters.

INTRODUCTION

Estimative of secondary production in aquatic environments is essential for the study of the energy flux through food webs, since zooplankton organisms are the major link between primary producers and higher trophic levels (Hopcroft and Roff 1998). Although plankton is composed of organisms from several taxonomic groups, crustaceans are generally dominants. Among them, copepods often contribute with the major part of the biomass and species diversity in estuaries (Kleppel et al. 1988).

Production can be defined as the amount of tissue or biomass generated in a certain area and period of time, being expressed as $\text{mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ (Rigler and Downing 1984). Estimations of production are generally obtained using the equation $P = B \times g$, where “P” is production, “B” biomass in the environment, and “g” represents growth rate (Kimmerer 1987; Huntley and Lopes 1992).

Methods for zooplankton biomass estimation are relatively standardized and biomass values are usually known. However, data are generally obtained from samples collected with nets of mesh diameter ranging from 64 to 300 μm (Purcell et al. 1994; Magalhães et al. 2006). It is important to note that net selectivity could have a significant influence on results, differentially representing the dominant species, as well as the proportion of developmental stages present in the environment. In spite of that, the methodology to be employed to determine the organism growth rate represents the major problem in the production estimation process.

Research efforts are concentrated on copepods in marine environments and on copepods and cladocerans in freshwater, since these groups are dominants in the respective environments. Growth estimation is generally based on weight-specific egg

production (Hirst and McKinnon 2001), cohort analysis (Kang et al. 2007), and physiological models (Ikeda et al. 2001). However, growth rates are generally determined based on results from laboratory experiments. In this case, growth rate is derived for a single species or for only few species present in the environment, since this approach is time-consuming. Consequently, a high-resolution estimation of the production considering a spatial-temporal frame is quite difficult to be performed.

With the goal of developing alternative methods to facilitate the secondary production estimation, some mathematical models were developed to estimate growth rate (g) based on growth rates reported by several authors for marine copepods (Huntley and Lopes 1992; Hirst and Bunker 2003) and freshwater crustaceans (Stockwell and Johannsson 1997). It is important to stress that each model differently considers the degree of influence of temperature, food deprivation, and size of organisms as factors affecting growth rate.

Other methods less employed for secondary production are those based on the biochemical relationships and activities of enzymes involved in growth (Biegala and Bergeron 1998). Based on previous studies (Espie and Roff 1995, Oosterhuis et al. 2000), Sastri and Dower (2006, 2009) described a method for estimation of secondary production based on the amount of chitinase released in the water during the crustacean molting process. The rationale behind this method is the existence of a relationship between the dried mass increment observed after growth from the molting stage “ x ” to the “ $x+1$ ” and the enzyme activity in the water, considering a balance between the activity generated by enzyme released by the population and the natural enzyme degradation in the field over time. In fact, tests performed in laboratory with freshwater cladocerans (Sastri and Roff 2000) and marine copepods such as *Temora*

longicornis (Oosterhuis et al. 2000), *Calanus pacificus*, *Metridia pacifica* and *Pseudocalanus spp.* (Sastri and Dower 2006) showed the existence of a positive correlation between the chitobiase activity in the water and the size and biomass of organisms. Also, the existing relationship between enzyme activity and biomass was also shown reliable for decapod and mysid larvae (Sastri and Dower 2009), indicating that the chitobiase method can potentially consider the overall production generated by crustaceans in the water column during the growth period.

Differently from the environments where the chitobiase method was already applied for secondary production estimation, i.e., low temperatures and high water salinities (mean 31 ppt) environments, the estuarine waters from the Patos Lagoon (Rio Grande, RS, Southern Brazil) are often subjected to frequent and wide changes in temperature (15-30°C) and salinity (0-30) over an annual basis (Niencheski et al. 1986). Due to the extreme changes in environmental parameters, biota living in the Patos Lagoon estuary is characterized by a low diversity and the frequent dominance of species adapted to these changes, with occurrence being alternated with marine and freshwater species. A dominance of the copepod *Acartia tonsa* has been historically reported to occur during periods of saltwater intrusion in the Patos Lagoon estuary. However, the copepod *Notodiaptomus incompositus* dominates the zooplankton community during the freshwater runoff (Montú 1980).

With this background in mind, the present study was performed to evaluate the influence of net selectivity on abundance and biomass of juvenile copepods, as well as the influence of these biotic parameters on the secondary production estimation. Additionally, the reliability of the chitobiase method was tested for a complex estuarine environment (Patos Lagoon estuary) by comparing the secondary production values

estimated through this enzymatic method and those generated by using the growth models described by Huntley and Lopes (1992) and Hirst and Bunker (2003) for organisms living in high salinity waters, and the method developed by Stockwell and Johannsson (1997) for freshwater animals.

METHODS

Estimation of secondary production based on mathematical models

The Patos Lagoon estuary (32° S; 52° W) shows a diversity of habitats, including large shallow areas and a deep canal. Water circulation in the estuary is driven by wind and salinity changes according to the intrusion of coastal marine waters and the volume of freshwater discharged into the lagoon towards the Atlantic Ocean (Moller et al. 2001). Considering this diversity of habitats, five different collection sites were selected for this study, as follows: EM (estuary mouth); ME (Mangueira enclosure); WM (west margin of the estuary); NC (navigation channel); and YC (Yatch Club) (Fig. 1).

In each season (25 August 2009, 29 October 2009, 13 January 2010 and 06 April 2010), one sample for zooplankton analysis was collected per site. All collections were performed at the same day. Sampling was performed by horizontal towing at the surface water using a bongo plankton net (0.3 m mouth diameter; 90 and 200- μ m mesh). A flow meter (Hydro-Bios Kiel, Altenholz, Germany) was attached to the net mouth for water flux measurements. Organisms captured were fixed in 4% formaldehyde solution neutralized with sodium tetraborate immediately after collection.

These samples were used for determination of the abundance of larval stages and biomass of copepods and cladocerans.

In the laboratory, sample aliquots containing at least 300 individuals were counted and identified under stereoscopic microscope (Olympus BH-2, Center Valley, Pennsylvania, United States of America), and classified according to Montú and Goeden (1986) and Bradford-Grieve et al. (1999). Calanoida copepods were classified by stages (nauplius, copepodite and adult). Cyclopoida and Cladocera copepods were identified at the genus level.

Production of marine copepods was calculated using the instantaneous growth method defined by the relationship among production (P), biomass (B) and growth rate (g), following the formula $P = B \times g$ (Rigler & Dowling 1984). In the present study, “total biomass” of copepods in the sample (B) was determined by the sum of the biomass obtained for each developmental stage [density of individuals in i stage (individual.m⁻³) x body mass of the individual i (μg C)]. The growth rates were estimated through the equations proposed by Huntley and Lopes (1992) and Hirst and Bunker (2003), while production of freshwater copepods and cladocerans was calculated using the model described by Stockwell and Johannsson (1997) (Table 1). For each sampling site, production of freshwater organisms was added to that estimated by the “Huntley and Lopes” model or the “Hirst and Bunker” model. In the Results section, values are thus referred as “Huntley model” (estimation using Huntley and Lopes + Stockwell and Johannsson models) and “Hirst model” (estimation using Hirst and Bunker + Stockwell and Johannsson models).

“Total production” was calculated adding the biomass of each taxonomic group. For this purpose, the biomass value adopted corresponded to that originated from the

sample showing the higher relative abundance for the respective taxonomic group, disregarding the net mesh used for collection. Similarly, the “juvenile production” was also calculated based on the sum of biomass of the juvenile stages found in the sample. The biomass value adopted for each stage corresponded to that originated from the sample showing the higher relative abundance for the respective stage, disregarding the net mesh used for collection. In both cases, values represented the production closer to the “ideal” conditions for calculations based on fixed samples.

For all mathematical models employed, biomass was obtained for the more abundant Copepoda and Cladocera species present in each sample. Biomass values were obtained through body length measurements and application of the relationships existing between body length and mass to each respective taxonomic group (Table 1).

For the Hirst and Bunker (2003) model, chlorophyll-*a* values were obtained from data generated by the “Projeto Lagoa” (Lagoon Project) and kindly provided by the Phytoplankton Laboratory of the University (Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande – FURG). These values were measured in the Patos Lagoon estuary in previous years. In this case, mean seasonal values were used. For the Stockwell and Johannsson (1997) model, the individual body mass (*M*) was obtained from the relationships reported by McCauley (1984) based on the mean body length of individuals from each Cladocera genus identified and counted in the samples collected in the present study (Table 1). In equations where the biomass is estimated based on dry mass, the correction factor of 0.4 was used to convert dry mass in the amount of carbon (Postel et al. 2000).

Estimation of secondary production based on the chitobiase (enzymatic) method

The estimation the secondary production using the enzymatic method was performed employing the relationship between the chitobiase activity measured in the environment (native chitobiase - CBA_{nat}) and the rate of enzyme activity decay in the field (Sastri and Dower 2009), as well as the relationship between the activity of the enzyme released during the molting process (CBA) and the increment in biomass from the x stage to the $x+1$ stage (ΔB), which was measured in laboratory. Secondary production (P ; $\text{mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) was then calculated using the following equation: $P = \Delta B / T_{cba}$, where ΔB is the biomass increment in the environment and T_{cba} the time (days) necessary to generate this biomass.

Relationship between increment in dry mass (ΔB) and enzyme activity (CBA)

According to previous reports on the zooplankton composition in the Patos Lagoon estuary, the copepod *Acartia tonsa* was identified as the major representative of crustaceans. Therefore, this copepod species was employed for molting experiments in laboratory.

The enzyme activity from chitobiase released during the molting process of each *A. tonsa* copepodite developmental stage was determined after incubation of individuals at the different life stages in 200 μl of a dilution solution (DS). This solution was prepared with seawater (salinity 30) after being autoclaved and filtered (polycarbonate filter; 0.2- μm mesh filter) to eliminate bacteria and other microorganisms that can influence the rate of enzyme activity decay (Oosterhuis et al. 2000). Every 2 h, copepods were observed under microscope to identify the molted individuals. Activity of chitobiase released was measured in water samples (150 μl) collected from the incubation medium, as described below. Both copepod and exuviae were fixed for

further measurement and calculation of biomass using the relationship between the cephalotorax length and dry mass (Berggreen et al. 1988).

The parameter ΔB was calculated from the difference in the dry mass between the stages x and $x+1$. A natural log transformation was applied to the enzyme activity and ΔB values, which were subjected to regression analysis. The equation $\ln(CBA) = a \ln(\Delta B) + b$ was further employed to determine the secondary production in the Patos Lagoon estuary by replacing the term CBA by the CBA_{nat} value for each data point. The ΔB value (μg dry mass) added to the environment in the respective period of time was then calculated. The period of time (T_{cba}) was determined from the rate of enzyme activity decay in the field (Sastri and Dower 2009).

Estimation of secondary production in the field based on the chitobiase activity

Secondary production in the Patos Lagoon estuary was estimated based on the chitobiase method for the five sampling sites described above. In each sampling site, 300 mL of surface water were collected, filtered (30- μm mesh filter) to remove crustaceans, and stored in glass vials. Aliquots of these samples were filtered (0.02- μm mesh sterile filter) and frozen in glass vials. These water aliquots were labeled as “Native Chitobiase” (CBA_{nat}). The remaining sample was employed for determination of the rate of enzyme activity decay over time.

Enzyme activity decay essay was performed using an enzyme concentrated obtained after homogenization of 50 individuals of the dominating species in the respective sampling site. Homogenates were centrifuged (5 min; 10,000 $\times g$) and the supernatant obtained was filtered (0.2- μm mesh filter). The concentrated containing the enzyme was added to the water samples collected at the five sampling sites in the Patos

Lagoon estuary. Reaction flasks were kept at the same temperature of the environmental water. Aliquots of the reaction medium were then collected until 24 h of test were completed. These aliquots were filtered and frozen as described above for the CBA_{nat} samples. Enzyme activity values were log transformed and a regression line between enzyme activity and reaction time was built. The regression slope value (k) corresponded to the enzyme activity decay. Therefore, $-1/k$ was applied to determine the time (h) to generate ΔB (i.e., Tcba). The Tcba value derived was divided by 24 h to express results in days.

Chitobiase assay

Chitobiase activity was measured following the method described by Oosterhuis et al. (2000) and Sastri and Dower (2006) with some modifications. Briefly, the substrate methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (MUFNAG, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the enzyme assay. A stock solution (9 mM MUFNAG) was prepared dissolving MUFNAG in dimethylsulfoxide. For enzyme assays, the stock solution was diluted to give a final concentration of 250 μ M MUFNAG. Assay tubes were filled with water sample (486 μ l) and diluted MUFNAG (14 μ l). Controls were also run using only the dilution solution (DS) without the enzyme source and/or the substrate (MUFNAG).

Chitobiase reaction with the substrate (MUFNAG) releases the fluorescent methylumbelliferone (MUF). Therefore, after have been prepared in assay tubes, aliquots of the reaction medium were transferred to a 96-wells microplate for fluorescence readings (excitation: 360 nm; emission: 450 nm) at 25°C using a spectrofluorometer (Hitachi F-2000; Tokyo, Japan). Fluorescence readings were

performed every 5 min up to 60 min. Increment in fluorescence over time corresponded to the free chitinase activity in the water and was expressed as the amount of MUF produced per hour ($\text{nmol MUF L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Data were calculated based on a calibration curve built with different concentrations of 4 - methylumbelliferone (Sigma, St. Louis, MO, USA). As water salinity influences the fluorescence generated by MUF and chitinase activity, results were corrected accordingly (T.R. Avila, A.A. Machado, A. Bianchini unpubl.).

Comparison among estimation methods

Comparison among the mean total production values estimated based on the mathematical models and the enzymatic method used were performed through regression analyses using the software Statistica version 6.0 (Statsoft, USA).

RESULTS

Depth of sampling sites used in the present study ranged from 4 to 12 m. Water temperature and salinity did not change significantly among sites within the same season, but showed significant seasonal variations. Minimum and maximum temperature recorded were 16 and 25°C, respectively. Minimum and maximum salinity were 0 and 4, respectively. The lower water pH was found in the winter (pH 6.5). The mean pH in the other seasons was 7.6 (Table 2).

Seasonal mean values of chlorophyll-*a* obtained from the databank of the “Projeto Lagoa” (Lagoon Project; Laboratory of Phytoplankton, Federal University of Rio Grande - FURG, Brazil) were employed in the “Hirst model” (Hirst and Bunker

2003) and corresponded to 3.9, 2.6, 2.4 and 1.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for winter, spring, summer and autumn, respectively.

Zooplankton biomass

Biomass for each taxonomic group studied showed significant changes among seasons and sampling sites within the same season. The copepod *A. tonsa* virtually represented 100% of the zooplankton biomass in the winter. However, it was not found in spring and winter, being replaced by the copepod *N. incompositus* and cladocerans. Cladocerans and Cyclopoida copepods were identified at the genus level. However, they were grouped for analyses of biomass and production.

In winter, *A. tonsa* showed the highest biomass (24.57 mg C m^{-3}) at the WM site when the 200- μm mesh net was used. The minimum value corresponded to 1.3 mg C m^{-3} at the NC site using the 90- μm mesh net. In autumn, the maximum biomass was also found for *A. tonsa* (0.92 mg C m^{-3}), but at the ME site using the 90- μm mesh net. In spring, the copepod *N. incompositus* and cladocerans showed the highest biomass values (12.04 and 10.02 mg C m^{-3} , respectively). Although these organisms showed the higher biomass in the summer, maximum values were only 2.03 and 1.38 mg C m^{-3} (Table 3).

During the whole period of study, the highest biomass values were found in winter (25.29 mg C m^{-3}) and spring (24.98 mg C m^{-3}) with annual mean values of 13.64 and 9.7 mg C m^{-3} , respectively. The lowest value was observed in autumn (0.07 mg C m^{-3}) with a mean annual value of 0.5 mg C m^{-3} .

Net selectivity

The different selectivity of nets (90 and 200- μm mesh nets) employed in the present study reflected in different values of the biomass calculated for samples from the same site of collection. For example, biomass values for *A. tonsa* collected in winter at the ME site corresponded to 3.58 and 17.08 mg C m^{-3} for the 90- and 200- μm mesh nets, respectively. Biomass values for cladocerans collected in spring at the YC site corresponded to 7.23 and 2.85 mg C m^{-3} for the 90- and 200- μm mesh nets, respectively (Table 3). For all taxa evaluated, net selectivity influenced the estimation of biomass, with higher mean values for the 200- μm mesh net in three seasons (Table 4)

Net selectivity also influenced copepodite and nauplius density results. Depending on the developmental stage of copepodites, they were more captured by one or another net. However, as expected, nauplii showed higher density in all samples collected with the 90- μm mesh net when compared with those collected with the 200- μm mesh net. In some sampling sites where nauplii were not found in samples collected with the 200- μm mesh net, density reached values as high as 2,343 individuals m^{-3} (Table 5).

Chitobiase activity

For the copepod *A. tonsa*, the relationship between the biomass increment from the stage x to the stage $x+1$ (ΔB) and the activity of the enzyme released during the molting process (CBA) was represented by the equation $\ln(\Delta B) = 0.8876 + 0.5847 \times \ln(\text{CBA})$ ($r^2 = 0.98$; $p < 0.05$; $n = 47$ molted copepods) (Fig. 2).

Figure 3 shows the transformed data [$\ln(x)$] of the chitobiase activity over time for each collection site in spring. The Tcba values were calculated from the regression

slope (k) for each collection site. The same procedure was adopted for all samples collected for secondary production determination through the enzymatic method.

Zooplankton production for the different estimation methods

Both mathematical models and the enzymatic method detected the differences among samples collected at the different sampling sites at the same day. They were also able to detect the seasonal variation in production (Fig. 4).

Regarding the mathematical models, values estimated by the “Huntley model” were generally higher than those estimated by the “Hirst model” for both “total production” (adults + juveniles) and “juvenile production”. Mean production followed the same pattern showed by biomass with higher values being estimated from data collected with the 200- μm mesh net in three seasons. The higher mean value was observed in winter ($4.35 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$), decreasing in the other seasons, disregarding the mathematical model employed or the mesh net used for zooplankton collection. The lower mean value ($0.05 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) was observed in autumn (Table 4).

Considering production estimated based on the zooplankton samples collected at each estuarine sampling site using the mathematical models, as well as that estimated using the enzymatic method ($12.5 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$), the higher total production calculated using the “Huntley model” was observed at the ME site ($9.2 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) in spring. For the “Hirst model”, the higher production was also found at the ME sampling site, but in summer ($7.9 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$). In turn, the lower production was estimated in autumn at all sampling sites, being below $1 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ for both “Huntley” and “Hirst” models and approximately $2 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ for the chitobiase method (Fig. 4).

Net mesh, mathematical model, and estimation method (mathematical model or enzymatic method) employed were shown to influence the result obtained for the zooplankton production estimation. Differences among mean values estimated for the two nets using the same model were higher than those found using the different mathematical models for the same net, as well as than those obtained using the chitobiase method in winter. In this case, mean production estimated using the “Huntley model” was $2.55 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ higher for samples collected with the 200- μm mesh net than for those collected with the 90- μm mesh net, while the difference between values estimated using the “Huntley model” and the chitobiase method and between the “Huntley model” and the “Hirst model” was only 1.12 and $1.34 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$, respectively. In the other seasons, the main factor responsible for the differences observed in production values was the method employed for estimation. In this case, the higher difference ($4.75 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) was found for winter samples when production values were estimated using the “Hirst model” and the chitobiase method (Table 4).

Taken all sampling sites and seasons together, the slope of the regression between the mean production values estimated based on the “Huntley model” and the chitobiase method was not different from 1 ($b = 1.12 \pm 0.16$; $n = 20$; $R^2 = 0.73$; $p < 0.001$). A similar result was found for the regression analysis between data obtained for the “Hirst model” and the chitobiase method ($b = 1.21 \pm 0.26$; $n = 20$; $R^2 = 0.55$; $p < 0.001$). In all cases, production values estimated based on the enzymatic method were systematically higher than those generated by the mathematical models. The magnitude of this difference corresponded to 1.95 ± 0.58 and $2.494 \pm 0.73 \text{ mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ for the “Huntley model” and the “Hirst model”, respectively. These values were derived from the intercept of the regression curves referred above.

DISCUSSION

In the present study, zooplankton analysis in the Patos Lagoon estuary was performed based on only one collection per sampling site at each season. Despite that, water temperature data obtained are similar to the mean values representatives of each season (Niencheski et al. 1986). Regarding water salinity, low mean values are frequent in the estuarine waters from Patos Lagoon. However, the low mean values found in all seasons in the present study are indicative of the Oscillation phenomenon occurring in the South Pacific (El Niño) observed during the study. This phenomenon causes an increase in the pluviometric index in the whole drainage basin of the Patos Lagoon increasing the freshwater flow through the estuarine area (Fernandes et al. 2002).

The long periods of low water salinity (0-4) and the volume of freshwater discharged through the estuary mouth prevented the intrusion of coastal marine waters into the estuarine area, influencing the zooplankton composition. The expected presence of the copepod *A. tonsa* year round did not occur, with organisms appearing only in the winter and autumn when water of salinity 4 was an indicative of some intrusion of coastal waters into the estuary. With the occurrence of waters of low salinity during spring and summer, the freshwater copepod *N. incompositus* replaced the marine copepod *A. tonsa* and the proportion of freshwater cladocerans and Cyclopoida copepods increased respect to that observed in the winter sampling. It is recognized that only one day of collection per season in five sampling sites at the estuarine area would not be enough to determine the pattern of zooplankton composition, biomass and production for each season. However, differences observed among sampling sites and seasons represented the variations existing among habitats, making the conditions ideal

to evaluate the effectiveness of the methods employed for secondary production estimations.

The present paper is the first to report data of zooplankton biomass in the Patos Lagoon estuary. All taxonomic groups present in samples were identified and quantified. However, calculations were based only on crustaceans. In fact, results showed no significant abundance of other groups, as previously reported for other environments with similar characteristics (Lobo and Leighton 1986). Therefore, values obtained in the present study are representative of the zooplankton total biomass.

With the frequent occurrence of waters of low salinity, it was observed a decrease in the total biomass, as observed in the Tamar estuary (Tasmania) when the peak of biomass (20.5 mg C m^{-3}) occurred in waters of intermediary salinities and the lower values were found in waters of lower salinities (Lopez and Neira 2008). Also, an extremely low abundance of organisms was also reported in the Pensacola Bay when rain events were frequent, causing large discharge of freshwater from rivers into the bay (Murrel and Loes 2004). The higher values of biomass found in the winter ($25.29 \text{ mg C m}^{-3}$) and spring ($24.98 \text{ mg C m}^{-3}$) in the Patos Lagoon estuary are similar to the maximum values reported for the Tasmanian (Tamar estuary; 20.5 mg C m^{-3}) and South African (Kariega estuary; $23.72 \text{ mg C m}^{-3}$) estuaries (Froneman 2001). However, they are lower than those reported for the North American estuaries in the Pensacola Bay (34.1 mg C m^{-3}) (Murrel and Loes 2004) and the Chesapeake Bay (32.4 mg C m^{-3}) (Park and Marshall 2000).

Regarding the differences in biomass observed among sampling sites at the same day of collection, they could be explained considering the dynamic of water circulation in the estuarine area. It causes a higher concentration of organisms in some sectors of

the estuary and defines part of the zooplankton composition, as previously discussed by Montú (1980). In turn, differences observed when biomass values were calculated for each taxonomic group using data from samples collected with nets of different mesh are indicative of a significant influence of net selectivity on the results obtained. The different proportions of sizes collected with higher efficiency by each one of the nets employed (90- and 200- μ mesh nets) reflected in different values of final biomass. In winter, the final biomass of *A. tonsa* was estimated as being more than 2-fold higher with samples collected with the 200- μ m mesh net than with those collected with the 90- μ m mesh net. The different selectivity of nets was also evident when we consider the proportion of nauplii and copepodites collected using one or another net. Higher values were obtained with the 90- μ m mesh net, as previously reported for a comparison between the 64- and 200- μ m mesh nets (Favareto et al. 2009). These findings show the need for using more than one type of net (mesh size) during sampling in order to better evaluate the composition of stages and biomass of zooplankton. Once production data resulting from the application of mathematical models are dependent on the biomass values calculated for field samples, changes in these values directly affect the final data of production for both marine copepods and freshwater organisms.

Regarding the enzymatic (chitobiase) method, the relationship between ΔB values and activity of chitobiase released in the water during the molting process (CBA) found for the copepod *A. tonsa* in the present study showed a similar pattern reported for the Copepoda, Mysidacea and Decapoda evaluated by Sastri and Dower (2009). It is also important to note that the relationship between body length and CBA found for *A. tonsa* in the present study is similar to those reported for the copepod *Temora longicornis* (Oosterhuis et al. 2000) and Cladocera (Espie and Roff 1995; Sastri and

Roff 2000). These findings indicate that the terms of the equation used to estimate secondary production in the present study ($P = \Delta B/Tc_{ba}$) would be valid and reliable.

The methodology employed to estimate the rate of enzyme activity decay over time in the field, and therefore to calculate the Tc_{ba} values, was also effective. Results obtained showed an enzyme activity behavior similar to that described by Oosterhuis et al. (2000) and Sastri and Dower (2006; 2009). As only Sastri and Dower (2009) applied the chitobiase method to estimate secondary production in the field, estimations for the Patos Lagoon estuary made in the present study strictly followed the protocol described by these authors. However, the Patos Lagoon estuary shows frequent changes in water salinity, as opposed to the environments previously evaluated. As the chitobiase activity is dependent on water salinity, correction factors were calculated considering the influence of this water parameter on enzyme activity and final data were corrected using the experimentally derived factors, as described above in the Material and Methods section. Nevertheless, the enzymatic (chitobiase) method showed to be efficient in estimate crustacean production in the water column, thus being its application indicated also for secondary production in estuarine waters.

The maximum values of secondary production calculated in the present study were 12.5, 9.2 and 7.9 mg C m⁻³ day⁻¹ for the chitobiase method, “Huntley model” and “Hirst model”, respectively. These values are comparable to those estimated by Miyashita et al (2009) for the Santos estuarine system (Santos, SP, Southeastern Brazil) with maximum values of 5.4 and 14.3 mg C m⁻³ day⁻¹ using the models described by Hirst and Lampitt (1998) and by Huntley and Lopes (1992), respectively. As observed in the present study, the minimum values reported by Miyshita et al. (2009) were also lower than 1 mg C m⁻³ day⁻¹. Also, minimum and maximum values of 3 and 8 mg C m⁻³

day⁻¹ for copepod production and of 2.90 and 12.40 mg C m⁻³ day⁻¹ for total production were reported for the Skagerrak Strait (Peterson et al. 1991) and the Ria de Aveiro estuary (Leandro et al. 2007), respectively. Therefore, results of production found for the Patos Lagoon estuary in the present study are within the range of values reported for the other estuaries mentioned above. However, it is important to note that results reported in the present study were obtained during the occurrence of the El Niño phenomenon, when a significant increase in the flow of freshwater is observed through the estuarine area. Therefore, it is expected that different production values can be found in years when the El Niño phenomenon is not present.

As observed in the present study, differences in the estimation of secondary production values using different methods were also previously reported in the literature. For example, Miyashita et al. (2009) estimated significantly higher production values using the model described by Huntley and Lopes (1992) when using the model described by Hirst and Lampitt (1998). Leandro et al. (2007) also reported 22% higher values using the model described by Huntley and Lopes (1992) when using the model described by Hirst and Bunker (2003). Therefore, differences among the estimation capacity of the mathematical models and the enzymatic method would be also expected. In the present study, the generally higher production values estimated using the chitobiase method could be explained considering different aspects. It is clear that net selectivity directly influences the production values estimated by the mathematical models, as a consequence of the net selectivity effect on the biomass estimation. A “loss of biomass” could have occurred if bigger organisms escaped from the net or the smaller ones passed through the mesh net. In both cases, biomass values estimated from collected samples would be underestimated. In the other hand, the

enzymatic method considers all the chitobiase present in the water sample. Therefore, it is possible that some copepods that have contributed to the total chitobiase measured in the water sample have died or were predated after having released the enzyme. Furthermore, other sources of chitobiase such as benthic crustaceans could be also contributing for the total enzyme measured in the water column. In these cases, the chitobiase method would be overestimating the production values.

It is also important to stress the current inexistence of a completely accepted method for secondary production estimation. This is a consequence of the variety of factors affecting this analysis, being difficult to precisely determine the efficiency of each method employed. Therefore, it is not possible to ascertain if one value of production estimated by one of the methods employed in the present study is more reliable than another value estimated using a different method (mathematical model or enzymatic method). However, it is important to consider that the mathematical models were employed in the present study as reliable tools to estimate secondary production in the Patos Lagoon estuary, since these models consider ecological parameters such as biomass and growth rate, which have been longer studied. In this context, they were also employed in the present study to evaluate the capacity of the enzymatic (chitobiase) method in estimate the expected values found based on the mathematical models. According to the results reported in the present study, we can conclude that the application of the enzymatic method is not limited to marine waters (Sastri and Dower 2009), but can now be extended to estimate secondary production in estuarine areas where the zooplankton community is dominated by crustaceans. As the present study is only the second report on the application of the chitobiase method to estimate secondary production in the field, it is suggested that more studies should be performed in both

estuarine and marine waters to confirm the reliability of the chitobiase method in estimating the secondary production under changing environmental conditions.

REFERENCES

- Berggreen, U., B. Hansen, and T. Kiørboe. 1988. Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Mar. Biol.* **99**: 341–352, doi:10.1007/BF02112126.
- Biegala, I.C., and J.P. Bergeron. 1998. Optimal assay conditions for aspartate transcarbamylase (ATCase) activity in mesozooplankton. *J. Plankton Res.* **20**: 1205–1218, doi:10.1093/plankt/20.7.1205.
- Bradford-Grieve, J.M., E.L., Markhaseva, C.E.F., Rocha, and B. Abiahy. 1999. Copepoda, p. 869-1098. *In* D. Boltovskoy [ed.], *South Atlantic Zooplankton*. Backhuys Publishers, v.2, Leiden.
- Espie, J.P., and J.C. Roff. 1995. A biochemical index of duration of the molt cycle for planktonic Crustacea based on the chitin-degrading enzyme, chitobiase. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1028-1034.
- Favareto, L.R., G. Perbiche-Neves, M. Serafim-Júnior, and L.P. Sartori. 2009. Selectivity of plankton nets over planktonic Copepoda in two sub-tropical estuaries. *Acta. Limnol. Bras.* **21**: 67-77.
- Fernandes, E.H.L., K.R. Dyer, O.O. Moller, and L.F.H. Niencheski. 2002. The Patos Lagoon hydrodynamics during an El Niño event (1998). *Contin. Shelf Res.* **22**: 1699-1713, doi:10.1016/S0278-4343(02)00033-X.

- Froneman, P.W. 2001. Seasonal changes in zooplankton biomass and grazing in a temperate estuary, South Africa. *Est. Coast. Shelf Sci.* **52**: 543-553, doi:10.1006/ecss.2001.0776.
- Hirst, A.G., and R.S. Lampitt. 1998. Towards a global model of in situ weight-specific growth in marine planktonic copepods. *Mar. Biol.* **132**: 247-257, doi:10.1007/s002270050390.
- Hirst, A.G., and A.J. Bunker. 2003. Growth of marine planktonic copepods: global rates and patterns in relation to chlorophyll *a*, temperature, and body weight. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1988–2010, doi:10.4319/lo.2003.48.5.1988.
- Hirst, A.G., and A.D. Mckinnon. 2001. Does egg production represent adult female copepod growth? A call to account for body weight changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **223**:179-199, doi:10.3354/meps223179.
- Hopcroft, R.R., and J.C. Roff. 1998. Zooplankton growth rates: the influence of size in nauplii of tropical marine copepods. *Mar. Biol.* **132**: 87-96, doi:10.1007/s002270050374.
- Huntley, M.E., and M.D.G. Lopez. 1992. Temperature-dependent production of marine copepods: a global synthesis. *Amer. Natur.* **140**: 201-242, doi:10.1086/285410.
- Ikeda, T., Y. Kanno, K. Ozaki, A. Shinada. 2001. Metabolic rates of epipelagic marine copepods as a function of body mass and temperature. *Mar. Biol.* **139**: 587–596, doi:10.1007/s002270100608.
- Kang, H.K., Y. J. Kang, and P. Chul. 2007. Production of *Acartia omorii* (Copepoda: Calanoida) in Ilkwang Bay, southeastern coast of Korea. *J. Mar. Systems* **67**: 236–244, doi:10.1016/j.jmarsys.2006.05.014.

- Kimmerer, W.J. 1987. The theory of secondary production calculations for continuously reproducing populations. *Limnol. Oceanogr.* **32**:1-13.
- Kleppel, G.S., D. Frazel, R.E. Pieper, and D.V. Holliday. 1988. Natural diets of zooplankton off southern California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**: 231–241.
- Leandro, S.M., F. Morgado, F. Pereira, and H. Queiroga. 2007. Temporal changes of abundance, biomass and production of copepod community in a shallow temperate estuary (Ria de Aveiro, Portugal). *Est. Coast. Shelf Sci.* **74**: 215-222, doi:10.1016/j.ecss.2007.04.009.
- Lobo, E.A., and G. Leighton 1986. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la Zona Central de Chile. *Revista Rev. Biol. Mar.* **22**: 1-29.
- Lopez, A.L., and F.J. Neira. 2008. Synchronicity between zooplankton biomass and larval fish concentrations along a highly flushed Tasmanian estuary: assessment using net and acoustic methods. *J. Plankton Res.* **30**: 1061–1073, doi:10.1093/plankt/fbn063.
- Magalhães, A., R.M. Costa, T.H. Liang, L.C.C. Pereira, and M.J.S. Ribeiro, 2006. Spatial and temporal distribution in density and biomass of two *Pseudodiaptomus* species (Copepoda: Calanoida) in the Caeté River estuary (Amazon region - north of Brazil). *Braz. J. Biol.* **66**: 421-430, doi:10.1590/S1519-69842006000300006.
- McCauley, E. 1984. The estimation of the abundance and biomass of zooplankton in samples, p.228-265. *In* Downing, J.A., and Rigler, F.H. [eds.] *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwater*. Blackwell, Oxford.

- Miyashita, L.K., M.M. Junior, and Lopes R.M. 2009. Estuarine and oceanic influences on copepod abundance and production of a subtropical coastal area. *J. Plankton Res.* **31**: 815–826, doi:10.1093/plankt/fbp039.
- Möller, O.O., P. Casting, J.C. Salomon, and P. Lazure. 2001. The influence of local and non local forcing effects on the subtidal circulation of Patos Lagoon. *Estuaries* **24**: 297-311, doi:10.2307/1352953
- Montú, M. 1980. Zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos I. Estrutura e variações temporais e espaciais da comunidade. *Atlântica* **4**: 53-72.
- Montú, M.A., and I. Gloeden. 1986. Atlas dos Cladocera e Copepoda (Crustacea) do Estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, Brasil). *Nerítica* **1**: 1-134.
- Niencheski, L.F., J.R. Baptista, C. Hartmann, and G. Filmann. 1986. Caracterização hidrológica de três regiões distintas no Estuário da Lagoa dos Patos – RS. *Acta Limnol. Brasil.* **1**: 47-64.
- Oosterhuis, S.S., M.A. Baars, W.C.M. Klein Breteler. 2000. Release of the enzyme chitobiase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **196**: 195–206, doi:10.3354/meps196195.
- Park, G.S., and H.G. Marshall. 2000. Estuarine relationships between zooplankton community structure and trophic gradients. *J. Plankton Res.* **22**: 121–135, doi:10.1093/plankt/22.1.121.
- Peterson, W.T., P. Tiselius, and T. Kiorboe. 1991. Copepod egg production, moulting and growth rates, and secondary production, in the Skagerrak in August 1988. *J. Plankton Res.* **13**: 131-154, doi:10.1093/plankt/13.1.131.

- Postel, L., H. Fock, and W. Hagen. 2000. Chapter 4, p. 1-32. *In* R.P. Harris, P.H. Wiebe, J. Lenz, H.R. Skjoldal, and M. Huntley [Eds], ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, San Diego.
- Purcell, J.E., J.R. White, and M.R. Roman. 1994. Predation by gelatinous zooplankton and resource limitation as potential controls of *Acartia tonsa* copepod populations in Chesapeake Bay. *Limnol Oceanogr.* **39**: 263-278.
- Rigler, F.H., and J.A. Downing. 1984. A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. Blackwell Scientific, London. 501 pp.
- Sastri, A.R., and J.C. Roff. 2000. Rate of chitobiase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**: 1965–1968, doi:10.1139/cjfas-57-101965.
- Sastri, A.R., and J.F. Dower. 2006. Field validation of an instantaneous estimate of in situ development and growth for marine copepod communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **63**: 2639-2647, doi:10.1139/F06-149.
- Sastri, A.R., and J.F. Dower. 2009. Interannual variability in chitobiase-based production rates of the crustacean zooplankton community in the Strait of Georgia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **388**: 147–157, doi:10.3354/meps08111.
- Sprugel, D.G. 1983. Correcting for bias in log-transformed allometric equations. *Ecology.* **64**: 209–210, doi:10.2307/1937343.
- Stockwell, J.D., and O.E. Johannsson. 1997. Temperature-dependent allometric models to estimate zooplankton production in temperate freshwater lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**: 2350-2360, doi:10.1139/cjfas-54-10-2350.

Table 1. Equations employed to calculate biomass and production of copepods and cladocerans based on zooplankton samples seasonally collected in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil).

<i>Freshwater organisms</i>		
Equation	Reference	Definition of equation terms
Biomass $B = a.L^b$	1	B: biomass (mg dry weight) L: body length (mm)
<i>Daphnia spp.</i> (a=6.0; b=3.62) <i>Diaphanosoma spp.</i> (a=6.95; b=2.07) <i>Bosmina spp.</i> (a=15.1; b=2.53) Cyclopoida (a=4.18; b=2.64) Calanoida (a= 6.81; b= 2.11) Nauplii (a=1.64; b=0.57)		a and b - specific allometric coefficients for each taxonomic group
Production $P = 10^{(a \cdot \log_{10} M + b)} \cdot CF \cdot M \cdot N$	2	M: mean dry body weight (μ g) CF: correction factor = 1.12 (Sprugel 1983) N: abundance of stage in the sample a = -0.23; b = -0.73
<i>Estuarine and marine organisms</i>		
Equation	Reference	Definition of equation terms
Biomass $\log C = 3.319 \log CT - 8.519$ $\log C = 2.919 \log CP - 7.953$	3 3	C: carbon (μ g) CT: total length of nauplii (NI - NIV) (μ m) CP: length of copepodite and adult prosome (CI - CVI)
Growth rate $g = 0.0445 e^{0.111T}$ $\log_{10} g = a [T] + b [\log_{10} PC] +$ $c [\log_{10} Cl-a] + d$	4 5	T: temperature ($^{\circ}$ C) PC: body weight Cl-a: chlorophyll-a a, b, c and d – coefficients varying according to the developmental stage and the spawning strategy (free-spawning or sac-spawners).
Production $P = B \cdot g$		B: biomass g: growth rate

1. McCauley (1984), 2. Stockwell and Johannsson (1997), 3. Berggreen et al. (1988), 4. Huntley and Lopes (1992), 5. Hirst and Bunker (2003).

Table 2. Characteristics of the five sampling sites (SS) in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil) in different seasons (WI: winter; SP: spring; SU: summer; AU: autumn). ME: Mangueira enclosure; EM: estuary mouth; WM: west margin of the estuary; NC: navigation channel; YC: Yatch Club enclosure.

SS	Depth (m)	Temperature (°C)				Salinity				pH			
		WI	SP	SU	AU	WI	SP	SU	AU	WI	SP	SU	AU
ME	5	16	21	26	25	4	0	0	4	6.4	7.6	7.2	7.8
EM	12	16	21	26	25	4	0	0	4	6.5	7.6	7.6	7.7
WM	7	16	21	26	25	4	0	0	4	6.3	7.5	7.4	7.8
NC	12	16	21	26	25	4	0	0	4	6.5	7.4	7.6	7.6
YC	4	16	21	26	25	4	0	0	4	6.5	7.4	7.3	7.6

Table 3. Biomass of each taxon and total biomass of zooplankton for each sampling site (SS) in each season (WI: winter; SP: spring; SU: summer; AU: autumn). Values were calculated from results obtained from samples collected with 200- and 90- μ mesh nets (NM) and are expressed in mg C m^{-3} . Zero (0.00) corresponded to biomass values higher than 0 and lower than $0.003 \text{ mg C m}^{-3}$. EM: estuary mouth; ME: Mangueira enclosure; WM: west margin of the estuary; NC: navigation channel; YC: Yatch Club enclosure.

SS		EM		ME		NC		WM		YC	
NM		200	90	200	90	200	90	200	90	200	90
WI	<i>A. tonsa</i>	9.24	8.07	17.08	3.58	3.54	1.39	24.57	10.24	11.93	4.18
	<i>N. incompositus</i>	0.04	0.31	0.21	-	-	-	0.59	0.18	0.59	0.41
	Cladocera	0.01	0.03	0.02	-	0.18	0.04	0.11	0.07	-	-
	Cyclopoida	0.01	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03
	Total	9.30	8.47	17.33	3.60	3.74	1.45	25.29	10.53	12.53	4.62
SP	<i>A. tonsa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N. incompositus</i>	12.04	1.98	11.18	1.20	0.29	0.30	0.47	0.75	1.16	1.80
	Cladocera	5.39	0.29	10.02	1.78	0.03	0.01	-	-	2.85	7.23
	Cyclopoida	0.95	0.70	3.80	1.79	0.01	-	0.03	0.08	0.29	1.49
	Total	18.38	2.97	25.00	4.77	0.33	0.31	0.50	0.83	4.30	10.52
SU	<i>A. tonsa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N. incompositus</i>	0.12	0.77	0.93	1.57	0.07	0.00	0.16	0.85	1.33	2.03
	Cladocera	0.22	0.81	0.51	1.26	0.92	0.08	0.41	0.82	0.71	1.38
	Cyclopoida	0.02	0.18	0.07	0.16	0.03	0.00	-	0.04	-	0.30
	Total	0.36	1.76	1.51	2.99	1.02	0.08	0.57	1.71	2.04	3.71
AU	<i>A. tonsa</i>	0.64	0.77	0.59	0.92	0.23	0.25	0.07	0.08	0.20	0.02
	<i>N. incompositus</i>	0.02	0.10	0.13	0.03	0.08	0.13	0.03	0.03	0.04	0.04
	Cladocera	0.03	0.03	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
	Cyclopoida	0.00	0.01	0.02	0.01	0.04	0.07	0.01	0.00	0.04	0.01
	Total	0.69	0.91	0.78	0.97	0.36	0.46	0.12	0.12	0.30	0.07

Table 4. Mean biomass for each season calculated based on results from samples collected with nets of different mesh size (200 and 90 μm) and mean production calculated using the “Huntley model”, the “Hirst model” and the chitobiase method for the zooplankton of the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil).

Net mesh (μm)	Mean biomass (mg C m^{-3})		Mean production ($\text{mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$)				
			Huntley model		Hirst model		Chitobiase
	200	90	200	90	200	90	
Winter	13.64	5.73	4.35	1.80	3.84	2.45	5.55
Spring	9.70	3.88	3.51	1.20	2.07	0.85	7.08
Summer	1.10	2.05	0.56	1.12	0.22	0.52	3.87
Autumn	0.44	0.50	0.30	0.35	0.05	0.18	2.35

Table 5. Mean density (individuals m^{-3}) of individuals at different developmental stages (DE; C: copepodites; N: nauplii) for each sampling site (SS) and season (WI: winter; SP: spring; SU: summer; AU: autumn) collected with nets of different mesh size (NM: 200 and 90 μm) in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil). EM: estuary mouth; ME: Mangueira enclosure; WM: west margin of the estuary; NC: navigation channel; YC: Yatch Club enclosure.

SS	DE	EM		ME		NC		WM		YC	
NM		200	90	200	90	200	90	200	90	200	90
WI	C	2368	1076	13977	13453	3296	2878	3939	4020	4054	1005
	N	0	4305	932	6115	0	1245	0	3544	0	905
SP	C	7616	1349	7333	287	210	208	381	1080	105	324
	N	55	372	333	2156	6	375	0	170	2874	180
SU	C	128	516	387	1036	158	213	86	593	874	1143
	N	0	1793	0	1461	0	1340	0	2343	0	1543
AU	C	52	212	377	201	141	294	0	76	0	63
	N	69	3434	152	3289	0	1324	81	3652	27	3043

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Location of the five sampling sites in the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil). EM: estuary mouth; ME: Mangueira enclosure; WM: west margin; NC: navigation channel; YC: Yatch Club enclosure.

Figure 2. Relationship between the natural logarithm of the increment in dry weight from stage x to the stage $x+1$ ($\ln \Delta B$) and the activity ($\text{nmol MUF L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) of the chitobiase (CBA) released during the molting process of *Acartia tonsa* copepodites (CI-CVI).

Figure 3. Chitobiase activity decay over time for each sampling site of the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil) during spring.

Figure 4. Total and juvenile secondary production ($\text{mg C m}^{-3} \text{ day}^{-1}$) calculated using the “Huntley model”, the “Hirst model” and the chitobiase method for each sampling site of the Patos Lagoon estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil) in each season.

Fig. 1

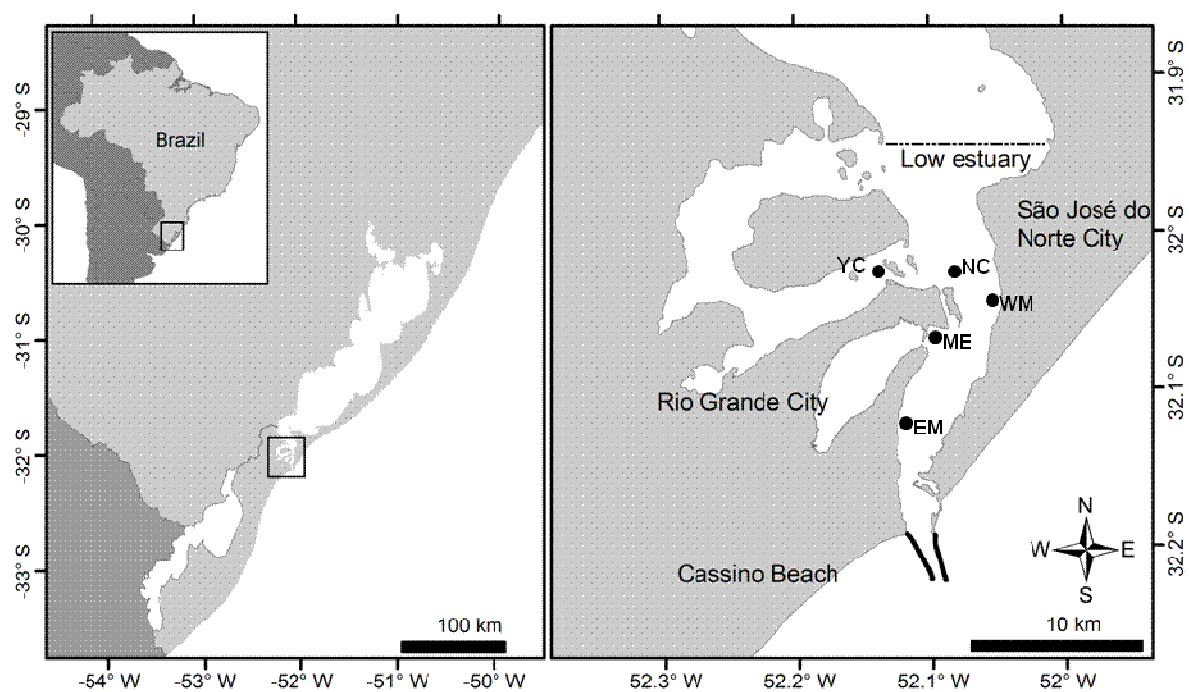


Fig. 2

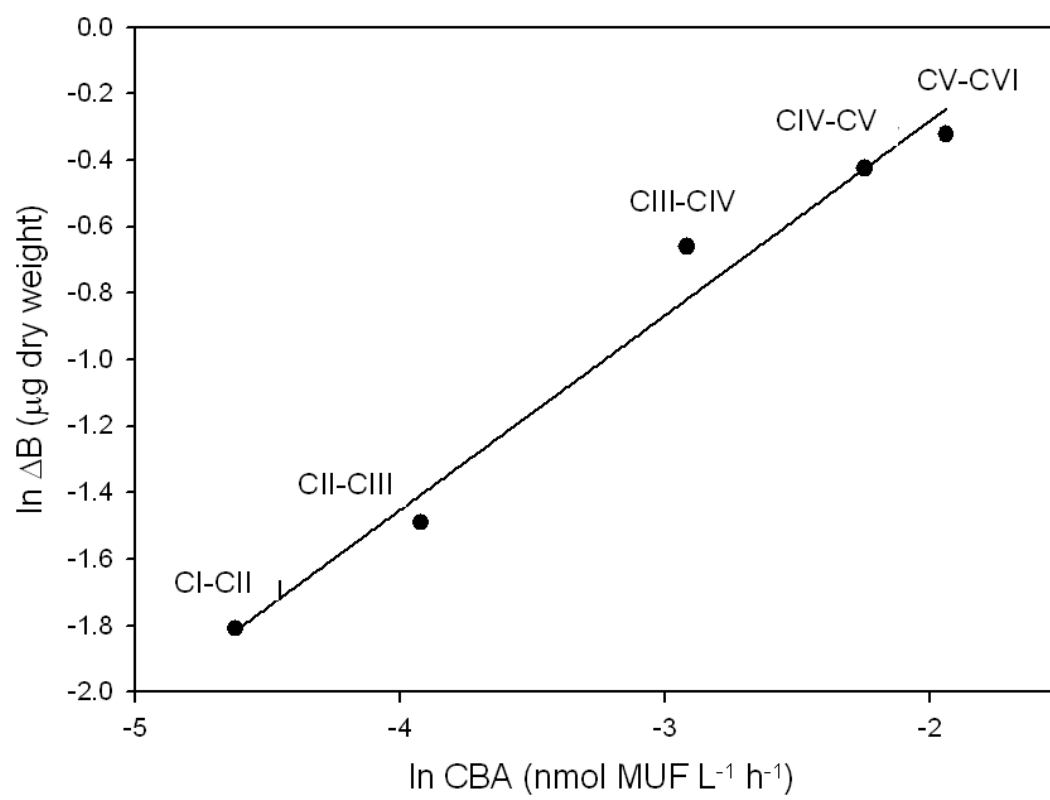


Fig. 3

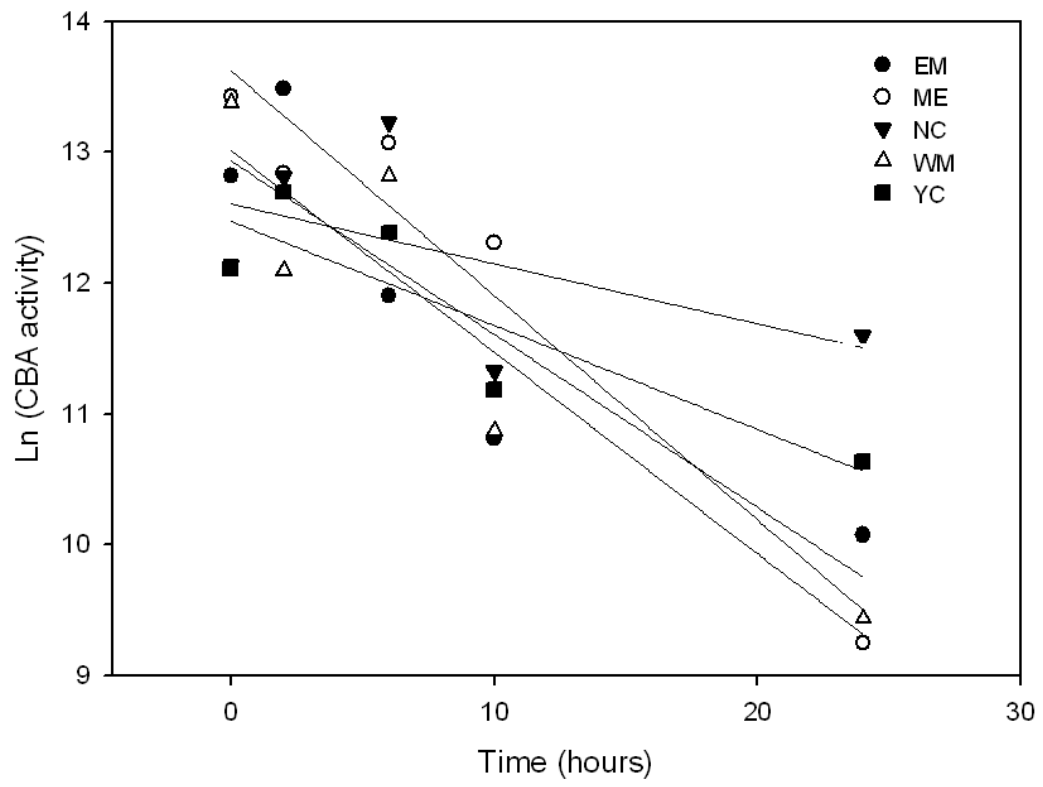
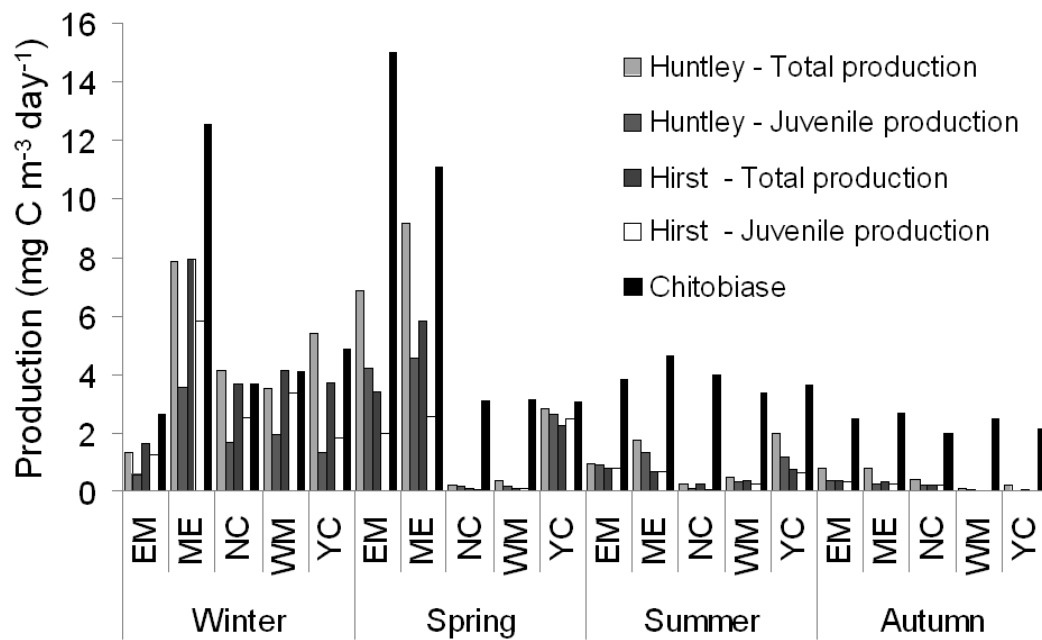


Fig. 4



9. APÊNDICE III

Título: Crescimento de náuplios e produção de ovos no copépode *Acartia longiremis*

Autores: Tatiana Ramos Avila, Anderson Abel de Souza Machado & Adalto Bianchini

Revista: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences

RESUMO

O estudo de taxas de crescimento em copépodes é utilizado para conhecimento da biologia das populações e como índice que permite avaliar as preferências das diferentes espécies às condições dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do ambiente. O presente estudo teve como objetivo medir o crescimento de náuplios de *Acartia longiremis* nas temperaturas de 10 e 15°C, a produção de ovos de adultos em diferentes temperaturas e dietas, bem como determinar as características da quitobiase da espécie, enzima envolvida no processo de muda de crustáceos e utilizada para estimativa de crescimento. O comprimento total médio máximo observado a 10 e 15°C após 15 dias de incubação foi de 180.5 e 216.3 μm , respectivamente. Por sua vez, a taxa de crescimento (g) foi de 0.17 e 0.2 dia^{-1} , respectivamente. Nenhuma fêmea produziu ovos durante o período de incubação do casal de copépodes em nenhuma das combinações de temperatura (5 e 15°C) e dieta (assembléia de fitoplâncton de Saanich Inlet, assembléia de fitoplâncton da praia de Cadboro Bay, *Isochrysis galbana*, *Talassiosira weissflogii* e algas industrializadas Instant Algae e Reef Nutrition) testadas. Comparando-se o crescimento *A. longiremis* com aquele de outros copépodes do gênero *Acartia* nas mesmas temperaturas testadas no presente estudo, foi observado que as taxas de crescimento foram inferiores àqueles de *A. tonsa* e *A. clausi*. Por sua vez, a ausência de produção de ovos nas diferentes combinações de temperatura e dieta testadas demonstra a variedade de preferências físicas e biológicas entre espécies do mesmo gênero, já que *A. tonsa* e *A. clausi* se alimentam e se reproduzem normalmente nas mesmas condições testadas para *A. longiremis*.

INTRODUÇÃO

Organismos do zooplâncton são conhecidos pela sua importância ecológica como principais consumidores da produção primária nos oceanos e regiões costeiras, bem como por serem a base da alimentação de larvas de peixes e crustáceos explorados comercialmente (Schmidt *et al.*, 1998; Mauchline, 1998). O zooplâncton é constituído por diferentes grupos taxonômicos, porém, na maioria das vezes, este é dominado por copépodes. A importância deste grupo taxonômico para o ecossistema, torna o estudo da sua reprodução, alimentação, crescimento e produção como essencial para o entendimento dos fluxos de energia na cadeia trófica (Fraser *et al.* 1989; Williamson & Gribbin, 1991).

As taxas de crescimento de juvenis (Kang *et al.* 2007; Renz *et al.* 2007) e a produção de ovos de adultos (Kiorboe & Nielsen 1994) podem ser usadas como parâmetros para definir a preferência das espécies por determinados fatores físicos (temperatura, salinidade) e biológicos (alimento), além de gerarem dados para a estimativa de produção secundária em campo (Huntley & Lopes 1992; Hirst & Bunker 2003). Em relação à produção, alguns métodos enzimáticos também vêm sendo desenvolvidos e utilizados para estimar a produção secundária, sendo que a quitobiase de crustáceos liberada durante a muda dos estágios juvenis tem sido utilizada com sucesso (Sastri & Dower 2009).

O copépode do gênero *Acartia* é amplamente distribuído ao redor do mundo, dominando muitas regiões costeiras e estuarinas. Espécies como *A. tonsa*, *A. clausi* e *A. danae* são mais características de ambientes tropicais e subtropicais (Bradford-Grieve 1999; Hooff & Peterson 2006), enquanto *A. longiremis* e *A. hudsonica* se distribuem

pelas regiões temperada e polar do Hemisfério Norte. A biologia de *A. tonsa* e *A. clausi* é bem conhecida e inúmeros estudos foram realizados com estas espécies (Landry 1975; Halsband & Hirche 2001; Holste & Peck 2006). Por outro lado, apesar de sua ocorrência freqüente nas amostras de zooplâncton (Park et al 2004; Dzierzbicka-Glowacka et al. 2010; Hooff & Peterson 2002), pouco se sabe sobre a biologia de *A. longiremis*. Um dos motivos das poucas informações disponíveis sobre copépodes menores em regiões de águas frias é a presença de gêneros com espécies grandes como *Calanus* (Sastri & Dower 2006; Kosobokova 1999) e *Metridia*, que por algum tempo receberam a maior atenção dos pesquisadores.

Assim, pela importância de *A. longiremes*, muitas vezes dominante na sua fração de tamanho na costa oeste da América do Norte (Hooff & Peterson 2006; McFarlane et al. 2010), este estudo buscou avaliar a taxa de crescimento de náuplios em duas temperaturas e a produção de ovos de adultos da espécie submetidos a diferentes dietas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos copépodes

Os organismos utilizados nos experimentos descritos no presente estudo foram coletados quinzenalmente a bordo da embarcação John Strickland no Saanich Inlet (BC, Canadá) através de arrastos oblíquos com rede cilindro-cônica (60 cm de diâmetro de abertura de boca e 300 µm de malha da rede). Os arrastos foram realizados nos primeiros 20 m de profundidade. A amostra foi filtrada (rede de 1 cm de malha), a fim de retirar os organismos gelatinosos, possíveis predadores, bem como os detritos

maiores. A fração que foi filtrada pela malha foi diluída em água do ambiente de coleta e acondicionada em recipientes plásticos, sendo mantidos em caixa de isopor na mesma temperatura da água do mar ($\sim 15^{\circ}\text{C}$).

No laboratório, os recipientes contendo as amostras foram equipados com aeradores e a triagem dos organismos foi realizada sob microscópio estereoscópico. Adultos e copepoditos de *A. longiremis* foram separados individualmente e colocados em recipiente de vidro com água do mar do local de coleta (salinidade 30 e temperatura de 15°C) filtrada (malha de $40\ \mu\text{m}$) para manter a comunidade fitoplanctônica que serviu de alimento para os copépodes. Os organismos também foram alimentados com *Isochrysis galbana* (diâmetro de $4,7\ \mu\text{m}$) cultivada em laboratório, como descrito abaixo.

Cultivo de algas

A microalga *I. galbana* utilizada nos experimentos de crescimento e produção de ovos foi cultivada a partir de inóculo obtido da “Canadian Center for the Culture of Microorganisms”. As microalgas foram cultivadas em frascos Erlenmayer (500 mL) contendo meio Guillard F/2 adaptado (Guillard & Ryther, 1962). Réplicas (5 L) foram mantidas continuamente em fase de crescimento exponencial. Os cultivos foram acondicionados em câmara de D.B.O. com temperatura fixa de 15°C e fotoperíodo de 12C:12E.

Efeito da temperatura no crescimento de náuplios

Assim que foram separados da amostra total e colocados em cultivo monoespecífico, os copépodes foram alimentados com a assembléia fitoplanctônica do

ambiente, contendo *I. galbana*. Após 24 h de incubação, os organismos foram filtrados (malha de 150 μm) para que os ovos e náuplios de até 24 h de idade fossem separados dos adultos. Os adultos foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo e os ovos e náuplios coletados foram utilizados para o experimento de crescimento, conforme descrito abaixo.

Os ovos e náuplios produzidos durante as 24 h de incubação foram separados em três unidades experimentais compostas por recipientes de vidros (2 L) preenchidos com 1,8 L de água do mar (salinidade 30) filtrada (40 μm) e autoclavada. Uma amostra de 50 mL de cada unidade experimental foi coletada no início do experimento (tempo zero) e consecutivamente a cada 24 h, durante 10 dias. Uma última amostra do meio experimental foi coletada no 15º dia de experimento. As amostras de cada réplica foram fixadas com formol 4%. Os indivíduos presentes nas amostras foram contados sob microscópio estereoscópico e medidos sob microscópio óptico usando uma ocular com régua milimétrica. Durante o experimento, os náuplios foram alimentados com 100.000 células de *I. galbana*. mL^{-1} . As células do cultivo de algas e de cada réplica do experimento foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração mantida constante durante todo o período experimental. Os testes foram realizados nas temperaturas de 10 e 15°C.

Efeito da dieta na produção de ovos

Para avaliar o efeito da dieta na produção de ovos, copépodes adultos foram testados iniciando a incubação 24 h após a coleta, período no qual os animais foram mantidos sob a dieta de teste.

Para os experimentos de produção de ovos, um macho e uma fêmea de *A. longiremis* foram incubados por 24 h em 50 ml de água do mar (salinidade 30), sendo testadas dez repetições para cada tratamento. Diferentes tratamentos foram testados, sendo estes constituídos de diferentes dietas: (1) assembléia de fitoplâncton do Saanich Inlet (BC, Canadá) obtida a partir de água filtrada (40 μ m) do ambiente, (2) assembléia de fitoplâncton da praia de Cadboro Bay (BC, Canadá) obtida a partir de água filtrada (40 μ m) do ambiente, (3) *I. galbana* cultivada em laboratório, (4) *Thalassiosira weissflogii* e (5) mistura de algas comerciais concentradas (Instant Algae e Reef Nutrition). As dietas 3, 4 e 5 foram acrescidas ao meio experimental (água do mar filtrada e autoclavada). Após 24 h de incubação, o volume de teste foi filtrado (malha de 40 μ m) para reter adultos e ovos. Os adultos foram observados para determinar a sobrevivência. A presença e número de ovos, bem como o número de pelotas fecais, foram também registrados. Os diferentes tratamentos (dietas) foram testados nas temperaturas de 5 e 15°C.

Quitobiase

A temperatura ótima para máxima atividade e a afinidade (K_m) da quitobiase pelo substrato metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (MUFNAG, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi determinado em *A. longiremis* seguindo a metodologia descrita por Oosterhuis et al. (2000). Os testes foram realizados utilizando uma solução de diluição (SD) preparada com água do mar filtrada (filtro de polycarbonato; 0,2 μ m) e autoclavada. A enzima concentrada foi obtida através da homogeneização de 50 copépodes em SD, utilizando-se um macerador manual. O homogeneizado foi centrifugado (5 min; 10.000 x g) e o sobrenadante obtido foi filtrado (malha de 0,2 μ m)

e utilizado como fonte da enzima no ensaio. O ótimo de temperatura da enzima foi determinado utilizando o mesmo macerado de copépodes em 250 μ M de MUFNAG. O meio de reação foi mantido 60 min em diferentes temperaturas (5-50°C). Por sua vez, o *K_m* foi determinado a 25°C, adicionando-se uma alíquota do sobrenadante do homogeneizado a diferentes concentrações do substrato.

A fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 450 nm) de cada amostra foi medida antes e depois de um período de 60 min de incubação a 25°C. O aumento na fluorescência corresponde à atividade da quitobiase, a qual foi expressa como a quantidade do produto da reação (metilumbeliferil; MUF) produzido pela enzima durante 1 h a partir do substrato (MUFNAG). Uma curva de calibração foi construída com uma seqüência de diluição realizada a partir de uma solução preparada a partir da solução estoque do fluorescente MUF dissolvido na SD (Oosterhuis et al., 2000; Sastri & Dower 2006).

Análise estatística

A análise de diferença de médias (teste *t*) foi utilizada para a comparação entre os dados dos experimentos de crescimento a 10 e 15°C, considerando-se as medidas de cada estágio de náuplio para cada temperatura e entre os valores de atividade da quitobiase em cada temperatura testada. As análises de diferença entre médias foram realizadas no pacote estatístico R.

RESULTADOS

Crescimento em diferentes temperaturas

A abundância relativa de ovos e náuplios (NI-NVI) de *A. longiremis* variou ao longo dos 15 dias de experimento e a proporção de cada estágio em relação ao tempo de incubação foi diferente em 10 e 15 °C. Enquanto os primeiros náuplios foram registrados no 3º dia de experimento na temperatura de 10°C, aproximadamente 50% dos indivíduos eram NI no 2º dia de experimento a 15°C. Ao final de 15 dias, a maior abundância ainda era de ovos na temperatura de 10°C, sendo que o estágio de desenvolvimento NIV foi o mais freqüente. Por sua vez, na temperatura de 15°C não foram registrados ovos, sendo que NIII, NIV, NV e NVI foram identificados no 15º dia de experimento (Fig.1).

Após 15 dias de incubação, o comprimento total médio máximo observado nas temperaturas de 10 e 15°C foi de 180,5 e 216,3 µm, com uma taxa de crescimento (g) de 0,17 e 0,2 dia⁻¹, respectivamente (Fig. 2).

O diâmetro dos ovos de *A. longiremis* foi de 75 µm, enquanto o comprimento total médio de NVI foi de 270 µm. Náuplios V e VI só foram encontrados na temperatura de 15°C, não havendo diferença entre as médias das medidas de ovos até NIV na comparação entre as duas temperaturas testadas (Fig. 3).

Produção de ovos em diferentes dietas

Apesar de produzirem nas primeiras 24 h após a coleta os ovos que foram utilizados nos experimentos de crescimento, nenhuma fêmea produziu ovos durante o período de incubação do casal de copépodes em nenhuma das combinações de temperatura e dieta testadas. Pelotas fecais foram encontradas somente na dieta com *I. galbana* na temperatura de 15°C. O valor máximo registrado foi de 10 pelotas⁻¹.copépode⁻¹.dia⁻¹, com valor médio de 3,2 pelotas⁻¹.copépode⁻¹.dia⁻¹.

Quitobiase

O K_m da quitobiase foi de 47,05 μM ($r^2 = 0,94$) e a temperatura ótima para atividade da enzima foi observado entre 35-45°C, apresentando forte inibição da enzima em 50°C.

DISCUSSÃO

Crescimento em diferentes temperaturas

O efeito da temperatura no crescimento de *A. longiremis* era esperado, uma vez que este fator é amplamente estudado no crescimento de copépodes e pode representar até 90% da variação na taxa de crescimento (g) deste grupo animal (Huntley & Lopes 2002). Os valores de taxa de crescimento obtidos para os náuplios de *A. longiremis* a 10 (0,17 dia^{-1}) e 15°C (0,2 dia^{-1}) são muito similares àqueles relatados para a espécie em 10°C (0,2 dia^{-1}) por Gómez-Gutiérrez & Peterson (1999) e por Peterson et al. (1991) para a média de seis espécies de mesma faixa de tamanho (0,27 dia^{-1}). Em relação a outras espécies, o valor de g para *A. longiremis* a 10°C é próximo àquele obtido para náuplios de *A. tonsa* na mesma temperatura (0,19 dia^{-1}) (Leandro et al. 2006). Porém, o g de *A. tonsa* é de 0,88 a 22°C (Leandro et al. 2006), demonstrando um aumento de 0,695 dia^{-1} com um incremento de 12°C na temperatura. Este valor representa 0,0579 dia^{-1} por grau de temperatura, enquanto *A. longiremis* apresentou elevação de 0,006 dia^{-1} por grau de temperatura. Esta diferença pode estar relacionada com as faixas de preferência de cada espécie, já que *A. tonsa* tolera melhor águas mais quentes e *A. longiremis* cresce e reproduz principalmente em águas frias (1–2°C).

A maior taxa de crescimento de *A. tonsa* se reflete no tempo de desenvolvimento total (ovo a ovo), que é de 13 dias a 15,5°C (Heinle 1966), enquanto *A. longiremis* apresentou apenas 12,5% de NVI e 52,5% de NIV após 15 dias de incubação. Variações nestas taxas podem ser encontradas dentro da mesma espécie, com o tempo de desenvolvimento total de *A. tonsa* sendo estimado em 20,3 dias a 15°C (Landry 1983), ou seja, 7,3 dias a mais do que aquele estimado Heinle (1966), e 2 dias de diferença entre os valores de 21 dias (Landry 1983) e 23 dias (Uye 1980) para *A. clausi*. Para *A. longiremis* não foram publicados estudos que acompanharam o crescimento da espécie de ovo a ovo, não sendo possível, portanto, comparar os resultados.

No presente estudo, não foi encontrada diferença entre o tamanho de cada estágio de desenvolvimento em relação à temperatura. Porém, os organismos não passaram do estágio NIV em 10°C, sendo que as diferenças encontradas para *A. tonsa* entre as temperaturas testadas para a espécie (Leandro et al. 2006) foram identificadas principalmente a partir deste estágio.

Produção de ovos em diferentes dietas

A ausência de ovos nos testes de produção de *A. longiremis* em todos os tratamentos (combinações de temperatura e dieta) tem como primeira possível explicação a ineficiência na captura do alimento pelos organismos, uma vez que o número de pelotas fecais foi baixa ou nula na maioria dos testes. De fato, Hansen et al. (1994) observaram a espécie predando sobre diatomáceas entre 30 e 40 µm de diâmetro, ou seja, sobre células maiores do que as utilizadas nos experimentos do presente estudo. Ainda assim, de acordo com as peças bucais de *A. longiremis*, a espécie deve utilizar hábitos suspensívoros para se alimentar de partículas pequenas e hábitos raptorais para

partículas maiores (Ohtsukam et al. 1996). A preferência por algas em relação à protozooplâncton também foi estudada por Hansen et al. (1999) e observada por Ohtsukam et al. (1996), enfraquecendo assim a hipótese de que a carnivoría possa ser o fator responsável pela ausência de alimentação dos copépodes.

Poucos dados de produção de ovos foram registrados para *A. longiremis* e, em geral, as médias registradas foram baixas, com valores de 1,6 (Hansen et al. 1999), 5 (Peterson et al. 2002), 6 (Halsband et al. 2001), 7,5 (Gómez-Gutiérrez & Peterson 1999), 7,6 (Peterson et al. 1991) e $10 \text{ ovos}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Hansen et al. 1999). Comparando-se com a produção de ovos de *A. tonsa*, que apresenta média variando entre 28 (Teixeira et al. 2010) e $50 \text{ ovos}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Holste & Peck 2006), e de *A. clausi*, que apresenta média variando entre 26 e $33 \text{ ovos}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Halsband et al. 2001), a fecundidade de *A. longiremis* pode, portanto, ser considerada baixa. Porém, *A. hudsonica*, outra espécie de águas frias, também apresentou baixa produção de ovos, com média de $1.4 \text{ ovos}^{-1} \cdot \text{fêmea}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Estes resultados indicam que a temperatura das regiões onde as espécies são dominantes influencia na fecundidade, já que os valores parecem ser menores do que nas espécies de dominância em águas mais quentes, mesmo quando testadas sob mesmas temperaturas (Augustin & Boersma 2006).

Quitobiase

A quitobiase da *A. longiremis* apresentou K_m de 47,05 μM , sendo próximo ao valor estimado de 55 μM para o copépode *Temora longicornis* (Oosterhuis et al. 2000), porém bem superior àquele de 20,77 estimado para *A. tonsa*, um congênere do Oceano Atlântico Sul (Avila et al. 2011). Diferenças entre as temperaturas ótimas também são observadas entre as espécies. No caso de *A. longiremis*, a faixa ótima de temperatura

para a atividade da enzima foi de 35-45°C, sendo semelhante àquela relatada para *A. tonsa* (30-35°C), porém inferior ao valor registrado para *T. longicornis* (55°C).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canadá), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES, Brasília, Brasil) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil) no âmbito do “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática”. A. Bianchini é bolsista produtividade do CNPq (Proc. nº 304430/2009-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Augustin, C. B. & M. Boersma. 2006. Effects of nitrogen stressed algae on different *Acartia* species. J. Plankton Res. 28: 429-436.
- Avila T.R., A.A.S. Machado, A. Bianchini. 2011. Chitobiase of planktonic crustaceans from South Atlantic coast (Southern Brazil): Characterization and influence of abiotic parameters on enzyme activity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (Submetido).
- Bradford-Grieve, J.M., E.L., Markhaseva, C.E.F., Rocha, B. Abiahy. 1999. Copepoda, p. 869-1098. In D. Boltovskoy [ed.], South Atlantic Zooplankton. Backhuys Publishers, v.2, Leiden.
- Dzierzbicka-Glowacka L., I.M. Z`mijewska, S. Mudrak, J. Jakacki, A. Lemieszek. 2010. Population modelling of *Acartia* spp. in a water column ecosystem model for the South-Eastern Baltic Sea. Biogeosciences. 7: 2247–2259.
- Fraser, A.J., J.R. Sargent, J.C. Gamble, D.D. Seaton. 1989. Formation and transfer of fatty acids in an enclosed marine food chain comprising phytoplankton, zooplankton and herring (*Clupea harengus* L.) larvae. Mar. Chem. 27:1-18.

- Gómez-Gutiérrez, J. & W.T. Peterson. 1999. Egg production rates of eight calanoid copepod species during summer 1997 off Newport, Oregon, USA. *J. Plankton Res.* 21: 637-657.
- Guillard, R.R.L. & J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms *Cyclotella nanna* (Hustedt) and *Detonula convervacea* (Cleve). *Gran. Can. J Microbiol.* 8: 229-239.
- Halsband, C. & H.J. Hirche. 2001. Reproductive cycles of dominant calanoid copepods in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 209: 219–229.
- Hansen, B., P. Verity, T. Falkenhaus, K.S. Tande, F. Norrbin. 1994. On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Harriot). V. Trophic relationships between *Phaeocystis* and zooplankton: an assessment of methods and size dependence. *J. Plankton Res.* 16:487-511.
- Hansen, B.W., T.G. Nielsen, H. Levinsen. 1999. Plankton community structure and carbon cycling on the western coast of Greenland during the stratified summer situation. 111. Mesozooplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 16: 233-249.
- Heinle, D.R. 1966. Production of a calanoid Copepod, *Acartia tonsa*, in the Patuxent River estuary. *Chesapeake Sci.* 7: 59-74
- Hirst, A.G., & A.J. Bunker. 2003. Growth of marine planktonic copepods: global rates and patterns in relation to chlorophyll a, temperature, and body weight. *Limnol. Oceanogr.* 48: 1988–2010.
- Holste, L. & M.A. Peck. 2006. The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation *Mar. Biol.* 148: 1061–1070.
- Hooff R.C. & W.T. Peterson. 2006. Copepod biodiversity as an indicator of changes in ocean and climate conditions of the northern California current ecosystem *Limnol. Oceanogr.* 51: 2607-2620.
- Huntley, M.E., & M.D.G. Lopez. 1992. Temperature-dependent production of marine copepods: a global synthesis. *Amer. Natur.* 140: 201-242.
- Kang, H.K., Y. J. Kang, P. Chul. 2007. Production of *Acartia omorii* (Copepoda: Calanoida) in Ilkwang Bay, southeastern coast of Korea. *Jour. Mar. Systems.* 67: 236–244.

- Kjørboe, T. & T.G. Nielsen. 1994. Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate, coastal ecosystem. 1. Copepods. *Limnol. Oceanogr.* 39: 493-507.
- Kosobokova, K.N. 1999. The reproductive cycle and life history of the Arctic copepod *Calanus glacialis* in the White Sea. *Polar Biol.* 22: 254–263.
- Landry, M. R. 1975. The relationship between temperature and the development of life stages of the marine copepod *Acartia clausi*. *Limnol. Oceanogr.* 20: 854-857.
- Landry, M. R. 1983. The development of marine calanoid copepods with comment on the isochronal rule. *Limnol. Oceanogr.* 28:614-624.
- Leandro, S.M., P. Tiselius, H. Queiroga. 2006. Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Mar. Biol.* 150:121–129.
- Mauchline, J. 1998. The biology of Calanoid Copepods. *Advances in Marine Biology*, Academic Press, London, 710 pp.
- McFarlane G., J. Schweigert, J. Detering, V. Hodes. 2010. Diet analysis of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) off the west coast of Vancouver Island, British Columbia from 1997 to 2008 CalCOFI Rep. 51: 169-181.
- Ohtsukam S., A. Shimozua, S. Tanimurama, I. Fukuchi, H. Hattorih, H. Sasak, O. Matsuda. 1996 Relationships between mouthpart structures and in situ feeding habits of five neritic calanoid copepods in the Chukchi and northern Bering seas in October 1988. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 9:153-168.
- Oosterhuis, S.S., M.A. Baars, W.C.M. Klein Breteler. 2000. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 196:195–206.
- Park W., M. Sturdevant, J. Orsi, A. Wertheimer, E. Fergusson, W. Heard, T. Shirley. 2004. Interannual abundance patterns of copepods during an ENSO event in Icy Strait, southeastern Alaska ICES. *J. Mar. Sci.* 61: 464-477.
- Peterson, W.T., J. Gomez-Gutierrez, C.A. Morgan. 2002. Cross-shelf variation in calanoid copepod production during summer 1996 off the Oregon coast, USA. *Mar. Biol.* 141: 353–365.

- Peterson, W.T., P. Tiselius, T. Kiorboe. 1991. Copepod egg production, moulting and growth rates, and secondary production, in the Skagerrak in August 1988. *J. Plankton Res.* 13: 131-154.
- Renz, J, J. Peters, H.J. Hirche. 2007. Life cycle of *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht (Copepoda, Calanoida) in the Central Baltic Sea: II. Reproduction, growth and secondary production. *Mar. Biol.* 151:515-527.
- Sastri, A.R. & J.F. Dower. 2006. Field validation of an instantaneous estimate of in situ development and growth for marine copepod communities. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63: 2639-2647.
- Sastri, A.R. & J.F. Dower. 2009. Interannual variability in chitobiase-based production rates of the crustacean zooplankton community in the Strait of Georgia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 388: 147–157.
- Schmidt, K., P. Kahloer, B. Von Bodungen. 1998. Copepod egg production rates in the Pomeranian Bay (Southern Baltic Sea) as a function of phytoplankton abundance and taxonomic composition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 174, 183-195.
- Teixeira P.F., S. M. Kaminski, T.R. Avila, A.P. Cardozo, J.G.F. Bersano, A. Bianchini. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *An. Acad. Bras. Cienc.* 82: 333-339.
- Uye, S. 1980. Development of neritic copepods *Acartia clausi* and *A. steueri* I. Some environmental factors affecting egg development and the nature of resting eggs. *Bull. Plankton Soc. Japan* 27: 1-9.
- Williamson, P. & J. Gribbin. 1991. How plankton changes the climate. *New Scient.* 129, 48-52. The R Foundation for Statistical Computing - R : Copyright 2006, Version 2.3.0.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Abundância relativa de ovos e estágios de náuplios (NI-NVI) de *Acartia longiremis* ao longo do tempo de incubação (dias) nas temperaturas de (A) 10 e (B) 15°C.

Figura 2. Comprimento total médio (μm) dos náuplios de *Acartia longiremis* ao longo do tempo de incubação (dias) nas temperaturas de (A) 10 e (B) 15°C.

Figura 3. Média ($\pm$ desvio padrão) do diâmetro dos ovos e comprimento total (μm) dos estágios de náuplios (NI-NVI) de *Acartia longiremis* nas temperaturas de 10°C e 15°C.

Figura 4. Atividade da chitobiase ($\text{nM.MUF.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de *Acartia longiremis* em relação ao (A) substrato (μM) e à (B) temperatura (°C).

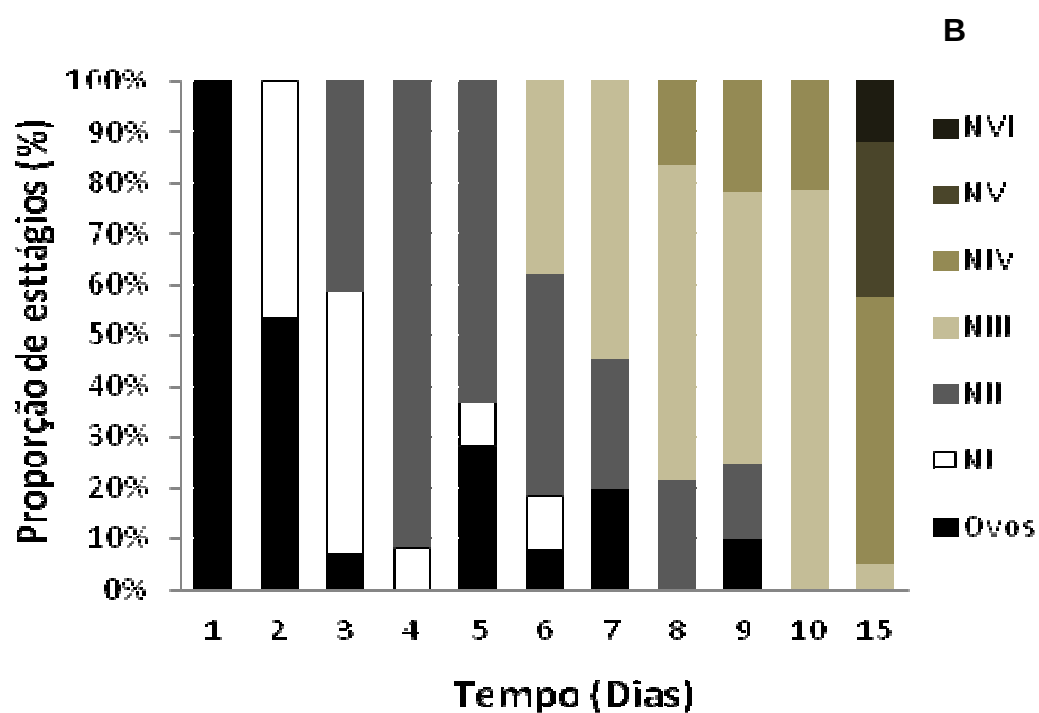
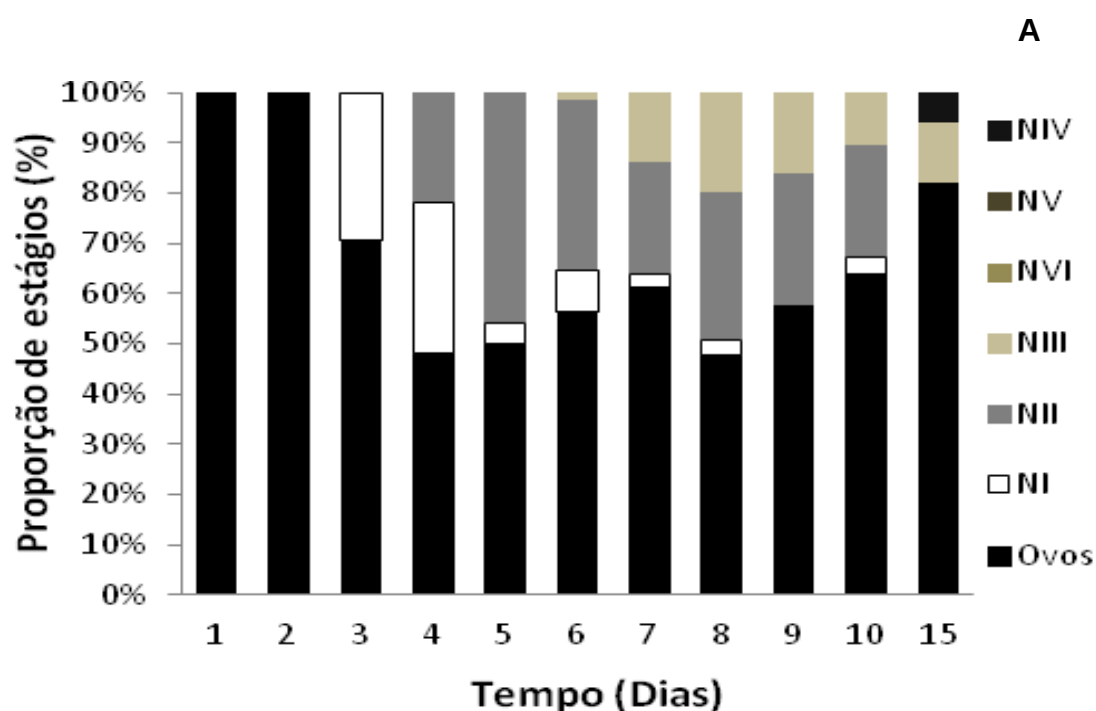


Figura 1

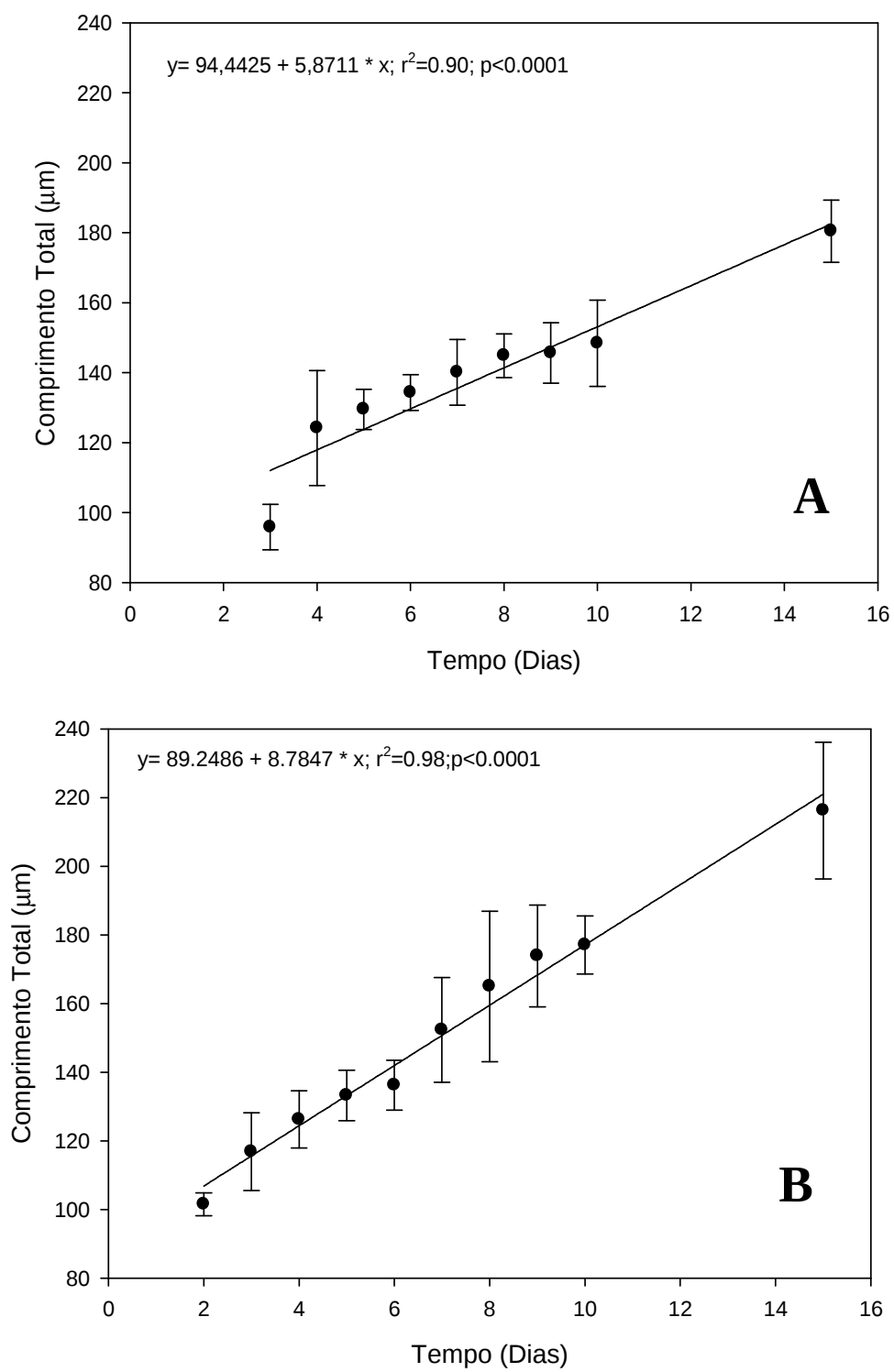


Figura 2

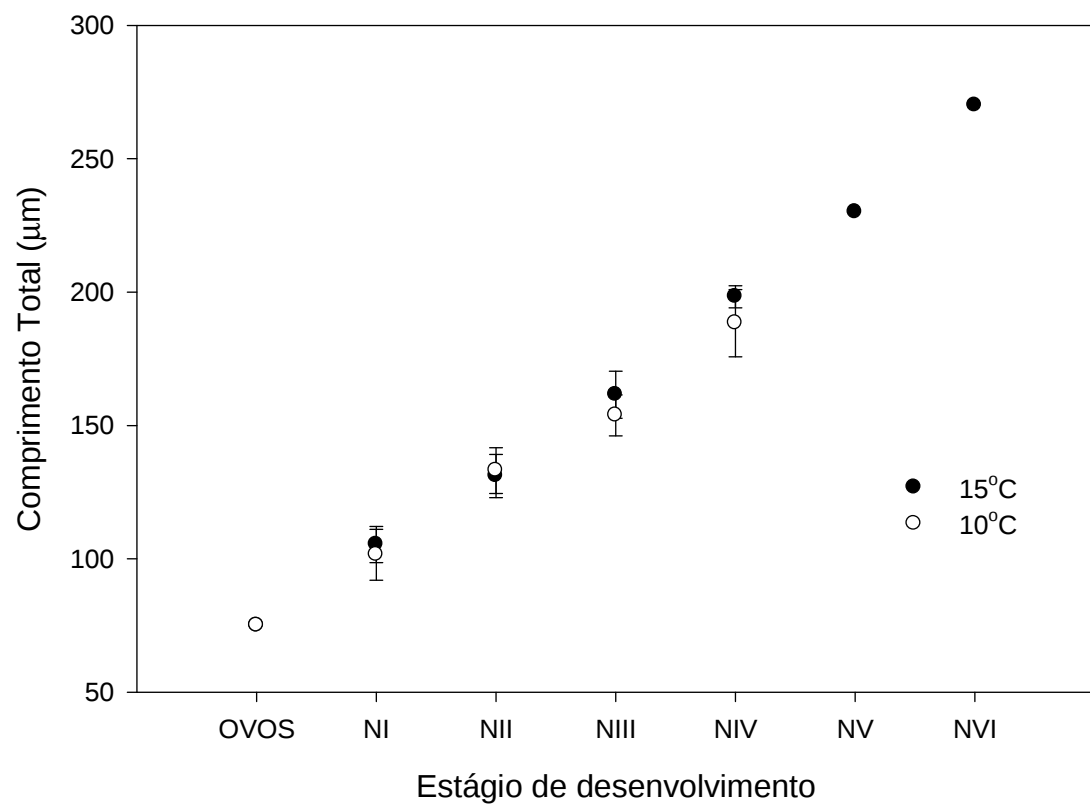


Figura 3

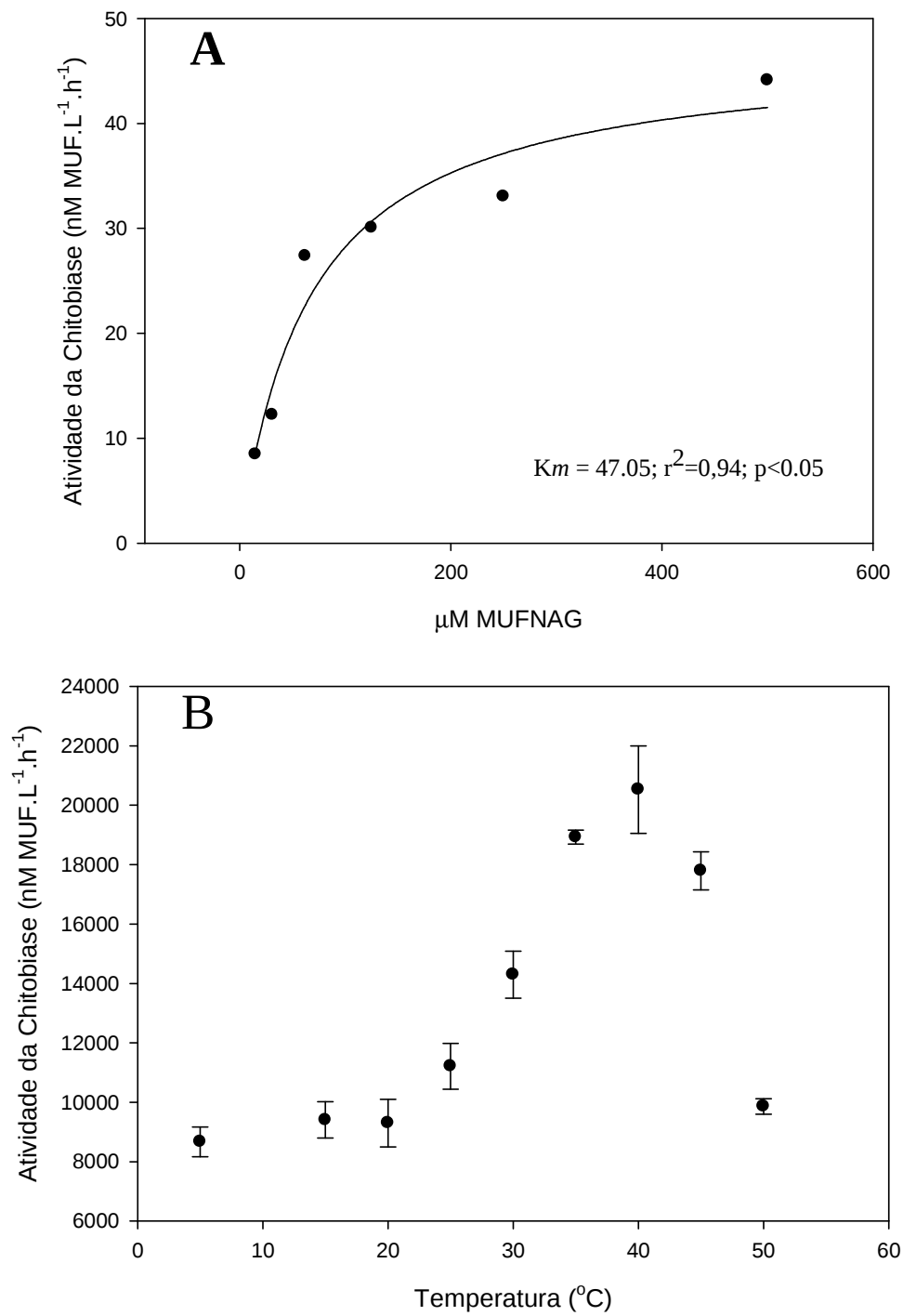


Figura 4