

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Influência da limitação de “N” e “P” e de ácidos graxos polinsaturados do alimento sobre o crescimento de cladóceros do Lago Monte Alegre.

Claudia Fileto

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto – SP
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marlene Sofia Arcifa Froehlich pela grande orientação e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP/USP) pela grande colaboração neste trabalho com relação à técnica de Cromatografia Gasosa empregada e pela concessão do uso de equipamentos de seu laboratório;

A Izabel Cristina Casanova Turatti (FMRP/USP) pela realização das análises cromatográficas;

À Profa. Dra. Lúcia Helena Sampaio Silva pelas contagens das amostras de fitoplâncton e pela pronta disposição em ajudar;

À Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti (FCFRP/USP) pela grande ajuda no processo de microencapsulamento dos ácidos graxos e pela concessão do uso de equipamentos de seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini pela realização das análises do conteúdo de proteína das microcápsulas de ácidos graxos;

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pela concessão do uso contínuo de equipamentos do seu laboratório;

Ao Prof. Dr. José Fernando de Andrade (FFCLRP/USP – Depto. Química) pela concessão do uso de Espectrofotômetro;

Ao Wagner Guagnoni pela valiosa montagem dos equipamentos indispensáveis para a realização dos meus experimentos e manutenção destes, mesmos em fins de semana e a noite;

À Valdir Roberto Balbo (Depto. Química) pelo auxílio nas análises de fósforo;

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira (UNAERP) pela liofilização do séston utilizados nos experimentos;

A Profa. Dra. Elenice Mouro Varanda pela concessão do uso de equipamentos de seu laboratório;

À FAPESP (processo nº 00/12885-7) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudo;

Ao Prof. Dr. Aloysio da Silva Ferrão-Filho pelos esclarecimentos prestados nas horas de dúvida;

À Tais Cristina Bunioto, Veronika Schimdt, Michael Hrcnir e Roberto L. A. Haiduke pela ajuda indispensável nas coletas de água no Lago Monte Alegre;

Aos amigos de laboratório: André, Mara, Maria Stela, Sérgio e Walter pela amizade nesses anos de convivência;

Aos meus pais e ao meu irmão querido pelo incentivo nos estudos;

Aos meus amigos da USP e fora desta, que são muitos e valiosos, pelo companheirismo de sempre.

RESUMO

A influência da adição de nitrogênio e fósforo ao séston do Lago Monte Alegre sobre o crescimento e a reprodução de cladóceros foi avaliada, assim como a existência de possível efeito sinérgico entre estes nutrientes. Esta avaliação foi realizada através de um experimento de tabela de vida e outros de crescimento individual em biomassa. Todos os experimentos foram realizados com temperatura (23°C) e luz controladas, utilizando uma roda de plâncton (exceto o experimento de tabela de vida realizado em câmara de germinação), evitando a sedimentação do alimento. Os seguintes tratamentos foram feitos: 1) Séston, 2) Séston enriquecido com 25 $\mu\text{g PO}_4\text{P L}^{-1}$, 3) Séston enriquecido com 260 μg

de $\text{NO}_3\text{ L}^{-1}$ e 4) *S. spinosus* (1 mg C L^{-1}). Nos experimentos de sinergismo, o tratamento com a alga foi substituído pelo séston enriquecido tanto com nitrato como fosfato nas mesmas concentrações citadas e os outros tratamentos foram mantidos. Os cladóceros utilizados foram: *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia ambigua* e *D. gessneri*, dependendo da disponibilidade destes no lago. O conteúdo de carbono, nitrogênio e fósforo do séston, da alga e dos animais utilizados nos experimentos foram medidos e as razões C:N e C:P calculadas. Ao final dos experimentos, o número de ovos foi contado para o posterior cálculo da fecundidade média e do tamanho da ninhada. Os resultados obtidos mostraram que a adição de nutrientes ao séston não causou, na maioria dos casos, aumento no crescimento e reprodução dos cladóceros. Também não foi encontrado efeito sinérgico entre nitrogênio e fósforo.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the addition of nitrogen, phosphorus and fatty acids to the seston of the Monte Alegre Lake on growth and reproduction of cladocerans and test a possible synergic effect between these nitrogen and phosphorus. The influence of the addition of fatty acids was evaluated to test whether they were an important component of the diet of tropical cladocerans as known for the temperate ones. The cladocerans used were: *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia ambigua* and *D. gessneri*, depending on their availability in the lake during the experiments. The experiments *in vitro* included a life table (nitrogen and phosphorus addition) and many other growth bioassays. All of the experiments were carried out under controlled temperature (23°C) and light, using a plankton wheel to avoid food settlement (except the life table one that was carried out on a environmental chamber). Nitrate and phosphate were added in sufficient quantities to maintain C:N and C:P ratios above the values considered limitants to cladocerans. The fatty acids were encapsulated with a mixture of gelatin and arabic gum to serve as food to the animals. Carbon, nitrogen and phosphorus of the seston, algae and animals used in the experiments were measured and the C:N and C:P ratios were calculated. The fatty acid content of seston and cladocerans was also measured by Gas Chromatography. The results showed that the addition of nutrients and fatty acids to the seston did not improved growth and reproduction of the cladocerans in the majority of the experiments. A synergic effect between nitrogen and phosphorus was also not found. The influence of the mineral and biochemical content of the algae on growth and reproduction of the cladocerans are questionable. It is possible that there is a hierarchy among factors that regulate cladocerans 'growth, being the size and the morphological characteristics of the phytoplankton besides energy (carbon) more important than the mineral and biochemical limitation.

INTRODUÇÃO

Existe uma rica literatura que mostra a importância da composição bioquímica das algas testadas como alimento para as espécies de zooplâncton herbívoras, e como tais algas afetam o crescimento e a reprodução desses animais. Existem também dois problemas gerais que dificultam a interpretação destes estudos: (i) a grande variação intraespecífica e interespecífica da composição bioquímica das dietas cultivadas com limitação de nutrientes e (ii) a grande

variação das respostas dos herbívoros às dietas que diferem qualitativamente.

Vários constituintes celulares são importantes determinantes da qualidade do alimento para o zooplâncton: C, N, P, lipídeos, ácidos graxos essenciais, proteínas e aminoácidos. O nitrogênio é importante na síntese de aminoácidos e proteínas. O fósforo é um componente importante dos fosfolipídeos, está envolvido no metabolismo de estoque de energia (ATP) e na síntese de ácidos nucléicos, estando desse modo, envolvido no crescimento e na reprodução. Alguns estudos sugerem que os altos níveis de fósforo dos cladóceros estão associados com alto conteúdo de RNA (Dobberfuhl & Elser, 1997). Também pode haver uma quantidade significativa de fósforo associado às carapaças dos animais (Vrede *et al.*, 1999).

Atualmente, vem crescendo o número de trabalhos que citam a razão elementar C:

N: P do séston como o fator mais importante na determinação da qualidade do alimento para o zooplâncton (Hessen, 1992; Sommer, 1992; Sterner, Elser & Hessen, 1992; Urabe & Watanabe, 1992; Sterner & Hessen, 1994). Tais estudos fazem parte de um ramo novo da Ecologia, chamado Ecologia Estequiométrica (Sterner & Elser, 2002) que lida com o balanço de energia e elementos químicos em interações ecológicas, especialmente em relações tróficas (Andersen *et al.*, 2004).

Esses elementos foram inicialmente examinados pelo oceanógrafo A.C. Redfield, que encontrou que as amostras de material particulado de águas oceânicas apresentavam a seguinte relação: C₁₀₆: N₁₆: P₁, a qual é chamada de "Redfield ratio" em sua homenagem. Essa relação é constante nos ambientes marinhos, contrastando com as razões encontradas para o séston de águas continentais, que variam espacial e temporalmente, desviando bastante da razão encontrada por Redfield.

No entanto, apesar de muitos autores concordarem que a qualidade alimentar é importante (Sterner & Schulz, 1998) existe uma ampla discussão sobre qual é o mais provável fator determinante da qualidade alimentar para os organismos zooplanctônicos (Gulati & De Mott, 1997; Brett *et al.*, 2000). As hipóteses mais debatidas e estudadas são a hipótese de limitação mineral (Hessen, 1992, Urabe & Watanabe, 1992) e a de limitação bioquímica, principalmente de ácidos graxos essenciais (Ahlgren, 1990; Müller-Navarra, 1995). Existe também evidência de limitação por nitrogênio (proteína) (Kilham *et al.*, 1997) e a importância

da resistência à digestão das algas que servem de alimento para o zooplâncton (Van Donk *et al.*, 1997).

A hipótese de limitação mineral é baseada no fato do zooplâncton ser limitado pelo conteúdo de nitrogênio e fósforo do alimento, sendo o fósforo mais importante em regiões temperadas e o nitrogênio em regiões tropicais (Lewis, 1996; Talling & Lemoalle, 1998). Os herbívoros pertencentes, por exemplo, ao gênero *Daphnia*, mantém relações estequiométricas C:P e C:N relativamente constantes mesmo com a considerável variação de C:P e C:N das suas dietas (Hessen, 1990). Alguns dados encontrados na literatura indicam que as razões C:N e C:P do zooplâncton são mais baixas que as do fitoplâncton (Hessen, 1990; Andersen & Hessen, 1991). As diferenças das taxas elementares do zooplâncton e fitoplâncton sugerem que esses animais podem concentrar N ou P em relação ao C nos seus tecidos corporais através da alimentação e de processos metabólicos para o crescimento e produção de ninhadas (Sterner, 1990). Se as razões C:N ou C:P do alimento são baixas, os animais podem facilmente obter a quantidade necessária de N e P em relação ao C. Se essas razões forem altas, no entanto, os animais têm que concentrar N ou P reduzindo a incorporação de C nos tecidos. Dessa maneira, existem limiares de C:N e C:P acima dos quais a produção líquida do zooplâncton é limitada por N ou P (Urabe & Watanabe, 1992). Uma vez que os consumidores podem liberar muito dos nutrientes em excesso e reter a maioria do nutriente em limitação, a qualidade de certo recurso alimentar pode ser determinada somente pela sua taxa de nutriente comparada às necessidades do consumidor. Dessa forma, a homeostase dos consumidores é um recurso para o entendimento das taxas de crescimento em várias condições de qualidade alimentar encontradas em ambientes naturais (Plath & Boersma, 2001).

Muitos estudos mostraram baixos valores de crescimento individual e das taxas de crescimento de *Daphnia* quando alimentadas com algas apresentando baixo conteúdo de P em relação ao C, isto é, altas taxas C:P (Sommer, 1992, Sterner 1993, DeMott, 1998, Urabe *et al.*, 1997; Elser *et al.*, 2001) e baixo conteúdo de N (Groeger *et al.* 1991). Por outro lado, em alguns foi encontrada baixa correlação entre o crescimento de *Daphnia* e o conteúdo de fósforo do séston tanto no campo (Müller-Navarra, 1995) como em experimentos laboratoriais utilizando o séston (DeMott & Tessier, 2002).

Em experimentos anteriores realizados com cladóceros do Lago Monte Alegre, observou-se que estes animais, aparentemente, não estavam limitados por energia (carbono)

durante o verão e a primavera, uma vez que as concentrações do séston estavam acima do limiar de concentração de alimento para a maioria dos cladóceros (Ferrão-Filho *et al.*, 2003). A razão média C:P foi de aproximadamente 552 no verão, sendo bem maior que a razão encontrada por Urabe & Watanabe (1992), que vai de 200 a 380 para concentrações de alimento variando de 0,05 a 2,5 mg C L⁻¹, indicando uma possível limitação de fósforo. A razão média C:N foi de 9,4, e não se pode supor que houve limitação de nitrogênio uma vez que valores entre 15 e 30 molar são sugeridos como indicativos de limitação de nitrogênio (Urabe & Watanabe, 1992).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a existência de possível limitação do séston do Lago Monte Alegre em nitrogênio e fósforo a qual poderia influenciar o crescimento e reprodução de cladóceros ao longo das estações do ano. A avaliação de tal influência foi realizada através de experimentos de tabela de vida e de crescimento individual em biomassa, associados à determinação das razões C:N e C:P do séston utilizados nos experimentos.

OBJETIVOS

- 1 Determinar a influência da adição de nitrogênio e fósforo sobre o crescimento e reprodução de cladóceros do Lago Monte Alegre, durante as estações do ano, através de experimentos de tabela de vida e crescimento individual em biomassa;
- 2 Avaliar a existência de sinergismo entre o nitrogênio e o fósforo, adicionados ao séston do Lago Monte Alegre, sobre o crescimento e reprodução de cladóceros, através de experimentos de crescimento individual em biomassa.

ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados utilizando o séston e cladóceros do Lago Monte Alegre (21° 11'S, 47° 43'W), que está localizado no sudeste do Brasil e foi resultado do represamento do Córrego Laureano, pertencente à bacia do Rio Pardo

em 1942 (Fig. 1). A região é caracterizada por um clima tropical, com duas estações bem marcadas: uma seca e fria (Maio a Setembro) e uma quente e úmida (Outubro a Abril). É um reservatório pequeno, eutrófico e classificado como polimíctico descontínuo quente. Alguns dados morfométricos são apresentados na Tabela 1.

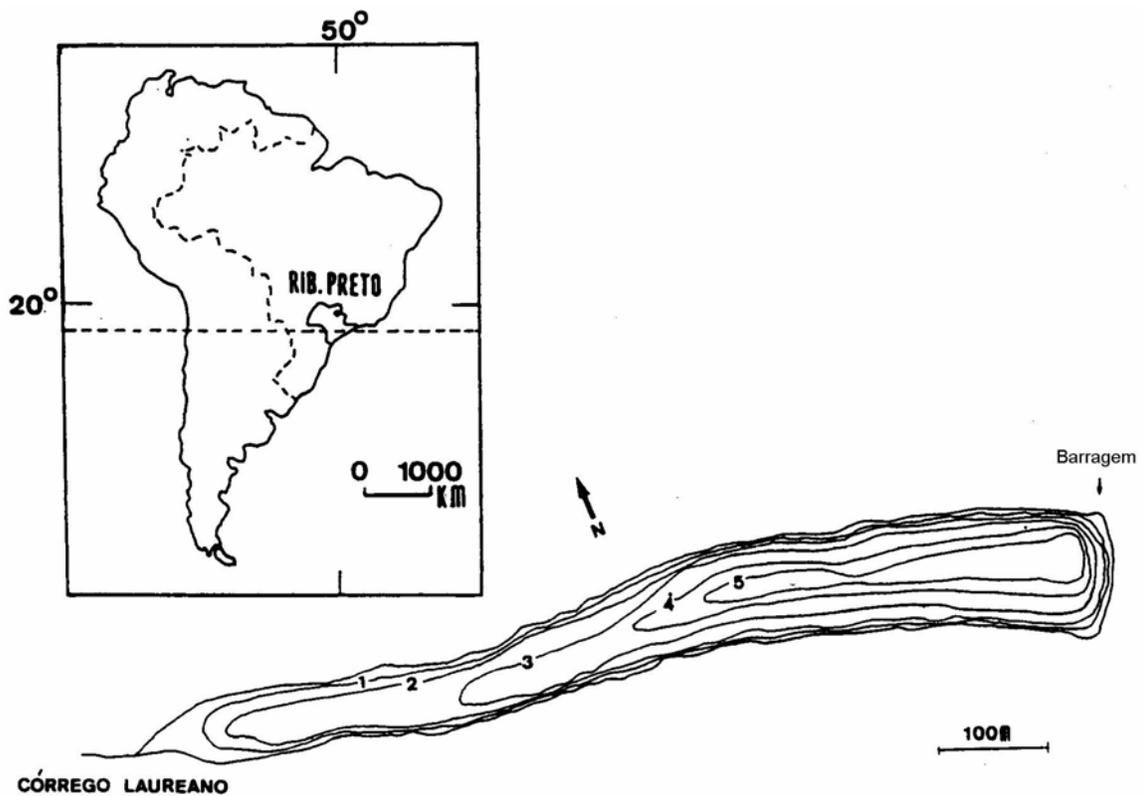


Figura 1. Mapa morfológico e localização geográfica do Lago Monte Alegre.

Tabela 1. Dados morfométricos e hidrológicos do Lago Monte Alegre.

Área (km ²)	0,07
Comprimento total (m)	906
Perímetro (m)	1900
Volume (m ³)	187 x 10 ³
Profundidade máxima (m)	5,0
Profundidade média (m)	2,9

Vazão do córrego ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) 0,0095
Tempo de retenção (dias) 45

A ausência de manipulação pelo homem, já que o reservatório é usado somente para ensino e pesquisa, o pequeno tamanho, o baixo fluxo do córrego e a presença de ventos de baixa velocidade e com direção constante contribuem para a estabilidade do lago (Arcifa *et al.*, 1990).

Em quatro anos de estudo (1985-86/1988-89/1999 e 2001-02), oito espécies de cladóceros foram encontradas no lago (Arcifa *et al.*, 1992; Arcifa *et al.*, 1998; Fileto, C (2001) e Bunioto, T. C. (2003): *Bosmina tubicen*, *Ceriodaphnia cornuta*, *C. richardi*, *Daphnia ambigua*, *D. gessneri*, *Diaphanosoma birgei*, *Moina micrura* e *M. minuta*. De 1998 a 2001, as espécies mais freqüentes e em algumas ocasiões as mais abundantes foram

D. gessneri e *D. ambigua* (densidades máximas: 100 e 80 ind/l, respectivamente).

De 1999 a 2001, Chlorophyceae foi o grupo de algas mais diverso e abundante, sendo *Chlorella homosphaera* (densidade máx. 2139 ind/ml) e *Oocystis lacustris* (1017 ind/ml) as espécies mais representativas, seguidas por colônias da Cyanophyceae *Aphanocapsa incerta* (2249 ind/ml). Existem diferenças sazonais na quantidade e qualidade do alimento, sendo o séston do verão melhor para a reprodução e crescimento populacional dos cladóceros do que o do outono, quando a contribuição da Dinophyceae *Peridinium* no fitoplâncton aumenta (Ferrão-Filho *et al.*, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas do séston e do zooplâncton do lago

O séston foi coletado no lago, durante a realização dos experimentos. As coletas foram feitas numa estação no eixo central do reservatório, com o auxílio de uma bomba de sucção (30 L min^{-1}), fazendo-se a integração da coluna de água até a profundidade de 3,5 m evitando a

região mais profunda que pode ser mais pobre em oxigênio, em alguns períodos do ano. O séston foi passado por uma rede de 140 μm para a retirada do zooplâncton de maior tamanho.

A composição do fitoplâncton do séston foi avaliada durante cada experimento (no início e no final) e a contagem deste foi feita de acordo com Utermöhl (1958).

O zooplâncton foi coletado com o auxílio de rede de plâncton de 60 μm , através de coletas verticais, integrando-se a coluna de água. Os animais foram separados com auxílio de lupa e selecionados dependendo das espécies disponíveis no ambiente no período de cada experimento. Cerca de 40 fêmeas grandes e sem ovos, foram medidas e, posteriormente, colocadas em lâminas de vidro. Os animais foram então secos em estufa por 24 horas e pesados em microbalança (mod.UT2, Metler Toledo). Depois da pesagem, foram transferidos para cápsulas de estanho (análises de C e N) ou de alumínio (análise de P), previamente pesadas, e guardadas em dessecador até a realização das análises químicas. Foram feitas três réplicas para cada elemento químico analisado.

Alga e Animais de laboratório

A clorofícea, *Scenedesmus spinosus*, utilizada nos experimentos, foi cultivada em meio MBL (Stemberger, 1981), em câmara germinativa (FANEM, São Paulo, Brasil) com temperatura constante de 23°C, fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro) e aeração constante.

Os animais utilizados nos experimentos foram cultivados no Laboratório de Limnologia desta Faculdade. Estes foram colocados em garrafas de 500 ml, presas a uma roda de plâncton, contendo água do lago filtrada (filtros de fibra de vidro de 0,45 μm de poro -Sartorius) com adição da clorofícea *S. spinosus* (1 mg C L⁻¹). Estes animais foram cultivados por várias gerações antes da realização dos experimentos e selecionados da mesma forma que aqueles coletados diretamente do ambiente para o procedimento de análises químicas.

Tanto *S. spinosus* quanto o séston coletado no lago foram concentrados através de centrifugação, a 2000 rpm por 5 minutos (exceto no primeiro experimento realizado, de tabela de vida, quando essa metodologia ainda não tinha sido adotada e o séston foi filtrado em filtros de fibra de vidro, e não pode ser analisado em termos de carbono e nitrogênio por motivos técnicos). Alíquotas do concentrado foram então retiradas e colocadas em cápsulas de estanho previamente pesadas para as análises de carbono e nitrogênio. Para as análises de fósforo, alíquotas do séston e de *S. spinosus* foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,45 μm de poro, previamente pesados e incinerados em mufla a 400°C por 1 hora.

Posteriormente, as amostras em cápsulas ou em filtros foram colocadas em estufa a 60°C, por 24 horas. Essas amostras foram guardadas em dessecador até a realização das análises químicas, sendo feitas três réplicas para cada elemento analisado.

Análises Químicas

Carbono e nitrogênio O carbono e nitrogênio de *S. spinosus*, do séston e dos animais foram medidos em Elemental Analyser (Carlo Erba Mod. 1110), pertencente ao Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos. Os resultados são expressos como % do peso seco.

Fósforo

As análises de fósforo de *S. spinosus*, do séston e dos animais foram realizadas através da metodologia que consiste na reação do material a ser analisado com molibdato, ácido ascórbico e tartarato de antimônio. Os ácidos molibdáticos formados são convertidos, por agentes redutores, em um complexo de cor azul (Murphy & Riley, 1962).

Protocolo:

Séston e Alga:

- Filtros contendo o material foram colocados em béqueres de 50 ml e colocados em mufla a 550°C, por duas horas. Esperou-se esfriar;
- Adicionaram-se 1,2 ml de ácido sulfúrico 10N e 5 ml de água destilada. Colocou-se em banho-maria por 10 minutos;
- Em seguida, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, lavando-se o béquer com água destilada até a completa lavagem dos filtros. Esperou-se esfriar;
- Adicionaram-se 5 ml de solução de molibdato (400 ml de água destilada + 0,109g de tartarato de antimônio + 4,8g de heptamolibdato + 80 ml de ac. sulfúrico 10N) e 2 ml de ácido ascórbico 2%. O balão foi preenchido com água destilada até completar 50 ml;
- As amostras foram centrifugadas e depois de 10 minutos, mas antes de 4 horas, foi lida

a absorvância em espectrofotômetro (715nm). Para isso, foi utilizada cubeta de vidro de 5 cm de passo ótico.

Nota: Três brancos foram preparados para cada análise, sendo estes submetidos ao banho-maria e às outras etapas da análise. Os resultados são expressos como % do peso seco.

Animais:

As análises dos animais foram realizadas da mesma maneira, com apenas algumas diferenças: balões volumétricos de 10 ml foram usados, ajustando a quantidade de reagentes para esse volume, sendo que as amostras não precisam ser centrifugadas antes da leitura em espectrofotômetro, além de serem levadas à mufla nos próprios balões, ao invés do uso de béqueres.

Experimentos

A influência da adição de nitrogênio e fósforo ao séston sobre os cladóceros foi analisada através do crescimento individual em biomassa, porém, essa primeira avaliação foi feita através de experimento de tabela de vida, com o objetivo de ter uma idéia mais ampla sobre a estratégia de vida desses animais.

- **Experimento de Tabela de vida**

Período: 13/09 – 01/10/2001

Espécies: *Ceriodaphnia richardi* e *Daphnia ambigua*

Este experimento foi realizado a uma temperatura constante de 23°C e fotoperíodo de 12/12h claro/escuro em câmara de germinação. Os seguintes tratamentos foram feitos: **1)**

Séston, 2) Séston enriquecido com 25 $\mu\text{g PO}_4\text{P L}^{-1}$ 3) Séston

enriquecido com 260 $\mu\text{g de NO}_3\text{ L}^{-1}$ e 4) *S. spinosus* (1 mg C L⁻¹). As quantidades dos nutrientes adicionados foram calculadas de forma que a razão C:P fosse menor que 300 molar e

a razão C:N menor que 15 molar, razões essas consideradas não limitantes. Este experimento foi realizado utilizando coortes de animais obtidos a partir de fêmeas cultivadas em laboratório. Dez neonatos, nascidos num período de 0 – 24 horas, foram colocados individualmente em tubos de ensaio preenchidos com 30 ml dos tratamentos acima especificados. O controle com *S. spinosus* serviu para se ter uma idéia do crescimento máximo dos cladóceros, pois as clorofíceas são tidas como um bom alimento. Foram feitas dez réplicas para cada tratamento.

Diariamente, os animais eram transferidos para novas suspensões de séston e *S. spinosus*, quando o número de sobreviventes e o número de neonatos produzidos foram avaliados para posterior cálculo da sobrevivência etária específica (l_x) e fecundidade etária específica (m_x). Estes dados serviram para a confecção de tabelas de vida e para o cálculo da taxa intrínseca de aumento populacional (r) ou potencial biótico das espécies (Birch, 1948), através do uso de métodos estatísticos (Bootstrap -Programa Computacional SAS) e com o auxílio de outro programa computacional desenvolvido por Mayer *et. al.* (1986).

Os parâmetros de tabela de vida analisados foram: idade da primeira reprodução (primípara), total de neonatos produzidos, fecundidade média, tamanho máximo da prole e tamanho das ninhadas. Estes experimentos foram estendidos até que todos os animais tivessem morrido na maioria dos tratamentos.

Por ocasião dos experimentos, *S. spinosus*, os animais de laboratório, do lago e submetidos aos tratamentos experimentais com adição de nitrogênio e fósforo ao séston foram analisados quanto ao conteúdo de carbono, nitrogênio e fósforo. No entanto, conforme explicado na seção b, o séston desse experimento então retido em filtros não pode ser analisado em termos de carbono e nitrogênio, apesar de vários testes terem sido realizados, porém sem resultados satisfatórios. Devido a tal problema, nos outros experimentos o séston foi concentrado através de centrifugação e colocado diretamente em cápsulas de estanho para análises em “Elemental Analyser”. As análises do conteúdo de fósforo foram realizadas

normalmente conforme metodologia já descrita anteriormente.

Os experimentos de crescimento individual em biomassa foram realizados nas quatro estações do ano para se ter idéia da influência da sazonalidade sobre o crescimento e reprodução das espécies de cladóceros alimentados com o séston da época.

Os experimentos realizados foram:

- **Experimento de Verão**

Período: 19/01 – 24/01/2002

Espécies: *Ceriodaphnia richardi* e *Daphnia ambigua*

- **Experimento de Outono**

Período: 07/06 -11/06/2002

Espécies: *Daphnia ambigua* e *D. gessneri*

- Experimento de Inverno**
- Experimento de Primavera**

Período: 03/09 -06/09/2002

Espécie: *Ceriodaphnia richardi*

Período: 03/12 -07/12/2002 Espécies: *C. richardi* e *D. gessneri*

Outros experimentos foram realizados, avaliando a adição conjunta de fosfato e nitrato ao séston sobre o crescimento individual em biomassa e reprodução de cladóceros, com o intuito

de avaliar a existência de efeito sinérgico entre tais nutrientes.

Esses foram:

• **Experimento de Sinergismo I**

Período: 08/02 -12/02/2003

Espécie: *C. richardi* e *D. gessneri*

• **Experimento de Sinergismo II**

Período: 21/01 -25/01/2004

Espécie: *C. richardi*

Em todos os experimentos citados acima, cerca de 20 animais, nascidos num período de 0 a 24 horas, foram colocados em frascos de 500 ml, presos a uma roda de plâncton, programada para girar durante um minuto e parar durante cinco minutos. Os seguintes tratamentos foram feitos: 1) Séston, 2) Séston enriquecido com $25 \mu\text{g PO}_4\text{P L}^{-1}$ 3) Séston enriquecido com $260 \mu\text{g de NO}_3\text{L}^{-1}$ e 4) *S. spinosus* (1 mg C L^{-1}). Nos experimentos de sinergismo, os seguintes tratamentos foram feitos: 1) Séston, 2) Séston

enriquecido com $25 \mu\text{g PO}_4\text{P L}^{-1}$ 3) Séston enriquecido com $260 \mu\text{g de NO}_3\text{L}^{-1}$ e 4)

Séston enriquecido com $25 \mu\text{g PO}_4\text{P L}^{-1}$ + $260 \mu\text{g de NO}_3\text{L}^{-1}$. Esses experimentos foram realizados em temperatura de 23°Ce com fotoperíodo de 12/12 h claro/escuro.

No início do experimento (tempo t_0), cerca de 10 indivíduos jovens foram transferidos para recipientes de alumínio pré-pesados, os quais foram colocados em estufa a 60°C para secagem completa (24 horas), e novamente pesados. Nos dias subsequentes (2, 3 e/ou 5 dias, dependendo da duração da fase pré-reprodutiva de cada espécie), cerca de 5 a 10 indivíduos foram retirados de cada garrafa, colocados em lâminas de vidro, medidos e secos em estufa a 60°C, por 24 horas. Depois, esses animais foram pesados diretamente em uma microbalança (mod.UT2, Metler Toledo). Os animais restantes nas garrafas eram transferidos para novas suspensões de séston e alga. Foram utilizadas 3 garrafas como réplicas para cada tratamento, sendo que a biomassa dos animais foi obtida pela média da biomassa de conjuntos de 5 a 10 animais retirados das três garrafas. A taxa exponencial de crescimento foi calculada segundo a equação:

$$g = [\ln (W_t) - \ln (W_0)] / t, \text{ onde } W_0 \text{ e } W_t$$

são os pesos médios (em μg) dos indivíduos no tempo t_0 e após t dias, respectivamente. Ao final do experimento, o número de ovos foi contado para o posterior cálculo da fecundidade (n° ovos/total de fêmeas) e do tamanho da ninhada (n° de ovos/fêmea ovígera).

Os resultados foram analisados estatisticamente usando General Linear Model (Estimate Model) e as diferenças significantes foram avaliadas usando ANOVA (Programa Computacional Systat).

Com o intuito de testar se realmente houve absorção dos nutrientes adicionados pelas algas do séston, quantidades de fosfato e nitrato iguais às utilizadas nos tratamentos experimentais foram adicionadas às amostras do séston coletado para os experimentos, com período de incubação de 1 hora. Depois, procedeu-se às análises químicas.

Também foram realizados alguns testes para avaliar possível limitação de energia (carbono) durante o intervalo de troca de água (2 dias) durante estes experimentos. Amostras do séston (400 ml) onde o mesmo número de animais utilizados nos experimentos se alimentou do séston e deste adicionado da alga *S. spinosus* durante 2 dias foram filtradas em filtros (0,45 μm de poro), previamente pesados e incinerados em mufla a

400°C por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa (60 °C) por 24 horas para secagem completa. Essas amostras (duplicatas) foram guardadas em dessecador até a realização das análises químicas (Strickland & Parsons, 1972). Os resultados destes testes são apresentados na seção de anexos (anexo 6).

Para facilitar a leitura dos resultados e discussão os elementos carbono, nitrogênio e fósforo serão citados pelas iniciais: C, N e P.

RESULTADOS

1) Experimento de Tabela de vida

Análises químicas

Scenedesmus spinosus

S. spinosus apresentou valores das razões C:P e C:N abaixo dos limites considerados limitantes em regiões temperadas (C:P > 300 molar e C:N 15 -30 molar) (Tab. 2).

Tabela 2. Valores médios de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) de *S. spinosus* durante o experimento de tabela de vida. Razões C:N e C:P expressas em molar.

C (mg L⁻¹) N (mg L⁻¹) P (µg L⁻¹) C:N C:P

30,50 ± 1,50 2,90 ± 0,15 1380,00 ± 34,00 12,30 ± 0,70 57,00 ± 2,70

Animais

O conteúdo de C em *Daphnia ambigua* foi ligeiramente menor do que o encontrado para *Ceriodaphnia richardi*, exceto quando esta última foi

submetida ao tratamento do séston enriquecido com N (Tab. 3). Os valores da porcentagem de N nos tecidos corporais de ambas as espécies foram similares e observou-se aumento significativo do conteúdo de N em *C. richardi* alimentada com o séston adicionado de N em relação aos animais do ambiente ($P = 0,049$). Da mesma forma, porcentagens de P significativamente maiores foram encontradas em *C. richardi* e *D. ambigua* submetidas ao tratamento do séston adicionado de P em relação ao séston sem adições ($P = 0,049$ e $P = 0,037$, respectivamente). Devido ao baixo número de animais disponível nos tratamentos experimentais, as análises de C dos animais submetidos ao tratamento do séston enriquecido com P não foram realizadas, impossibilitando o cálculo das razões C:P para esse tratamento.

Tabela 3. Valores médios da porcentagem (peso seco) de carbono (C), N (N) e fósforo (P) de *D. ambigua* e

C. richardi durante o experimento de tabela de vida. Valores expressos com média \pm desvio padrão.

D. ambigua

Cultivo Ambiente Séston + P Séston + N

C. richardi

Cultivo Ambiente Séston + P Séston + N

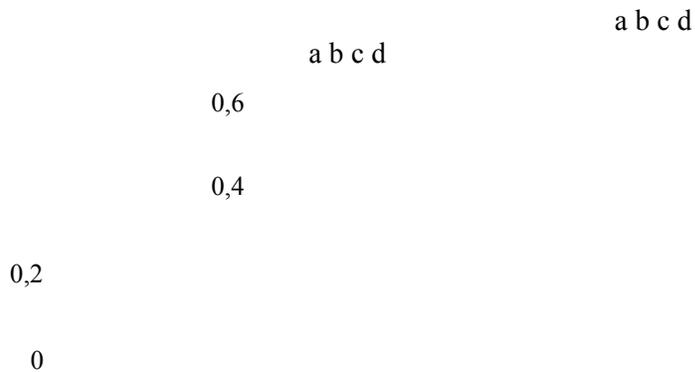
C (%)	N (%)	P (%)	C:N	C:P
37,70 \pm 2,60	13,20 \pm 0,35	1,15 \pm 0,09	3,30 \pm 0,00	37,15 \pm 0,00
36,50 \pm 1,40	9,90 \pm 0,45	0,99 \pm 0,00	4,30 \pm 0,20	150,00 \pm

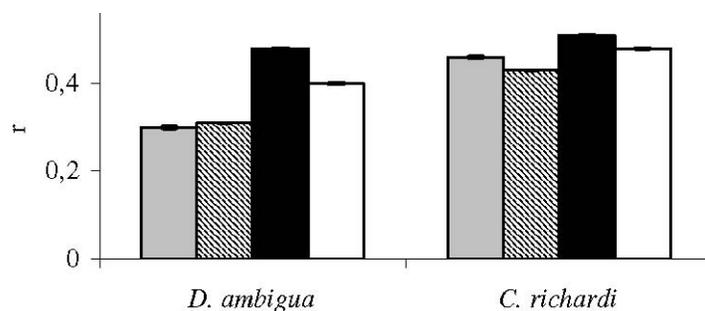
				10,00
□	□	1,40 ± 0,03	□	□
33,40 ± 2,06	11,00 ± 3,55	□	3,65 ± 1,70	□
41,00 ± 3,70	7,25 ± 0,40	1,00 ± 0,05	6,65 ± 1,05	125,00 ± 15,00
46,50 ± 2,15	9,15 ± 1,98	0,99 ± 0,00	5,90 ± 0,00	137,00 ± 1,80
□	□	1,30 ± 0,15	□	□
29,00 ± 5,40	9,00 ± 1,75	□	2,75 ± 0,30	□

Experimento

Taxa intrínseca de aumento populacional (r)

Os valores de r foram significativamente maiores no séston enriquecido com N comparado ao séston sozinho e ao séston adicionado de P para *D. ambigua* e *C. richardi* (P = 0,000 para todos os casos) (Fig. 2). Nota-se, entretanto, que houve um menor crescimento populacional com a adição de P em relação ao séston sozinho para *C. richardi* (P = 0,000).





Séston

▨ Séston +P

■ Séston +N □ Sce

□

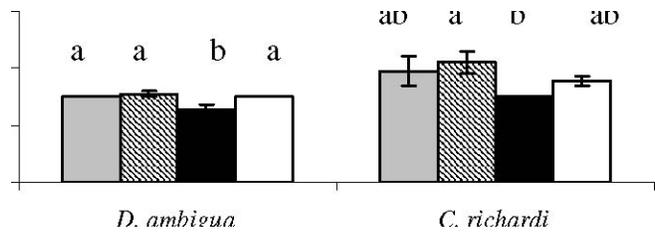
Figura 2. Valores de média \pm desvio padrão de r (Bootstrap – Programa Computacional SAS) para *D. ambigua* e *C. richardi* do experimento de tabela de vida. Valores designados por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

Parâmetros reprodutivos

A idade da primeira reprodução (primípara) de *D. ambigua* foi significativamente menor no séston enriquecido com N em relação ao séston sozinho ($P = 0,013$) e ao séston com adição de P ($P = 0,002$) (Fig. 3). *C. richardi* apresentou uma diminuição no tempo para atingir a primípara no séston adicionado de N em relação ao tratamento com séston adicionado de P ($P = 0,030$).

A fecundidade média de *D. ambigua* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com séston. *C. richardi* apresentou fecundidade média significativamente maior no séston adicionado de N em relação ao séston adicionado de P ($P = 0,000$) (Fig. 3).

Primípara



ab a b ab

a a b a

4

2

0

dias

Fecundidade média

a

b a a

D. ambigua C. richardi

■ Séston

▨ Séston + P

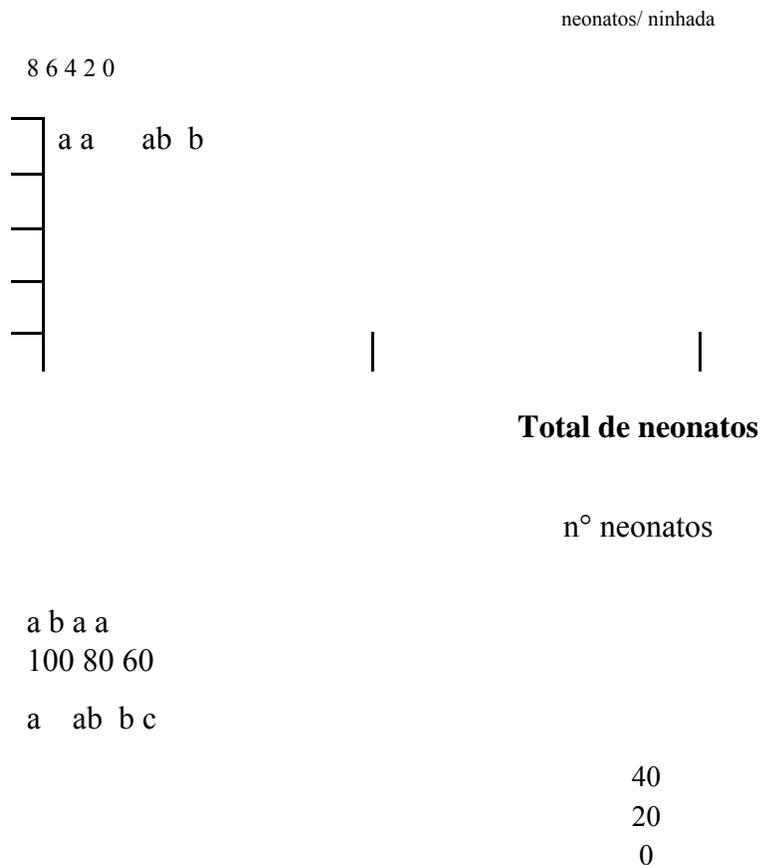
■ Séston + N

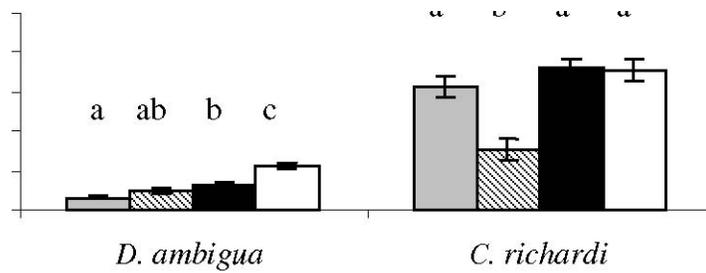
□ Sce

Figura 3. Parâmetros reprodutivos (média \pm desvio padrão) de *D. ambigua* e *C. richardi*. As diferenças foram analisadas por ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores designados por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

O total de neonatos produzidos por *D. ambigua* foi significativamente maior no tratamento séston + N em relação ao séston sozinho ($P = 0,022$) (Fig. 4), enquanto *C. richardi* apresentou número de neonatos significativamente maior no tratamento séston + N em relação ao séston + P ($P = 0,000$).

D. ambigua e *C. richardi* não apresentaram diferença significativa no tamanho máximo da prole entre os tratamentos com séston, mas observa-se que *C. richardi* apresentou tamanhos máximos das proles bem maiores quando comparada com *D. ambigua* (Fig. 4).





Tamanho máximo da prole

25 a ab ab b20 15 10 5 0

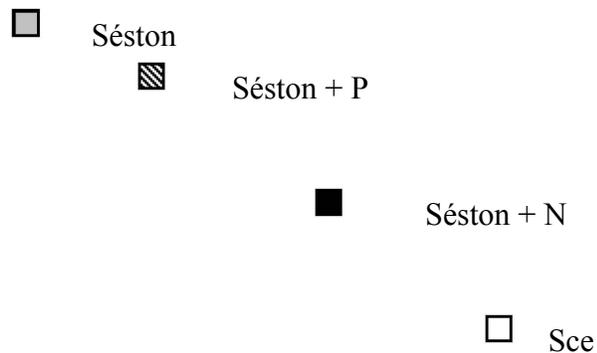
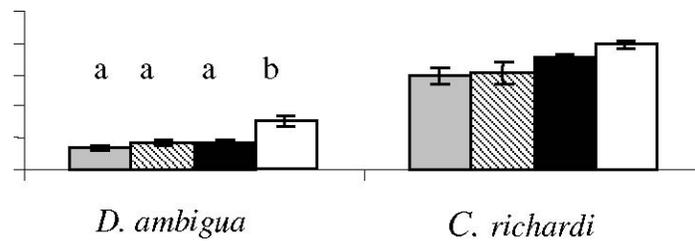


Figura 4. Parâmetros reprodutivos (média \pm desvio padrão) de *D. ambigua* e *C. richardi*. As diferenças foram analisadas por ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores designados por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

Outro parâmetro reprodutivo analisado foi o tamanho das proles (Fig. 5). A segunda ninhada de *D. ambigua* foi significativamente maior nos tratamentos do séston com adição de P e séston com adição de N em relação ao séston sozinho ($P = 0,022$ e $P = 0,014$,

respectivamente). O tratamento séston sem adições não permitiu o cálculo da terceira ninhada, pois nesse período houve uma grande mortalidade das réplicas. *C. richardi* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com séston nas duas primeiras ninhadas, mas na terceira ninhada o tamanho da prole foi significativamente maior no tratamento séston adicionado de N em relação ao séston sozinho ($P = 0,017$). Por outro lado, na quarta ninhada o número de neonatos foi significativamente maior no tratamento séston adicionado de P em relação ao séston sozinho ($P = 0,020$). No entanto, os animais sobreviveram menos com a adição de P, não havendo número suficiente de réplicas para o cálculo da quinta ninhada. Os indivíduos de *C. richardi* alimentados com o séston sozinho conseguiram manter a reprodução por mais tempo quando comparados com *D. ambigua*.

D. ambigua

8

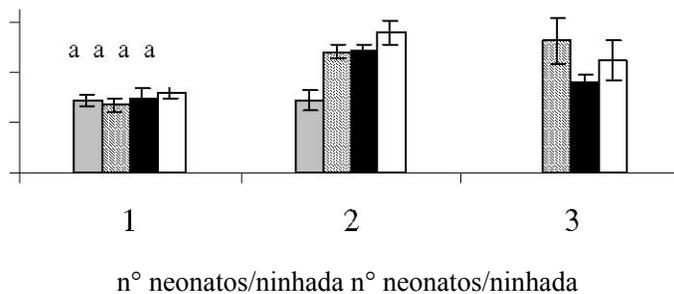
a b b b aaa

6

4

2

0



C. richardi

25

20 15

aa aa

10 5 0

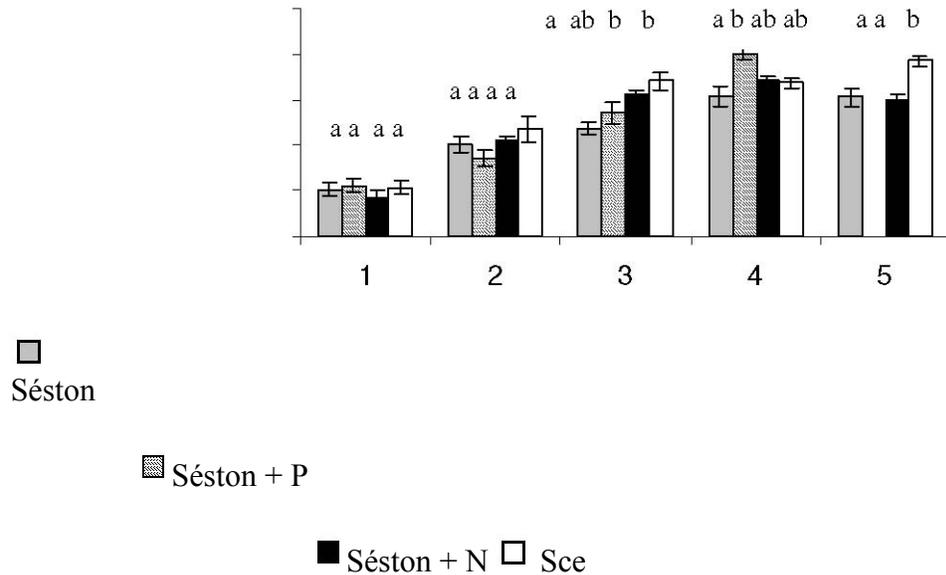


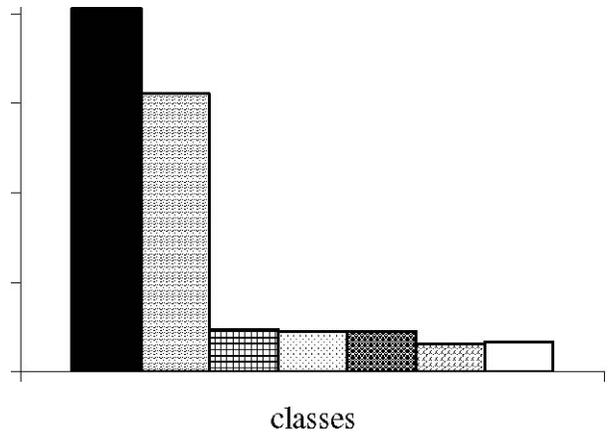
Figura 5. Tamanho das proles (média \pm desvio padrão) de *D. ambigua* e *C. richardi*. As diferenças foram analisadas por ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Valores designados por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

Composição do fitoplâncton

A classe de algas mais abundante durante esse experimento foi Cyanophyceae, seguida por Chlorophyceae (Fig. 6). No entanto, a diversidade de clorofíceas foi maior. Bacillariophyceae, Euglenophyceae e Cryptophyceae foram outras classes presentes no fitoplâncton.

ind/ml

5000 4000 3000 2000 1000 0



■
 ▨
 □ Cyanophyceae

Chlorophyceae

Baccilariophyceae

Cryptophyceae Euglenophyceae Crysophyceae

Zygnemaphyceae Figura 6. Composição fitoplanctônica do séston no experimento

de tabela de vida.

Com o objetivo de facilitar a interpretação da composição do fitoplâncton e suas respectivas relações com os cladóceros utilizados nos experimentos, este foi analisado em termos de tamanho, forma e presença de espinhos e mucilagem. Tais características são consideradas influenciadoras da ingestão destas partículas pelo zooplâncton, incluindo cladóceros. Observou-se predomínio do nanoplâncton neste experimento (Tab. 4). Nesta fração, 40 % das algas presentes apresentavam-se na forma colonial e com mucilagem e *ca.* de 3,50 % apresentavam espinhos ou eram cenóbicas. O restante das algas (43,50 %) desta classe de tamanho apresentava formas mais arredondadas, filiformes ou fusiformes, sem espinhos ou

mucilagem. No microplâncton, 70 % das algas possuíam formas filamentosas e outros 30 % das algas continham espinhos ou eram coloniais/mucilaginosas, ou seja, todas consideradas inadequadas para a alimentação dos cladóceros.

Tabela 4. Composição relativa, com base nas densidades, das frações do nano-e microplâncton quanto às características das algas encontradas em cada fração do experimento de tabela de vida. ND = não detectada; Outras = algas sem ornamentações, com formas arredondadas, ovóides e filiformes.

Frações do séston

≤ 20 μm >20 μm

% cada fração	≤ 20 μm	>20 μm
Colônia/mucilagem	40,0 %	2,0 %
Espinhos	2,0 %	26,0 %
Cenóbio	1,5 %	2,0 %
Filamentosas	ND	70,0 %
Outras	56,5 %	0 %

2) Experimentos de crescimento individual em biomassa

Análises químicas Scenedesmus spinosus A clorofíceia *S. spinosus*

não apresentou limitação de N ou P, sendo considerada

suficiente em nutrientes em todos os experimentos (Tab. 5).

Observou-se que as concentrações de C, N e P variaram nos

diferentes experimentos, mesmo usando a alga na sua fase exponencial de crescimento em todos eles. No entanto, tais variações são aceitáveis, pois não comprometeram o estado nutricional da alga.

Tabela 5. Valores (média \pm desvio padrão) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) de *S. spinosus* durante os experimentos de crescimento individual em biomassa nas estações do ano de 2002. Razões C:N e C:P expressas em molar.

Verão Outono Inverno Primavera

C (mg L⁻¹)	N (mg L⁻¹)	P (μg L⁻¹)	C:N	C:P
29,95 \pm 0,60	2,85 \pm 0,06	620,50 \pm 110,60	12,20 \pm 0,00	127,00 \pm 25,25
22,20 \pm 1,25	2,40 \pm 0,30	843,00 \pm 67,00	11,30 \pm 1,40	70,70 \pm 7,50
26,00 \pm 0,50	3,75 \pm 0,90	638,00 \pm 33,00	8,50 \pm 2,25	108,00 \pm 5,40
18,50 \pm 0,30	2,90 \pm 0,00	488,00 \pm 3,10	7,40 \pm 0,15	101,00 \pm 2,45

Séston

As concentrações de C, N e P do séston variaram entre as estações do ano de 2002 e, em alguns casos, dentro de um mesmo experimento (Tab. 6), porém tais concentrações estavam acima dos valores considerados limitantes para o crescimento do zooplâncton.

No experimento de verão, as concentrações de C do séston (medidas no início e fim do experimento) foram mais altas em relação às outras estações do ano, sendo que o mesmo

ocorreu com as concentrações de N (Tab. 6). Houve alta variação nas concentrações de P entre o início e o fim do experimento de verão, porém valores mais elevados dessas concentrações foram encontrados no experimento de outono em relação ao de verão.

No experimento de outono, as concentrações dos nutrientes foram similares comparando-se o início e fim dos experimentos (Tab. 6).

No inverno, as concentrações de C foram as que mais variaram comparando-se o início e o fim do experimento enquanto as concentrações de N e P foram similares (Tab. 6).

No experimento de primavera as concentrações de C e P variaram entre o início e o fim do experimento, enquanto as de N variaram menos (Tab. 6).

As razões C:N diminuíram, na maioria dos casos, com a adição de N ao séston comparado ao séston sem adições ao longo dos experimentos, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada. As razões C:P diminuíram significativamente com a adição de P ao séston somente no inverno ($P = 0,020$).

Razão C:N significativamente menor foi encontrada no verão ($P = 0,000$) em relação às outras estações, enquanto não houve diferença significativa nas razões C:P ao longo das estações.

Tabela 6. Valores (média \pm desvio padrão) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) do séston durante os experimentos de crescimento individual em biomassa nas estações do ano de 2002. Razões C:N e C:P expressas em molar.

C (mg L⁻¹) N (mg L⁻¹) P (μ g L⁻¹) C:N C:P

Verão Séston inicial 0,75 \pm 0,05 0,20 \pm 0,02 22,00 \pm 3,40 4,25 \pm 0,60
 57,00 \pm 13,50 Séston final 0,65 \pm 0,06 0,17 \pm 0,03 30,50 \pm 0,93 4,30 \pm

3,50 46,50 ± 8,75 Séston + N 0,60 ± 0,30 0,20 ± 0,07 □ 4,00 ± 3,00 □
 Séston + P 0,39 ± 0,00 □ 50,00 ± 20,55 □ 24,95 ± 2,60

Outono

Séston inicial	0,50 ± 0,05	0,11 ± 0,00	20,70 ± 2,60	5,85 ± 0,55	73,00 ± 0,15
Séston final	0,55 ± 0,00	0,11 ± 0,00	22,70 ± 0,90	5,80 ± 0,30	66,00 ± 2,70
Séston + N	0,75 ± 0,00	0,20 ± 0,00	□	4,12 ± 0,00	□
Séston + P	0,70 ± 0,06	0,18 ± 0,00	44,00 ± 1,60	4,70 ± 0,40	44,00 ± 4,10

Inverno Séston inicial 0,60 ± 0,00 0,11 ± 0,00 23,60 ± 2,70 6,35 ± 0,45
 64,10 ± 1,00 Séston final 0,47 ± 0,00 0,09 ± 0,00 26,95 ± 5,80 6,35 ± 0,15
 41,45 ± 2,25 Séston + N 0,44 ± 0,15 0,14 ± 0,00 □ 3,60 ± 1,15 □ Séston +
 P 0,60 ± 0,01 □ 43,00 ± 1,30 □ 37,40 ± 0,20

Primavera Séston inicial 0,46 ± 0,00 0,09 ± 0,00 28,00 ± 2,30 5,75 ± 0,10
 43,00 ± 3,85 Séston final 0,50 ± 0,10 0,11 ± 0,00 23,00 ± 0,83 5,75 ±
 1,30 63,00 ± 17,40 Séston + N 0,50 ± 0,17 0,22 ± 0,00 □ 2,70 ± 0,90 □
 Séston + P 0,50 ± 0,00 0,16 ± 0,00 66,30 ± 3,95 3,60 ± 0,03 20,80 ± 1,70

Animais

C. richardi e *D. ambigua* apresentaram porcentagens de C similares durante o experimento de verão, considerando animais de cultivo, do ambiente e submetidos aos tratamentos do séston enriquecido com N (Tab 7). Os valores do conteúdo de N foram ligeiramente mais altos em *C. richardi* quando comparada a *D. gessneri*, que apresentou baixa porcentagem de N quando coletada diretamente do ambiente. Foram encontradas porcentagens de P similares em ambas as espécies.

No outono, menores porcentagens de C nos tecidos corporais de *D. ambiguae* *D. gessneri* foram encontradas nos animais coletados diretamente do ambiente, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada (Tab. 7). O valor da porcentagem de N também foi menor

em *D. gessneri* do ambiente. As porcentagens de P foram similares em ambas as espécies, sendo que esta se apresentou mais elevada em indivíduos que se alimentaram tanto do séston sem adições como daquele enriquecido com P, porém nenhuma diferença significativa foi observada com a adição de P.

No inverno, as porcentagens de C, N e P encontradas foram similares em *C. richardi* (Tab. 7).

Na primavera, *C. richardi* e *D. gessneri* apresentaram porcentagens de C corporal similares, assim como as de N. No entanto, somente *C. richardi* apresentou aumento significativo de N corporal quando o séston foi suplementado com N ($P = 0,0243$) (Tab. 7). O conteúdo de P de *C. richardi* e *D. gessneri* foram similares, exceto que *C. richardi* apresentou menor porcentagem quando coletada diretamente do ambiente.

Tabela 7. Porcentagem (peso seco) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) nos animais utilizados nos experimentos de crescimento individual em biomassa nas estações do ano de 2002.

C		N	P	C	N	P	
		<i>C. richardi</i>			<i>D. gessneri</i>		
Verão Cultivo	48,55 ± 7,00	11,20 ± 4,00	1,00 ± 0,08	45,60 ± 2,20	10,30 ± 0,25	1,07 ± 0,15	
Ambiente	46,50 ± 2,10	12,00 ± 1,00	1,10 ± 0,03	47,25 ± 1,10	6,35 ± 1,10	1,06 ± 0,10	
Séston	52,50 ± 6,90	12,40 ± 1,60	1,10 ± 0,15	50,55 ± 9,25	10,30 ± 0,40	1,15 ± 0,07	
Séston + P	□	□	1,20 ± 0,20	□	□	1,40 ± 0,02	
Séston +N	45,75 ± 6,00	10,40 ± 0,40		50,40 ± 1,30	12,35 ± 1,25	□	
		<i>D. ambigua</i>			<i>D. gessneri</i>		
Outono Cultivo	50,50 ± 2,10	10,40 ± 3,40	0,97 ± 0,04	49,10 ± 2,70	10,75 ± 3,90	1,00 ± 0,06	

Ambiente	40,85 ± 1,65	10,15 ± 0,35	1,00 ± 0,10	42,90 ± 1,40	6,60 ± 0,60	1,25 ± 0,20
Séston	51,50 ± 9,20	9,55 ± 0,07	1,10 ± 0,14	54,15 ± 3,00	9,50 ± 0,70	1,40 ± 0,06
Séston + P	□	□	1,30 ± 0,20	□	□	1,30 ± 0,18
Séston + N	50,40 ± 1,30	12,20 ± 1,65	□	54,90 ± 10,10	10,00 ± 0,20	□
Inverno	<i>C. richardi</i>					
Cultivo	49,90 ± 2,30	8,55 ± 3,20	1,12 ± 0,20			
Ambiente	46,30 ± 1,85	9,15 ± 3,00	1,00 ± 0,10			
Séston	54,60 ± 3,90	8,85 ± 0,60	1,10 ± 0,15			
Séston + P	□	□	1,40 ± 0,01			
Séston + N	51,20 ± 13,90	9,85 ± 0,90				
Primavera	<i>C. richardi</i>			<i>D. gessneri</i>		
Cultivo	52,50 ± 3,25	7,10 ± 0,20	1,30 ± 0,25	48,00 ± 1,60	7,45 ± 0,50	1,00 ± 0,07
Ambiente	48,45 ± 4,80	10,24 ± 3,55	1,15 ± 0,08	47,55 ± 3,80	10,75 ± 4,20	1,10 ± 0,20
Séston	53,50 ± 4,95	9,10 ± 1,50	0,99 ± 0,01	48,15 ± 8,70	10,45 ± 0,15	1,46 ± 0,15
Séston + P	□	□	1,20 ± 0,20	□	□	1,30 ± 0,10
Séston + N	49,95 ± 1,35	15,10 ± 1,20	□	55,00 ± 5,65	10,90 ± 0,90	□

As razões C:N dos cladóceros de cultivo, do ambiente e submetidos aos tratamentos experimentais variaram de 3,90 a 8,80, sendo que na maioria dos casos observou-se diminuição das razões com a adição de N ao séston (Tab. 8). No entanto, somente no experimento de primavera a adição de N ao séston provocou diminuição significativa da razão C:N de *C. richardi* ($P = 0,047$). As razões C:P encontradas variaram de 67 a 378 nos animais de cultivo, ambiente e alimentados com o séston, sendo significativamente menores em *D. ambigua* alimentada com o séston enriquecido com P no outono ($P = 0,0383$). Devido ao baixo número de animais disponíveis no tratamento do séston adicionado com P ao final do experimento, não foi possível calcular as razões C:P para esse tratamento.

Tabela 8. Razões C:N e C:P (média \pm desvio padrão) nos animais utilizados nos experimentos de crescimento individual em biomassa nas estações do ano de 2002.

Estações/Tratamentos

Verão

Cultivo
Ambiente
Séston
Séston + N

Outono

Cultivo
Ambiente
Séston
Séston + N

Inverno

Cultivo
Ambiente
Séston
Séston + N

Primavera

Cultivo
 Ambiente
 Séston
 Séston + N

C:N		C:P	
<i>C. richardi D. gessneri</i>		<i>C. richardi D. gessneri</i>	
5,20 ± 2,80	5,20 ± 0,10	220,00 ± 13,00	123,00 ± 28,00
4,55 ± 0,20	8,80 ± 1,30	67,00 ± 1,30	107,00 ± 13,10
4,95 ± 0,01	5,75 ± 1,30	266,00 ± 15,00	272,00 ± 18,90
5,20 ± 0,90	4,80 ± 0,60	□	□
<i>D. ambigua D. gessneri</i>		<i>D. ambigua D. gessneri</i>	
6,00 ± 2,20	5,75 ± 2,40	378,00 ± 66,50	275,00 ± 31,60
4,70 ± 0,03	7,60 ± 0,90	170,00 ± 9,90	112,50 ± 30,80
6,30 ± 1,20	6,70 ± 0,90	338,00 ± 19,50	116,00 ± 5,70
4,80 ± 1,60	6,40 ± 0,72	□	□
<i>C. richardi</i>		<i>C. richardi</i>	
7,40 ± 3,10		252,00 ± 107,00	
6,20 ± 1,80		167,10 ± 31,00	
7,20 ± 0,03		234,00 ± 60,10	
6,20 ± 2,20		□	
<i>C. richardi D. gessneri</i>		<i>C. richardi D. gessneri</i>	
8,60 ± 0,30	7,60 ± 0,25	375,00 ± 3,45	243,30 ± 64,20
5,80 ± 1,45	5,50 ± 1,70	151,20 ± 17,00	110,00 ± 44,00
6,90 ± 0,50	5,40 ± 0,90	330,50 ± 45,55	236,23 ± 85,95
3,90 ± 0,20	5,90 ± 0,15	□	□

Experimentos

Experimentos

Experimento de Verão

Observou-se que *C. richardi* e *D. ambigua* não apresentaram diferença significativa no crescimento em biomassa nos tratamentos com o séston sozinho ou com adição de nutrientes (Figs. 7 e 8). Crescimento individual máximo foi obtido com a alga *S. spinosus* para ambas as espécies ($P = 0,000$).

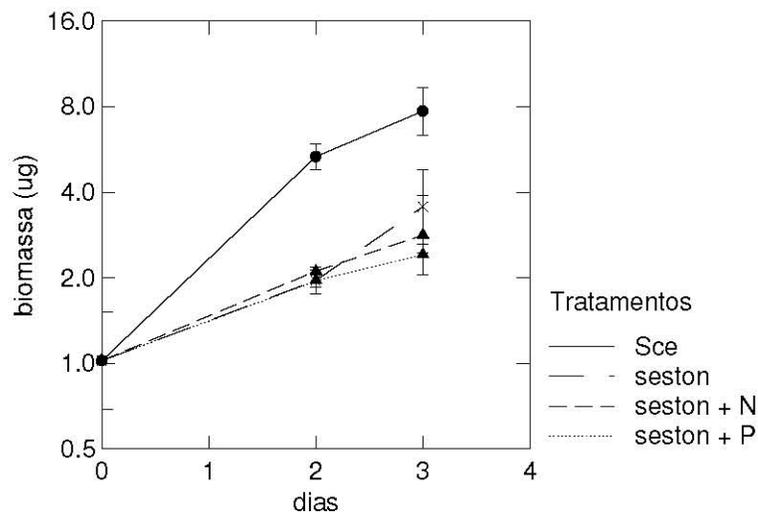


Figura 7. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no experimento de verão. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

Tratamentos

Sce seston seston + N seston + P

01234 dias Tratamentos

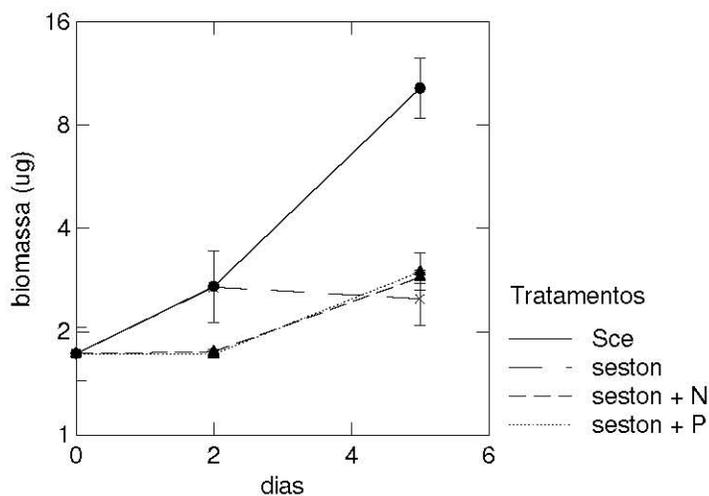


Figura 8. Crescimento em biomassa de *D. ambigua* submetida aos tratamentos no experimento de verão. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Com relação à taxa de crescimento (g), somente *D. ambigua* apresentou diferença significativa entre os tratamentos com o séston, no segundo dia de experimento, quando o g foi maior no séston sozinho em relação ao séston adicionado de nutrientes, sendo que nestes dois últimos, a taxa de crescimento foi muito baixa (Tab. 9). Por outro lado, a taxa máxima de crescimento foi significativamente maior no tratamento com *S. spinosus* comparando aos outros tratamentos para as duas espécies (exceto *D. ambigua* no T = 2 dias), indicando seu alto valor nutricional para as espécies em questão.

no tratamento com *S. spinosus*

=2

Tabela 9. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *D. ambigua* e *C. richardi*, no verão, através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

Espécies	<i>D. ambigua</i>		<i>C. richardi</i>	
	T = 2 dias	T = 5 dias	T = 2 dias	T = 3 dias
Tratamentos	0,23 \pm	0,60 \pm	0,82 \pm	0,67 \pm
<i>S. spinosus</i>	0,000 (a) 0,23 \pm	0,043 (a) 0,07 \pm	0,035 (a) 0,32 \pm	0,041 (a) 0,41 \pm
Séston	0,050 (a) 0,05 \pm	0,014 (b) 0,11 \pm	0,044 (b) 0,32 \pm	0,040 (b) 0,28 \pm
Séston + P	0,000 (b) 0,01 \pm	0,016 (b) 0,10 \pm	0,062 (b) 0,36 \pm	0,025 (b) 0,34 \pm
Séston + N	0,002 (b)	0,006 (b)	0,005 (b)	0,040 (b)

Tabela 10. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em biomassa (verão – 2002) de *D.ambigua* e *C. richardi*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F = efeito.

		<i>D. ambigua</i>	<i>C richardi</i>
		T = 2 - 3 dias	T = 2 - 5 dias
Efeito	g.l QM	3 0,166	3 0,230
	F	11,096	52,580
	P	0,000	0,000
Erro	g.l QM	15 0,015	14 0,004

O tamanho da ninhada e a fecundidade não foram significativamente diferentes, comparando os tratamentos séston sozinho e adicionado de P e N (Fig. 9).

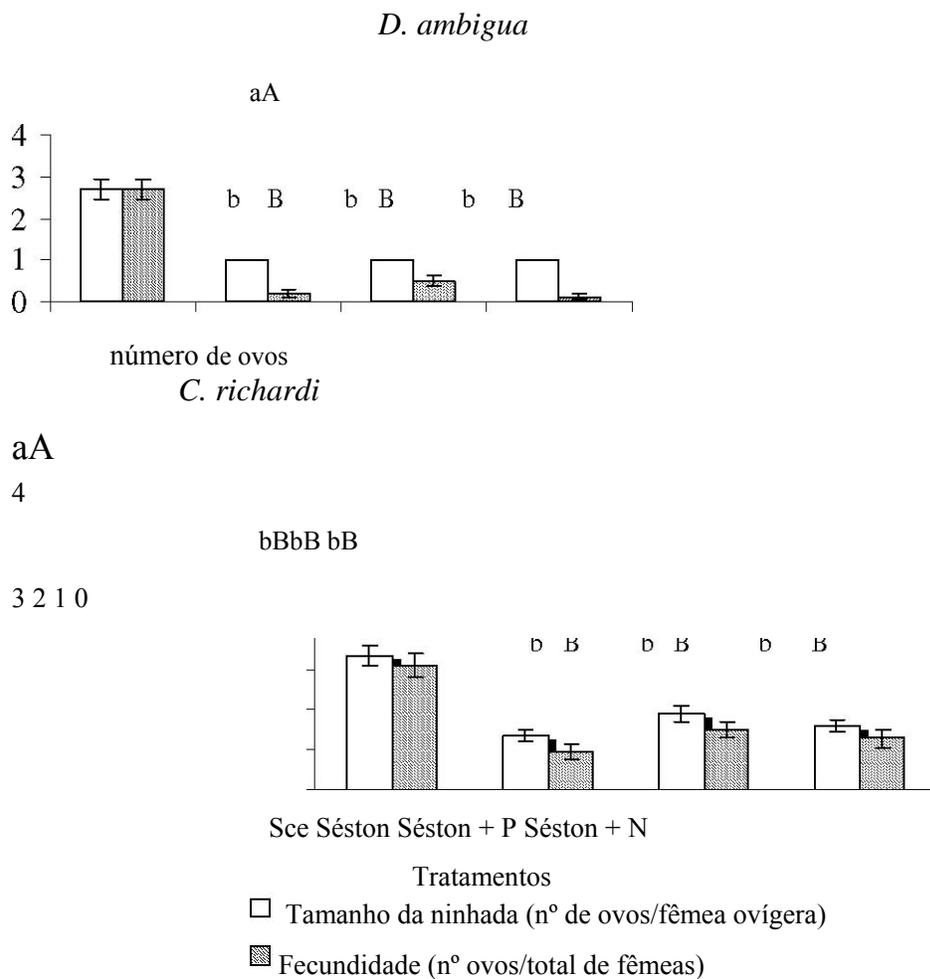


Figura 9. Diferenças de tamanho da ninhada e fecundidade de *D. ambigua* e *C. richardi* no experimento de verão (ANOVA). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras

diferentes referem-se a médias significativamente diferentes.

Experimento de Outono

Observou-se que *D. ambigua* e *D. gessneri* não apresentaram diferença significativa no crescimento em biomassa nos tratamentos com o séston sem adições ou com adição de nutrientes (Figs. 10 e 11).

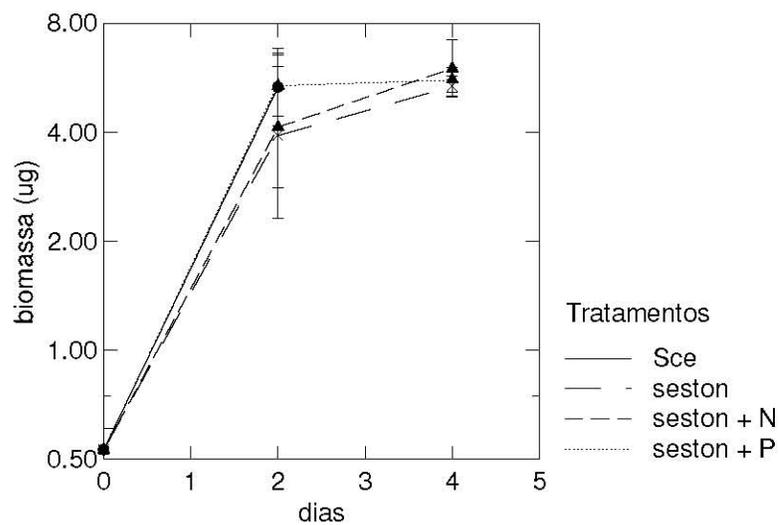
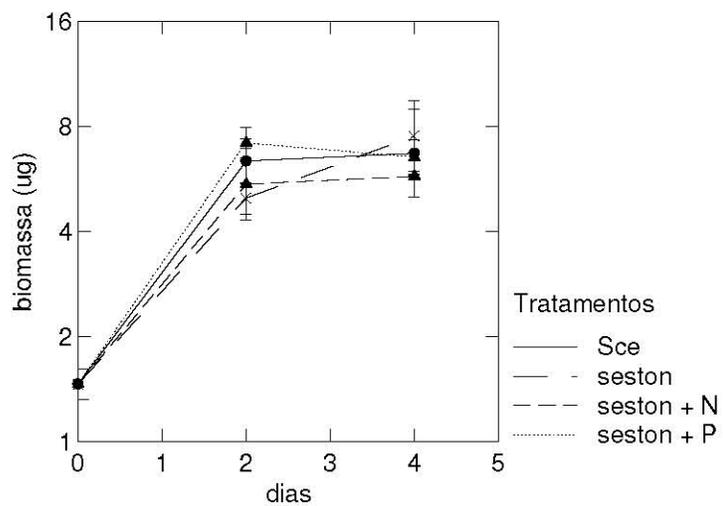
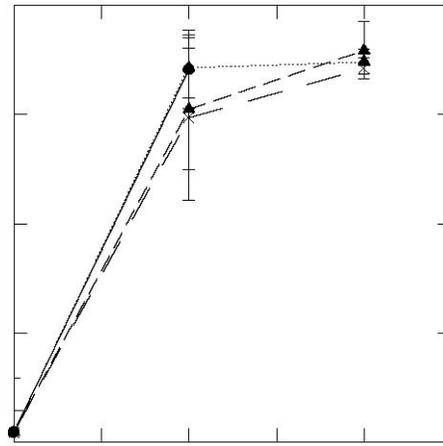


Figura 10. Crescimento em biomassa de *D. ambigua* submetida aos tratamentos no experimento de outono. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.





Tratamentos

Sce seston seston + N seston + P

012345 dias

012345 dias

Figura 11. Crescimento em biomassa de *D. gessneri* submetida aos tratamentos no experimento de outono. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

Com relação à taxa de crescimento, *D. ambigua* e *D. gessneri* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tab. 11).

Tabela 11. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *D. ambigua* e *D. gessneri*, no outono, através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

Espécies	<i>D. ambigua</i>		<i>D. gessneri</i>	
	T = 2 dias	T = 4 dias	T = 2 dias	T = 4 dias
<i>S. spinosus</i>	1,05 \pm 0,000 (a)	0,65 \pm 0,020 (a)	0,74 \pm 0,047 (a)	0,41 \pm 0,030 (a)
Séston	1,16 \pm 0,100 (a)	0,59 \pm 0,009 (a)	0,79 \pm 0,020 (a)	0,41 \pm 0,020 (a)
Séston + P	1,04 \pm 0,035 (a)	0,61 \pm 0,009 (a)	0,75 \pm 0,031 (a)	0,37 \pm 0,016 (a)
Séston + N		0,25 (a)	0,45 (a)	0,34 \pm 0,000 (a)

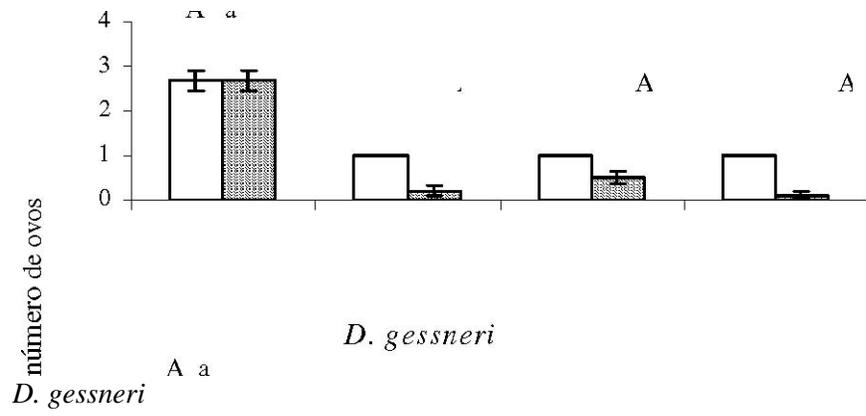
Tabela 12. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em

		<i>D. ambigua</i>	<i>D. gessneri</i>
		T = 2 -4 dias	T = 2 - 4dias
Efeito	g.l QM	3 0,776	3 2,222
	F	0,119	0,319
	P	0,948	0,812
Erro	g.l QM	27 6,504	27 6,975

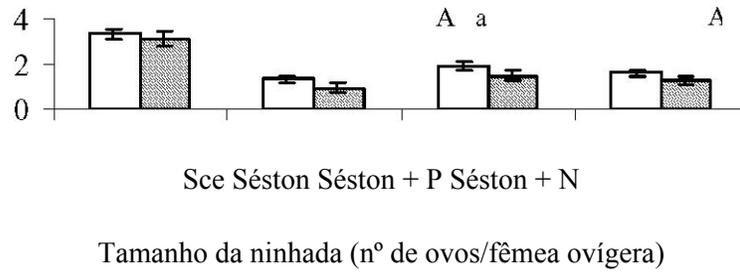
biomassa (outono – 2002) de *D.ambigua* e *D. gessneri*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F = efeito.

O tamanho da ninhada e a fecundidade não foram significativamente diferentes, comparando os tratamentos séston sozinho e adicionado de P e N (Fig. 12).

Aa *D. ambigua*



Aa



■ Fecundidade (nº ovos/total de fêmeas)

Figura 12. Diferenças de tamanho da ninhada e fecundidade de *D. ambigua* e *D. gessneri* no

experimento de outono (ANOVA). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes.

Experimento de Inverno

C. richardi apresentou crescimento em biomassa significativamente maior quando alimentada com *S. spinosus* em relação ao séston sem adições ($P = 0,021$) no terceiro dia de experimento, não havendo diferença estatística entre os tratamentos com o séston sem adições e séston adicionado de N ou P (Fig. 13). No entanto, observa-se uma tendência de queda de crescimento nos tratamentos com o séston sem adições após o segundo dia de experimento.

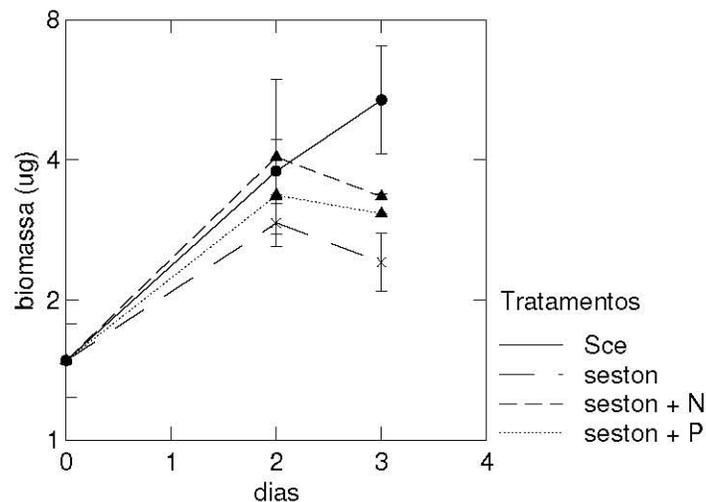


Figura 13. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no experimento de inverno. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

A taxa de crescimento individual (g) de *C. richardi* não foi significativamente diferente ao longo do experimento entre os tratamentos (Tab. 13).

experimento.

Tratamentos
Sce seston seston + N seston + P

01234 dias

Tabela 13. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *C. richardi*, no inverno, através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

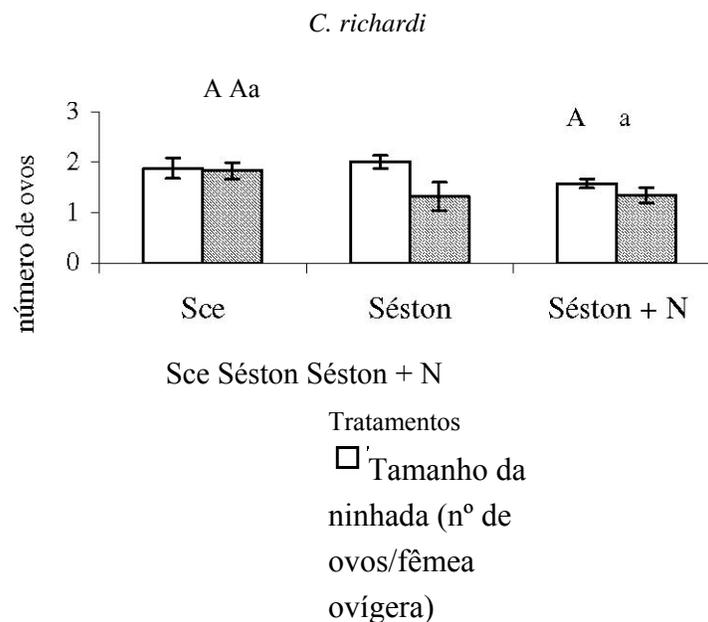
Espécie	<i>C. richardi</i>	
	T = 2 dias	T = 3 dias
Tratamentos		
<i>S. spinosus</i>	0,52 \pm 0,086 (a)	0,47 \pm 0,000 (a)
Séston	0,38 \pm 0,061 (a)	0,22 \pm 0,070 (a)
Séston + P	0,41 \pm 0,000 (a)	0,24 \pm 0,000 (a)
Séston + N	0,51 \pm 0,170 (a)	0,31 \pm 0,063 (a)

Tabela 14. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em biomassa (inverno – 2002) de *C. richardi*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F = efeito.

T = 2 -3 dias

Efeito	g.l	3
	QM	2,713
	F	1,431
	P	0,267
Erro	g.l	18
	QM	1,896

Com relação à reprodução, *C. richardi* não apresentou diferença significativa no tamanho da ninhada e fecundidade média entre os tratamentos, sendo que não houve produção de ovos no tratamento séston enriquecido com P até o final do experimento (Fig. 14).



■ Fecundidade (nº ovos/total de fêmeas) Figura 14. Diferenças de tamanho da ninhada e fecundidade de *C. richardi* no experimento de inverno (ANOVA). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes.

Experimento de Primavera

C. richardi e *D. gessneri* não apresentaram diferença significativa no crescimento individual em biomassa entre os tratamentos com o séston (Figs. 15 e 16).

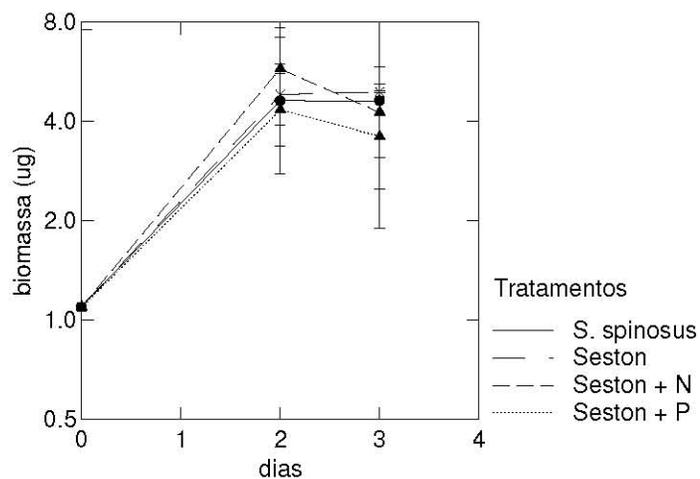


Figura 15. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no experimento de primavera. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

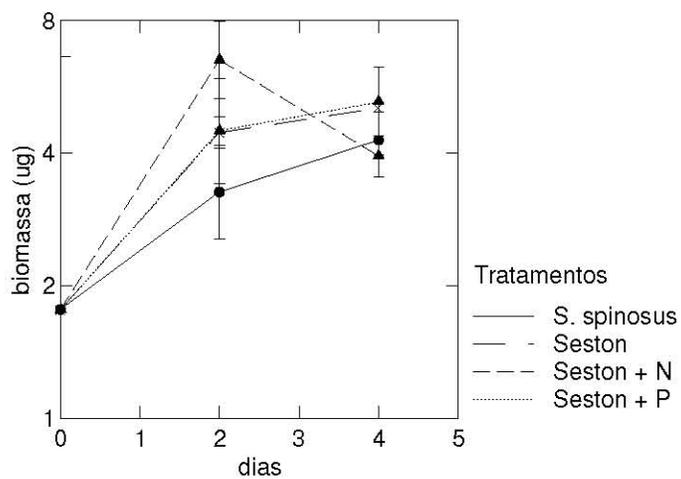


Figura 16. Crescimento em biomassa de *D. gessneri* submetida aos tratamentos no experimento de primavera. Resultados expressos com média \pm erro padrão.

8.0

4.0

2.0

1.0

0.5 01234

dias

Tratamentos

S. spinosus Seston Seston + N Seston + P

8

4 Tratamentos

2 S. spinosus Seston Seston + N Seston + P

1

0 12345 dias

C. richardi apresentou taxas de crescimento individuais em biomassa (g) significativamente maiores às taxas de *D. gessneri* ($P = 0,000$) (Tab. 15). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos com o séston para *C. richardi*, ao contrário de *D. gessneri* que apresentou valores de g significativamente maiores no tratamento séston enriquecido com N comparado a *S. spinosus* e séston enriquecido com P ($P = 0,004$ e $P = 0,049$, respectivamente).

Tabela 15. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *C.*

richardi, no inverno, através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

Espécies	<i>C. richardi</i>		<i>D. gessneri</i>	
	T = 2 dias	T = 4 dias	T = 2 dias	T = 4 dias
<i>S. spinosus</i>	0,66 ± 0,013 (a)	0,61 ± 0,110 (a)	0,24 ± 0,077 (a)	0,19 ± 0,029 (a)
Séston	0,56 ± 0,068 (a)	0,31 ± 0,000 (a)	0,38 ± 0,020 (ab)	0,24 ± 0,005 (a)
Séston + P	0,70 ± 0,077 (a)	0,44 ± 0,074 (a)	0,59 ± 0,065 (a)	0,17 ± 0,028 (a)
Séston + N	0,068 (a)	0,160 (a)	0,059 (b)	0,000 (a)

Tabela 16. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em biomassa (Primavera – 2002) de *C. richardi*. e *D. gessneri*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F = efeito.

		<i>C. richardi</i>	<i>D. gessneri</i>
		T = 2 -4 dias	T = 2 – 4dias
Efeito	g.l	3	3
	QM	0,021	0,039
	F	0,726	2,163
Erro	P	0,549	0,128
	g.l	19	18
	QM	0,029	0,018

Com relação à reprodução, tanto *C. richardi* como *D. gessneri* não apresentaram diferença significativa do tamanho da ninhada e da fecundidade média entre os tratamentos (Fig. 17).

D. gessneri

Aa

5

Aa Aa

4

3

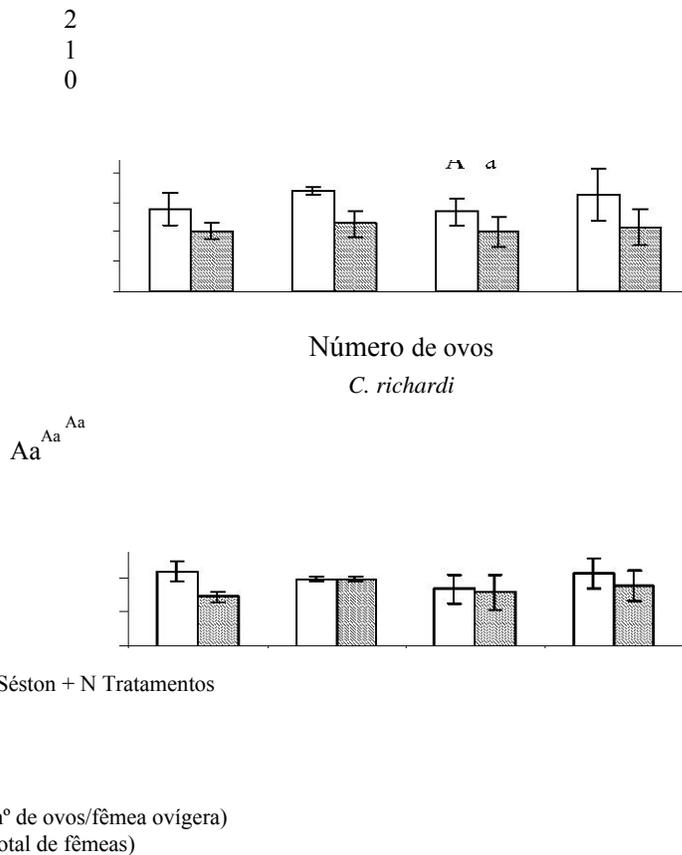


Figura 17. Diferenças de tamanho da ninhada e fecundidade de *D. gessneri* e *C. richardi* no experimento de primavera (ANOVA). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes.

Composição do fitoplâncton

Chlorophyceae foi a classe dominante em todos os experimentos (Fig. 18). No verão, Cyanophyceae foi a segunda classe mais abundante, seguida por Zygnemaphyceae. No outono, Bacillariophyceae e Cyanophyceae foram as classes mais abundantes depois das clorofíceas. No inverno, as clorofíceas representavam *ca.* de 80% do fitoplâncton seguida por Bacillariophyceae e Zygnemaphyceae. Já na primavera, a contribuição de Chlorophyceae caiu para cerca de 65% e a contribuição de Chrysophyceae foi mais evidente comparada às outras estações.

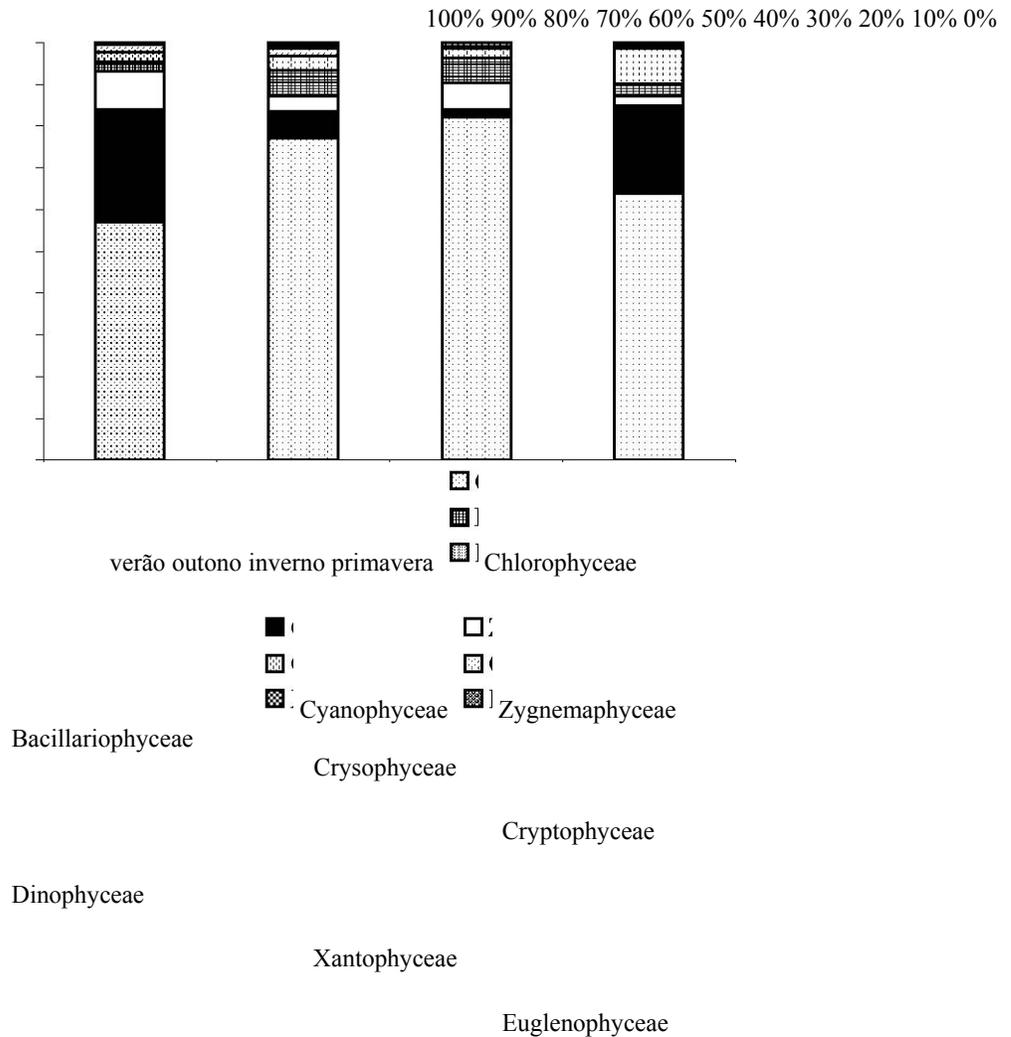


Figura 18. Composição relativa do fitoplâncton do séston, baseada na densidade, dos experimentos de crescimento individual em biomassa ao longo das estações do ano de 2002.

Durante os experimentos, houve predomínio de algas nanoplanctônicas (Tab. 17). No entanto, esta fração era composta por 42 % e 20 % de algas coloniais e com presença de bainhas de mucilagem nos experimentos de verão e de primavera, respectivamente. A fração do microplâncton, no inverno era composta por 52 % de algas com espinhos e na primavera esta fração apresentou alta porcentagem (58 %) de algas filamentosas.

Tabela 17. Composição relativa, com base das densidades, das frações do nano e microplâncton quanto às características das algas encontradas nos experimentos de crescimento individual em biomassa nas estações do ano de 2002. nd = não detectada; Outras = algas sem ornamentações, com formas arredondadas, ovóides ou filiformes.

Morfologia/Estações	Verão ≤ 20 μm >20 μm	Outono ≤ 20 μm >20 μm	Inverno ≤ 20 μm >20 μm	Primavera ≤ 20 μm >20 μm
% cada fração	80,0 20,0 42,0	76,0 24,0 13,0	88,0 12,0 2,5 nd	87,0 13,0 20,0
Colonial/mucilagem	12,0 4,0 15,0 4,0	10,0 3,0 3,0 nd	nd 52,0 nd nd	2,0 1,0 4,5 2,5 nd
Espinhos Cenóbio	nd nd 10,0 50,0	nd nd 2,0 84,0	nd nd 97,5 48,0	nd 58,0 76,5 35,5
Filamentosa Outras	63,0	85,0		

3) Experimentos de Sinergismo

3. 1) Experimento I

Análises químicas

Séston

O séston não estava limitado por energia (C) durante este experimento, uma vez que as concentrações de C variaram de 0,39 mg L⁻¹ a 0,99 mg L⁻¹, valores estes superiores aos considerados limitantes para o crescimento e reprodução do zooplâncton (Tab. 17). As razões C:N e C:P também não indicaram limitação de N ou P durante o experimento. A adição de N ao séston diminuiu significativamente as razões C: N nos tratamento séston + N e séston + NP (P = 0,026 e 0,050, respectivamente), enquanto a adição de P ao séston

causou decréscimo na razão C:P do tratamento do séston enriquecido com N e P ($P = 0,012$).

Tabela 17. Valores (média \pm desvio padrão) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) do séston durante o experimento de sinergismo I. Razões C:N e C:P expressas em molar.

	Séston				
	Séston + N				
	Séston + P				
	Séston + NP				
	C (mg L-1)	N (mg L-1)	P (μ g L-1)	C:N	C:P
	$0,60 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$	$13,10 \pm 0,40$	$5,80 \pm 0,03$	$119,30 \pm 0,04$
	$0,39 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,00$	□	$3,55 \pm 0,10$	□
	$0,90 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$	$17,80 \pm 2,80$	$5,00 \pm 0,28$	$125,20 \pm 22,00$
	$0,99 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$25,40 \pm 2,10$	$4,60 \pm 0,18$	$98,55 \pm 0,65$

Animais

C. richardi e *D. gessneri* apresentaram valores similares da porcentagem de C em seus tecidos corporais, sendo menores os valores encontrados em animais do ambiente (Tab. 18). As porcentagens de N encontradas foram similares para ambas as espécies e a adição de N ao séston não causou aumento significativo no conteúdo de N nesses animais. Os animais do ambiente apresentaram os menores valores de porcentagem de P e nenhuma diferença significativa foi encontrada nos animais submetidos aos tratamentos com adições de nutrientes. Para ambas as espécies, observaram-se ligeiros aumentos nos conteúdos corporais de C, N e P

nos animais cultivados em laboratório em relação àqueles coletados diretamente do ambiente. Tal fato é coerente uma vez que os animais de cultivo não estão sujeitos à falta ou à competição por alimento como os do ambiente. No tratamento do séston enriquecido com N e P o número de animais não foi suficiente para as análises de C e N, impossibilitando o cálculo das razões C:N e C:P.

Tabela 18. Valores médios (\pm desvio padrão) da porcentagem (peso seco) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) de *C. richardi* e *D. gessneri* durante o experimento de sinergismo I. Razões C:N e C:P expressas em molar.

C. richardi

Cultivo

Ambiente

Séston

Séston + P

Séston + N

Séston + NP

D. gessneri

Cultivo

Ambiente

Séston

Séston + P

Séston + N

Séston + NP

C N P C:N C:P

49,10 ± 6,20 11,75 ± 3,25 0,99 ± 0,01 4,90 ± 2,15 170,00 ± 34,00 46,60 ± 1,95 10,40 ± 0,20
 0,80 ± 0,04 5,25 ± 0,10 132,40 ± 27,50 52,45 ± 6,90 12,00 ± 1,10 1,10 ± 0,15 5,10 ± 0,20
 105,70 ± 21,35
 □□ 1,18 ± 0,25 □□ 51,40 ± 0,80 10,70 ± 0,85 □ 5,60 ± 0,55 □
 □□ 0,98 ± 0,03 □□

C N P C:N C:P

49,00 ± 2,75 9,80 ± 0,40 1,10 ± 0,10 5,80 ± 0,10 243,30 ± 64,00 46,50 ± 0,70 9,60 ± 0,05 0,75 ±
 0,03 5,65 ± 0,12 31,00 ± 1,10 50,55 ± 9,25 11,00 ± 0,70 1,10 ± 0,03 5,35 ± 0,65 163,70 ± 27,50
 □□ 0,95 ± 0,02 □□ 51,65 ± 0,50 12,20 ± 0,02 □ 4,95 ± 0,04 □
 □□ 1,10 ± 0,03 □□

Experimento

Neste experimento, pode-se observar uma tendência de maior crescimento individual em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos com o séston adicionado em relação ao séston sem adições, porém essa diferença não foi estatisticamente significativamente (Fig. 19). *D. gessneri* apresentou tendência de menor crescimento nos tratamentos com o séston sem adições e séston enriquecido com P, sendo que a partir do segundo dia de experimento, o crescimento continuou baixo no séston enriquecido com P e aumentou com

o séston sem adições, porém nenhuma das diferenças foi significativa (Fig. 20).

b

i

o

m

ci
iç

biomassa (ug)

n
u

n
u

ci
iç

biomassa (ug)

n
u

n
u

(

u

g)

16

b

i

o

m

te
to

—

.

.

.

—

—

en
e:

biomassa (ug)

en
e:

le

io

—

.

.

.

—

—

en

e:

biomassa (ug)

en

e:

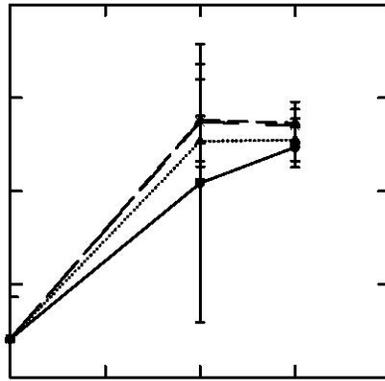
u

g)

8

Figura 19. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no experimento de sinergismo I. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

Figura 20. Crescimento em biomassa de *D. gessneri* submetida aos tratamentos no experimento de sinergismo I. Resultados expressos com média \pm erro padrão.



4

Tratamentos

2

seston seston + N seston + P seston+NP
1 0

1234 dias

32

16

8

Tratamentos

4

seston seston + N2 seston + P seston+NP

1

012345

dias

D. gessneri apresentou taxa de aumento em biomassa (g) significativamente maior (t = 2 dias) quando N e P foram adicionados conjuntamente ao séston em relação ao séston natural (P = 0,046) (Tab. 19), enquanto *C. richardi* não apresentou taxas de crescimento significativamente diferentes entre os tratamentos.

Tabela 19. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *C. richardi* e *D. gessneri*, através do Teste de Tukey (P < 0,05). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

Espécies		
	<i>C. richardi</i>	<i>D. gessneri</i>

Tratamentos	T = 2 dias 0,58 ±	T = 3 dias 0,47 ±	T = 2 dias 0,43 ±	T = 4 dias 0,45 ±
Séston	0,020 (a) 0,81 ±	0,030 (a) 0,53 ±	0,040 (a) 0,58 ±	0,025 (a) 0,36 ±
Séston + P	0,009 (a) 0,81 ±	0,030 (a) 0,51 ±	0,060 (ab) 0,71 ±	0,002 (a) 0,46 ±
Séston + N	0,130 (a) 0,73 ±	0,020 (a) 0,49 ±	0,110 (ab) 0,85 ±	0,010 (a) 0,45 ±
Séston + NP	0,060 (a)	0,030 (a)	0,090 (b)	0,040 (a)

Tabela 20. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em biomassa (sinergismo I) de *C. richardi*. e *D. gessneri*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F = efeito.

		<i>C. richardi</i>	<i>D. gessneri</i>
		T = 2 -3dias	T = 2 - 4dias
Efeito	g.l QM	3 0,028	3 0,041
	F	1,075	1,737
	P	0,383	0,193
Erro	g.l QM	19 0,026	19 0,024

C. richardi apresentou valores semelhantes de tamanho da ninhada e fecundidade média sem diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 21), enquanto *D. gessneri* apresentou valores significativamente menores de fecundidade média no tratamento séston enriquecido com P em relação ao séston sem adições (P = 0,041) e nenhuma diferença estatística no tamanho da ninhada entre os tratamentos.

D. gessneri

Os valores de C orgânico particulado do séston ficaram acima dos considerados limitantes para o zooplâncton (Tab. 21). Baixos valores de N foram encontrados ao final deste experimento ($0,045 \text{ mg N L}^{-1}$), sendo que a adição de N na forma de N ao séston elevou tais valores para $0,35 \text{ mg N L}^{-1}$. As concentrações de P também diminuíram ao final do experimento (de $11,40 \text{ } \mu\text{g P L}^{-1}$ para $2,25 \text{ } \mu\text{g P L}^{-1}$), causando aumento da razão C:P no final do experimento. Os valores de C:P estavam acima de 300 molar, indicando possível limitação de P no ambiente. A adição de P ao séston causou decréscimo significativo na razão C:P ($P = 0,023$), assim como a adição de N diminuiu significativamente a razão C:N ($P = 0,029$).

Tabela 21. Valores (média \pm desvio padrão) de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) do séston durante o experimento de sinergismo II. Razões C:N e C:P expressas em molar.

Séston inicial
 Séston final
 Séston + N
 Séston + P
 Séston + NP

C (mg L-1)	N (mg L-1)	P ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C:N	C:P
$1,70 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,01$	$11,40 \pm 0,00$	$9,50 \pm 0,70$	$412,00 \pm 10,70$
$0,40 \pm 0,10$	$0,045 \pm 0,00$	$2,25 \pm 0,00$	$10,35 \pm 0,07$	$460,00 \pm 19,80$

1,70 ± 0,05	0,35 ± 0,00	—	6,00 ± 0,30	—
1,70 ± 0,05	—	30,00 ± 0,00	—	160,00 ± 4,25
0,40 ± 0,02	0,27 ± 0,05	29,90 ± 0,00	1,60 ± 0,20	156,00 ± 4,00

Animais

C. richardi apresentou porcentagem de C em seus tecidos corporais similares, considerando animais cultivados em laboratório, coletados diretamente do ambiente ou animais submetidos aos tratamentos do séston sem adições e adicionado de N (Tab. 22). Valores mais baixos das porcentagens de N e P foram encontrados nos tratamentos do séston enriquecidos com tais nutrientes.

Tabela 22. Valores médios (\pm desvio padrão) da porcentagem (peso seco) de carbono (C), N (N) e P (P) de *C. richardi* durante o experimento de sinergismo II. Razões C:N e C:P expressas em molar.

Cultivo	49,60 ± 0,05	9,10 ± 0,20	1,06 ± 0,00	6,40 ± 0,10	168,00 ± 56,00
Ambiente	49,70 ± 0,10	9,00 ± 0,15	1,00 ± 0,01	6,40 ± 0,10	100,00 ± 6,00
Séston	49,90 ± 0,10	11,60 ± 0,07		5,00 ± 0,05	—
Séston + P	—	—	0,80 ± 0,01	—	—
Séston + N	46,50 ± 0,15	7,00 ± 0,05	—	7,80 ± 0,03	—
Séston + NP	—	—	0,60 ± 0,00	—	—

C N P C:N C:P

Experimento

O crescimento em biomassa de *C. richardi* foi significativamente maior nos tratamentos do séston sem adições em relação ao séston adicionado de N e de N e P ($P = 0,017$ e $P = 0,034$, respectivamente) (Fig. 22). Também houve crescimento significativamente maior desse animal no séston adicionado de P em relação ao adicionado de N e P ($P = 0,006$).

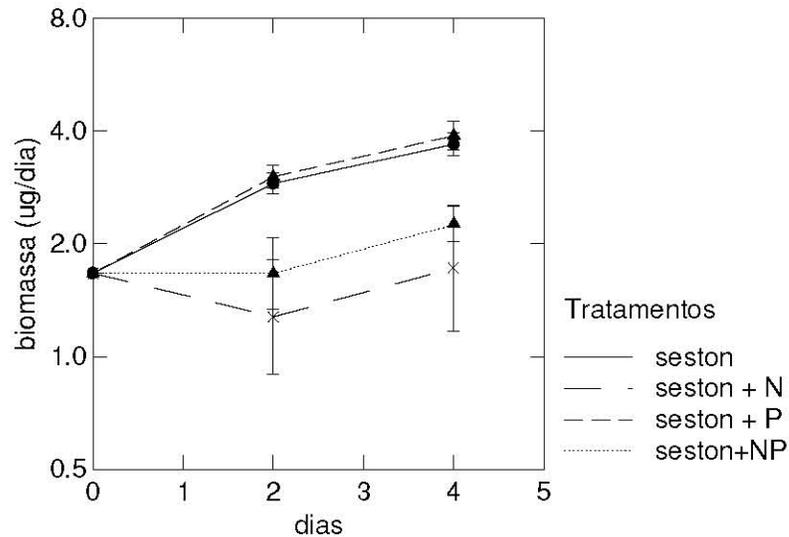


Figura 22. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no experimento de sinergismo II. Resultados expressos com média \pm desvio padrão.

Observou-se que a adição de N ao séston teve um efeito negativo no crescimento de *C. richardi*, ocasionando até mesmo perda de peso dos animais (taxa de crescimento g com valor negativo) nos primeiros dois dias de experimento, havendo, posteriormente, manutenção do peso até o último dia de experimento (T = 4 dias) (Tab. 23). A adição conjunta de N e P ao séston também teve um efeito negativo no crescimento de *C. richardi* em relação ao séston sem adições ou adicionado somente de P.

Tratamentos

seston seston + N seston + P seston+NP

012345 dias

valor negativo)

primeiros dois dias de experimento, havendo, posteriormente,

= 4 dias) (Tab. 23). A adição

Tabela 23. Comparação das médias (\pm desvio padrão) da taxa de crescimento (g) de *C. richardi* através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos com letras iguais não são significativamente diferentes.

Tratamentos	T = 2 dias	T = 4 dias
Séston	0,270 \pm 0,020 (a)	0,200 \pm 0,020 (a)
Séston + P	0,300 \pm 0,005 (a)	0,220 \pm 0,030 (a)
Séston + N	-0,130 \pm 0,120 (b)	0,000 \pm 0,050 (b)
Séston + NP	0,002 \pm 0,140 (bc)	0,080 \pm 0,030 (b)

Tabela 24. Parâmetros de ANOVA (Programa Systat) do experimento de aumento em biomassa (sinergismo II) de *C. richardi*. g.l = graus de liberdade; QM = quadrado médio, F =

efeito.

Parâmetros		T = 2 – 4 dias
Efeito	g.l QM	3 5,189
	F	15,348
	P	0,000
Erro	g.l QM	19 0,338

Com relação aos parâmetros reprodutivos observados, *C. richardi* não apresentou diferença significativa no tamanho da ninhada e na fecundidade média entre os tratamentos (Fig. 23).

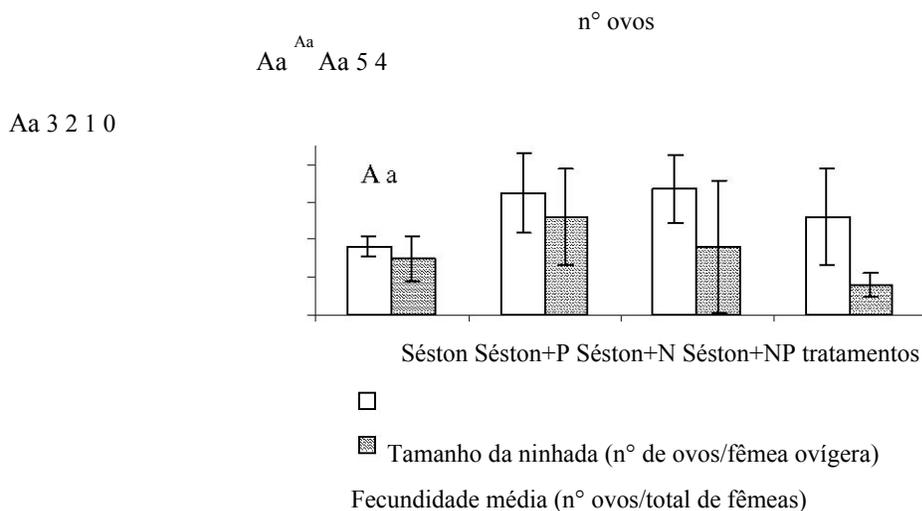


Figura 23. Diferenças de tamanho da ninhada e fecundidade de *C. richardi* no experimento de sinergismo 2 (ANOVA). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes.

3. 3) Composição do fitoplâncton

Chlorophyceae foi o grupo predominante durante os experimentos de sinergismo 1 e 2, seguido por Cyanophyceae e Euglenophyceae (sinergismo I) e Zygnemaphyceae no experimento 2 (Fig. 24).

100%

90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%

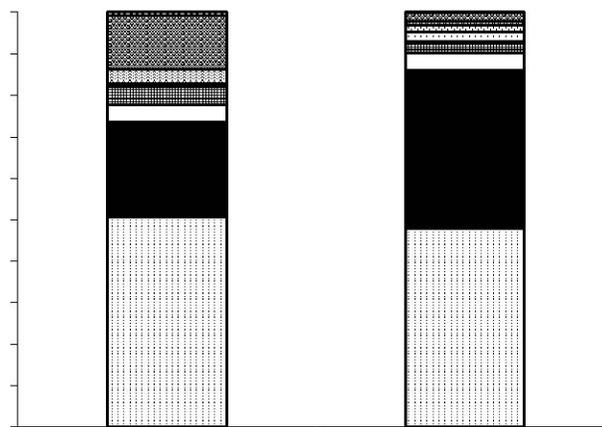
0% Sinergismo I

Sinergismo

II



Chloro
phyceae



Bacillariophyceae

Cryptophyceae

Dinophyceae

Euglenophyceae

Crysophyceae

Xantophyceae

Cyanophyceae

Zygnemaphyceae

Figura 24. Composição relativa do fitoplâncton do séston, baseada na densidade, dos experimentos de sinergismo I e II.

O nanoplâncton compreendia a maioria das algas encontradas nos experimentos de Sinergismo I e II (Tab. 25). Maior contribuição de algas coloniais e mucilaginosas foi encontrada no nanoplâncton e no microplâncton do Experimento de sinergismo I, enquanto algas com espinhos foram encontradas em maior quantidade na fração do microplâncton. No experimento de sinergismo II, foram encontradas algas filamentosas em maior número na fração do microplâncton.

Tabela 25. Composição relativa, baseada nas densidades, das frações do nano e microplâncton quanto às características das algas encontradas nos experimentos de Sinergismo I e II. nd = não detectada; Outras = algas sem ornamentações, arredondadas, ovóides ou filiformes.

Morfologia/Frações	Sinergismo		Sinergismo	
	I ≤ 20 μm	I >20 μm	II ≤ 20 μm	II >20 μm
% cada fração	80,0	32,0	20,0	15,0
Colônia/mucilagem	nd	3,0	19,0	nd
Espinhos	nd	65,0	nd	66,0
Cenóbio				
Filamentosas				
Outras				

DISCUSSÃO

Composição elementar do séston e dos animais

O séston do experimento de tabela de vida não pôde ser avaliado em termos da

porcentagem de C e N (por motivos anteriormente explicados), impossibilitando, assim, o cálculo das razões C:N e C:P. Essas razões seriam úteis para auxiliar na confirmação de ocorrência de possível limitação de N no séston, evidenciada por resultados positivos encontrados em alguns parâmetros de tabela de vida com a adição de N ao séston. Dessa forma, não se pode afirmar que o séston estava limitado por C, N ou P durante este experimento, mas somente que houve melhora em alguns parâmetros populacionais e reprodutivos dos cladóceros estudados com a adição de N ao séston.

Com relação aos experimentos de crescimento individual em biomassa, as razões C:P e C:N não indicaram limitação de N e P do séston durante os experimentos, com exceção de moderada limitação de P observada no séston durante o Experimento de Sinergismo II (C:P média = 436). Razões C:P > 300 molar e C:N = 15 -30 molar são consideradas limitantes para o crescimento do zooplâncton em regiões temperadas (Urabe & Watanabe, 1992). No entanto, vale salientar que em poucas ocasiões o séston sem adições não ficou diferente do séston adicionado de N (verão e Sinergismo I) ou de P (Sinergismo I), dificultando a comparação.

DeMott & Gulati (1999) encontraram, em três lagos na Holanda, relações inversas entre a abundância de *Daphnia* e as taxas C:P de dois dos três lagos. A abundância média de *D. cucullata* caiu de 114 para 0,7 ind L⁻¹ com razões C:P variando entre 250 a 500 molar. Alguns autores sugerem outros valores da razão C:P que seriam limitantes para o crescimento de *Daphnia*, tais como: Olsen *et al.* (1986): C:P = 307, Sterner & Hessen (1994): C:P = 138 e Sterner (1993): C:P = 200.

Em estudos anteriores realizados no Lago Monte Alegre, foram encontrados períodos de limitação de P no verão, com menores taxas de crescimento e fecundidade de *Daphnia gessneri* com valores de C:P = 552 (Ferrão-Filho *et al.* 2003). Neste estudo, a razão C:P = 436 encontrada no experimento de Sinergismo II não influenciou significativamente o crescimento e reprodução de *C. richardi*. Resultados semelhantes foram encontrados por DeMott & Tessier (2002) que observaram limitação de P fraca e esporádica, mesmo com razões C:P > 300 molar em estudos laboratoriais, havendo, porém, indícios de forte limitação por energia.

No experimento de verão foram encontrados os maiores valores das concentrações de C comparado às outras estações estudadas. Altas concentrações de C são comumente encontradas

nesse lago durante o verão (Ferrão-Filho *et al.*, 2003, Ferrão-Filho *et al.* 2005). No entanto, esses dados referem-se ao C particulado, onde outras fontes de C, além do C algal, tais como detritos e bactérias, estão presentes e podem servir de recursos complementares da dieta dos cladóceros.

As porcentagens de C, N e P dos cladóceros encontradas são semelhantes a dados encontrados na literatura. A porcentagem de C em *Daphnia* geralmente encontrada na literatura é, em média, 44% (Hessen, 1990). As porcentagens de N variam de 8 % a 10 %, tanto em copépodos como em cladóceros (Andersen & Hessen, 1991). O N é o constituinte primário das proteínas, e é provável que o “pool” de proteínas varie entre os diferentes táxons (Elser *et al.*, 1996). As porcentagens de P geralmente encontradas (especialmente em *Daphnia*) variam de 0,60 % a 1,50 % (Andersen & Hessen, 1991). Brett *et al.* (2000) encontraram 1,33 %, em média, de porcentagem de P em nove espécies diferentes de *Daphnia*. As diferentes porcentagens de P entre as espécies podem ser explicadas por diferentes conteúdos de RNA (Mckee & Knowles, 1987).

DeMott *et al.* (2004) encontraram forte evidência de que o conteúdo de P em *Daphnia* no ambiente varia com os níveis de P presentes no alimento, medido através da razão C:P, contrariando a idéia de homeostase nos animais. Lehman & Naumoski (1985) encontraram variação de até 2 vezes no conteúdo de P de *Daphnia*, aumento este intimamente relacionado ao valor de C:P da alga. Por outro lado, Peter & Rigler (1973) não encontraram variação no conteúdo específico de P em *D. rosea*, submetida a altas variações de P no alimento.

Neste estudo não foram encontradas situações de redução do crescimento e reprodução dos cladóceros por limitação de nutrientes, ou seja, na maioria dos casos as razões C:N e C:P estavam acima das consideradas limitantes para o crescimento e reprodução do zooplâncton. Mesmo assim, em alguns experimentos, observou-se aumento do conteúdo de N e P de *C. richardi*, *D. gessneri* e *D. ambigua* alimentadas com o séston enriquecido com estes nutrientes. Tais aumentos, apesar de não serem significativos na maioria dos casos, podem ser devido à capacidade dos animais em incorporar o N e P inorgânicos quando estes estão em altas concentrações (Sterner & Schulz, 1998). Apesar do aumento no conteúdo de N e P dos cladóceros estudados com a adição destes nutrientes ao séston, não foi observado aumento no crescimento dos animais. Segundo DeMott *et al.* (no prelo) a adição de P ao séston causa aumento no conteúdo de P nos animais sem aumentar a taxa de crescimento do animal.

O conteúdo de N e P encontrados nos cladóceros de cultivo e coletados diretamente do ambiente foram similares na maioria dos experimentos. Segundo DeMott *et al.* (2004), declínio no conteúdo de P em animais do ambiente pode indicar limitação do crescimento por nutrientes ou, pelo menos, indicar um sinal de stress na dieta. Dessa forma, no presente estudo, pode-se dizer que o séston não estava aparentemente limitado por nutrientes, levando também em consideração o conteúdo destes nos animais.

Efeitos da adição de N e P sobre o crescimento e reprodução

De uma maneira geral, a análise dos resultados de todos os experimentos realizados mostra que a adição de nutrientes ao séston apresentou efeito nulo no crescimento e na reprodução dos cladóceros na maioria dos casos (67 %). Esses resultados obtidos mostram que a limitação por nutrientes no Lago Monte Alegre não deve ser considerada como um fator isolado na determinação do crescimento e reprodução dos cladóceros.

Aumento de crescimento em biomassa dos herbívoros é esperado quando o séston está mineralmente e/ou bioquimicamente limitado e o composto em falta é adicionado. Entretanto, neste estudo o séston não apresentava limitação por nutrientes na maioria dos experimentos (exceto moderada limitação de P no Experimento de Sinergismo II) e a adição de mais nutrientes, por sua vez, aumentou o crescimento e a reprodução dos cladóceros estudados em poucas ocasiões. De acordo com a Lei do Mínimo de Liebig (von Liebig, 1885), o crescimento corporal se estabiliza depois que certa concentração de P é atingida. Considerando esta lei, é possível que as concentrações de nutrientes encontradas ao longo dos experimentos já se encontravam em níveis suficientes para suportar o bom desenvolvimento dos cladóceros e a adição de mais nutrientes ao séston não causou melhora no crescimento ou na reprodução dos animais.

Apesar das razões C:N e C:P encontradas nos experimentos não indicarem limitação, houve diminuição destas com a adição dos nutrientes, mas quase nenhum aumento no crescimento individual em biomassa dos cladóceros foi encontrado. DeMott & Tessier (2002) através de experimentos de crescimento utilizando *Daphnia* encontraram correlação negativa

entre o crescimento e a razão C:P, sendo que este efeito não foi causal, pois a resposta à adição de P também foi fraca. No entanto, esses autores encontraram correlação positiva entre crescimento e a adição de algas ao séston, implicando em limitação de energia.

Considerando os efeitos benéficos encontrados com a adição de nutrientes ao séston, observou-se que a adição de N ou de N e P ao séston melhorou alguns parâmetros de tabela de vida analisados, assim como aumentou as taxas de crescimento de *D. gessneri* (verão e primavera). Na maioria dos ambientes de água doce, o P é considerado o nutriente limitante para o crescimento de fitoplâncton e muitos estudos foram realizados testando esta limitação (Elser & Hasset, 1994). Elser *et al.* (2001), estudando três lagos limitados em P, observaram diminuição significativa da razão C:P com a adição de P acompanhado com aumento do crescimento de *Daphnia dentifera*. DeMott *et al.* (2001) também encontraram aumento do crescimento de *D. cucullata* com o enriquecimento do séston com P em três lagos hipereutróficos. Estes resultados confirmaram a hipótese da limitação de P, mas também mostraram que tanto a limitação de energia, quanto outros fatores podem contribuir para as diferenças de crescimento de *Daphnia* em diferentes ambientes.

No entanto, o N também tem recebido atenção (Butler *et al.*, 1989). Groeger *et al.* (1991) observaram menores taxas de crescimento em *Daphnia* alimentada com alga deficiente em N. Por outro lado, Mitchell *et al.* (1992) estudando a alimentação de *Daphnia magna* com *Chlamydomonas* limitada em P e em N, encontraram que a alga limitada em P apresentou menor qualidade alimentar quando comparada à alga limitada em N.

Em experimentos anteriores realizados no Lago Monte Alegre, *Moina micrura*, ao contrário do esperado, cresceu melhor e produziu maior número de ovos quando alimentada com a alga *Scenedesmus spinosus* deficiente em N, enquanto *Ceriodaphnia cornuta* cresceu bem tanto em alga deficiente em P como em N, mas o tamanho da ninhada foi menor no tratamento com a alga deficiente em N (Ferrão-Filho *et al.*, 2003). *D. gessneri* foi a espécie mais sensível à limitação de nutrientes, apresentando menor crescimento e tamanho da ninhada quando alimentadas com algas limitadas em N e P.

No entanto, vale ressaltar que os dados citados acima foram obtidos a partir de experimentos realizados com culturas monoalgais e o presente experimento foi realizado com

o séston. No ambiente, o fitoplâncton é composto por diversas espécies e as dietas do zooplâncton são misturas complexas de fitoplâncton, protozoários, bactérias e detritos. Dessa forma, outros fatores poderiam ter influenciado o crescimento e reprodução dos cladóceros. Um desses fatores poderiam ser as características morfológicas do fitoplâncton, como tamanho, forma, presença de espinhos e mucilagem, que são muito importantes na determinação das partículas a serem ingeridas pelos cladóceros.

Por outro lado, observou-se em alguns experimentos que a adição de nutrientes ao séston reduziu o crescimento e inibiu a reprodução dos cladóceros. Uma explicação para tal fato pode ser que os níveis destes nutrientes estavam acima daqueles considerados ótimos para os cladóceros. De fato, as taxas de crescimento declinaram quando a razões C:P ou

C:N dos animais eram maiores que a do seu alimento (ex: C:N do séston enriquecido com N = 4,20 e C:N de *D. ambigua* = 5,20 no Experimento de Verão e C:N do séston adicionado de N = 6,00 e de *C. richardi* = 7,80, Experimento de Sinergismo II). Uma vez que os cladóceros vivem normalmente em ambientes onde as razões C:P e C:N do alimento são maiores que as suas próprias (Hessen, 1990), isso demonstra que raramente eles encontraram alimentos com excesso de N ou P. Poderia também se pensar que esses nutrientes, em altas concentrações poderiam ter tido um efeito tóxico sobre os animais. No entanto, as concentrações de tais nutrientes encontradas são comumente encontradas em lagos eutróficos que possuem altas densidades de *Daphnia* (Jeppesen *et al.*, 1997).

Considerando o Experimento de Sinergismo II, caso onde a adição de N ao séston afetou negativamente o crescimento e a reprodução de *C. richardi*, dados similares foram encontrados por Matveev & Balseiro (1990) que encontraram menor crescimento populacional de *Ceriodaphnia dubia* com o enriquecimento do séston do lago Ezquerria (Argentina) com N e P. Os autores concluíram que esse decréscimo da taxa intrínseca de crescimento populacional ocorreu, na verdade, devido à deterioração da qualidade do alimento causada pela adição de nutrientes. Os experimentos destes autores tiveram duração de 7 a 10 dias, período que realmente pode levar à deterioração das condições da água com adição de nutrientes, provocando o aparecimento ou dominância de espécies de algas diferentes daquelas sem o

enriquecimento. Por outro lado, os experimentos realizados neste estudo tiveram menor tempo de duração (máximo de 4 dias) e, dessa forma, pode-se supor que as condições do fitoplâncton não foram alteradas e não causaram o decréscimo no crescimento de *C. richardi*. No entanto, este fato não pode ser confirmado, uma vez que

o fitoplâncton do séston enriquecido com nutrientes não foi analisado. Ainda no Experimento de Sinergismo II, observou-se que a adição somente de P ao séston (moderadamente limitado por tal nutriente nesse período) proporcionou taxas de crescimento significativamente maiores em relação ao séston adicionado de N e de N e P. Observando os valores das concentrações de N durante este experimento, observou-se queda elevada ao final do experimento o que pode ter sido responsável pelo baixo crescimento de *C. richardi*, apesar das razões C:N, tanto do séston sem adições como do séston adicionados de N estarem indicando a não limitação deste.

Segundo Boersma & Kreutzer (2002), a limitação mineral não é importante no crescimento quando o alimento é escasso porque a manutenção do metabolismo requer primeiramente energia. O ganho de biomassa, por sua vez, requer muitos outros componentes como: nutrientes, biomoléculas essenciais, etc (Sterner & Robinson, 1994).

No presente estudo, observou-se que a adição de *S. spinosus* ao séston aumentou o crescimento de *C. richardi* (inverno) e *C. richardi* e *D. ambigua* (verão). O mesmo já tinha sido encontrado anteriormente no Lago Monte Alegre para *D. ambigua* e outras espécies de cladóceros (Ferrão-Filho *et al.*, 2005). Este aumento no crescimento de *C. richardi* e *D. ambigua* com a adição da clorófitica ao séston poderia ser atribuído a dois fatores: i) incremento de C (energia), fator quantitativo do alimento adicionado e ii) tamanho e forma da alga, fator qualitativo do alimento adicionado. A concentração limitante de C para espécies de *Daphnia* varia em torno de 0,06 a 0,1 mg C L⁻¹ (Gliwicz, 1990). Os valores de C encontrados no séston destes dois períodos situaram-se acima desses valores, de modo que dificilmente houve situação de limitação alimentar, em termos quantitativos, para os cladóceros. Poder-se-ia afirmar então que o fator qualitativo foi mais importante. O tamanho da alga adicionada (14 µm) e sua forma arredondada poderiam ter contribuído

para melhorar as condições do séston nestes períodos, pois partículas entre 3 e 20 μm sem espinhos ou envoltórios protetores podem ser mais adequadas à alimentação de cladóceros (Sternner, 1989).

Dessa forma, a forma das algas oferecidas como alimento para o zooplâncton, o tamanho e o modo de alimentação das espécies estudadas também devem ser levados em consideração para a discussão da influência do alimento sobre o crescimento e a reprodução desses organismos.

A análise do fitoplâncton dos experimentos realizados neste estudo revelou predomínio de algas nanoplanctônicas. Estudos realizados por Fileto *et al.* (2004) demonstraram preferência por algas nanoplanctônicas por alguns cladóceros do Lago Monte Alegre comparado ao microplâncton.

No experimento de tabela de vida, observou-se que a fração microplanctônica era composta por algas filamentosas (70 %) ou com presença de espinhos e de mucilagem ou possuíam forma colonial. Com relação aos experimentos de crescimento individual em biomassa, no verão, 42 % das algas nanoplanctônicas eram compostas por espécies coloniais e com bainhas de mucilagem. No inverno encontrou-se alta porcentagem de espécies de algas com presença de espinhos (52 %) na fração do microplâncton, assim como de algas filamentosas nessa mesma fração no experimento de primavera.

Segundo Sternner (1989), a maioria dos cladóceros alimenta-se de partículas entre 3 e 20 μm , sem espinhos ou envoltórios protetores. Discrepância entre a proporção relativa de espécies de fitoplâncton encontradas no aparelho digestivo do zooplâncton e entre a proporção de algas encontradas nas comunidades lacustres, sugere que o zooplâncton frequentemente se alimenta de maneira seletiva (Porter, 1973; Infante, 1978; Berquist & Carpenter, 1986). Copépodos ciclopoídes, utilizam a mecano -e a quimiorrecepção para localizar e identificar a

alga (Kerfoot, 1978). Ao contrário dos copépodos, observações da morfologia e da alimentação de *Daphnia* indicam que esta possui habilidades mais limitadas para capturar partículas individualmente, e criam correntes de alimentação. Dessa forma, algas coloniais e filamentosas podem se emaranhar no aparelho filtrador de *Daphnia*, exigindo um gasto energético para a retirada dessas partículas não desejáveis, enquanto os copépodos podem agarrar as partículas e manipulá-las para a alimentação, beneficiando-se com algumas formas. Porém, Segundo Svensson & Stenson (1991), a presença de bainha de mucilagem pode ser um mecanismo anti-herbivoria, ou seja, torna a ingestão da alga mais difícil ou impossível para um herbívoro.

Em conclusão, a maior parte dos experimentos e dos parâmetros analisados não demonstrou melhora no crescimento e na reprodução dos cladóceros com a adição de N e P ao séston. A influência do conteúdo mineral das algas no crescimento de cladóceros do Lago Monte Alegre é questionável. É possível que exista uma hierarquia entre os fatores que regulam o crescimento dos cladóceros, sendo o tamanho e as características morfológicas do fitoplâncton (Fileto *et al.*, 2004) e a energia (Ferrão-Filho *et al.*, 2005), mais importantes que a limitação mineral.

Conclusões

- 1) A ADIÇÃO DE N E P AO SÉSTON, NA MAIOR PARTE DOS EXPERIMENTOS, NÃO DEMONSTROU MELHORA NO CRESCIMENTO E NA REPRODUÇÃO DOS CLADÓCEROS, INDICANDO QUE O SÉSTON NÃO ESTAVA LIMITADO POR ESTES NUTRIENTES DURANTE ESTE ESTUDO;
- 2) DA MESMA FORMA, NÃO FOI ENCONTRADO EFEITO SINÉRGICO ENTRE

NITROGÊNIO E FÓSFORO SOBRE O CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DOS CLADÓCEROS ESTUDADOS;

- 3) O CONTEÚDO DE CARBONO, NITROGÊNIO E FÓSFORO DOS CLADÓCEROS ENCONTRADOS É SIMILAR AOS DADOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M. & Forsberg, C. 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for some cladoceran zooplankters. *J. Plankton Res.*, 12: 809-818.
- Andersen, T. & Hessen, D. O. 1991. Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 807-814.
- Andersen, T.; Elser, J. J. & Hessen, D. O. 2004. Stoichiometry and population dynamics. *Ecology Letters*, 7: 884-900.
- Arcifa, M. S.; Meschiatti, A. J. & Gomes, E. A. T. 1990. Thermal regime and stability of a tropical shallow reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 23: 271-281.
- Arcifa, M. S.; Gomes, E. A. T. & Meschiatti, A. J. 1992. Composition and fluctuations of the zooplankton of a tropical brazilian reservoir. *Arch. Hidrobiol.*, 123: 479-495.
- Arcifa, M. S.; Silva, L. H. S. & Silva, M. H. L. 1998. The planktonic community in a tropical Brazilian reservoir: composition, fluctuations and interactions. *Rev. Brasil. Biol.*, 58: 241-254.
- Berquest, A. M. & Carpenter, S. R. 1986. Limnetic herbivory: Effects on phytoplankton

- populations and primary production. *Ecology*, 67: 1351-1360.
- Birch, L.C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *The J. Anim. Ecol.*, 17: 15-26.
- Boersma, M & Kreutzer, C. 2002. Life at the edge: is food quality really of minor importance at low quantities? *Ecology*, 83: 2552-2561.
- Brett, M. T.; Müller-Navarra, D. C. & Park, S. K. 2000. Empirical analysis of the effect of phosphorus limitation on algal food quality for freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 1564-1575.
- Bunioto, T. C. 2003. Variação temporal e distribuição horizontal do zooplâncton no Lago Monte Alegre e a influência do alimento e da temperatura sobre cladóceros. Dissertação de Mestrado, FFCLRP/USP. 96 p.
- Butler, N. M.; Shuttle, C. A. & Neil, W. E. 1989. Discrimination by freshwater zooplankton between single cells differing in nutritional status. *Oecologia*, 78: 368-372.
- DeMott, W. R. 1998. Utilization of a cyanobacterium and a phosphorus-deficient green algae as complementary resources by daphnids. *Ecology*, 79: 2463-2481.
- DeMott, W. R. & Gulati, R. D. 1999. Phosphorus limitation in *Daphnia*: Evidence from a long-term study of three hypereutrophic Dutch lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1557-1564.
- DeMott, W. R.; Gulati, R. D. & Van Donk, E. 2001. Effects of dietary phosphorus deficiency on the abundance, phosphorus balance, and growth of *Daphnia cucullata* in three hypereutrophic Dutch lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 1871-1880.
- DeMott, W. R. & Tessier, A. J. 2002. Stoichiometric constraints vs. algal defenses: testing

- mechanisms of zooplankton food limitation. *Ecology*, 83: 3426-3433.
- DeMott, W. R.; Pape, B. J. & Tessier, A. J. 2004. Patterns and sources of variation in daphnia phosphorus content in nature. *Aquat. Ecol.*, 38: 433-440.
- DeMott, W. R. & Pape, B. J. (no prelo). Testing predictions of stoichiometric theory: laboratory experiments with 10 *Daphnia* taxa. *Oecologia*.
- Dobberfuhl, D. R.; Miller, R. & Elser, J. J. 1997. Effect of a cyclopoid copepod (*Diacyclops thomasi*) on phytoplankton and the microbial food web. *Aquat. Microb. Ecol.*, 12: 29-37.
- Elser, J. J. & Hasset, R. P. 1994. A stoichiometric analysis of the zooplankton-phytoplankton interaction in marine and freshwater ecosystems. *Nature*, 370: 211-213. Elser, J. J.; Dobberfuhl, D. R.; MacKay, N. A. & Schampel, J. H. 1996. Organism size, life history, and N:P stoichiometry. *BioScience*, 46: 674-684. Elser, J. J.; Hayakawa, K. & Urabe, J. 2001. Nutrient limitation reduces food quality for zooplankton: response to seston phosphorus enrichment. *Ecology*, 82: 898-903. Ferrão-Filho, A. S.; Arcifa, M. S. & Fileto, C. 2003. Resource limitation and food quality for cladocerans in a tropical Brazilian lake. *Hydrobiologia*, 491: 201-210.
- Ferrão-Filho, A. S.; Arcifa, M. S. & Fileto, C. 2005. Influence of seston quantity and quality on growth of tropical cladocerans. *Braz. J. Biol.*, 65: 77-89.
- Fileto, C. 2001. O zooplâncton do Lago Monte Alegre: variação temporal e a influência das frações do fitoplâncton sobre o crescimento e reprodução de cladóceros. Dissertação de Mestrado. FFCLRP/USP. 100 p.

- Fileto C., Arcifa M. S., Ferrão-Filho A. S. & Silva, L. H. S. 2004. Influence of phytoplankton fractions on growth and reproduction of tropical cladocerans. *Aquat. Ecology*, 38: 503-514.
- Gliwicz, Z. M. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature*, 343: 638-640.
- Groeger, A. W.; Scharam, M. D. and Marzolf, G. R. 1991. Influence of food quality on growth and reproduction in *Daphnia*. *Freshwat. Biol.*, 26:11-19.
- Gulati, R. D. & DeMott, W. R. 1997. The role of food quantity for zooplankton: Remarks on the state-of-art, perspectives and priorities. *Freshwat. Biol.*, 38:753-768.
- Hessen, D. O. 1990. Carbon, nitrogen and phosphorus status in *Daphnia* at varying food conditions. *J. Plankton. Res.*, 12: 1239-1249.
- Hessen, D. O. 1992. Nutrient element limitation of zooplankton production. *Am. Nat.*, 140: 799-814.
- Infante, A. D. 1978. Natural food of herbivorous zooplankton of lake Valencia (Venezuela). *Arch. Hydrobiol.*, 82: 347-358.
- Jeppesen, E.; Jensen, J. P.; Sondergaard, T.; Lauridsen, L.; Pedersen, J. & Jensen, L. 1997. Top-down control in freshwater lakes—role of nutrient state, submerged macrophytes and water depth. *Hydrobiologia*, 342: 151-164.
- Kerfoot, W. C. 1978. Combat between predatory copepods and their prey: *Cyclops*, *Epischura* and *Bosmina*. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 1089-1102.
- Kilham, S. S.; Kreeger, D. A.; Goulden, C. E. & Lynn, S. G. 1997. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Fresh. Biol.*, 38: 639-647.
- Lehman, J. T. & Naumoski, T. 1985. Content and turnover rates of phosphorus

- in *Daphnia pulex*: Effect of food quality. *Hydrobiologia*, 128: 119-125.
- Lewis, W. M. Jr. 1996. Tropical lakes: how latitude makes a difference. In: Schiemar, F & Boland, K. T. (eds.): perspectives in tropical limnology: 43-64. SPB Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.
- Matveev, V. F & Balseiro, E. G. 1990. Contrasting responses of two cladocerans to changes in the nutritional value of nanoplankton. *Freshwat. Biol.*, 23: 197-204.
- Mayer, J. S.; Ingersoll, C. G.; MacDonald, L. L & Boyce, M. S. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology*, 67: 1156-1166.
- McKee, M. & Knowles, C. O. 1987. Levels of protein, RNA, DNA, glycogen and lipids during growth and development of *Daphnia magna* Straus (Crustacea – Cladocera). *Freshwat. Biol.*, 18: 341-351.
- Mitchell, S. F.; Trainor, F. R.; Rich, P. H. & Goulden, C. E. 1992. Growth of *Daphnia magna* in the laboratory in relation to the nutritional state of its food species, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plankton Res.*, 14: 379-391.
- Müller-Navarra, D. 1995. Evidence that highly unsaturated fatty acids limits *Daphnia* growth in nature. *Arch. Hydrobiol.*, 132: 297-307. Murphy, J. & Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.
- Olsen, Y.; Jensen, A.; Reinertsen, H.; Børnsheim, K. Y.; Heldal, M. & Langeland, A. 1986. Dependence of the rate of release of phosphorus by zooplankton upon the P:C ratio in the food supply, as calculated from the recycling model. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 34-44.

- Plath, K. & Boersma, M. 2001. Mineral limitation of zooplankton: stoichiometric constraints and optimal foraging. *Ecology*, 82: 1260-1269.
- Peters, R. H. & Rigler, F. H. 1973. Phosphorus release by *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 18: 821-839.
- Porter, K. G. 1973. Selective grazing and differential digestion of algae by zooplankton. *Nature*, 224.
- Sommer, U. 1992. Phosphorus-limited *Daphnia*: intraspecific facilitation instead of competition. *Limnol. Oceanogr.*, 37: 966-973.
- Stemberger, R. S. 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 721-724.
- Sterner, R. W. 1989. Resource competition during seasonal succession toward dominance by cyanobacteria. *Ecology*, 70: 229-245.
- Sterner, R. W. 1990. The ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by herbivores zooplankton and the algal competitive arena. *Am. Nat.*, 136: 209-229.
- Sterner, R. W. 1993. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton. *Ecology*, 74: 2351-2360.
- Sterner, R. W.; Elser, J. J. & Hessen, D. O. 1992. Stoichiometric relationships among producers, consumers, and nutrient cycling in pelagic ecosystems. *Biogeochemistry*, 17: 49-67.
- Sterner, R. W. & Hessen, D. O. 1994. Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annu. Rev. Syst.*, 25: 1-29.
- Sterner, R. W. & Robinson, J. L. 1994. Thresholds for growth in *Daphnia magna* with high and low phosphorus diets. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1228-1232.

- Sterner, R. W. & Schulz, K. L. 1998. Nutrition: recent progress and a reality check. *Aquat. Ecol.*, 32: 261-279.
- Sterner, R. W. & Elser, J. J. 2002. Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton Univ. Press.
- Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd Ed. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, 167p.
- Svensson, E. J. & Stenson, J. A. E. 1991. Herbivorous impact on phytoplankton community structure. *Hydrobiologia*, 226: 71-80.
- Talling, J. F. & Lemoalle, J. 1998. Ecological Dynamics of Tropical Inland Waters. Cambridge University Press, Cambridge.
- Utermöhl, V. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 9: 1-38.
- Urabe, J. & Watanabe, Y. 1992. Possibility of nitrogen or phosphorus limitation for planktonic cladocerans: An experimental test. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 232-241.
- Urabe, J.; Clasen, J. & Sterner, W. 1997. Phosphorus limitation of *Daphnia* growth: is it real? *Limnol. Oceanogr.*, 42: 1436-1443.
- van Donk, E.; Lürling, M. ; Hessen, D. O. & Lokhorst, G. M. 1997. Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 357-364.
- Von Liebig, J. 1885. Die Grundsätze der Agrikulturchemie. Vieweg, Braunschweig, Germany.
- Vrede, T., Andersen, T. & Hesse, D. O. 1999. Phosphorus distribution in three crustacean zooplankton species. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 225-229.

RESUMO

A influência da adição de ácidos graxos essenciais ao séston do Lago Monte Alegre foi avaliada com o intuito de testar se estes eram componentes importantes da dieta de cladóceros tropicais, assim como são para os de regiões temperadas. Foram realizados experimentos de crescimento individual em biomassa, sendo que ao final destes, o número de ovos foi contado para o posterior cálculo da fecundidade média e do tamanho da ninhada. Todos os experimentos foram realizados com temperatura (23°C) e luz controladas, utilizando roda de plâncton para evitar a sedimentação do alimento. Os cladóceros utilizados foram: *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia ambigua* e *D. gessneri*, dependendo da disponibilidade desses organismos no ambiente durante a realização dos experimentos. Os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA), linoléico e linolênico foram microencapsulados antes de servirem como alimento para os cladóceros. Os seguintes tratamentos foram feitos: 1) Séston, 2) Séston suplementado com microcápsulas de EPA e DHA ou de linoléico e linolênico, 3) Séston suplementado com microcápsulas vazias e 4) Séston + *Scenedesmus spinosus* (1 mg C L⁻¹). O conteúdo de carbono, nitrogênio e fósforo do séston e da alga foram medidos e as razões C:N e C:P calculadas. Também foi realizado o perfil de ácidos graxos do séston e dos animais. Os resultados obtidos mostraram que a adição de ácidos graxos ao séston não aumentou o crescimento e reprodução dos cladóceros, indicando que este não estava limitado por estes durante este estudo. Também se observou que em termos de porcentagem os ácidos graxos encontrados no séston e nos cladóceros contribuem de modo muito semelhante ao encontrado em regiões temperadas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the addition of nitrogen, phosphorus and fatty acids to the seston of the Monte Alegre Lake on growth and reproduction of cladocerans and test a possible synergic effect between these nitrogen and phosphorus. The influence of the addition of fatty acids was evaluated to test whether they were an important component of the diet of tropical cladocerans as known for the temperate ones. The cladocerans used were: *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia ambigua* and *D. gessneri*, depending

on their availability in the lake during the experiments. The experiments *in vitro* included a life table (nitrogen and phosphorus addition) and many other growth bioassays. All of the experiments were carried out under controlled temperature (23°C) and light, using a plankton wheel to avoid food settlement (except the life table one that was carried out on an environmental chamber). Nitrate and phosphate were added in sufficient quantities to maintain C:N and C:P ratios above the values considered limitants to cladocerans. The fatty acids were encapsulated with a mixture of gelatin and arabic gum to serve as food to the animals. Carbon, nitrogen and phosphorus of the seston, algae and animals used in the experiments were measured and the C:N and C:P ratios were calculated. The fatty acid content of seston and cladocerans was also measured by Gas Chromatography. The results showed that the addition of nutrients and fatty acids to the seston did not improve growth and reproduction of the cladocerans in the majority of the experiments. A synergic effect between nitrogen and phosphorus was also not found. The influence of the mineral and biochemical content of the algae on growth and reproduction of the cladocerans is questionable. It is possible that there is a hierarchy among factors that regulate cladocerans' growth, being the size and the morphological characteristics of the phytoplankton besides energy (carbon) more important than the mineral and biochemical limitation.

INTRODUÇÃO

Estudos da influência da qualidade do fitoplâncton sobre o crescimento e reprodução de cladóceros, especialmente do gênero de água doce *Daphnia* e de copépodos marinhos, vêm se destacando dentro da Ecologia nas últimas duas décadas. Os herbívoros zooplancônicos são constituintes importantes dos ambientes aquáticos, sendo um elo entre os produtores primários e níveis tróficos mais elevados. No entanto, a transferência de carbono da produção primária para a produção secundária é bastante variável, sendo atribuída à variação da qualidade alimentar.

A qualidade alimentar depende do conteúdo de nutrientes presentes nas algas,

especialmente carbono, nitrogênio e fósforo e uma hipótese muito discutida é a de limitação mineral, especialmente de fósforo (Hessen, 1992). Outra hipótese é a de limitação bioquímica, que diz respeito à composição de ácidos graxos essenciais presentes nas algas que servem de alimento para o zooplâncton (Müller-Navarra, 1995). Estudos sugerem que os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) e os ácidos graxos de cadeia muito longa (superior a 18 carbonos na cadeia) LCPUFA (do inglês “long chain polyunsaturated fatty acids”) são constituintes bioquímicos importantes na dieta natural do zooplâncton, pois a prevalência desses no séston é um indicador de crescimento do zooplâncton e pode ser crucial na estruturação das pirâmides da cadeia alimentar (Brett & Müller-Navarra, 1997).

Os ácidos graxos essenciais desempenham papel importante no metabolismo celular, como precursor de eicosanóides (prostaglandinas) nos animais e também fazem parte das paredes celulares e regulam a fluidez da membrana (Brett & Müller-Navarra, 1997). As prostaglandinas são importantes na fisiologia dos invertebrados, pois regulam a produção de ovos entre outras funções (Stanley-Samuelson, 1994). Além do mais, em baixas condições alimentares as reservas de lipídeos são cruciais para a sobrevivência de *Daphnia* adultas (Goulden & Henry, 1985), assim como de embriões e neonatos (Goulden *et al.*, 1987).

Os ácidos graxos considerados essenciais para o zooplâncton são os PUFA linoléico (18:2 ω 6) e linolênico (18:3 ω 3) e o LCPUFA eicosapentaenóico (EPA) (20:5 ω 3) (Goulden *et al.*, 1998). O ácido linolênico é importante porque quase todos os herbívoros e, provavelmente, quase todos os onívoros são capazes de converter esse ácido graxo em EPA e em ácido docosahexaenóico (DHA), outro LCPUFA. No entanto, essa conversão parece ser ineficiente e existem muitas indicações de que a maioria dos organismos cresce melhor quando alimentados com fontes diretas de EPA e DHA, como os invertebrados aquáticos (Jones *et al.*, 1979).

Embora EPA seja considerado um ácido graxo essencial para o zooplâncton, sua presença no alimento não é vital para o crescimento e reprodução de *Daphnia*, pois animais alimentados somente com *Scenedesmus* (que não contém EPA) tiveram um desenvolvimento normal e completo (Weers & Gulati, 1997). Outra razão pela qual EPA talvez não seja essencial é que o ácido linolênico está presente em altas concentrações nas clorofíceas e, dessa forma, pode ser convertido em EPA (Weers & Gulati, 1997). Esse processo metabólico é mediado pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases, as quais participam da formação dos PUFA, ω -3 e ω -6.

No entanto, estudos sobre os efeitos de adições de PUFA a dietas monoalgais mostraram dependência dos cladóceros em ácidos graxos essenciais, principalmente em espécies do gênero *Daphnia* de regiões temperadas (DeMott & Müller-Navarra, 1997; Sundbom & Vrede, 1997), mas poucos estudos encontraram as mesmas respostas em cladóceros tropicais (Ferrão-Filho *et al.*, 2003).

EPA e DHA são importantes para os animais que habitam altas latitudes e regiões de baixas temperaturas que são adaptados a uma grande variação térmica, funcionando como um “anticongelante” (Brett & Müller-Navarra, 1997). Ao contrário destes, os cladóceros tropicais não são submetidos a temperaturas congelantes e a uma grande variação térmica ao longo do ano. Assim, para os cladóceros tropicais, os ácidos graxos essenciais devem estar envolvidos em funções relacionadas mais à reprodução quando comparado ao crescimento.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi testar a influência dos ácidos graxos sobre o crescimento e reprodução de cladóceros tropicais, além de determinar a composição desses ácidos graxos no séston e nos tecidos corporais dos cladóceros estudados.

OBJETIVOS

- 1 Testar a influência da adição dos ácidos graxos: linoléico, linolênico, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) ao séston do Lago Monte Alegre sobre o crescimento e reprodução dos cladóceros *Ceriodaphnia richardi*, *Daphnia ambigua* e *Daphnia gessneri*, através de experimentos laboratoriais de crescimento individual em biomassa;
- 2 Determinar, utilizando Cromatografia Gasosa, o conteúdo de ácidos graxos dos cladóceros e do séston utilizados nos experimentos para comparação com dados de região temperada.

ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos apresentados neste capítulo foram realizados utilizando o séston e cladóceros do Lago Monte Alegre (21° 11'S, 47° 43'W), que está localizado no sudeste do Brasil e foi resultado do represamento do Córrego Laureano, pertencente à bacia do Rio Pardo em 1942 (Fig. 25). A região é caracterizada por um clima tropical, com duas estações bem marcadas: uma seca e fria (Maio a Setembro) e uma quente e úmida (Outubro a Abril). É um reservatório pequeno, eutrófico e classificado como polimíctico descontínuo quente. Alguns dados morfométricos são apresentados na Tabela 26.

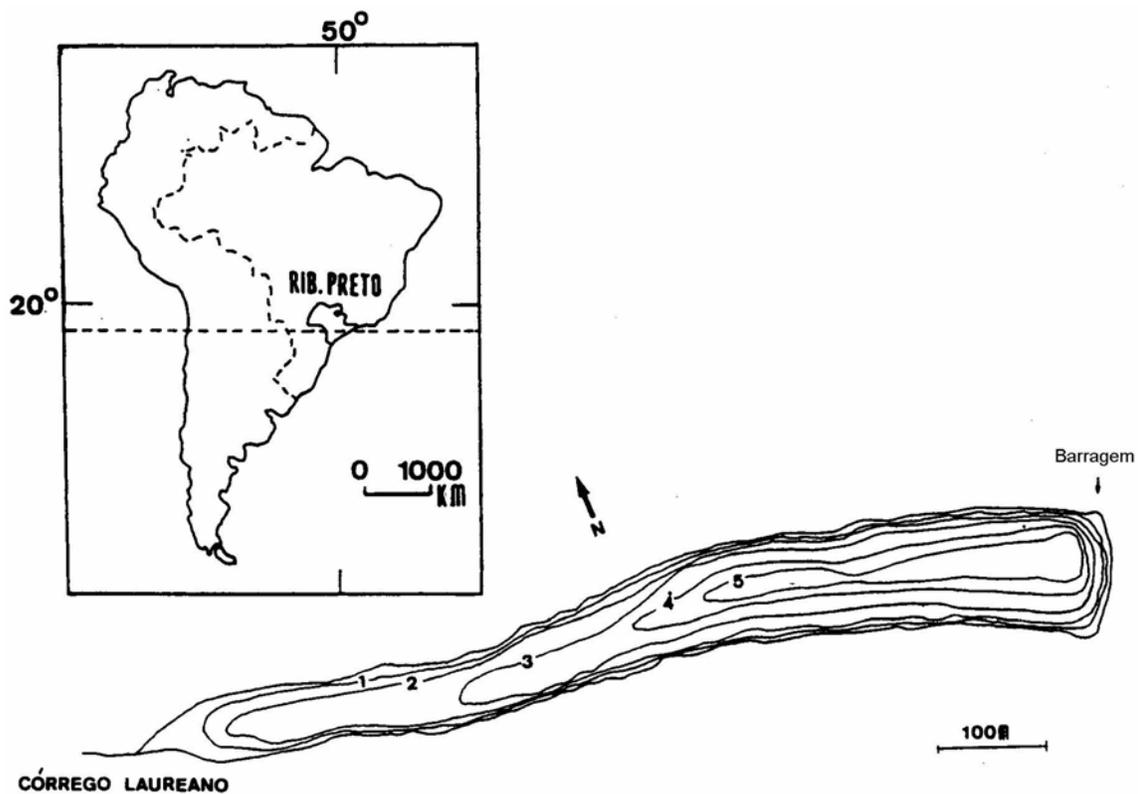


Figura 25. Mapa morfológico e localização geográfica do Lago Monte Alegre.

Tabela 26. Dados morfológicos e hidrológicos do Lago Monte Alegre.

Área (km ²)	0,07
Comprimento total (m)	906
Perímetro (m)	1900
Volume (m ³)	187 x 10 ³
Profundidade máxima (m)	5,0
Profundidade média (m)	2,9
Vazão do córrego (m ³ s ⁻¹)	0,0095
Tempo de retenção (dias)	45

A ausência de manipulação pelo homem, já que o reservatório é usado somente para ensino e pesquisa, o pequeno tamanho, o baixo fluxo do córrego e a presença de ventos de baixa velocidade e com direção constante contribuem para a estabilidade do lago (Arcifa *et al.*,

1990).

Em quatro anos de estudo (1985-86/1988-89/1999 e 2001-02), oito espécies de cladóceros foram encontradas no lago (Arcifa *et al.*, 1992; Arcifa *et al.*, 1998; Fileto, C (2001) e Bunioto, T. C. (2003): *Bosmina tubicen*, *Ceriodaphnia cornuta*, *C. richardi*, *Daphnia ambigua*, *D. gessneri*, *Diaphanosoma birgei*, *Moina micrura* e *M. minuta*. De 1998 a 2001, as espécies mais freqüentes e em algumas ocasiões as mais abundantes foram *D. gessneri* e *D. ambigua* (densidades máximas: 100 e 80 ind/L, respectivamente).

De 1999 a 2001, Chlorophyceae foi o grupo de algas mais diverso e abundante, sendo *Chlorella homosphaera* (densidade máx. 2139 ind/ml) e *Oocystis lacustris* (1017 ind/ml) as espécies mais representativas, seguidas por colônias da Cyanophyceae *Aphanocapsa incerta* (2249 ind/ml). Existem diferenças sazonais na quantidade e qualidade do alimento, sendo o séston do verão melhor para a reprodução e crescimento populacional dos cladóceros do que o do outono, quando a contribuição da Dinophyceae *Peridinium* no fitoplâncton aumenta (Ferrão-Filho *et al.*, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas do séston

O séston foi coletado no lago, durante a realização dos experimentos. As coletas foram feitas numa estação no eixo central do reservatório, com o auxílio de uma bomba de sucção (30 L min⁻¹), fazendo-se a integração da coluna de água, evitando a região mais profunda. O séston foi passado por uma rede de 140 µm para a retirada do zooplâncton de maior tamanho antes da realização dos experimentos.

Foram retiradas amostras do séston durante os experimentos para posterior contagem e

identificação do fitoplâncton, de acordo com Utermöhl (1958).

Alga e Animais de laboratório

A clorofícea, *Scenedesmus spinosus*, utilizada nos experimentos, foi cultivada em meio MBL (Stemberger, 1981), em câmara germinativa (FANEM, São Paulo, Brasil) com temperatura constante de 22°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e aeração constante.

Os animais utilizados nos experimentos foram coletados no Lago Monte Alegre e, posteriormente, cultivados no Laboratório de Limnologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. O zooplâncton foi coletado com o auxílio de rede de plâncton de 60 µm, através de coletas verticais, integrando-se a coluna de água. Estes foram separados por espécie, dependendo da disponibilidade no ambiente. Os animais foram colocados em garrafas de 500 ml, presas a uma roda de plâncton, contendo água do lago filtrada (filtros de fibra de vidro de 0,45 µm de poro -Sartorius) adicionada da clorofícea *S. spinosus* (1 mg C L⁻¹). Os animais foram cultivados por várias gerações antes da realização dos experimentos.

Tanto *S. spinosus* quanto o séston coletado no lago durante os experimentos foram concentrados através de centrifugação (2000 rpm por 5 minutos), sendo que alíquotas deste concentrado foram retiradas e colocadas em cápsulas de estanho previamente pesadas para as análises de carbono e nitrogênio. Para as análises de fósforo, alíquotas do séston coletado (500 ml) e de *S. spinosus* (30 ml) foram filtradas em filtros de vidro de 0,45 µm de poro (Sartorius), previamente pesados e incinerados em mufla a 400°C por 1 hora. Posteriormente, as amostras em cápsulas ou em filtros foram colocadas em estufa a 60°C, por 24 horas. Essas amostras foram guardadas em dessecador até a realização das análises, sendo feitas três réplicas.

Análises químicas de S. spinosus e séston

Carbono e nitrogênio O carbono e nitrogênio de *S. spinosus* e do séston foram medidos em um Elemental Analyser (Carlo Erba Mod. 1110), pertencente ao Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos. Os resultados são expressos como % do peso seco.

Fósforo

As análises de fósforo de *S. spinosus* e do séston foram realizadas através da metodologia que consiste na reação do material a ser analisado com molibdato, ácido ascórbico e tartarato de antimônio. Os ácidos molibdáticos formados são convertidos, por agentes redutores, em um complexo de cor azul (Murphy and Riley, 1962).

Procedimentos:

- Filtros contendo o material foram colocados em béqueres de 50 ml e colocados em mufla a 550°C, por duas horas. Esperou-se esfriar;
- Adicionaram-se 1,2 ml de ácido sulfúrico 10N e 5 ml de água destilada. Colocou-se em banho-maria por 10 minutos;
- Em seguida, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, lavando-se o béquer com água destilada até a completa lavagem dos filtros. Esperou-se esfriar;
- Adicionaram-se 5 ml de solução de molibdato (400 ml de água destilada + 0,109g de tartarato de antimônio + 4,8g de heptamolibdato + 80 ml de ac. sulfúrico 10N) e 2 ml de ácido ascórbico 2%. O balão foi preenchido com água destilada até completar 50 ml;
- As amostras foram centrifugadas e depois de 10 minutos, mas antes de 4 horas, foi lida a absorbância em espectrofotômetro (715 nm). Para isso, foi utilizada cubeta de vidro de 5 cm de passo ótico.

Nota: Três brancos foram preparados para cada análise, sendo estes submetidos ao banho-maria e às outras etapas da análise. Os resultados são expressos como % do peso seco.

Preparo das microcápsulas

Óleo de peixe comercial contendo o ácido eicosapentaenóico (EPA) (21%) e docosahexaenóico (DHA) (12%) (Flor & Erva Farmácia de Homeopatia e Manipulação,

Ribeirão Preto, SP) e os ácidos linoléico e linolênico (Sigma – 99% pureza) foram utilizados no preparo das microcápsulas.

Os ácidos graxos foram encapsulados de acordo com um método modificado de Langdon & Waldock (1981), como segue:

- 1 Goma arábica (10%) + gelatina (5%) foram adicionadas em 100 ml de água destilada, a 40°C, usando-se agitação magnética por 10 minutos;
- 2 Posteriormente, o ácido graxo (1ml) foi gotejado nessa solução de gelatina + goma arábica, sob agitação de 500 rpm, utilizando um homogeneizador de alta velocidade (Heidolph, model RZR1, Germany), por 3 minutos;
- 3 A agitação foi diminuída para 100 rpm e solução de HCl (0,1M) foi adicionada até atingir-se um pH de 3,9, ocorrendo, assim, precipitação e formação da parede das microcápsulas;
- 4 Essa mistura foi deixada em agitação de 100 rpm, a 40°C por 40 minutos;
- 5 Depois, foi feito o ajuste do pH para 9,3 com adição lenta de NaOH (1M);
- 6 Após a neutralização, as microcápsulas foram despejadas em 300 ml de água destilada a 5 °C. Estas foram mantidas nessa temperatura por pelo menos 1 hora, garantindo o endurecimento da parede;
- 7 Finalmente as microcápsulas foram lavadas através de centrifugações repetidas para retirada do excesso de goma arábica, gelatina e ácidos graxos não encapsulados, e guardadas em refrigerador, a 5 °C, até sua utilização nos experimentos.

No entanto, como os diferentes ácidos graxos utilizados nos experimentos diferiam em termos de viscosidade e pureza, algumas modificações tiveram que ser feitas para o preparo das microcápsulas de ácido linoléico e linolênico. Nesse caso, não foi usada agitação mecânica (com auxílio de homogeneizador), mas somente a magnética. O volume de 100 ml de água destilada foi diminuído para 10 ml e o de ácido graxo de 1 ml passou para 0,1 ml, sendo que as proporções de goma e gelatina foram mantidas.

O mesmo protocolo para o preparo das microcápsulas contendo EPA e DHA foi utilizado para preparar microcápsulas vazias, só que nesse caso, nenhum ácido graxo foi adicionado. Essas microcápsulas vazias serviram de controle durante os experimentos para testar se a capa formada por gelatina e goma arábica poderia causar algum dano ao aparelho digestivo dos cladóceros ou interferir na ingestão, ou mesmo incrementar a oferta de proteína no alimento

oferecido e, assim, invalidar o objetivo original dos experimentos que era testar o efeito da adição dos ácidos graxos na dieta dos cladóceros.

As concentrações das microcápsulas utilizadas nos experimentos foram determinadas através de contagens em Câmara de Neubauer e o tamanho foi medido diretamente em microscópio ótico. As microcápsulas de EPA e DHA mediam $1,65 \mu\text{m} \pm 0,30$, enquanto as microcápsulas de ácido linoléico e linolênico apresentaram tamanhos médios de $2,00 \mu\text{m} \pm 0,50$ e $1,70 \mu\text{m} \pm 0,25$, respectivamente. As microcápsulas vazias mediam $7,00 \mu\text{m} \pm 2,70$.

Determinação do perfil de ácidos graxos dos animais e do séston

Preparo das amostras

Essa determinação foi realizada em *C. richardi* e *D. gessneri* (fêmeas adultas sem ovos) cultivadas em laboratório e naquelas utilizadas nos experimentos. Como é inviável obter amostras dos animais submetidos aos tratamentos experimentais com peso suficiente para a realização de tais análises, experimentos “paralelos” foram realizados para obtenção de um maior número de animais. Para tal, as mesmas espécies de cladóceros utilizadas nos Experimentos IV e VII foram submetidas às mesmas condições experimentais durante a realização destes. A única diferença foi que estes animais não foram colocados em roda de plâncton (por falta de espaço), mas as garrafas eram agitadas em intervalos regulares para evitar a sedimentação do alimento.

Amostras de séston (concentrado através de centrifugações repetidas) também foram retiradas durante os experimentos IV e VII para a determinação do perfil de ácidos graxos. As

amostras foram imediatamente congeladas e, posteriormente, liofilizadas.

Metodologia cromatográfica, testes de recuperação, curvas de calibração e limites de detecção:
Os perfis de ácidos graxos foram realizados utilizando Cromatografia Gasosa e

transesterificação direta dos ácidos graxos, segundo a metodologia:

- a. Pesar animais sem ovos ($> 200 \mu\text{g}$ – peso seco) ou séston liofilizado (4 mg) e colocar em tubos de ensaio (fundo cônico);
- b. Adicionar 500 μl de metanol e colocar em ultra-som por 30 minutos (ou 1 hora para *D. gessneri*) para a quebra dos mesmos, provocando o rompimento das células;
- c. Adicionar 500 μl de metóxido de sódio 1M (reagente da transesterificação) recentemente preparado e aquecer em banho-maria a 65 °C por 5 minutos;
- d. Deixar esfriar;
- e. Adicionar 30 μl de padrão interno (C 17:0 – Heptadecanoato metil éster);
- f. Adicionar 1 ml de água e fazer 3 adições de 1 ml de clorofórmio com agitação em "mixer" durante 1 minuto para cada adição;
- g. Centrifugar (3000 rpm por 2 min.) para separar as fases, recuperando-se a fase clorofórmica inferior e depois concentrar sob N_2 até o volume final (1 ml);
- h. Injetar 2 μl no cromatógrafo gasoso.

Condições cromatográficas:

Equipamento: Cromatógrafo a Gás Hewlet-Packard modelo 5890 série II

Coluna: capilar de sílica fundida 30m x 0,25mm DI e 0,25 μm de espessura do filme
(HP-Immovax)

Detector: ionização de chama

Programação da coluna: 50°C até 200°C a 20°C/min, permanecendo 5 minutos; então até 230°C a 5 °C/min permanecendo 15 minutos

Gás de arraste: hidrogênio com velocidade linear 46cm/seg medido a 200°C

Temperatura do injetor: 220°C com "split" 1:20

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através da comparação dos

valores de retenção relativa com aqueles obtidos com os compostos de referência, sendo adicionados 16,5 µg de heptadecanoato metil éster como padrão interno.

A validação do método descrito foi realizada através de testes de recuperação, onde o componente a ser analisado foi adicionado à matriz seguida da execução do método a ser avaliado. O teor medido do componente adicionado foi dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100, obtendo-se assim, a porcentagem de recuperação.

Para a quantificação dos ácidos graxos foi realizada a padronização interna, com confecção de curvas de calibração para cada ácido graxo analisado. Tais curvas foram confeccionadas injetando-se quantidades conhecidas de cada ácido graxo de interesse junto com o padrão interno. Depois, traçou-se um gráfico da concentração do ácido graxo de interesse versus a razão entre a área do padrão interno e a área do ácido graxo de interesse.

Também foram determinados os limites de detecção para cada ácido graxo analisado. Tal limite é definido como o menor valor de concentração do composto na amostra para o qual um determinado método analítico produz um sinal, cujo valor difere daquele produzido pela amostra testemunha num intervalo de confiança de 95%. Os valores destes, assim como as porcentagens de recuperação, as curvas de calibração e os cromatogramas dos padrões internos, do séston e dos animais utilizados nos experimentos IV e VII são apresentados na Seção de Anexos.

Determinação do conteúdo de proteína das microcápsulas

As análises foram realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. O conteúdo de proteína das microcápsulas foi analisado utilizando o método de Lowry (1951). Este método consiste em duas reações diferentes. A primeira envolve a formação de um íon complexo de cobre, formando cobre

reduzido em soluções alcalinas, sendo chamada de “Biuret”. A segunda reação é a redução do reagente “Folin-Ciocalteu” (fosfomolibdato e fosfotungstato) por resíduos de tirosina e triptofano.

As análises foram realizadas segundo o protocolo abaixo:

- Amostras das microcápsulas contendo mais que 100 µg de proteína foram adicionadas a tubos de 1 ml e o volume total foi preenchido com água. Dois tubos continham somente água para servirem como brancos;
- 5 ml de uma mistura de reagente alcalino + reagente de cobre foram adicionados a cada tubo e estes foram agitados;
- Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos;
- 5 ml de reagente Folin-Ciocalteu diluído foram adicionados e os tubos foram agitados imediatamente;
- Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos;
- Os tubos foram agitados. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro, zerado com água destilada, a uma absorbância de 660 nm.

Experimentos

Quatro experimentos foram realizados utilizando-se microcápsulas contendo

EPA/DHA:

- Experimento I: 24-27/10/2003
Espécie: *Ceriodaphnia richardi*
- Experimento II: 04-07/12/2003
Espécie: *Ceriodaphnia richardi*
- Experimento III: 16-19/12/2003
Espécie: *Ceriodaphnia richardi*
- Experimento IV: 22-26/06/2004
Espécies: *Ceriodaphnia richardi* e *Daphnia gessneri*

E três experimentos foram realizados utilizando microcápsulas contendo ácidos

linoléico ou linolênico:

- Experimento V: 29/01/2004-01/02/2004

Espécie: *Ceriodaphnia richardi*

- Experimento VI: 05-09/04/2004
Espécies: *Ceriodaphnia richardi* e *Daphnia ambigua*
- Experimento VII: 27-31/07/2004
Espécies: *Ceriodaphnia richardi* e *Daphnia gessneri*

Esses experimentos foram realizados em temperatura de 22 a 23°C, com fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro).

Em todos os experimentos, 7 animais, nascidos num período de 0 a 24 horas, foram colocados em frascos de 500 ml, presos a uma roda de plâncton, programada para girar durante um minuto e parar durante cinco minutos. Os seguintes tratamentos foram feitos: **1) Séston, 2) Séston adicionado de microcápsulas de EPA e DHA (Experimento I a IV) ou de ácidos linoléico e linolênico (Experimento V -VII), 3) Séston adicionado de microcápsulas vazias e 4) Séston + *S. spinosus* (1mg C L⁻¹)**. O tratamento com a alga controle serviu para se ter uma idéia do crescimento máximo dos animais. As concentrações de microcápsulas adicionadas ao séston variaram ao longo dos experimentos, sendo estas: 25.10³ microcápsulas ml⁻¹ no Experimento I, 12,5.10³ microcápsulas ml⁻¹ no Experimento II e 10.10² microcápsulas ml⁻¹ nos Experimentos III a VII. Essas concentrações foram mudadas porque nos Experimentos I e II elas foram tóxicas para os animais.

No início do experimento (tempo t₀), 3 grupos de 10 indivíduos jovens cada foram colocados em lâminas de vidro, secos em estufa a 60°C para secagem completa (24 horas), e pesados para a avaliação do peso inicial. Todos os dias os animais eram transferidos para novas suspensões algais até o dia da primeira reprodução, quando os animais foram medidos, colocados em lâminas de vidro (após a retirada dos ovos), secos em estufa a 60°C, por 24

horas, e pesados para a obtenção do peso final. De cada réplica (3), 5 animais foram individualmente pesados em microbalança, sendo feita a média final da biomassa.

A taxa exponencial de crescimento foi calculada segundo a

$$\text{equação: } g = [\ln (Wt) - \ln (Wo)] / t,$$

onde W_o e W_t são os pesos médios

(em μg) dos indivíduos no tempo t_o

e após t dias, respectivamente. Ao

final do experimento, o número de

ovos foi contado para o cálculo

posterior da fecundidade (n°

ovos/total de fêmeas) e do tamanho

da ninhada (n° de ovos/fêmea

ovígera).

Foram realizados alguns para avaliar possível limitação de energia (carbono) no intervalo de troca de água (1 dia) durante alguns experimentos. Amostras do séston (400 ml) onde os cladóceros se alimentaram por 1 dia foram filtradas em filtros (0,45 μm de poro), previamente pesados e incinerados em mufla a 400°C por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa (60 °C) por 24 horas para secagem completa. Essas amostras (duplicatas) foram guardadas em dessecador até a realização das análises químicas (Strickland & Parsons, 1972). Os resultados destes testes são apresentados na seção de anexos (anexo 6).

RESULTADOS

Composição elementar de S. spinosus e séston

A composição elementar de *S. spinosus* foi medida em cada experimento (Tab. 27). O conteúdo de carbono variou entre os experimentos, sendo encontrados valores entre 22,70 mg L⁻¹ a 95,40 mg L⁻¹. Houve também variação da concentração de nitrogênio, sendo que estas variaram entre 3,45 mg L⁻¹ a 9,30 mg L⁻¹ enquanto o conteúdo de fósforo variou entre 334,00 mg L⁻¹ a 750,00 mg L⁻¹. As razões C:N e C:P ficaram abaixo dos limites considerados limitantes para o zooplâncton, exceto no Experimento IV, onde a razão C:P ficou acima de 300 molar, valor considerado limitante para o zooplâncton, mas nenhum efeito negativo foi encontrado neste experimento.

Tabela 27. Valores médios de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) de *S. spinosus* dos experimentos I a VII. Taxas C:N e C:P expressas em molar.

	C (mg L-1)	N (mg L-1)	P (µg L-1)	C:N	C:P
I	22,70 ± 0,00	6,70 ± 0,80	630,00 ± 97,00	3,90 ± 0,33	95,40 ± 10,40
II	53,00 ± 13,15	7,75 ± 1,00	334,20 ± 18,60	13,30 ± 0,20	181,20 ± 7,40
III	41,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	530,00 ± 14,30	2,60 ± 0,05	111,70 ± 2,17
IV	95,40 ± 3,00	8,45 ± 0,25	690,00 ± 14,00	13,00 ± 0,01	371,30 ± 19,40
V	78,30 ± 2,45	8,50 ± 0,18	348,00 ± 4,25	10,70 ± 0,10	171,00 ± 1,50
VI	49,00 ± 2,10	9,30 ± 0,40	525,00 ± 0,00	6,10 ± 0,01	247,00 ± 10,80
VII	18,80 ± 0,20	3,45 ± 0,35	750,00 ± 60,00	6,70 ± 0,07	67,00 ± 4,50

As concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo do séston, e conseqüentemente, as razões C:P e C:N variaram entre os experimentos e mesmo dentro de cada experimento (Tab. 28). O menor valor do conteúdo de carbono encontrado foi 0,30 mg L⁻¹, valor este ainda distante do

considerado limitante para o zooplâncton enquanto que o maior valor de carbono encontrado foi $3,10 \text{ mg L}^{-1}$. Com relação ao conteúdo de nitrogênio, a variação entre os experimentos foi menor, sendo encontrados valores entre $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,47 \text{ mg L}^{-1}$, e em nenhum experimento foi encontrada razão indicativa de limitação de nitrogênio

(C:N > 15) no ambiente. Por outro lado, as concentrações de fósforo variaram bastante entre os experimentos e dentro destes, sendo que em algumas ocasiões foram encontrados valores relativamente baixos, com razões C:P acima de 300 molar. Tais valores estariam indicando possível limitação deste nutriente no ambiente, como no início dos Experimentos III e IV, durante os Experimentos V e VI e no final do Experimento VII.

Tabela 28. Valores médios de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) do séston dos experimentos I a VII. Taxas C:N e C:P expressas em molar.

C (mg L^{-1}) N (mg L^{-1}) P ($\mu\text{g L}^{-1}$) C:N C:P

I -Inicial (24/10/03) Final (26/10/03) II -Inicial (04/12/03) Final (06/12/03) III -Inicial (16/12/03) Final (18/12/03) IV -Inicial (22/06/04) Final (26/06/04) V -Inicial (29/01/04) Final (01/02/04) VI -Inicial

(05/04/04) Final (07/04/04) VII -Inicial (27/07/04) Final (31/07/04)

$0,86 \pm 0,10$ $0,60 \pm 0,03$ $0,78 \pm 0,45$ $0,30 \pm 0,17$ $1,30 \pm 0,10$ $1,70 \pm 0,45$ $1,00 \pm 0,20$ $0,40 \pm 0,02$ $1,60 \pm 0,10$ $3,10 \pm 0,10$ $1,10 \pm 0,15$ $1,40 \pm 0,40$ $0,30 \pm 0,02$ $0,65 \pm 0,25$ $0,30 \pm 0,03$ $0,40 \pm 0,02$ $0,40 \pm 0,09$ $0,26 \pm 0,00$ $0,36 \pm 0,02$ $0,39 \pm 0,03$ $0,45 \pm 0,02$ $0,36 \pm 0,01$ $0,46 \pm 0,00$ $0,47 \pm 0,03$ $0,20 \pm 0,03$ $0,27 \pm 0,04$ $0,30 \pm 0,02$ $0,25 \pm 0,00$ $24,40 \pm 13,00$ $21,80 \pm 12,70$ $15,80 \pm 4,80$ $14,90 \pm 4,55$ $7,60 \pm 0,17$ $16,00 \pm 0,90$ $7,65 \pm 0,02$ $5,90 \pm 2,60$ $8,95 \pm 0,80$ $10,50 \pm 1,60$ $4,30 \pm 3,20$ $14,50 \pm 9,20$ $6,40 \pm 0,45$ $2,75 \pm 0,15$

$3,40 \pm 0,40$ $1,60 \pm 0,08$ $4,40 \pm 1,15$ $1,30 \pm 0,54$ $4,40 \pm 0,33$ $4,90 \pm 0,53$ $2,70 \pm 0,50$ $1,35 \pm 0,01$ $4,00 \pm$

$0,25$ $7,60 \pm 0,57$ $4,10 \pm 0,64$ $5,90 \pm 0,70$ $1,20 \pm 0,14$ $2,60 \pm 1,15$

$102,3 \pm 41,30$ $91,80 \pm 35,30$ $186,00 \pm 51,20$ $50,20 \pm 10,80$ $484,60 \pm 2,88$ $283,30 \pm 23,50$ $350,00 \pm 77,00$ $207,00 \pm 97,00$ $475,30 \pm 8,60$ $799,00 \pm 62,90$ $918,00 \pm 760,00$ $310,25 \pm 103,00$ $125,50 \pm 15,00$ $617,50 \pm 212,00$

Conteúdo de proteína nas microcápsulas

Com relação ao conteúdo de proteínas, observou-se que $1,30 \mu\text{g}$ de proteína ml^{-1} de séston foi oferecida aos animais durante os experimentos, concentração esta derivada da

gelatina utilizada no preparo das microcápsulas.

Conteúdo de ácidos graxos nos cladóceros e no séston

Ceriodaphnia richardi e *Daphnia gessneri* cultivadas em laboratório e alimentadas com *Scenedesmus spinosus* foram analisadas com relação ao conteúdo de ácidos graxos antes da realização das análises dos animais submetidos aos tratamentos experimentais para a adequação do método de transesterificação direta e calibração do Cromatógrafo.

Os resultados das cromatografias revelaram que o ácido linolênico foi o mais abundante, representando entre 41 % e 45 % do total de ácidos graxos analisados. Outros ácidos encontrados em menores porcentagens foram: palmítico, oléico e linoléico, enquanto somente traços de ácido eicosapentaenóico (EPA) foram encontrados nos tecidos dos cladóceros (Tab. 29). O ácido docosaxeoaenóico (DHA) não foi detectado.

Tabela 29. Composição relativa de ácidos graxos (porcentagem do total analisado) e total da massa de ácidos graxos analisados ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco do animal) de *C. richardi* e *D. gessneri* alimentadas com *Scenedesmus spinosus*.

Ácido graxo		
14:00 (Mirístico)	4,0	3,8
16:00 (Palmítico)	20,0	20,0
18:00 (Esteárico)	6,5	6,8
18: 1ω9 (Oléico)	15,5	12,0
18 : 2 ω6 (Linoléico)	11,0	11,5
18 : 3ω3 (Linolênico)	41,0	45,0
20 : 5 ω 3 (Eicosapentaenóico)	2,0	1,8
Total massa	9,0 \pm 4,0	9,30 \pm 2,0

C. richardi D. gessneri

Considerando os cladóceros submetidos aos tratamentos experimentais do séston, os principais ácidos graxos encontrados foram: palmítico, linolênico, seguidos por esteárico, oléico e linoléico em ambos os experimentos (Tabs. 30 e 31).

Observou-se que *C. richardi* e *D. gessneri* não apresentaram aumento de EPA quando este ácido graxo foi adicionado ao séston durante o Experimento IV (Tab. 30). Apesar da adição de DHA ao séston, este também não foi detectado nos animais submetidos aos tratamentos experimentais.

Tabela 30. Composição relativa de ácidos graxos de *C. richardi* e *D. gessneri* (porcentagem do total analisado) e total da massa de ácidos graxos analisados ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco do animal) durante o Experimento IV.

Ácido Graxo	<i>C. richardi</i>		<i>D. gessneri</i>	
	Séston	Séston+EPA/DHA	Séston	Séston+EPA/DHA
Mirístico	8,2 \pm 3,2	7,7 \pm 1,2	4,9 \pm 0,3	5,0 \pm 0,1
Palmítico	29,1 \pm 5,4	26,9 \pm 1,9	30,0 \pm 0,2	29,0 \pm 0,3
Esteárico	12,1 \pm 2,0	12,4 \pm 0,8	10,7 \pm 0,1	11,0 \pm 0,1
Oléico	10,8 \pm 1,7	11,8 \pm 0,4	15,3 \pm 0,1	15,0 \pm 0,2
Linoléico	12,8 \pm 1,6	11,9 \pm 1,1	11,3 \pm 0,1	12,0 \pm 1,0

Linolênico	19,9 ± 0,2	21,3 ± 0,1	18,0 ± 0,1	19,3 ± 0,2
Eicosapentaenóico	7,0 ± 3,3	8,0 ± 0,6	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,1
Total massa	22,8 ± 5,4	19,4 ± 0,5	11,9 ± 0,1	12,2 ± 0,1

Por outro lado, a adição dos ácidos linoléico e linolênico ao séston, aumentou significativamente a porcentagem do ácido linolênico nos tecidos corporais de *C. richardi* (P = 0,020) durante o Experimento VII (Tab. 31). Considerando *D. gessneri*, observou-se aumento na porcentagem de EPA em seus tecidos quando os ácidos linoléico e linolênico foram adicionados ao séston (P = 0,000). Este aumento pode ter ocorrido devido à conversão do ácido linolênico em EPA.

Tabela 31. Composição relativa de ácidos graxos de *C. richardi* e *D. gessneri* (porcentagem do total analisado) e total da massa de ácidos graxos analisados (µg/mg de peso seco do animal) durante o Experimento VII. LL = ácido linoléico + linolênico. O asterisco indica diferença significativa.

Ácido Graxo	<i>C. richardi</i>		<i>D. gessneri</i>	
	Séston	Séston+LL	Séston	Séston+LL
Mirístico Palmítico	7,6 ± 0,7	5,8 ± 0,7 26,8	8,0 ± 0,1	5,6 ± 0,0 28,0
Estearico Oléico	30,0 ± 5,2	± 0,8 12,3 ±	29,7 ± 0,2	±0,2 9,5 ± 0,1
Linoléico	13,4 ± 1,7	0,5 10,8 ± 0,5	9,0 ± 0,3	15,1 ± 0,1 9,9
Linolênico	12,0 ± 0,5	11,9 ± 0,5	13,0 ± 0,1	± 0,6 19,6 ±
Eicosapentaenóico	10,7 ± 2,6	24,4 ± 1,4*	11,2 ± 0,4	0,1 12,2 ± 0,1*
	18,9 ± 3,2	8,2 ± 0,5	21,1 ± 0,2	
	7,3 ± 1,3		8,0 ± 0,1	
Total massa	14,1 ± 2,4	17,6 ± 0,2	15,25 ± 0,1	10,9 ± 0,1

Com relação à composição de ácidos graxos do séston, foram encontrados principalmente: palmítico, mirístico, oléico, linolênico e estearico, sendo que somente traços de EPA foram encontrados em ambos os experimentos (Tab. 32).

Tabela 32. Composição relativa de ácidos graxos do séston (porcentagem do total

analisado) e total da massa de ácidos graxos analisados ($\mu\text{g}/\text{peso seco do s\acute{e}ston}$) durante os Experimentos IV e VII.

Ácido graxo Láurico

Mirístico Palmítico Esteárico Oléico

Linoléico

Linolênico

EPA DHA

Total massa

Experimentos

EXP IV	EXP VII	$1,2 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,0$	$18,4 \pm 0,2$	$14,8 \pm 0,7$	$49,0 \pm 3,8$	$53,0 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,5$	$5,9$
		$\pm 0,3$	$\pm 0,4$	$8,9 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,2$	$8,5 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,0$	

$2,6 \pm 0,4$ $2,4 \pm 0,0$

$2,0 \pm 0,2$ $5,1 \pm 0,0$

$2,7 \pm 0,7$ **$1,0 \pm 0,0$**

Considerando-se os efeitos da adição de EPA e DHA ao séston, foi observado que no Experimento I, a concentração de 25.10^3 microcápsulas ml^{-1} adicionada causou efeitos tóxicos em *C. richardi* em todas as réplicas. Redução da biomassa (não significante) (Fig. 26) e uma taxa de crescimento significativamente baixa ($P = 0,025$) (Fig. 27) foram observadas no tratamento do séston adicionado de microcápsulas de EPA/DHA.

b
i
o
m

UNIVERSITY

1

1

1

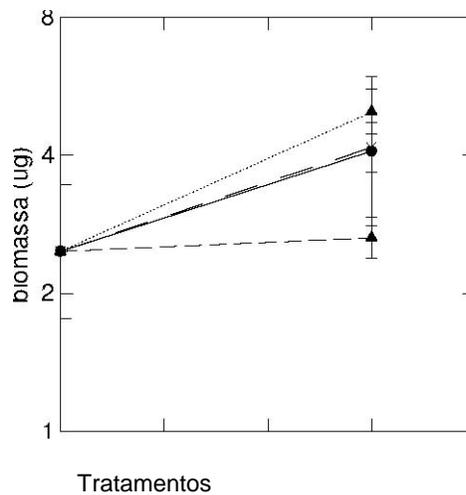
(u
g)

Figura 26. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento I. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de

-0,4

Figura 27. Taxas de crescimento de *C. richardi* nos experimentos I a III. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significantes (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

No Experimento II, a concentração das microcápsulas de EPA/DHA foi reduzida pela metade, mas efeitos tóxicos ainda foram observados neste tratamento. Os animais

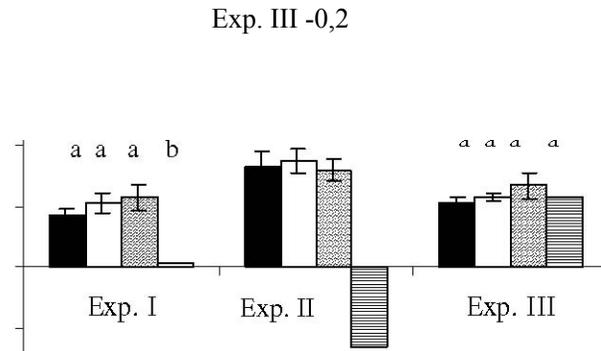


01234 dias

Seston + Sce seston seston + MP seston + MV

PUFA.

séston
séston + Sce
séston + MV
0,6
séston + MP
0,4
aaa b
aaa b
0,2
0
Exp. I Exp. II



perderam peso, apresentando taxa de crescimento ($P = 0,000$) (Fig. 27) e biomassa ($P = 0,034$) (Fig. 28) significativamente menores.

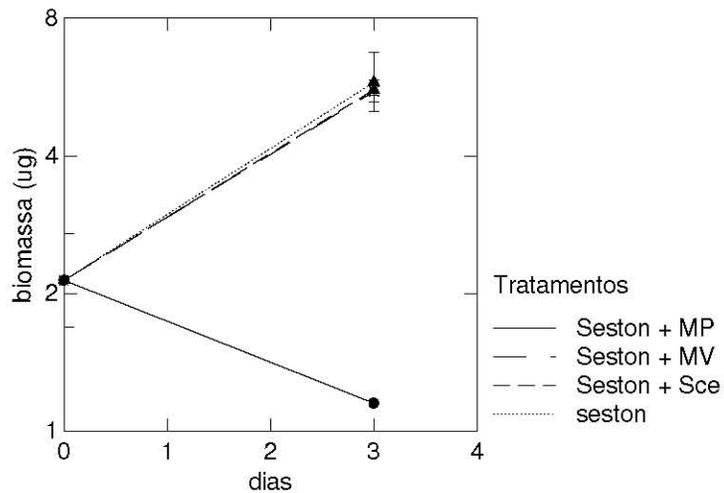


Figura 28. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento II. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

Já no Experimento III, a concentração foi reduzida para $10 \cdot 10^2$ microcápsulas ml^{-1} e nenhum efeito tóxico foi observado. A taxa de crescimento (Fig. 27) e a biomassa (Fig. 29) foram semelhantes entre os tratamentos, indicando que EPA e DHA não tiveram influência sobre o crescimento de *C. richardi*.

Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston

01234 dias

PUFA.

e

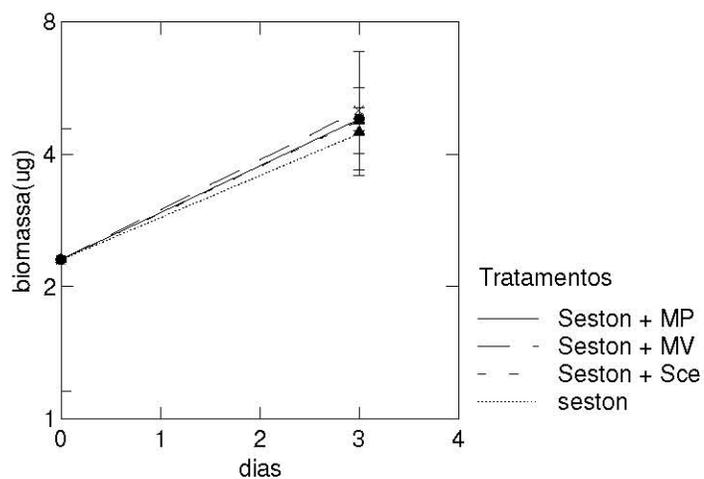


Figura 29. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento III. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

No experimento IV também não houve indicação de limitação de EPA e DHA no séston, uma vez que *C. richardi* e *D. gessneri* não apresentaram diferença significativa no crescimento em biomassa entre os tratamentos utilizados nos experimentos (Figs. 30 e 31).

Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston

01234 dias

PUFA.

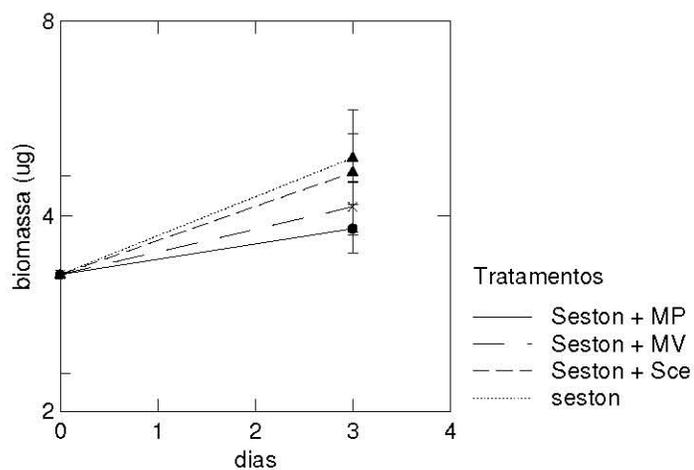


Figura 30. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento IV. Resultados expressos como média \pm erro padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

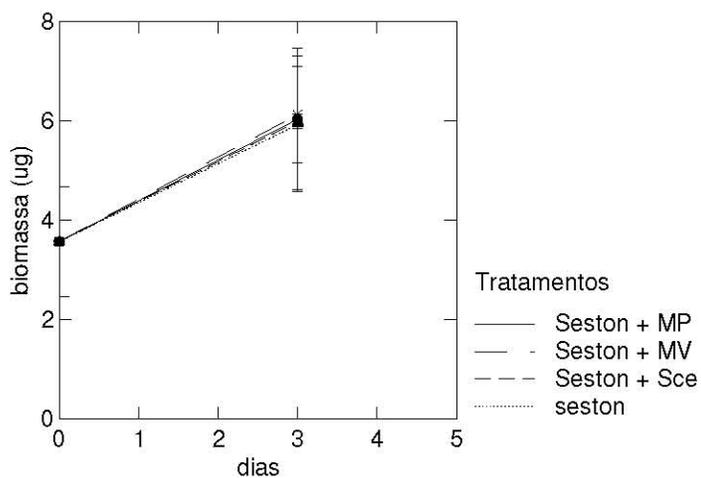
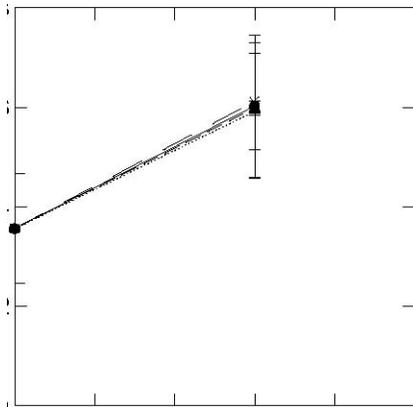


Figura 31. Crescimento em biomassa de *D. gesssnei* nos tratamentos no Experimento IV. Resultados expressos como média \pm erro padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston

01234 dias



Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston
12345 dias
de PUFA.

As taxas de crescimento (g) de *C. richardi* e *D. gessneri* também não diferiram estatisticamente entre os tratamentos no Experimento IV (Fig. 32).

Taxa de crescimento

0,2 0,16 0,12 0,08 0,04

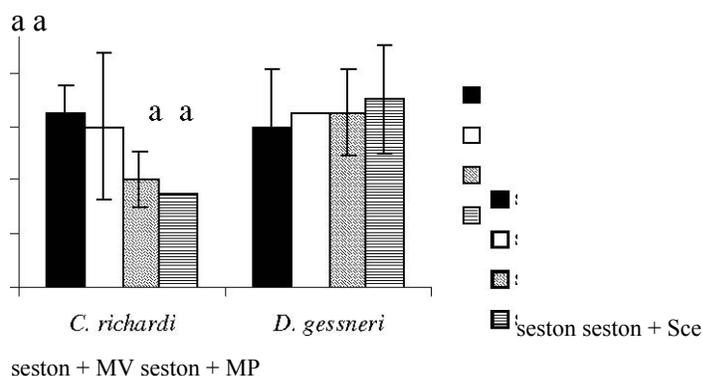
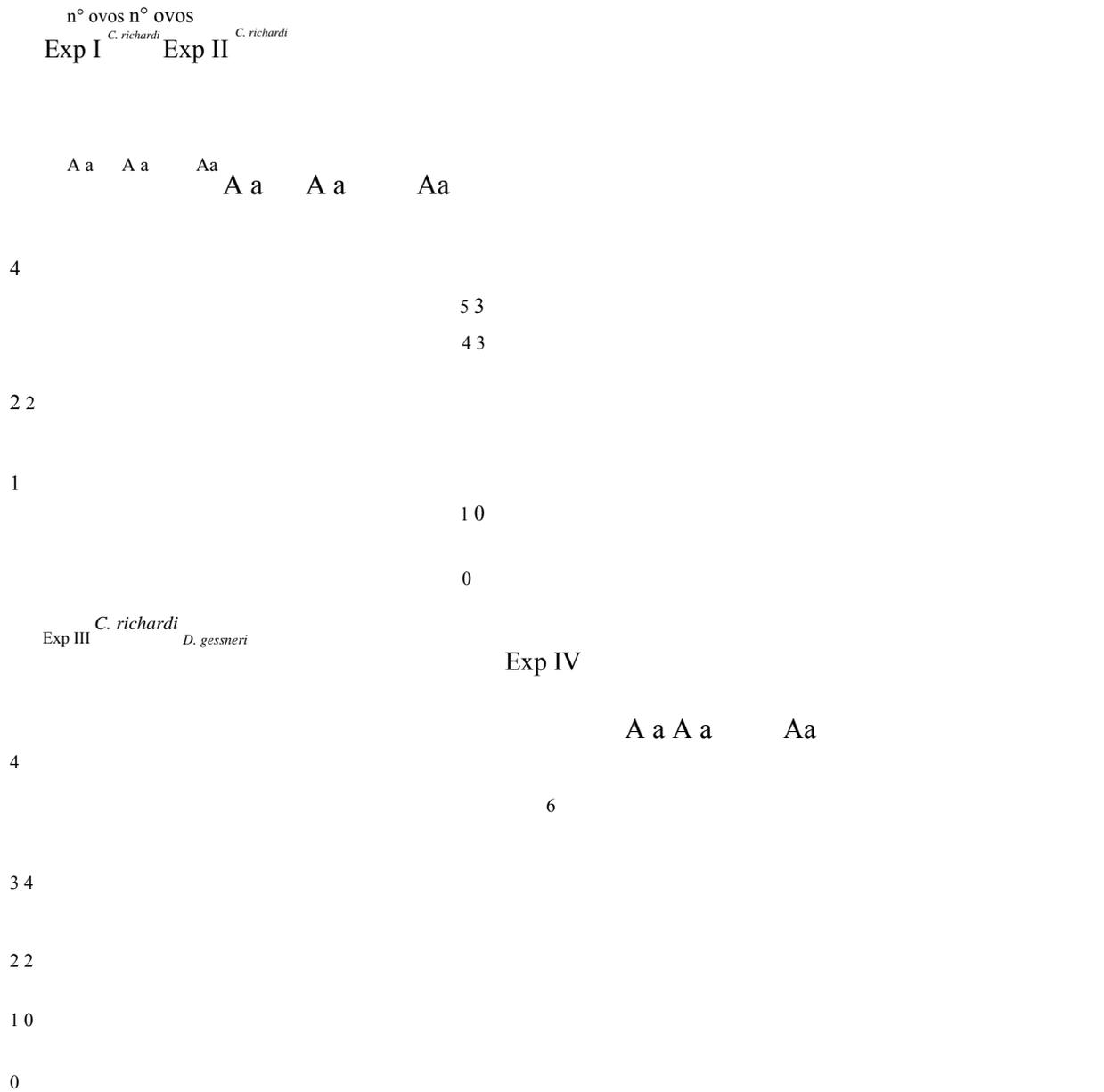


Figura 32. Taxas de crescimento de *C. richardi* e *D. gessneri* no experimento IV. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

Com relação à reprodução, não houve diferença significativa na fecundidade de *C. richardi* entre os tratamentos no Experimento I, enquanto o tamanho da ninhada foi significativamente menor no tratamento de séston adicionado de PUFA comparado com séston adicionado de *S. spinosus* ou de microcápsulas vazias ($P = 0,044$ e $P = 0,026$, respectivamente) (Fig. 33). No Experimento II, *C. richardi* não reproduziu no tratamento séston enriquecido com PUFA, provavelmente devido à toxicidade gerada pelo excesso de ácidos graxos e nenhuma diferença significativa foi encontrada na fecundidade ou no tamanho da ninhada entre os outros tratamentos. No Experimento III, *C. richardi* reproduziu em todos os tratamentos, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada na fecundidade ou no

tamanho da ninhada. Durante o experimento IV, *C. richardi* apresentou baixa produção de ovos por réplica nos tratamentos utilizados neste experimento, inviabilizando o tratamento estatístico. *D. gessneri* não produziu ovos no tratamento com séston sem adições e também não houve diferença significativa entre os outros tratamentos onde a espécie reproduziu normalmente (Fig. 33).



disponível era suficiente.

8
b
i
o
m

)

R

Uuimassa (uu)

)

:



)

R

unclassified (U)

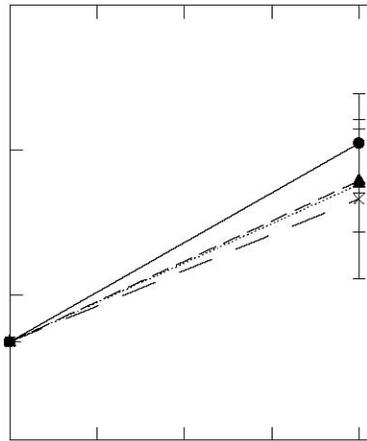
)

:

]

(u
g)
4
2
1

Figura 34. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento V. Resultados expressos como média \pm erro padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

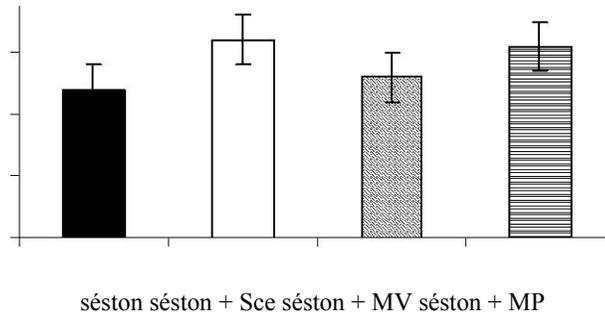


012345 dias

a a a a

taxa de crescimento (g)

0,4 0,3 0,2 0,1 0



Tratamentos

Séston Séston + MP Séston + MV Séston + Sce

Figura 35. Taxas de crescimento de *C. richardi* no Experimento V. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

C. richardi reproduziu em todos os tratamentos, mas nenhuma diferença

significativa foi encontrada na fecundidade ou no tamanho da ninhada (Fig. 36).

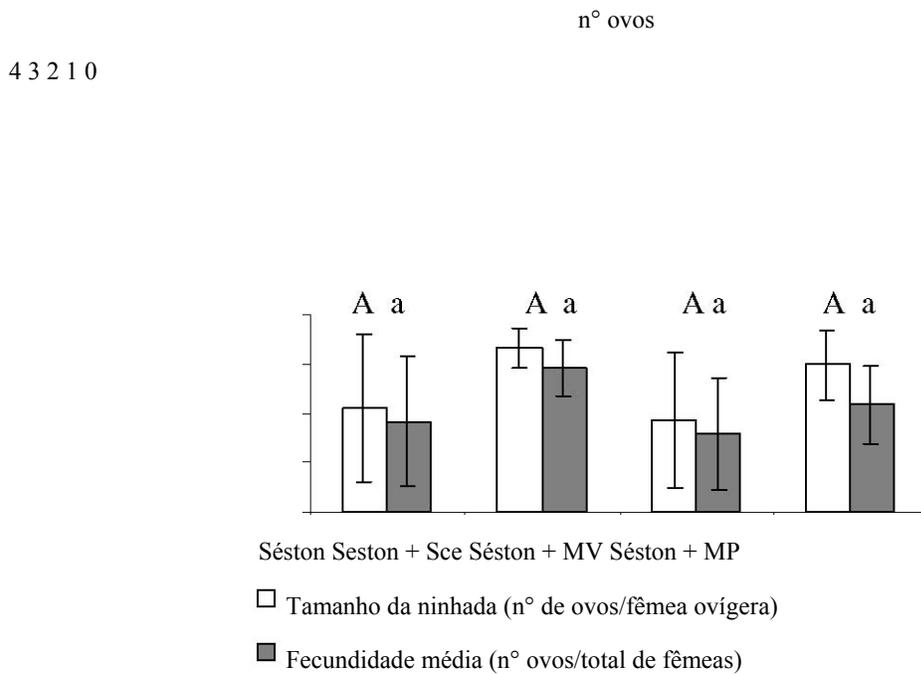


Figura 36. Tamanho da ninhada e fecundidade média de *C. richardi* no Experimento V. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística

(Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

D. ambigua e *C. richardi* também não apresentaram diferença significativa no crescimento em biomassa comparando os tratamentos do séston sem adições e do séston adicionado de ácidos linoléico ou linolênico no Experimento VI (Figs. 37 e 38).

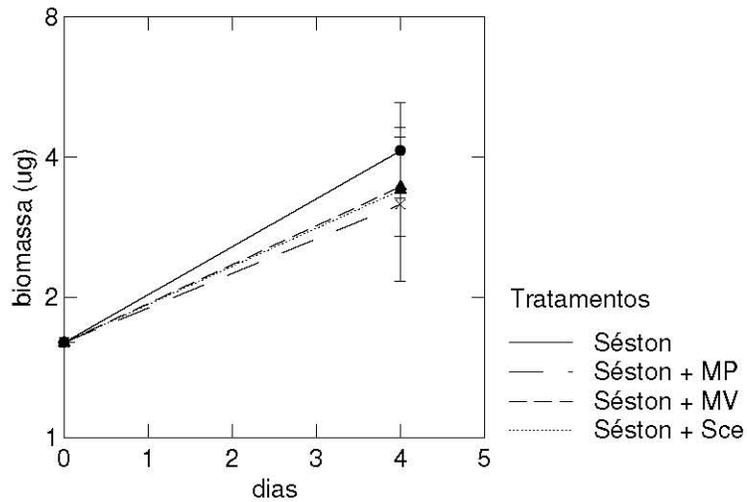


Figura 37. Crescimento em biomassa de *D. ambigua* nos tratamentos no Experimento VI. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

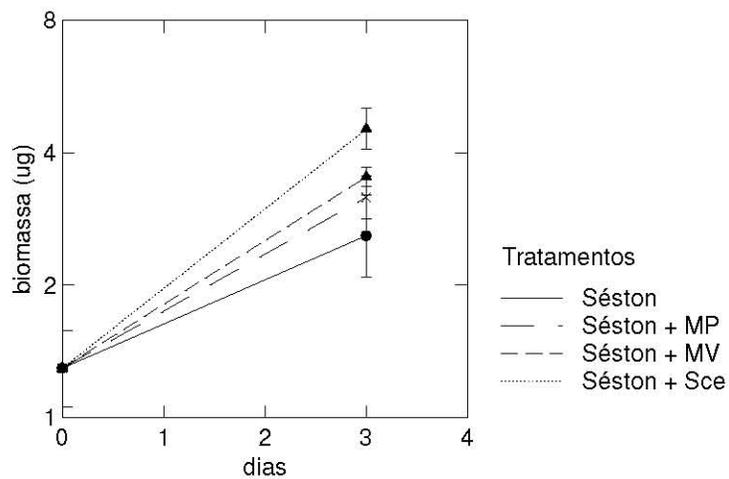
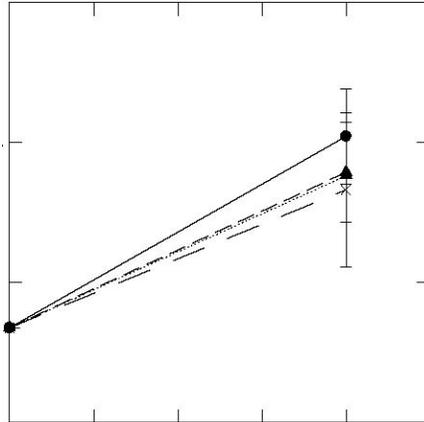


Figura 38. Crescimento em biomassa de *C. richardi* nos tratamentos no Experimento VI. Resultados expressos como média \pm erro padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.



Tratamentos

Séston Séston + MP Séston + MV Séston + Sce
012345 dias

Figura 37.

em biomassa de *D. ambigua* nos tratamentos no Experimento VI.

Resultados

expressos

média ± desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP

=

Tratamentos

Séston Séston + MP Séston + MV Séston + Sce

01234 dias

Com relação à taxa de crescimento, *C. richardi* apresentou valores significativamente maiores no séston adicionado de *S. spinosus* comparado ao séston adicionado de microcápsulas vazias ($P = 0,024$), de ácidos linoléico e linolênico ($P = 0,008$) e ao séston sem adições ($P = 0,001$) (Fig. 39). *D. ambigua* não apresentou diferença significativa na taxa de crescimento comparando-se os tratamentos.

Taxa de crescimento

0,6 0,4 0,2 0

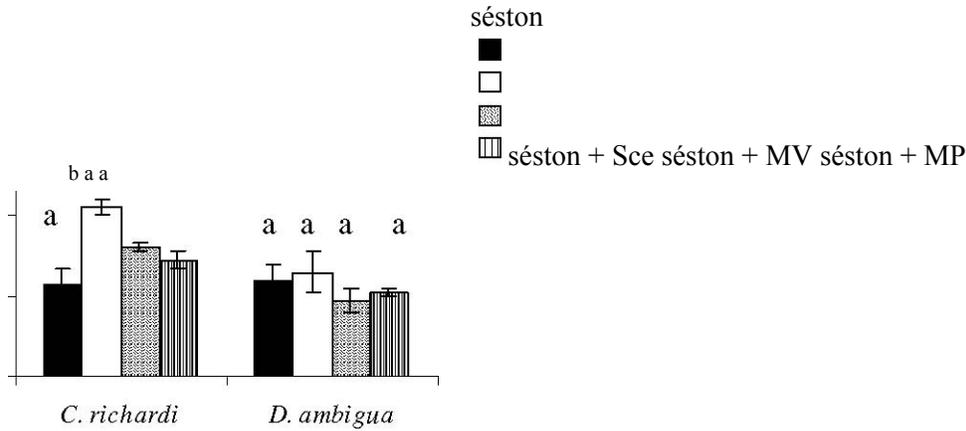
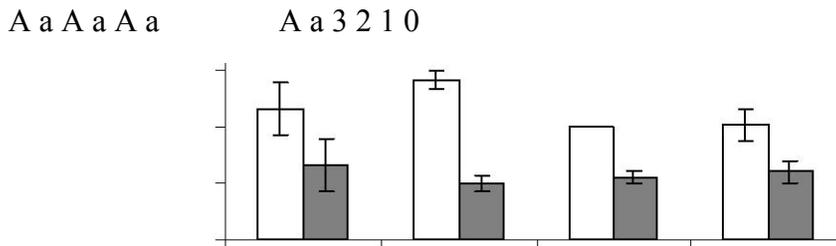


Figura 39. Taxas de crescimento de *C. richardi* e *D. ambigua* no experimento VI. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significantes (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

O tamanho da ninhada de *D. ambigua* e *C. richardi* não foi significativamente diferente comparando-se os tratamentos utilizados no Experimento VI (Fig. 40). No entanto, a fecundidade média de *C. richardi* foi significativamente menor no séston sem adição quando comparada ao séston adicionado de *S. spinosus* ($P = 0,040$). *D. ambigua* não apresentou nenhuma diferença significativa na fecundidade média comparando-se os tratamentos utilizados.

D. ambigua

4



C. richardi

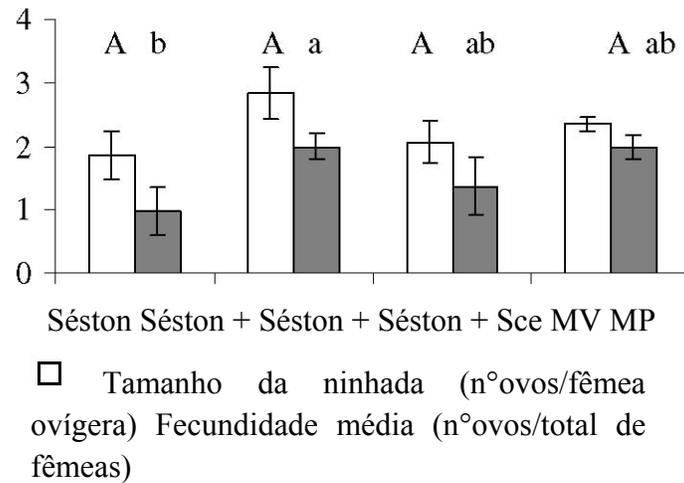


Figura 40. Tamanho da ninhada e fecundidade média de *D. ambigua* e *C. richardi* no Experimento VI. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

C. richardi não apresentou diferença significativa no crescimento em biomassa

comparando-se o séston sem adições ao séston adicionado de ácidos linoléico e linolênico

no Experimento VII (Fig. 41). Por outro lado, *D. gessneri* apresentou crescimento em

biomassa significativamente menor no tratamento com o séston sem adições com relação ao

séston adicionado de *S. spinosus* ($P = 0,013$), de microcápsulas de ácidos linoléico e linolênico ($P = 0,035$) e de microcápsulas vazias ($P = 0,003$) (Fig. 42).

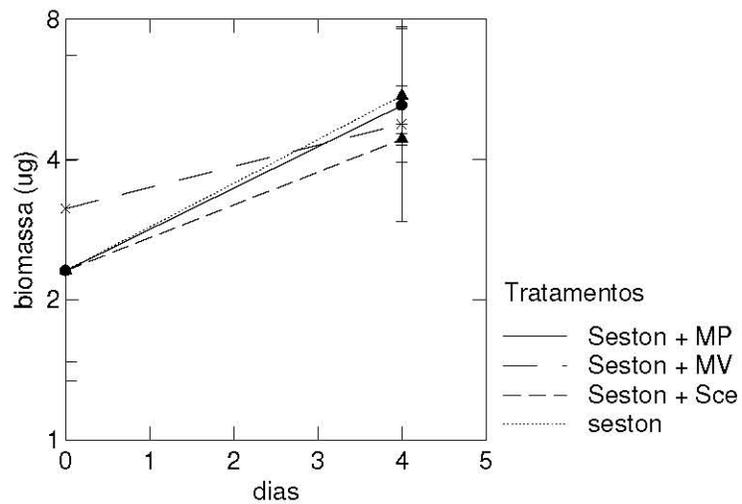
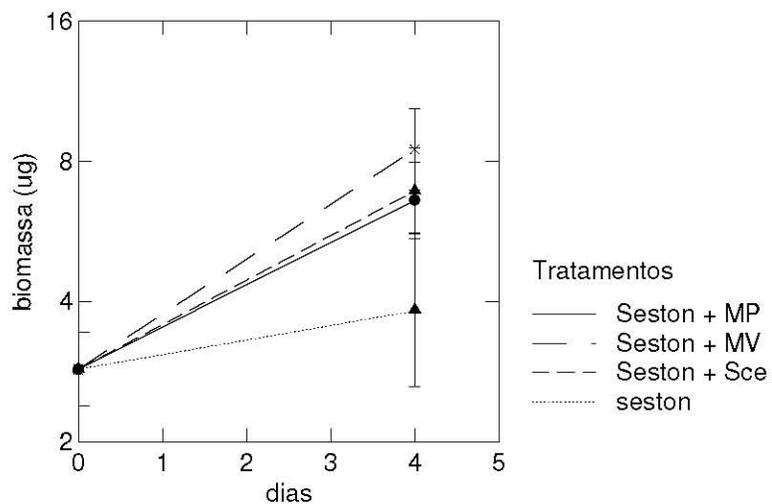
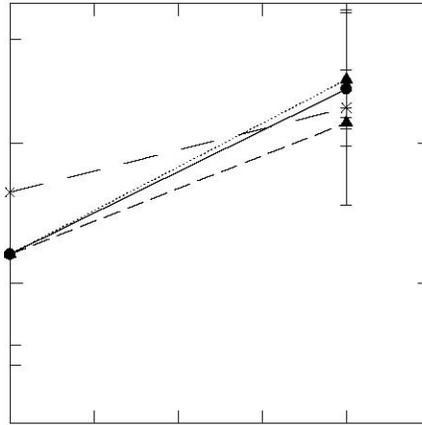


Figura 41. Crescimento em biomassa de *C. richardi* submetida aos tratamentos no Experimento VII. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.





Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston
012345 dias

Resultados

expressos

média ± desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP =

=

Tratamentos

Seston + MP Seston + MV Seston + Sce seston

012345 dias

Figura 42. Crescimento em biomassa de *D. gessneri* submetida aos tratamentos no Experimento

□ VII. Resultados expressos como média ± desvio padrão. MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

□ *C. richardi* não apresentou taxas de crescimento significativamente diferentes entre os tratamentos (Fig. 43), mas *D. gessneri* apresentou taxas significativamente maiores comparando-se o séston sem adições ao séston adicionado de *S. spinosus* ($P = 0,07$), de microcápsulas de ácidos linoléico e linolênico ($P = 0,013$) e de microcápsulas vazias ($P = 0,002$).

Taxa de crescimento

0,4 0,3 0,2 0,1 0

Figura 44. Tamanho da ninhada e fecundidade de *C. richardi* no Experimento VII. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$). MV = microcápsulas vazias, MP = microcápsulas de PUFA.

Composição do Fitoplâncton

Nos Experimentos I a III, Chlorophyceae foi a classe de alga predominante, enquanto no Experimento IV a composição do fitoplâncton apresentou-se distribuída entre as classes: Chlorophyceae, Cyanophyceae, Chrysophyceae e Cryptophyceae (Fig. 45).

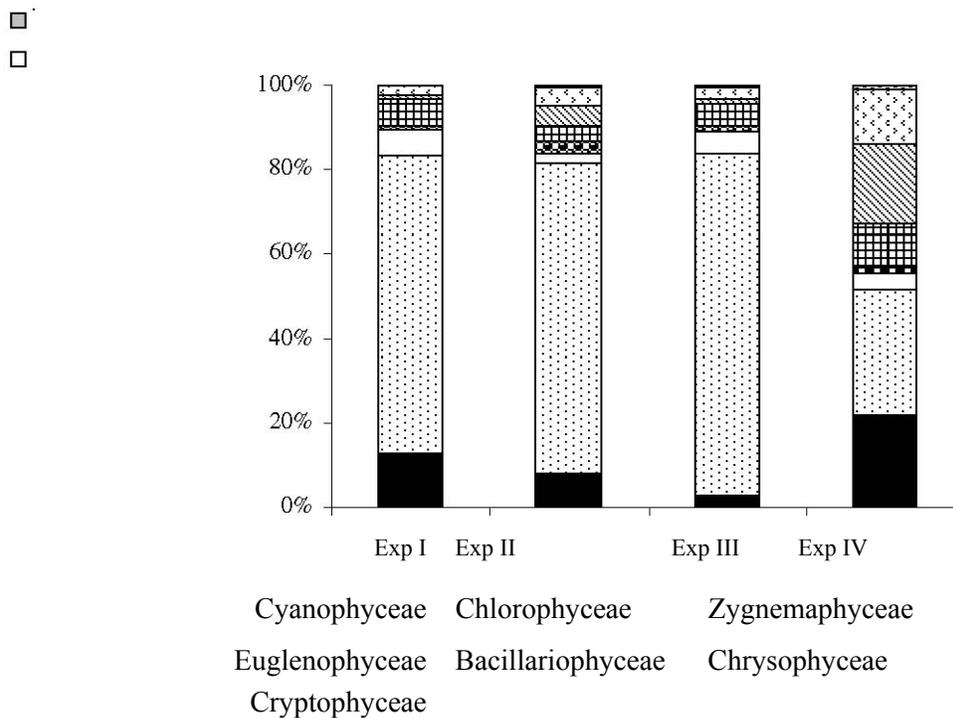


Figura 45. Composição relativa do fitoplâncton do séston, baseada na densidade, dos Experimentos I a IV.

Com relação às características morfológicas, no Experimento I metade das algas encontradas era microplanctônica, enquanto no Experimento II, as nanoplanctônicas eram maioria (86,3 %) (Tab. 33) Em ambos os experimentos, houve contribuição considerável de

algas filamentosas no microplâncton. No Experimento III, quase metade das algas encontrada era nanoplânctônica e no Experimento IV esse número subiu para 76%, sendo que destas, *ca.* de 30 % eram coloniais e apresentavam bainha de mucilagem.

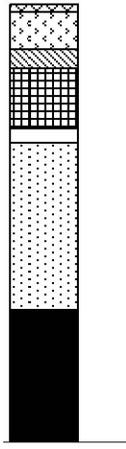
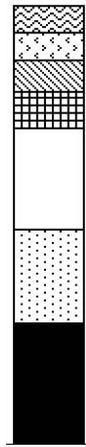
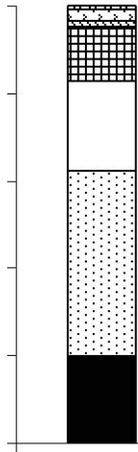
Tabela 33. Composição relativa, com base nas densidades, das frações do nano e microplâncton quanto às características das algas encontradas em cada fração do experimento de tabela de vida. ND = não detectada; Outras = algas sem ornamentações, com formas arredondadas, ovóides e filiformes.

Morfologia/Exp	Exp I ≤ 20 μm >20 μm	Exp II ≤ 20 μm >20 μm	Exp III ≤ 20 μm >20 μm	Exp IV ≤ 20 μm >20 μm
% cada fração	44,5 55,5 4,0 0,4	86,3 13,7 5,0 nd	48,0 52,0 5,0 nd	76,0 24,0 27,0 nd
Colonial/mucilagem	nd 4,7 nd nd nd	0,2 10,0 nd nd	1,0 4,5 nd 0,1 nd	nd nd 0,7 4,65
Espinhas Cenóbio	20,5 96,0 74,4	nd 35,0 94,8	2,0 94,0 93,4	nd 4,65 72,3 90,7
Filamentosa Outras		55,0		

Nos Experimentos V e VI, Chlorophyceae, Cyanophyceae e Zygnemaphyceae eram as classes mais abundantes (Fig. 46), assim como no Experimento VII (exceção de Zygnemaphyceae).

100%

80% 60% 40% 20% 0%



Exp V Exp VI Exp VII

-
-
- ▨
- ▩ Cyanophyceae

Chlorophyceae

Zygnemaphyceae Bacillariophyceae

Chrysophyceae Cryptophyceae

Dinophyceae

Figura 46. Composição relativa do fitoplâncton do séston, baseada na densidade, dos Experimentos V a VII.

A análise das características morfológicas revelou que nos Experimentos V e VI 52,6 % e 42,6 % das algas eram microplancônicas, sendo que houve contribuição considerável de algas filamentosas nesta fração (Tab. 34). No Experimento VII as algas nanoplancônicas predominaram (75,5 %), mas destas, quase metade era colonial e mucilagínosa.

Tabela 34. Composição relativa, com base nas densidades, das frações do nano e microplâncton quanto às características das algas encontradas em cada fração do experimento de tabela de vida. ND = não detectada; Outras = algas sem ornamentações, com formas arredondadas, ovóides e filiformes.

	Exp V $\leq 20 \mu\text{m}$ $>20 \mu\text{m}$	Exp VI $\leq 20 \mu\text{m}$ $>20 \mu\text{m}$	Exp VII $\leq 20 \mu\text{m}$ $>20 \mu\text{m}$
Morfologia/Exp			

% cada fração	47,4 52,6 5,0 6,5	57,3 42,7 14,0 9,5	75,5 25,5 37,0
Colonial/mucilagem	0,7 10,0 nd 0,5	0,3 1,4 nd nd nd	1,0 nd nd nd 4,0
Espinhos Cenóbio	nd 16,0 94,3 67,0	27,5 85,7 61,6	nd 8,0 63,0 61,5
Filamentosa Outras			

DISCUSSÃO

Nesse estudo, o crescimento e a reprodução de *Ceriodaphnia richardi* não sofreram incremento com adições dos ácidos graxos linoléico, linolênico, eicosapentaenóico (EPA) ou docosaheptaenóico (DHA), o mesmo ocorrendo para *Daphnia ambigua* alimentada com séston adicionado dos ácidos linoléico e linolênico. Aumento significativo do crescimento foi encontrado somente em *D. gessneri* com a adição dos ácidos linoléico e linolênico ao séston.

O conteúdo de ácidos graxos do séston, especialmente de PUFA, vem sendo apontado como um dos principais fatores controladores do crescimento do zooplâncton em lagos (Brett & Müller-Navarra, 1997), embora resultados contraditórios sejam reportados na literatura. Alguns autores encontraram alta correlação entre as taxas de crescimento de *Daphnia* e o conteúdo do ácido eicosapentaenóico (EPA -20:5 ω 3) do séston (Müller-Navarra, 1995; Park *et al.*, 2003) ou em misturas de algas enriquecidas com lipossomas suplementados com EPA (Ravet *et al.*, 2003). Por outro lado, outros autores não observaram correlação significativa entre as taxas de crescimento de *Daphnia* alimentadas com séston suplementado com EPA ou DHA. No entanto, eles encontraram uma alta correlação das taxas de crescimento de *Daphnia* com o ácido linoléico (Wacker & von Elert, 2001; Nadezhda *et al.*, 2003). No entanto, Goulden *et al.* (1998) não encontraram aumento no crescimento e na reprodução de três

espécies de *Daphnia* alimentadas com séston adicionado de microcápsulas de gelatina-acácia contendo os ácidos: palmítico, linoléico e linolênico, mas encontraram uma resposta positiva no crescimento de *Daphnia* quando alimentada com o séston adicionado de clorofíceas e de proteína (caseína).

Weers & Gulati (1997) afirmam que a presença de EPA no alimento não é essencial para o crescimento e reprodução de *Daphnia*, pois animais cultivados somente com *Scenedesmus*, que não contém EPA, apresentaram um desenvolvimento normal. Elendt (1990) utilizou microcápsulas contendo lipídeos (EPA 6% e DHA 2,6 %), proteína e uma mistura de minerais e vitaminas para suplementar *Scenedesmus* e alimentar *Daphnia magna*. Esse autor não encontrou aumento no crescimento e concluiu que isso ocorreu pela dificuldade dos animais em ingerir as microcápsulas, às altas taxas de sedimentação e a danificação do tubo digestivo dos animais causados pela presença das microcápsulas.

Uma grande variedade de métodos usados em aquicultura marinha (Coutteau & Sorgeloos, 1997) tem sido usada para o estudo da limitação bioquímica no zooplâncton. Um deles é o uso de emulsões complexas de lipídeos (DeMott & Müller-Navarra, 1997; Sundbom & Vrede, 1997; Weers & Gulati, 1997; Boersma *et al*, 2001, Park *et al*, 2003). Outros métodos utilizam microcápsulas de lipídeos formadas com goma arábica (Goulden *et al*, 1998) ou com BSA (do inglês “Bovine Serum Albumin”) (von Elert & Wolffrom, 2001) para liberar tais compostos para o zooplâncton. Os lipossomas têm sido usados extensivamente na indústria química e farmacêutica para liberação de compostos e, mais recentemente, foi aplicado em experimentos com zooplâncton (Ravet *et al.*, 2003).

Neste estudo, optou-se por se usar ácidos graxos encapsulados com goma arábica para suplementar o séston por se tratar de um método relativamente simples (após a adequação do

método) e pelo baixo custo. Outro motivo para esta escolha foi que emulsões de ácidos graxos já tinham sido usadas em experimentos anteriores realizados no Lago Monte Alegre (Ferrão-Filho *et al.*, 2003). Ressalta-se, no entanto, que os experimentos aqui apresentados refletem o efeito da adição ou não de ácidos graxos ao séston sobre o crescimento e reprodução dos cladóceros e, por motivos técnicos e de tempo de execução, as quantidades de ácidos graxos adicionadas ao séston não foram avaliadas. Segundo Langdon & Waldock (1980), o método de encapsulamento utilizado não interfere na composição de ácidos graxos e, dessa forma, devem ter sido liberados para os cladóceros na sua forma original.

As microcápsulas de goma arábica utilizadas neste estudo não causaram danos ao tubo digestivo de *C. richardi*, *D. ambigua* e *D. gessneri*, pois o tratamento com as microcápsulas vazias proporcionou boas taxas de crescimento e produção de ovos em todos os experimentos. Esse tratamento foi incluído porque a gelatina utilizada no preparo das microcápsulas poderia incrementar a quantidade de proteína oferecida aos cladóceros durante os experimentos e, dessa forma, invalidaria o objetivo original do estudo que era testar a importância dos ácidos graxos na nutrição dos cladóceros do Lago Monte Alegre.

Com relação à ingestão destas microcápsulas pelos cladóceros, algumas evidências sugerem que estas foram realmente ingeridas e que os ácidos graxos encapsulados estavam disponíveis para os animais. Uma delas foi o aumento significativo de ácido linolênico encontrado nos tecidos corporais de *C. richardi* alimentada com o séston enriquecido com ácidos (Experimento VII). Outra razão foi a inibição do crescimento e da reprodução de *C. richardi* nos Experimentos I e II com adição de microcápsulas de EPA/DHA em concentrações acima de $10 \cdot 10^2$ microcápsulas, enquanto que as microcápsulas vazias adicionadas na mesma quantidade não causaram efeitos tóxicos.

Conforme citado anteriormente, *D. gessneri* apresentou crescimento significativamente

maior com a adição dos ácidos linoléico e linolênico ao séston no Experimento VII, mas o mesmo foi encontrado com a adição de *S. spinosus* e das microcápsulas vazias, indicando que não só os ácidos graxos poderiam ser os fatores limitantes do séston nesse período.

Segundo Wacker & von Elert (2001), a limitação por PUFA só pode ser considerada verdadeira se o séston não apresentar, primeiramente, limitação por P, por baixa transferência de carbono para o zooplâncton (causada, por exemplo, pela resistência à digestão das partículas alimentares) ou por quaisquer outros fatores que poderiam limitar fortemente o séston.

Considerando o Experimento VII, os valores da concentração de carbono orgânico particulado encontrado ($> 0,30 \text{ mg C L}^{-1}$) não indicaram limitação quantitativa do séston em termos de carbono. Qualitativamente, o fitoplâncton era composto principalmente por algas nanoplancônicas, consideradas um bom alimento para os cladóceros do Lago Monte Alegre (Fileto *et al*, 2004). No entanto, metade destas eram algas coloniais e continham bainhas de mucilagem, o que pode ter contribuído para o menor crescimento de *D. gessneri*. A adição de *S. spinosus* de tamanho adequado (14 μm), forma arredondada e sem ornamentações pode ter melhorado qualitativamente as condições do séston neste caso.

Com relação o conteúdo mineral do séston as razões C:N revelaram também não haver limitação de N ao longo de todos os experimentos. No entanto, ao final do experimento VII, encontrou-se razão C:P = 617 molar indicativa de possível limitação de P no ambiente, que poderia ter influenciado principalmente a reprodução de *D. gessneri*, uma vez que esta espécie produziu poucos ovos até o final dos experimentos, inviabilizando até mesmo o cálculo da fecundidade média e do tamanho da ninhada. Assim, é possível que o séston estivesse limitado primeiramente por P e a adição de *S. spinosus* e dos ácidos graxos ao séston melhorou as condições deste em termos qualitativos, propiciando maior crescimento de *D. gessneri* em relação ao séston sem adições.

Ainda considerando o Experimento VII, observou-se que *C. richardi* não foi afetada pelas algas coloniais/mucilaginosas no mesmo experimento, desenvolvendo-se bem tanto no séston

sem adições como naquele adicionado de alga ou PUFA. Uma explicação para isso pode ser o menor tamanho de *C. richardi* (0,75 mm) em relação à

D. gessneri (1,16 mm). Alguns autores sugerem que cladóceros menores podem se beneficiar da inabilidade de coletar e ingerir grandes filamentos ou colônias de cianobactérias tóxicas (Fulton & Paerl, 1987). Além do mais, quanto menor o tamanho limite de algas ingeridas por um cladóceros, menos estes são afetados por algas indesejáveis e sofrem menores alterações na taxa de alimentação, crescimento e fecundidade (Gliwicz, 1980).

Em outras ocasiões, como no início dos Experimentos III e IV, e durante o Experimento VI, as razões C:P do séston também excederam 300 molar, indicando uma possível limitação de P no lago. No entanto, mesmo nessas condições, os cladóceros foram capazes de manter boas taxas de crescimento quando alimentada com o séston puro e com as adições. Estudos realizados por A. S. Ferrão-Filho & M. S. Arcifa (dados não publicados) encontraram que mesmo em situação de limitação de P no verão, a adição de P ao séston não incrementou o crescimento de cladóceros do Lago Monte Alegre. No Capítulo 1 deste estudo, a adição de N ou P ao séston provocou aumento no crescimento de *D. gessneri* somente em duas ocasiões, sendo que o séston não se apresentava limitado por nutrientes, segundo as razões C:N e C:P calculadas.

Sterner & Schulz (1998) sugerem que a limitação de ácidos graxos pode ser importante em situações onde as razões C:P são baixas e que a limitação de P é mais importante que a de ácidos graxos em situações de altas razões C:P. Os autores também concluíram que a limitação de P pode mudar para limitação de ácidos graxos no ambiente, quando ocorre a dominância de cianobactérias ricas em P. Nesse estudo, porém, não foi encontrada evidência de limitação de PUFA em situações de razões C:P baixas ou moderadas. No entanto, já foi encontrado que os PUFA eram importantes para os cladóceros tropicais uma

vez que foi observado aumento do crescimento e do tamanho da ninhada quando PUFA foi misturado à clorofíceia *Scenedesmus spinosus* deficiente em nutriente (Ferrão-Filho *et al.*, 2003).

Contudo, no ambiente, o fitoplâncton é composto por diversas espécies e as dietas do zooplâncton são misturas complexas de fitoplâncton, protozoários, bactérias e detritos. É possível que exista uma hierarquia de fatores reguladores do crescimento dos cladóceros.

Outro aspecto observado neste estudo foi que concentrações acima de $10 \cdot 10^3$

microcápsulas de ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosaxehanóico (DHA) adicionadas ao

séston provocaram inibição do crescimento e da reprodução de *C. richardi*, devido provavelmente, a efeitos tóxicos causados por tais ácidos graxos. Alguns estudos indicam que existem ácidos graxos que apresentam efeitos tóxicos para organismos aquáticos (Harada *et al.*, 2000). Reinikainen *et al.* (2001) encontraram que o ácido linolênico era tóxico para *D. magna* numa concentração de 9 mg ml^{-1} . Apesar destes estudos não terem avaliado o papel dos ácidos graxos como componentes essenciais na dieta do zooplâncton eles sugerem que os ácidos graxos podem ser tóxicos para o zooplâncton. Por outro lado, em estudos que avaliaram a alimentação do zooplâncton, foi encontrada alta mortalidade de *D. magna* alimentada com *Scenedesmus obliquus* enriquecida com EPA (Becker & Boersma, 2003). No entanto, os neonatos de fêmeas que se alimentaram da alga enriquecida com EPA apresentaram maior taxa de crescimento em relação aos neonatos de fêmeas controle (sem adição de EPA).

As concentrações do total dos ácidos graxos analisados encontrados no séston ficaram abaixo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Comparando os experimentos onde estas avaliações foram realizadas, menores valores foram encontrados no experimento VII ($0,32 \mu\text{g L}^{-1}$) comparado ao IV ($0,90 \mu\text{g L}^{-1}$). Este fato pode ser explicado devido à menor densidade de fitoplâncton encontrada no

experimento VII (5.708 ind/ml) em relação ao experimento IV (10.215 ind/ml).

A concentração do total de ácidos graxos no séston analisados ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) neste estudo é bem menor quando comparada a dados de lagos de região temperada: até $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (Wacker & von Elert, 2001); 5 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Müller-Navarra, 1995). Entretanto, essa variação se deve em grande parte ao número de ácidos graxos avaliados em cada estudo. Neste estudo, nove ácidos graxos foram analisados, enquanto em regiões temperadas o número analisado foi maior, dificultado a comparação. Considerando as concentrações individuais de alguns ácidos graxos, os valores encontrados neste estudo também são menores comparados a regiões temperadas. Por exemplo, as concentrações de EPA e de ácido linolênico encontradas são até 100 vezes menores que as encontradas em regiões temperadas. A composição de ácidos graxos de populações naturais de algas pode mudar drasticamente em função de fatores ambientais, como temperatura, concentração de nutrientes e luz (Wainman, 1999). Dessa forma, essas diferenças encontradas nessas diferentes regiões podem ser explicadas pelas situações diversas a que as algas são submetidas no ambiente.

Dados encontrados na literatura sugerem que concentrações acima de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de EPA no séston não aumentaram as taxas de crescimento de *Daphnia* (Müller-Navarra, 1995). Outros autores encontraram valores menores $0,04$ e $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$ (Becker & Boersma, 2005). Dessa forma, pode-se dizer que as concentrações de ácidos graxos totais encontrados neste estudo não seriam limitantes para o zooplâncton e que a adição de ácido graxo extra não causou aumento nas taxas de crescimento e na reprodução de *C. richardi* e *D. gessneri*. Vale ressaltar que poucos dados quantitativos de ácidos graxos do séston são encontrados na literatura impossibilitando uma melhor comparação com os dados obtidos neste estudo.

Por outro lado, em termos de porcentagem relativa de ácidos graxos os dados são similares, sendo encontrados principalmente os ácidos: palmítico, mirístico, oléico, esteárico,

linolênico e somente traços de EPA no séston do Lago Monte Alegre e no de alguns lagos de regiões temperadas (Bycheck & Gushchina, 2001; Nadezhda *et al*, 2003).

Com relação aos ácidos graxos encontrados nos tecidos corporais de *D. gessneri* e *C. richardi* os resultados mostraram-se coerentes com dados da literatura. Os principais ácidos graxos encontrados nos cladóceros testados alimentados com o séston foram: palmítico (30 %), linolênico (20 %), linoléico (12 %), esteárico (13 %), oléico (11 %) e EPA (8 %). Bychek & Guschina (2001) encontraram resultados similares em *Daphnia galeata* coletada no reservatório Kuibyshevskoe (Rússia), exceto que as porcentagens dos ácidos linoléico e linolênico mostradas pelos autores foram menores, *ca.* de 2,5 % e 7 %, respectivamente. Por outro lado, a concentração de ácido linolênico encontrado nos tecidos corporais de *C. richardi* e *D. gessneri* neste estudo, alimentadas com *S. spinosus* (nos cutivos) ou com o séston (nos experimentos IV e VII) foram menores (até 3,5 vezes) que os encontrados, por exemplo, em *D. galeata* alimentada com *S. obliquus* (von Elert, 2002). Este resultado corrobora a idéia de que o zooplâncton de águas frias estoca mais ácidos graxos. Uma explicação seria que o zooplâncton tropical possui, provavelmente, uma demanda energética maior, uma vez que vive permanentemente em águas quentes (> 18°C) (Pinto-Coelho, 1997). O oxigênio é afetado pelo aumento da temperatura (Tóth & Drits, 1991) e, dessa forma, o zooplâncton de águas quentes aloca mais energia para o metabolismo basal e isto pode provocar menor estocagem de lipídeos (Pinto-Coelho, 1997). Por outro lado, a concentração de EPA encontrada nos cladóceros daqui foi maior (até 45 vezes) que dados encontrados na literatura (von Elert, 2002). Isso pode ser devido ao fato de que os animais, neste estudo, estavam na sua fase pré-reprodutiva quando foram analisados sendo que maior conteúdo de EPA nesta fase de desenvolvimento é esperada, uma vez que o EPA é estocado para a produção de ovos (Becker & Boersma, 2003). No entanto, na literatura consultada acima, o autor não forneceu detalhes da faixa etária dos animais analisados quanto ao conteúdo de ácidos graxos em seus experimentos.

Também se observou que o DHA não foi detectado nos cladóceros utilizados neste estudo, mesmo quando este ácido graxo foi adicionado ao séston. Segundo Elendt (1990), *D. magna* não é capaz de incorporar e sintetizar DHA. Além do mais, o conteúdo deste no séston apresentou correlação mais fraca em relação ao EPA em outro estudo (MüllerNavarra,

1995), indicando que o DHA não seria importante componente da dieta de cladóceros.

Os animais utilizados nos experimentos deste estudo foram cultivados com a clorofícea *S. spinosus*, cuja composição de ácidos graxos não apresenta nem traços de EPA e DHA (Ferrão-Filho *et al.*, 2003), mas possuem altas concentrações dos ácidos linoléico e linolênico, como é comum acontecer com muitas clorofíceas (Weers & Gulati, 1997). Os animais, por sua vez, são incapazes de sintetizar estes ácidos graxos ou os sintetizam em baixíssimas quantidades insuficientes para suprir suas demandas (Wacker and von Elert, 2001), retirando-os diretamente da dieta. Nos tecidos de *C. richardi* alimentada com *S. spinosus*, foram encontradas altas porcentagens do ácido linolênico (42 %) e somente traços de EPA, enquanto que o DHA não foi encontrado. O motivo pelo qual EPA foi encontrado se deve ao fato da habilidade de *Daphnia* em alongar e desnaturar o ácido linolênico, um precursor de EPA e não de DHA (Weers & Gulati, 1997). Também foi observado que o conteúdo de EPA nos animais de cultivo, alimentados com dieta monoalgal, foi menor (2 %) comparado aos animais que se alimentaram diretamente do séston (8 %). Esse dado é coerente, pois o séston continha vários grupos de algas, incluindo as Cyanophyceae, ricas em EPA.

A análise do fitoplâncton dos experimentos revelou predomínio de clorofíceas no séston da maioria dos experimentos. Outros grupos encontrados foram cianofíceas, crisofíceas, criptofíceas e diatomáceas. A porcentagem de ácido linolênico no fitoplâncton varia de 0 a 24 % do total de ácidos graxos na maioria dos táxons, enquanto a porcentagem de PUFA varia de 3 % a 60 % (Ahlgren *et al.*, 1992). Em termos de composição de ácidos graxos, as clorofíceas geralmente possuem altas concentrações de ácidos linoléico e linolênico, mas somente traços de EPA e DHA, enquanto as cianofíceas não possuem EPA e DHA, mas possuem concentrações de ácidos graxos totais maiores que qualquer outro grupo (Napolitano, 1999).

As diatomáceas, por sua vez, são ricas em EPA e DHA e possuem baixas concentrações de ácidos linoléico e linolênico. A composição de ácidos graxos de populações naturais de algas pode mudar drasticamente em função de fatores ambientais, como temperatura, concentração de nutrientes e luz (Wainman, 1999). Boëchat & Giani (2000) encontraram relação linear no aumento de lipídeos totais do séston da Lagoa da Pampulha (MG) com aumentos dos níveis de luminosidade, enquanto os carboidratos mostraram um padrão oposto. Uma possível explicação, dada pelos autores, é que em altos níveis de luminosidade, pode ocorrer inibição fotossintética nas células das algas, dessa forma, afetando os carboidratos. O mesmo não ocorre em lipídeos e proteínas. Os autores também observaram aumento de lipídeos e proteínas com o aumento da temperatura.

Em conclusão, não ocorreu limitação de ácidos graxos no ambiente durante este estudo, uma vez que não foi observado aumento de crescimento ou reprodução dos cladóceros usando microcápsulas de goma arábica contendo ácidos graxos para suplementar o séston.

Espécies de zooplâncton com modo de alimentação similar podem enfrentar diferentes limitações por diferentes características do alimento ao mesmo tempo, o que pode explicar a razão de se encontrar organismos tão diferentes no plâncton (Hutchinson, 1961). Conclui-se então que diferentes características do alimento são, provavelmente, importantes em diferentes épocas do ano e espera-se que em poucos lagos, se é que em algum, somente um fator seja responsável pelo controle da dinâmica do zooplâncton.

CONCLUSÕES

- 1) A adição de ácidos graxos polinsaturados ao séston do Lago Monte Alegre não aumentou o crescimento e a reprodução de *C. richardi*, *D. ambigua* e *D. gessneri*, indicando que o séston não estava limitado por tais componentes durante este estudo;
- 2) Altas concentrações de ácidos graxos podem causar efeitos tóxicos nos cladóceros, como perda de peso e diminuição das taxas de reprodução;

- 3) A análise do perfil de ácidos graxos do séston revelou que em termos de porcentagem os ácidos graxos encontrados aqui contribuem de modo muito semelhante ao encontrado em regiões temperadas. No entanto, em termos quantitativos, os valores encontrados neste estudo são menores;
- 4) *C. richardi* e *D. gessneri* apresentaram porcentagem de ácidos graxos similares quando comparado a espécies de região temperada. Em termos quantitativos, menores valores foram encontrados para os cladóceros deste estudo para alguns ácidos graxos e maiores valores para outros. Tais diferenças podem estar relacionadas com a faixa etária dos animais analisados e com o padrão de estocagem de lipídios em regiões tropicais e temperadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlgren, G; Gustafsson, I. B. & Boberg, M. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.*, 28: 37-50.
- Arcifa, M. S.; Meschiatti, A. J. & Gomes, E. A. T. 1990. Thermal regime and stability of a tropical shallow reservoir: Lake Monte Alegre, Brazil. *Rev. Hydrobiol. Trop*, 23: 271-281. Arcifa, M. S. ; Gomes, E. A. T. & Meschiatti, A. J. 1992. Composition and fluctuations of the zooplankton of a tropical Brazilian reservoir. *Arch. Hydrobiol.*, 123: 479-495. Arcifa, M. S.; Silva, L. H. S. & Silva, M. H. L. 1998. The planktonic community in a tropical Brazilian reservoir: composition, fluctuations and interactions. *Rev. Brasil. Biol.*, 58: 241-254.
- Becker, C. & Boersma, M. 2003. Resource quality effects on life histories of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 700-706.
- Becker, C. & Boersma, M. 2005. Differential effects of phosphorus and fatty acids on *Daphnia*

- magna* growth and reproduction. *Limnol. Oceanogr.*, 50: 388-397.
- Boëchat, I G. & Giani, A. 2000. Factors affecting biochemical composition of seston in an eutrophic reservoir (Pampulha Reservoir, Belo Horizonte, MG). *Rev. Brasil. Biol.*, 60: 63-71.
- Boersma, M.; Schöps, C. & McCauley, E. 2001. Nutritional quality of seston for the freshwater herbivore *Daphnia galeata x hyalina*: Biochemical versus mineral limitations? *Oecologia*, 129: 342-348.
- Brett, M. T. and Müller-Navarra, D. C. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwat. Biol.*, 38: 483-499.
- Bunioto, T. C. 2003. Variação temporal e distribuição horizontal do zooplâncton no Lago Monte Alegre e a influência do alimento e da temperatura sobre cladóceros. Dissertação de Mestrado, FFCLRP/USP. 96 p.
- Bycheck, E. A. & Guschina, I. A. 2001. The transfer of fatty acids in a freshwater planktonic foodweb of the Kuibyshevskoe reservoir (middle reaches of the Volga). *Hydrobiologia*, 442: 261-268.
- Coutteau, P & Sorgeloos, P. 1997. Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwat. Biol.*, 38: 501-512.
- DeMott, W. R. & Müller-Navarra, D. C. 1997. The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwat. Biol.*, 38: 649-664.
- Elendt, B. P. 1990. Nutritional quality of a microencapsulated diet for *Daphnia magna*. Effects on reproduction, fatty acid composition, and midgut ultrastructure. *Arch. Hydrobiol.*, 118: 461- 475.
- Ferrão-Filho, A. S.; Fileto, C.; Lopes, N. P. and Arcifa, M. S. 2003. Effects of essential fatty

- acids and N and P-limited algae on the growth rate of tropical cladocerans. *Freshwat. Biol.*, 48: 1-9.
- Fileto, C. 2001. O zooplâncton do Lago Monte Alegre: variação temporal e a influência das frações do fitoplâncton sobre o crescimento e reprodução de cladóceros. Dissertação de Mestrado. FFCLRP/USP. 100 p.
- Fileto C., Arcifa M. S., Ferrão-Filho A. S. and Silva, L. H. S. 2004. Influence of phytoplankton fractions on growth and reproduction of tropical cladocerans. *Aquat. Ecol.*, 38: 503-514.
- Fulton, R. S. & Paerl, H. W. 1987. Effects of colonial morphology on zooplankton utilization of algal resources during blue-green algal (*Microcystis aureginosa*) blooms. *Limnol. Oceanogr.*, 32: 634-644.
- Gliwicz, Z. M. 1980. Filtering rates, food size-selection, and feeding rates in cladocerans-Another aspect of interspecific competition in filter feeding cladocerans. In Kerfoot, W. C. (ed.) *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities* (pp 268-281). University Press of New England, Hanover.
- Goulden, C. E. & Henry, L. 1985. Lipid energy reserves and their role in Cladocera. In: Meyers, D. G. & Strickler, J. R. (eds). *Trophic interactions within Aquatic Ecosystems*. (pp 167-185). American Association for the Advancement of Science, Westview Press, Boulder.
- Goulden, C. E.; Henry, L & Berrigan, D. 1987. Egg size, postembryonic yolk, and survival ability. *Oecologia*, 72: 28-31.

- Goulden, C. E.; Moeller, R. E.; McNair, J. N. and Place, A. R. 1998. Lipid dietary dependencies in zooplankton. In: Arts, M. T. and Wainman, B. C. (eds.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. (pp: 91-108). Springer-Verlag, New York.
- Harada, K-I; Suomalainen, M.; Uchida, H.; Masui, H.; Ohmura, K.; Kiviranta, J.; Niku-Paavola, M-L & Ikemoto, T. 2000. Insecticidal compounds against mosquito larvae from *Oscillatoria agardhii* strain 27 *Environ. Toxicol.*, 15:114-119.
- Hessen, D. O. 1992. Nutrient element limitation of zooplankton production. *Am. Nat.*, 140: 799-814.
- Hutchinson, G. E. 1961. The paradox of the plankton. *Am. Nat.*, 95: 137-145. Jones, D. A., Kanazawa, A. and Ono, K. 1979. Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Panaeus japonicus*. *Mar. Biol.*, 54: 261-267.
- Langdon, C. J. and Waldo, M. J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* SPAT. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 61: 431-448.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Müller-Navarra, D. 1995. Evidence that highly unsaturated fatty acids limits *Daphnia* growth in nature. *Arch. Hydrobiol.*, 132: 297-307.
- Murphy, J. and Ridley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.
- Nadezhda, N. S.; Gladyshev, M. I.; Kalachova, G. S.; Kravchuk, E. S.; Dobovskaya, A. P. & Ivanova, E. A. 2003. Particulate fatty acids in two small Siberian reservoirs dominated by different groups of phytoplankton. *Freshwat. Biol.*, 48: 394-403.
- Napolitano, G. E. 1999. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: Arts MT and Bruce CW (ed.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. (pp 21-44), Springer-Verlag, New York.

- Park, S.; Müller-Navarra, D. C. & Goldman, C. R. 2003. Seston essential fatty acids and carbon to phosphorus ratios as predictors for *Daphnia pulex* dynamics in a large reservoir, Lake Beryessa. *Hydrobiologia*, 505: 171-178.
- Pinto-Coelho, R. M.; Amorim, M. K. & Costa, A. R. 1997. Temporal dynamics of lipids in the zooplankton of two tropical reservoirs of different trophic status. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 584-587.
- Ravet, J.L.; Brett, M.T. & Müller-Navarra, D. C. 2003. A test of the role of polyunsaturated fatty acids in phytoplankton food quality for *Daphnia* using liposome supplementation *Limnol. Oceanogr.* 48: 1938-1947.
- Reinikainen, M; Meriluoto, J. A. O.; Spoof, L. & Harada, K-I. 2001. The toxicities of a polyunsaturated fatty acid and a microcystin to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.*, 16: 444-448.
- Stanley-Samuelson, D. W. 1994. The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. *Am. Zool.*, 34: 589-598.
- Stemberger R. S. 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 721-724.
- Sterner, R. W. & Schulz, K. L. 1998. Nutrition: recent progress and a reality check. *Aquat. Ecol.*, 32: 261-279.
- Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. 2nd Ed. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, 167p.
- Sundbom, M & Vrede, T. 1997. Effects of fatty acids and phosphorus content of food on the growth, survival and reproduction of *Daphnia*. *Freshwat. Biol.*, 38: 665-674.
- Tóth, L. G. & Drits, A. V. 1991. Respiratory energy loss of zooplankton in Lake Balaton (Hungary) estimated by ETS-activity measurements. *Verh. Internat. Verein.*

- Limnol.*, 24: 993-996.
- Utermöhl, V. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 9: 1-38.
- Von Elert, E. & Wolffrom, T. 2001. Supplementation of cyanobacterial food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 1552-1558.
- Von Elert, E. 2002. Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 1764-1773.
- Wacker, A. & von Elert, E. 2001. Polyunsaturated fatty acids: evidence for nonsubstitutable biochemical resource in *Daphnia galeata*. *Ecology*, 82: 2507-2520.
- Wainman, B. C.; Smith, R. E. H.; Rai, H. & Furgal, J. A. 1999. Irradiance and lipid production in natural algal populations. In: Arts MT and Bruce CW (ed.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. (pp 45-70), Springer-Verlag, New York.
- Weers, P. M. M. & Gulati, R. D. 1997. Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 1584-1589.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)