

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Estudo da influência da epibiose do protozoário ciliado
Epistylis pygmaeum Ehrenberg, 1838 **sobre o**
zooplâncton

Luciana Hitomi Hayashi Martins

São Carlos
2018

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Estudo da influência da epibiose do protozoário ciliado
Epistylis pygmaeum Ehrenberg, 1838 sobre o
zooplâncton**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências (área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais).

Orientadora: Prof^a. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

Luciana Hitomi Hayashi Martins

São Carlos

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Luciana Hitomi Hayashi Martins, realizada em 06/03/2018:

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
UFSCar

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Profa. Dra. Carla Andréa Leite
UFSCar

Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan
USP

Profa. Dra. Adrislaine da Silva Mansano Dornfeld
USP

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e ao meu marido.

Muito obrigada!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mirna pela confiança, orientação, paciência, compreensão e amizade.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos, pela estrutura oferecida para a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, docentes, coordenação do curso e à secretaria do Programa por todo o apoio concedido.

Às pisciculturas Orlagos e São Matheus por permitirem as coletas, em especial, ao Leandro e Rafael Xavier pela amizade e por ajudarem nas coletas.

Aos amigos Rafael e Márcia Geraldo, pela amizade e por me socorrer nas análises estatísticas.

À Carla Leite, pelo auxílio, pelas risadas e principalmente pela amizade.

À minha família, meus pais Shimpei e Setsuco, meu irmão Marcos, meus tios Miyoko e Hiro pelo amor, carinho e por acreditarem em mim.

Ao Marcos, pelo carinho, amor, pela dedicação, amizade, confiança, paciência, por me socorrer e apoiar em todos os momentos.

À minha família São-Carlense: Pipa, Mara, Ana Cláudia e Giovanni pelo apoio, amor e carinho.

Aos amigos do laboratório: Caio, Juliana, Mayara e Renato pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Aos funcionários do DEBE pelos papos na hora do café.

A Deus, por trilhar o meu caminho, iluminar a minha vida e estar sempre me guiando e cuidando dos que eu amo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A epibiose é um tipo de interação facultativa entre duas espécies. O epibionte é o organismo que coloniza um substrato vivo durante a fase sésil do seu ciclo biológico, e o basibionte é o organismo que serve de base para a colonização. No plâncton de sistemas aquáticos numerosas espécies de ciliados epibiontes são frequentemente encontrados colonizando diversos organismos, entretanto a relação entre eles e os papéis ecológicos da epibiose são pouco conhecidos. O presente estudo visou avaliar a relação epibiótica na comunidade zooplânctônica, em especial, entre cladóceros e o protozoário ciliado peritricado *Epistylis pygmaeum* Ehrenberg, 1838, em um ambiente eutrófico raso, reservatório do Monjolinho, no município de São Carlos - SP, Brasil. A presença de epibiontes no reservatório foi monitorada mensalmente durante o período de novembro de 2015 a novembro de 2017. Durante o estudo, foi observada a ocorrência e dominância de uma espécie de epibionte (*E. pygmaeum*) apenas em dois períodos: entre os meses de julho/ agosto de 2016 e agosto/setembro/outubro de 2017. Nesses períodos, amostras foram coletadas utilizando-se uma rede de plâncton e trazidas para o laboratório onde as populações foram identificadas e os experimentos de sobrevivência do basibionte, sítio de localização do epibionte, seletividade de hospedeiros, taxa de desprendimento e colonização e bacterivoria foram realizados. *E. pygmaeum* mostrou preferência por cladóceros, especialmente por espécies do gênero *Daphnia*, e saco ovífero de copépodos. Também mostrou preferência por determinados sítios de localização/colonização, sendo a região dorsal inferior preferida às outras regiões do corpo dos cladóceros. O protozoário apresentou capacidade de se desprender rapidamente do seu hospedeiro e se transformar da forma sésil para a livre-natante (telotróquia) em tempo médio de 30 minutos. No que diz respeito à influência da epibiose na sobrevivência do hospedeiro, constatamos que ela afeta de forma negativa e significativa a sobrevivência do hospedeiro. Em relação ao potencial bacterívoro, nas três espécies de basibionte testadas *Bosminopsis deitersi* Richard, 1895, *Daphnia ambigua* Scourfield, 1947 e *Moina micrura* Kurz, 1874 constatamos uma diminuição no consumo de bactérias por parte de cladóceros carregando epibiontes quando comparado com o consumo de bactérias realizado por cladóceros sem a presença do epibionte em sua carapaça. Já para o protozoário, a relação foi vantajosa pois o seu consumo de bactéria foi maior em sua forma epibionte quando comparada à sua forma livre-natante. A epibiose, para o protozoário, embora envolva gasto energético e suposta susceptibilidade à predação, confere benefícios. Já para o hospedeiro, a relação é desfavorável e o mesmo acaba sendo prejudicado, tanto no que diz respeito à alimentação, quanto à natação, podendo afetar também a sua sobrevivência, principalmente na presença de predadores ou na ocorrência de competição.

Palavras-chave: epibionte, protozoário, cladóceros, seletividade, bacterivoria.

ABSTRACT

Epibiosis is a type of facultative interaction between two species. The epibiont is the organism that colonizes a living substrate during the sessile stage of their life cycle, and the basibiont is the organism that serves as the basis for colonization. In the plankton of aquatic systems numerous epibiont ciliate species are often found colonizing various organisms, however the relationship between them and the ecological roles of epibiosis are poorly understood. The present study aimed to evaluate the epibiotic relationship in the zooplankton community, especially between cladocerans and the ciliate protozoan *Epistylis pygmaeum* Ehrenberg, 1838, in a shallow eutrophic environment, in Monjolinho reservoir, in the city of São Carlos-SP, Brasil. The presence of epibionts in the reservoir was monitored from november 2015 to november 2017. During the study, the occurrence and dominance of a species of epibiont (*E. pygmaeum*) was observed only in two periods: between july / august 2016 and august / september / october 2017. The samples were collected in horizontal trawls in the water column, using a mesh plankton net and brought to the laboratory where the populations were identified. After identification, basibiont survival experiments, epibiont localization site, host selectivity, rate of detachment and colonization and bacterivory were performed. *E. pygmaeum* showed preference for cladocerans, especially the genus *Daphnia*, and copepod ovine sac. It also showed preference for certain sites of colonization, the dorsal region being preferred to the other regions of the cladocerans' body. The protozoan was able to detach itself quickly from its host and transform from the sessile form to the free natant form (telotroquia) in an average time of 30 minutes. In relation to the influence of epibiosis on host survival we found that it affects adversely and significantly the survival of the host. In relation to the bacterivorous potential, in the three basibionte species tested *Bosminopsis deitersi* Richard, 1895, *Daphnia ambigua* Scourfield, 1947 and *Moina micrura* Kurz, 1874 we noticed a decrease in the consumption of bacteria by cladocerans carrying epibionts when compared to the consumption of bacteria performed by cladocerans without the presence of epibiont in their carapaces. For the protozoan, the relation seems to be advantageous because its bacterial consumption was greater in its epibionte form when compared to its free natante form. Epibiosis, for the protozoan, although involving energy expenditure and supposed susceptibility to predation, confers benefits. For the host, a relationship is unfavorable and it ends up being impaired, both with respect to food and swimming, and may also affect its survival, especially in the presence of predators or in the occurrence of competition.

Keywords: epibiont, protozoan, cladoceran, selectivity, bacterivory.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Densidade das espécies zooplanctônicas (rotíferos, cladóceros e copépodos) encontrados no reservatório do Monjolinho, nos meses de agosto de 2016 e agosto de 2017.	46
Tabela 2. Lista dos taxa de rotíferos encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, famílias e hábitos alimentares.....	47
Tabela 3. Lista dos taxa de cladóceros encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, famílias e hábitos alimentares.....	48
Tabela 4. Lista dos taxa de copépodes encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, família e hábitos alimentares.....	49
Tabela 5. Abundância de cada grupo zooplanctônico e a proporção de infestação por epibionte observada em agosto de 2016 e agosto de 2017 no reservatório do Monjolinho.	50
Tabela 6. Modificações do zoóide sésil de <i>E. pygmaeum</i> na transformação em telotróquio no tempo (min).....	60

Lista de Tabelas do Apêndice B

Tabela 1. Distribuição dos protozoários epibiontes (<i>E. pygmaeum</i>) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie <i>B. deitersi</i>	111
Tabela 2. Distribuição dos protozoários epibiontes (<i>E. pygmaeum</i>) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie <i>D. ambigua</i>	111
Tabela 3. Distribuição dos protozoários epibiontes (<i>E. pygmaeum</i>) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie <i>M. micrura</i>	111
Tabela 4. Número de sobreviventes durante os cinco dias de experimentos para a espécie de cladóceros <i>D. ambigua</i> com e sem epibiontes aderidos na carapaça.....	112
Tabela 5. Número de sobreviventes durante os cinco dias de experimentos para a espécie de cladóceros <i>B. deitersi</i> com e sem epibiontes aderidos na carapaça.....	112
Tabela 6. Número de sobreviventes durante as 48 horas de experimento para a espécie de cladóceros <i>D. ambigua</i> , quando testada individualmente em placa de cultivo celular, com e sem epibiontes aderidos na carapaça.....	112
Tabela 7. Número de sobreviventes durante as 48 horas de experimento para a espécie de cladóceros <i>B. deitersi</i> , quando testada individualmente em placa de cultivo celular, com e sem epibiontes aderidos na carapaça.....	113

Tabela 8. Taxa de colonização/ligação do epibionte *E. pygmaeum* no cladóceros *D. ambigua*. Os números indicam a quantidade de zoóides observados a cada período de tempo após o início do experimento e a localização nos mesmos. DI = região dorsal inferior, DS = região dorsal superior, V = região ventral e C= região da cabeça e antenas.....113

Tabela 9. Taxa de colonização/ligação do epibionte *E. pygmaeum* no cladóceros *B. hagmanni*. Os números indicam a quantidade de zoóides observados em cada período de tempo após o início do experimento e a localização nos mesmos. DI = região dorsal inferior, DS = região dorsal superior, V = região ventral e C= região da cabeça e antenas.113

Tabela 10. Seletividade de *E. pygmaeum* por basibiontes.....114

Tabela 11. Bactérias consumidas (x 10³) pelos cladóceros testados, *M. micrura*, *D. ambigua* e *B. deitersi* no experimento de bacterivoria *in vitro*.....116

Tabela 12. Bactérias consumidas (x 10³) pelo protozoário *E. pygmaeum* em sua forma epibionte e livre-natante no experimento de bacterivoria *in vitro*.....116

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema do ciclo de vida do ciliado Peritriquida *Epistylis pygmaeum*. Estágios do ciclo de vida: (a) zoóide aderido recentemente ao substrato, (b) colônia com dois zoóides (c) zoóide livre-natante, (d) telotróquio e (e) cisto. As setas escuras indicam rotas bem conhecidas em peritríqueos e setas claras indicam possíveis rotas e que necessitam de mais estudos. Fonte: Figura modificada de GILBERT e SCHRÖDER, 2003. 27
- Figura 2.** Teste de sobrevivência dos cladóceros. Béqueres na câmara de germinação contendo cladóceros com e sem epibiontes, água do reservatório filtrada e suspensão algal. Fonte: Autoria própria (2017)..... 35
- Figura 3.** Placa de cultura celular de fundo chato. Fonte: Autoria própria (2017). 36
- Figura 4.** Zoóide sésil de *Epistylis pygmaeum* sobre a carapaça de *Daphnia ambigua*, coletado no Reservatório do Monjolinho em agosto de 2017. Aumento de 400x. Fonte: Autoria própria (2017). 44
- Figura 5.** Abundância (em porcentagem) de cada morfotipo bacteriano encontrado no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016..... 45
- Figura 6.** Distribuição da localização dos zoóides epibiontes (em porcentagem) nas diferentes regiões do corpo dos cladóceros: *M. micrura*, *B. deitersi* e *D. ambigua*..... 51
- Figura 7.** Gráficos de efeitos resultantes dos testes de Welch, para os dados coletados após 2 e 4 dias de duração do experimento de sobrevivência para o cladóceros *D. ambigua*. Onde: No_de_sobrev = Número médio de sobreviventes 52
- Figura 8.** Gráficos de efeitos resultantes dos testes de Welch, para os dados coletados após 2 e 4 dias de duração do experimento de sobrevivência para a espécie de cladóceros *B. deitersi*. Onde: No_de_sobrev = Número médio de sobreviventes 53
- Figura 9.** A seta vermelha indica o zoóide nadando próximo ao corpo do cladóceros após sua morte, o círculo mostra a haste abandonada pelo protozoário no momento do desprendimento. Fonte: Autoria própria (2017)..... 55
- Figura 10.** Telotróquio de *E. pygmaeum* momentos antes de se soltar do hospedeiro (*D. ambigua*), o peristômio encontra-se contraído e há o batimento dos cílios da banda telotrocal localizada logo abaixo da região mediana da célula. Fonte: Autoria própria (2017). 55
- Figura 11.** Número de epibiontes aderidos à carcaça de *B. deitersi* em cada intervalo de tempo (min)..... 57
- Figura 12.** Número de epibiontes aderidos à carcaça de *M. micrura* em cada intervalo de tempo (min)..... 58
- Figura 13.** Número de epibiontes aderidos à carcaça de *D. ambigua* em cada intervalo de tempo (min)..... 59
- Figura 14.** Dois zoóides de *E. pygmaeum* coletados no reservatório do Monjolinho sobre a superfície corporal de *D. ambigua*. O primeiro zoóide encontra-se com o peristômio contraído, o segundo encontra-se aberto com a ciliatura oral do colar peristomial batendo formando uma corrente de água. Fonte: Autoria própria (2017). 60

Figura 15. Copépodo adulto da Ordem Calanoida com epibiontes ligados ao ovissaco. Fonte: A autoria própria (2017).	63
Figura 16. Bacterivoria pelo protozoário <i>E. pygmaeum</i> em sua forma epibionte e livre-natante; bactérias ingeridas por indivíduo após 30 min de incubação.....	64
Figura 17. Bacterivoria por cladóceros com e sem infestação por epibiontes; bactérias ($\times 10^3$) ingeridas por indivíduo após 30 min de incubação.	65
Figura 18. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao analisarmos o consumo médio de bactérias pelas três espécies de cladóceros estudadas (<i>B. deitersi</i> , <i>D. ambigua</i> e <i>M. micrura</i>) com e sem a presença do epibionte <i>E. pygmaeum</i> . No_bacterias = Número de bactérias ingeridas (10^3). Epi = epibiontes	66
Figura 19. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao compararmos se há diferença significativa no consumo de bactérias entre a forma epibionte e a forma livre-natante do protozoário <i>E. pygmaeum</i> . No gráfico, eixo x, 1 = <i>E. pygmaeum</i> em sua forma epibionte e 2 = <i>E. pygmaeum</i> em sua forma livre-natante; eixo y, bactérias = número de bactérias consumidas $\times 10$	67
Figura 20. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao testarmos se a epibiose (ou seja, a presença de epibiontes sobre o corpo dos cladóceros) influencia significamente o consumo de bactérias.....	68

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
Bact	Bactérias
Cel	Células
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenilindol
Dens	Densidade
DP	Desvio Padrão
DTAF	Fluorocromo 5 - (4,6-diclorotriazina-2yl) aminofluoresceína
FLB	Fluorescently Labelled Bacteria (Bactéria Marcada Fluorescentemente)
g	Grama
h	Hora
Ind	Indivíduo
km	kilometro
L	Litro
M	Molar
m	Metro
m ²	Metro quadrado
m ³	Metro cúbico
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
p	P-valor
PVC	Policloreto de vinila
R	Fator forma dos morfotipos bacterianos
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	ESTRUTURA DA TESE	16
2	INTRODUÇÃO	16
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo geral	18
3.2	Objetivos específicos	18
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1	Epibiose	19
4.1.1	Implicações da epibiose.....	20
4.1.2	Epibiose no ecossistema	22
4.2	Ciliados peritríquios.....	22
4.2.1	Ciliados peritríquios epibiontes	24
4.2.1.1	O gênero <i>Epistylis</i>	26
4.2.1.2	Epistilíase.....	28
4.3	Comunidade zooplanctônica.....	29
4.4	Bacterivoria.....	30
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1	Local de estudo	32
5.2	Coletas	32
5.3	Densidade de bactérias.....	33
5.4	Densidade de organismos zooplanctônicos.	34
5.5	Sobrevivência de cladóceros.....	35
5.6	Taxa de desprendimento do epibionte	36
5.7	Taxa de colonização/ligação do epibionte	38
5.8	Seleção de hospedeiros (basibiontes) pelos epibiontes.....	39
5.9	Bacterivoria (<i>grazing</i>).....	40
5.9.1	Preparo das bactérias fluorescentes	40

5.9.2	Bacterivoria (<i>grazing</i>) <i>in vitro</i> de <i>E. pygmaeum</i> e de cladóceros com e sem epibiontes	41
5.10	Análise estatística	43
6	RESULTADOS.....	44
6.1	Densidade de bactérias.....	45
6.2	Comunidade zooplanctônica.....	45
6.2.1	Densidade de rotíferos	45
6.2.2	Densidade de cladóceros	47
6.2.3	Densidade de copépodes.....	48
6.3	Epibiontes no zooplâncton.....	49
6.4	Sítios de localização de epibiontes nos organismos zooplanctônicos	50
6.5	Sobrevivência de cladóceros.....	52
6.6	Taxa de desprendimento do epibionte	54
6.7	Taxa de colonização/ligação do epibionte no basibionte.....	61
6.8	Seleção de hospedeiros (basibiontes) pelos epibiontes.....	61
6.9	Bacterivoría <i>in vitro</i> de <i>E. pygmaeum</i> e de cladóceros com e sem epibiontes	64
7	DISCUSSÃO.....	69
7.1	Densidade de bactérias.....	69
7.2	Comunidade zooplanctônica.....	69
7.2.1	Densidade de rotíferos	69
7.2.2	Densidade de cladóceros	70
7.2.3	Densidade de copépodos	72
7.3	Temporalidade da ocorrência de epibiontes	73
7.4	Densidade de epibiontes	74
7.5	Sítios de localização dos epibiontes nos organismos zooplanctônicos.....	75
7.6	Sobrevivência dos cladóceros.....	76
7.7	Taxa de desprendimento do epibionte	77

7.8	Taxa de colonização/ligação do epibionte	80
7.9	Seleção de hospedeiros (basibiontes) pelos epibiontes.....	81
7.10	Bacterivoria <i>in vitro</i> de <i>E. pygmaeum</i> e de cladóceros com e sem epibiontes	84
8	CONCLUSÕES	88
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	Apêndice A	101
1	COLETAS PRELIMINARES – TESTE DA METODOLOGIA / REPRESA DO LOBO.....	101
1.1	Introdução	101
1.2	Objetivos.....	102
1.3	Material e métodos.....	102
1.4	Resultados	103
1.5	Discussão	104
1.6	Referências.....	104
2	COLETAS PRELIMINARES – TANQUES DE PISCICULTURA	106
2.1	Introdução	106
2.2	Objetivos.....	106
2.3	Material e métodos.....	107
2.4	Resultados	108
2.5	Discussão	108
2.6	Referências.....	109
	Apêndice B	111

1 ESTRUTURA DA TESE

Na presente proposta foram abordados aspectos ecológicos da relação epibiótica entre o ciliado *Epistylis pygmaeum* Ehrenberg, 1838, e o zooplâncton em um reservatório eutrófico raso no município de São Carlos, São Paulo. Os aspectos abordados foram: ocorrência temporal, preferência por grupos de organismos na infestação, sítio de localização e intensidade de colonização dos ciliados epibiontes.

Na primeira parte foi realizado estudo da ocorrência de epibiontes sobre o zooplâncton nos municípios de São Carlos e de Itirapina, buscando-se um ambiente adequado para o estudo na região, realizamos coletas em reservatórios e em tanques de piscicultura em pelo menos dois períodos do ano (seco e chuvoso).

Na segunda, foi investigado o padrão de colonização de ciliados epibiontes sobre cladóceros, copépodos e rotíferos em um reservatório raso eutrofizado (reservatório do Monjolinho).

Na terceira, investigamos a preferência dos epibiontes por determinados sítios de localização sobre o corpo dos hospedeiros e quantificamos a intensidade de colonização destes ciliados sobre os organismos zooplanctônicos.

Na quarta, realizamos experimentos de sobrevivência do cladóceros, de desprendimento do protozoário e de bacterivoria por protozoários epibiontes e por cladóceros com e sem infestação de epibiontes através da utilização de bactérias marcadas fluorescentemente.

2 INTRODUÇÃO

No ecossistema, as comunidades bióticas influenciam-se mutuamente promovendo as chamadas interações ecológicas. As interações interespecíficas são muito importantes e necessárias no ciclo biológico da maioria das espécies (BRONSTEIN et al., 2006), pois proporcionam benefícios para, pelo menos, um dos organismos envolvidos e aumentam suas chances de sobrevivência (HOEKSEMA e BRUNA, 2000). Com isso, os estudos sobre essas interações se tornam ainda mais relevantes (BRONSTEIN et al., 2006) para entendermos o papel que as espécies desempenham no ecossistema e os fenômenos biológicos (NYBAKKEN, 2003).

A epibiose é um exemplo de interação interespecífica não simbiótica entre dois organismos: o epibionte e o basibionte (WAHL, 2010). O termo “epibionte” é utilizado para designar indivíduos que, durante o estágio sésil do seu ciclo de vida, colonizam um substrato vivo, sem depender troficamente do mesmo. A superfície ou organismo que os hospeda, o “basibionte”, aloja e constitui um suporte para o epibionte e frequentemente possui a superfície externa corporal biologicamente inativa (WAHL e MARK, 1999; TAYLOR, 2002; WAHL, 2010; RAJABUNIZAL e RAMANIBAI, 2011).

Uma ampla gama de espécies de animais invertebrados representantes de muitos filos apresentam em seu ciclo biológico, pelo menos, uma etapa de vida sésil, na qual precisa fixar-se em um substrato animado ou inanimado. Essas espécies epibiontes são representadas por algas, bactérias, cnidários, diatomáceas, esponjas, equinodermos, moluscos, anelídeos poliquetos, protozoários, rotíferos, entre outros (WAHL e MARK, 1999; WAHL, 2010). Devido à grande diversidade de organismos com essa característica peculiar no ciclo biológico, milhares de indivíduos ou colônias coexistem em pequenos substratos, tendo como consequência, a competição por estes substratos (FERNANDEZ-LEBORANS, 2009;).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo estudar a relação epibiótica entre o protozoário ciliado *Epistylis pygmaeum* Ehrenberg, 1838 e o zooplâncton de um reservatório eutrófico raso situado no município de São Carlos – SP, e avaliar se a interação influencia de alguma forma os organismos envolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a ocorrência e temporalidade de protozoários ciliados epibiontes no reservatório do Monjolinho.
- b) Analisar a distribuição, o sítio de localização e a preferência por basibiontes pelo epibionte *E. pygmaeum* no ambiente.
- c) Determinar a taxa de desprendimento e a de colonização, e avaliar experimentalmente a seletividade do epibionte por sítios de ligação e grupos/espécies de basibiontes.
- d) Avaliar a influência da epibiose na sobrevivência do hospedeiro.
- e) Determinar e verificar diferenças no consumo de bactérias entre as formas epibionte e livre-natante do protozoário e nos cladóceros com e sem infestação por epibiontes.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 EPIBIOSE

Em tempos passados, a epibiose era entendida como uma relação comensal entre dois ou mais organismos. Entretanto, alguns estudos demonstraram que os epibiontes podem causar efeitos perniciosos aos seus hospedeiros (XU, 1992; PUCKETT e CARMAN, 2002).

O termo epibionte é utilizado para designar organismos colonizando superfícies ou substratos orgânicos vivos e entende-se que o sufixo “bionte” refere-se não ao organismo colonizante, mas à natureza do substrato (TAYLOR, 2002). Este tipo de colonização em substratos vivos é um processo extremamente complexo, e difere do ectoparasitismo, da simbiose trófica ou da relação momentânea/passageira de um animal visitante móvel, pois trata-se de uma associação interespecífica facultativa não simbiótica entre dois organismos (WAHL, 2010).

Face à natureza ocasional e facultativa da epibiose, vários organismos sésseis podem viver como basibiontes ou como epibiontes, ou ambos simultaneamente (epibiose de segundo ou terceiro grau). Em uma revisão do tema, Wahl (2010) menciona que o número de epibiontes estabelecidos exclusivamente em substratos vivos é inferior a 20%, dos quais menos de 5% são restritos a uma espécie de basibionte. Esta associação pode ainda ser temporária, mas muitas vezes dura toda a vida de pelo menos um dos organismos envolvido. Na maioria dos casos, as etapas iniciais deste processo extremamente complexo parecem seguir um padrão, que é quase independente do tipo de substrato, da região geográfica ou das espécies colonizadoras estudadas (WAHL, 1989).

A colonização do basibionte geralmente acontece ao acaso, entretanto, existem evidências de que algumas espécies de epibiontes

“escolhem” o basibionte durante o processo de colonização. Os epibiontes podem ter preferência por sítios de localização no basibionte que satisfaçam suas necessidades ecológicas. Essa preferência pode estar relacionada ao tempo de evolução da interação epibiótica, bem como a aspectos funcionais, como a presença de sítios com menor possibilidade de deslocamento do epibionte, boa oxigenação e facilidade em obter nutrientes, ou sítios que ofereçam proteção contra a predação ou que sejam menos colonizados, evitando a competição entre epibiontes (D’ÁVILA e LAMEGO, 2016)

4.1.1 Implicações da epibiose

As implicações biológicas da epibiose envolvem vantagens e desvantagens para os epibiontes e basibiontes, além de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais tanto dos epibiontes como dos basibiontes (WAHL, 1989). Essas vantagens e desvantagens podem ocorrer para ambos os organismos envolvidos ou um deles, dependendo da história de vida dos organismos e das condições ambientais.

A presença de epibiontes modifica numerosas interações do basibionte com o meio onde vive (WAHL e MARS, 1999) e uma modificação na interface entre o organismo e o ambiente pode afetar uma ou mais interações do hospedeiro com o meio (LAUDIEN e WAHL, 2004). A relação que antes da colonização era apenas basibionte/meio passa a ser basibionte/epibionte/meio. (WAHL et al., 1997).

A relação epibiótica pode resultar em benefícios e malefícios tanto para os epibiontes quanto para os basibiontes. Sabe-se que, em altas densidades, os epibiontes podem causar os seguintes efeitos negativos ao basibionte: diminuir a fecundidade (GREEN, 1974; HENEERY e RIDGEWAY, 1979; WEISSMAN et al., 1993; GILBERT e SCHRODER, 2003), diminuir o tempo de sobrevivência (XU e BURNS, 1991; GILBERT e SCHRODER, 2003), causar-lhe lesões (SCHUWERACK et al., 2001), alterar a sua locomoção, reduzindo sua velocidade (HENEERY e RIDGEWAY, 1979), torná-lo mais susceptível à

predação (WILLEY et al., 1993), competir com ele por alimento (KANKAALA e ELORANTA, 1987) e aumentar a demanda energética do basibionte (WEISSMAN et al., 1993).

Todavia, o basibionte pode se beneficiar com os metabólitos produzidos pelos epibiontes como o produzido pelas microalgas e diatomáceas (WAHL, 1989). O epibionte pode proteger o basibionte contra dessecação (WAHL e SONNICHSEN, 1992; WAHL e MARK, 1999) ou ainda auxiliar na camuflagem química ou física contra predadores (WAHL, 1989), desde que a superfície do basibionte apresente alterações (físicas ou químicas) (WAHL et al., 1997), podendo interferir na aceitabilidade do predador (LAUDIEN e WAHL, 2004; FARREN e DONAVAN, 2007).

Para o epibionte, as vantagens da colonização ficam evidentes em ambientes superpopulosos, onde a competição por espaço e alimento é alta e um substrato vivo pode colocá-lo em posição hidrodinâmica favorável (WAHL, 1989). O transporte fornecido pelos basibiontes pode oferecer condições nutricionais variadas e ainda facilitar a dispersão gênica entre as populações de epibiontes (EVANS et al., 1979). Os epibiontes fototróficos podem se beneficiar do acesso mais fácil aos nutrientes dissolvidos e os heterotróficos pela constante renovação de partículas alimentares pela movimentação do hospedeiro (KUDO, 1966; THRELKELD et al., 1993; MAYÉN-ESTRADA e ALADROLUBEM, 2002). Alguns ciliados peritríqueos se localizam próximo à corrente de filtração de seus hospedeiros zooplânctônicos, o que reduz os custos da geração de uma corrente de alimentação (THRELKED et al., 1993).

Por outro lado, a epibiose pode proporcionar também desvantagens ao epibionte. A instabilidade do substrato vivo pode ocasionar alterações morfológicas e fisiológicas no protozoário; a possível competição entre epibiontes e basibiontes por nutrientes, principalmente os dissolvidos na água, além da exposição à predação, podem prejudicar ou impedir a colonização do epibionte (WAHL, 1989). Além disso, os epibiontes correm risco de colonizar basibiontes cujo hábitat é o mesmo de seus predadores (THRELKELD et al., 1993). Além destas desvantagens, alguns comportamentos de limpeza podem remover os epibiontes.

4.1.2 Epibiose no ecossistema

Os epibiontes constituem um componente significativo dos ecossistemas aquáticos e desempenham um importante papel na cadeia alimentar (PRATT e CAIRNS, 1985; BALDOCK, 1986). Contudo, poucos estudos abordam os aspectos ecológicos da relação epibionte/basibionte (BALDOCK, 1986; XU, 1992; FERNANDEZ-LEBORANS et al., 1997; HANAMURA, 2000; UTZ e COATS, 2005; DIAS et al., 2008; 2009; BULUT e SALER, 2017).

A presença de uma comunidade epibiótica pode modificar várias interações entre o basibionte e os componentes abióticos e bióticos do sistema, que podem ter diversos efeitos nas espécies envolvidas e na dinâmica da comunidade (WAHL e MARK, 1999). Em cada caso, a importância relativa dos efeitos positivos e negativos da epibiose depende de fatores ambientais, da biologia e da história de vida dos basibiontes e epibiontes (fatores específicos da espécie) (WAHL e SONNICHSEN, 1992) e geralmente não pode ser classificada como globalmente benéfica ou prejudicial para nenhum dos envolvidos (WAHL, 1989).

A elevada percentagem de infestação sugere que algumas espécies de crustáceos têm pouca ou nenhuma proteção contra a infestação por epibiontes. O percentual de alguns crustáceos planctônicos que transportam protozoários epibiontes e a abundância destes pode ser influenciada, principalmente, por fatores ambientais e pode ser um indicador de poluição da água como sugerido por Henebry e Ridgeway (1979).

4.2 CILIADOS PERITRÍQUIOS

O filo Ciliophora Doflein 1901 (Protista: Ciliophora) possui 11 classes e cerca de 8.000 espécies descritas, incluindo aproximadamente 200 formas fósseis e 3.000 espécies simbióticas. Os ciliados são heterotróficos,

exibindo uma ampla variedade de comportamentos alimentares e ampla distribuição geográfica (LYNN, 2008). Os ciliados da subclasse Peritrichia Stein, 1859 estão entre os ciliados mais comumente encontrados em ambientes marinhos e dulcícolas, sendo raros em ambientes terrestres (solos úmidos). Com cerca de 14 famílias e 96 gêneros, os peritríqueos são caracterizados por possuírem ciliatura oral conspícua disposta em sentido anti-horário ao redor do colar peristomial e, ciliatura somática reduzida a uma banda de cílios subequatoriais arranjados em fileiras curtas e oblíquas, chamada de banda telotrocal, a qual é ciliada nos estágios de dispersão das espécies sésseis (FOISSNER et al., 1992; LYNN, 2008).

Os ciliados são importantes na cadeia trófica, pois se alimentam de algas filamentosas, amebas, bactérias, detritos, cianobactérias, outros ciliados e hifas de fungos. Conforme o modo de capturar os alimentos, podem ser classificados como filtradores: que utilizam os batimentos dos cílios para se alimentar de bactérias ou nutrientes dissolvidos na água; raptorais: que predam outros protozoários; e suctorais: que se utilizam dos tentáculos especiais para preda suas presas. Os ciliados são na maioria de vida livre, sendo a minoria comensais, parasitas e simbiontes. Além disso, podem ser livre-natantes ou sésseis. Na fase sésil, os ciliados passam parte do ciclo biológico fixo ao substrato inanimado ou animado, com este último caracterizando a epibiose (VERNI e GUALTIERI, 1997; DIAS, 2007).

A reprodução desses organismos ocorre por fissão longitudinal e conjugação anisogâmica com formação de macro e microconjugantes. O microconjugante possui banda telotrocal e se prende lateralmente ao macroconjugante para troca de micronúcleo. Esse modo de reprodução consiste em uma forma de adaptação desses organismos à condição sésil (CORLISS, 1979; KAHL, 1935). Com exceção de algumas espécies que retornaram ao modo de vida livre-natante (Família Astylozoonidae), as espécies da subclasse Peritrichia passam a maior parte de seu ciclo de vida na condição sésil (estágio trofonte), como epibiontes presos a substratos vivos (plantas e animais) ou colonizando superfícies inanimadas (pedras, galhos) (KAHL, 1935).

4.2.1 Ciliados peritríquios epibiontes

Numerosas espécies de protozoários ciliados pertencentes ao grupo Peritrichida podem ser encontradas vivendo sobre outros organismos aquáticos. Este grupo é bastante diversificado, ecologicamente importante e geralmente com um ciclo de vida complexo. Embora a relação epibiótica entre ciliados e seus hospedeiros seja relativamente conhecida nos ecossistemas aquáticos, pouco se sabe a respeito de seus aspectos ecológicos, visto que a grande maioria dos estudos aborda novos registros e descrições de espécies de epibiontes (FERNANDEZ-LEBORANS et al. 1997; DIAS et al., 2007). A ecologia de ciliados e outros grupos de protozoários epibiontes requer atenção, especialmente em relação à sua seleção e colonização de hospedeiros, e seus efeitos na sobrevivência e reprodução do hospedeiro (BULUT e SALER, 2017).

A diversidade de peritríqueos epibiontes provavelmente é subestimada devido à escassez de estudos em outros continentes além da Europa (FOISSNER et al., 2009). O estudo de ambientes e microambientes na região neotropical têm revelado uma diversidade oculta, resultando na descrição de novas espécies e gêneros de ciliados peritríqueos (LAMEGO, 2015).

Os protistas ciliados peritríqueos vivem como epibiontes sobre uma variedade de espécies de metazoários aquáticos, incluindo diversos grupos de invertebrados: poríferos, cnidários, ctenóforos, rotíferos, tardígrados, planárias, crustáceos, anelídeos, larvas de insetos, moluscos e de vertebrados: peixes girinos e cágados (KAHL, 1935, LAIRD, 1959, CORLISS, 1979, FOISSNER et al., 1992, FERNANDEZ-LEBORANS e TATO-PORTO, 2002, MOSS et al., 2001; REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004).

A dinâmica populacional da espécie epibionte pode ser afetada por diversos fatores, tais como, a presença e abundância de hospedeiros (EVANS et al., 1979; HENEBRY e HIDGEWAY, 1979, THRELKELD et al., 1993; REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004; UTZ e COATS, 2005), disponibilidade de alimento, grau de poluição orgânica (LAIRD, 1959; XU, 1992; UTZ e COATS, 2005) e abundância dos predadores do hospedeiro (WILEY e THRELKELD, 1993; UTZ e COATS, 2005).

Mudanças nas características de um ambiente desencadeiam modificações qualitativas e quantitativas nas espécies que compõem a taxocenose de protistas ciliados de um ecossistema (SPARAGANO e GROLIÉRE, 1991). Aspectos quantitativos da relação epibiótica podem ser utilizados como indicadores da qualidade da água em diversos ecossistemas aquáticos, tais como a prevalência de intensidade de colonização e abundância dos ciliados sobre crustáceos planctônicos, pois podem ser influenciadas por fatores ambientais (XU, 1992). As vantagens na utilização dos ciliados epibiontes como indicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos são: ampla distribuição geográfica, sensibilidade às alterações das condições físicas e químicas da água e método rápido e pouco oneroso (HENEGBRY e RIDGEWAY, 1979; DIAS et al., 2009), podendo ser obtidos em quantidades estatisticamente aceitáveis (PICCINNI e GUTIÉRREZ, 1995). Segundo Laird (1959), ambientes organicamente enriquecidos apresentam elevadas abundâncias de ciliados peritríquios epibiontes.

Quando colonizam substratos vivos, os epibiontes peritríqueos têm que se adaptar aos aspectos da biologia de seus hospedeiros tal como crescimento e/ou muda, sendo capazes de formar estágios livre-natantes e colonizar novos substratos quando as mudanças ocorrem (WAHL, 1989). A fase sésil do ciclo de vida dos peritríqueos é conhecida como trofonte e a fase livre-natante como telotróquio (UTZ e COATS, 2005). A formação do telotróquio pode ser desencadeada por fatores ambientais como queda brusca na concentração de oxigênio, distúrbios diretos do organismo ou, no caso dos epibiontes, morte ou muda do hospedeiro (UTZ e COATS, 2005). As principais características morfológicas usadas na distinção de espécies de peritríqueos incluem dimensões do corpo, forma da região peristomial, número de voltas da espiral adoral e da membrana ondulante, tamanho do disco peristomial, tipos de estriacões na região somática e do pedúnculo, e disposição da ciliatura oral no peristômio e infundíbulo (FOISSNER, 1999; MAYÉN-ESTRADA e ALADRO-LUBEL, 2002).

O comportamento alimentar dos ciliados peritríqueos, primordialmente bacterívoro, possui implicações no sítio de localização destes

ciliados em regiões particulares de seus hospedeiros e ainda em sua predileção por ambientes eutrofizados (LAIRD, 1959; EVANS et al., 1979; HENEGBRY e RIDGEWAY, 1979; BALDOCK, 1986; MAYÉN-ESTRADA e ALADRO-LUBEL, 2002).

4.2.1.1 O gênero *Epistylis*

O gênero *Epistylis* inclui cerca de 100 espécies descritas de ciliados sésseis, a maioria dos quais se acredita viver como epibiontes de crustáceos, insetos, rotíferos, e plantas aquáticas em ambientes marinhos e de água doce (UTZ, 2007).

Epistylis pygmaeum possui zoóides *in vivo* medindo 22-50 μm x 17-45 μm , geralmente com 40 x 30 μm , isto é, com o comprimento medindo cerca de 1,3 vezes a largura. Os zoóides possuem formato de pera, cálice ou quase cilíndricos, raramente campanulados, com estriações transversais na película. Quando contraídos, possuem forma elipsoidal a globular. O macronúcleo está localizado no eixo transversal da célula, aproximadamente semicircular, em forma de ferradura, disco peristomial oblíquo e proeminente, vestíbulo largo. O vacúolo contrátil encontra-se ligeiramente abaixo do colar peristomial. São encontrados como epibiontes de crustáceos, rotíferos e peixes. Geralmente solitários, as colônias, quando presentes, são compostas por 2 ou 3 zoóides, raramente com mais que 8 zoóides (FOISSNER et al., 1999)

O ciclo de vida de *E. pygmaeum* apresenta dois estágios: sésseis e móvel (Figura 1). O estágio sésseis do ciclo é formado por zoóides (Figura 1 a) ou colônias (Figura 1 b) presos a um substrato e formas inativas encistadas (Figura 1 e). O estágio móvel possui as formas de dispersão desses organismos que são os telotróquios e os zoóides natantes. Os telotróquios (Figura 1d) são formas que não se alimentam e nadam em busca de um substrato para adesão, enquanto que os zoóides natantes (Figura 1c) são zoóides que se desprenderam do pedúnculo e podem se alimentar, se reproduzir ou se transformar em telotróquios. Tanto os telotróquios quanto os zoóides livre-natantes podem se

prender ao substrato e transformar-se em zoóides pedunculados (rotas 7 e 6), e podem também, dar origem a uma nova colônia (rota 1). Cada zoóide preso à colônia pode originar um telotróquio (rota 3, via transformação ou divisão celular), um zoóide natante (rota 2, via desprendimento ou divisão celular) e cistos, que são formas de resistência às condições ambientais desfavoráveis, produzidos por estágios sésseis ou móveis (rotas 8-11) (GILBERT e SCHRÖDER, 2003).

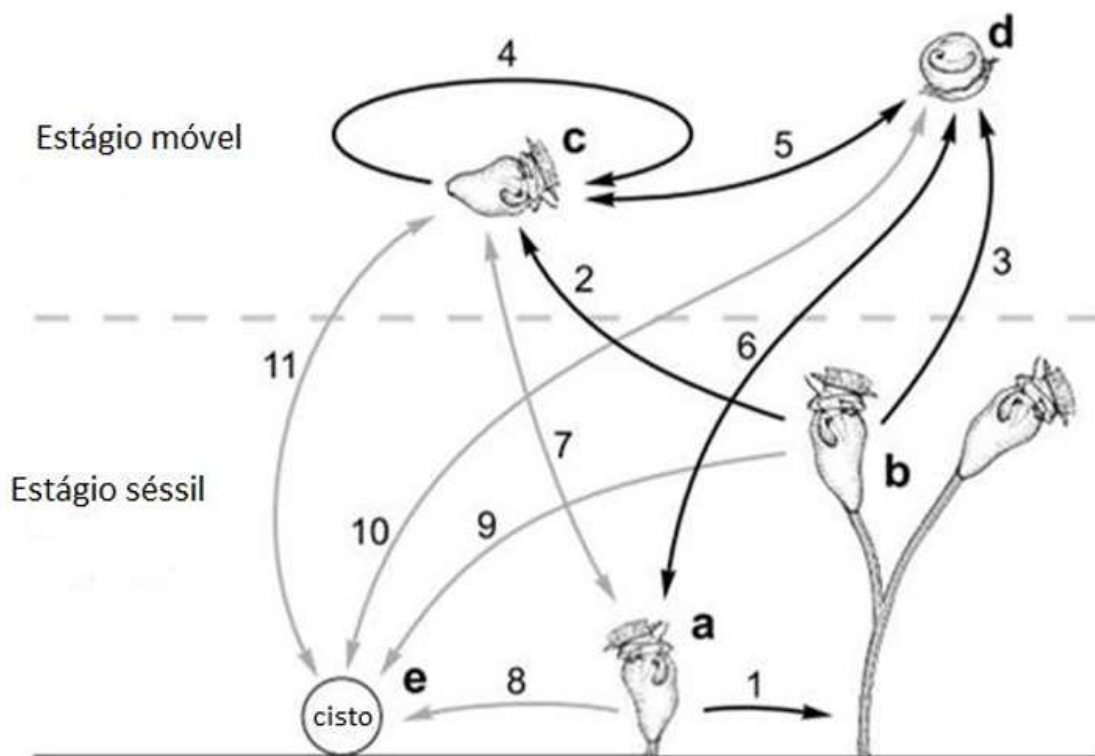


Figura 1. Esquema do ciclo de vida do ciliado Peritriquetida *Epistylis pygmaeum*. Estágios do ciclo de vida: (a) zoóide aderido recentemente ao substrato, (b) colônia com dois zoóides (c) zoóide livre-natante, (d) telotróquio e (e) cisto. As setas escuras indicam rotas bem conhecidas em peritriquetos e setas claras indicam possíveis rotas e que necessitam de mais estudos. Fonte: Figura modificada de GILBERT e SCHRÖDER, 2003.

4.2.1.2 Epistilíase

Epistilíase é uma doença causada por protozoários ciliados pertencentes ao gênero *Epistylis*. Estes protozoários utilizam peixes e também outros animais aquáticos tais como crustáceos, anfíbios ou répteis como basibiontes. Os peixes abrigam estes epibiontes nas escamas e nos raios das nadadeiras que proporcionam a sustentação necessária para o desenvolvimento das colônias (PÁDUA et al., 2013). Os epibiontes se alimentam de materiais em suspensão na água, principalmente bactérias. Sua presença geralmente está relacionada a infecções bacterianas, comumente corrosão de nadadeiras e ulceração da pele (MARTINS et al., 2015). É importante salientar que *Epistylis* sp. não se alimenta das células dos peixes, nem causa lesões nestes, tampouco perfuram a pele durante o processo de fixação. Fato que torna questionável a denominação de parasita para estes protozoários, já que eles não dependem dos peixes para se alimentarem, nem competem pelo mesmo alimento. No entanto, em infestações massivas por *Epistylis* é comum observar corrosão de nadadeiras e ulceração da pele, relacionada à atividade de enzimas bacterianas (PÁDUA et al., 2012). É, portanto, uma doença com etiologia mista, cujo efeito negativo torna a denominação de epibiose para essa situação também questionável. Por conveniência, o termo parasita para este protozoário é utilizado quando diagnosticado em peixes de criação. A transmissão ocorre por meio da infecção de telótroquios em contato com os peixes na água (MARTINS et al., 2015).

Na década de 70 a infestação por *Epistylis* em peixes produzidos nos Estados Unidos foi associada muitas vezes à formação de feridas avermelhadas sobre a superfície corporal destes, sendo denominada doença da ferida vermelha (*red-sore disease*), tendo este ciliado como agente primário da doença. Hazen et al. (1978) elucidou o envolvimento da bactéria *Aeromonas hydrophila* como agente primário desta enfermidade, revelando que *Epistylis* na realidade trata-se do agente causador secundário. Os ciliados não secretam enzimas líticas capazes de provocar lesões sobre os peixes. O que ocorre é a colonização do pedúnculo do protozoário por bactérias capazes de secretar essas enzimas, o que ocasiona a formação de lesões típicas que levam o nome

da doença. Além disso, a infecção exclusiva por *A. hydrophila* determina a ocorrência de septicemia hemorrágica, com a despigmentação da pele, ulceração cutânea, palidez branquial, além de alterações patológicas variadas em órgãos internos (SILVA et al. 2012).

No Brasil, a epistilíase tem sido caracterizada como uma doença emergente presente em criação de bagres e peixes ornamentais (ISHIKAWA et al., 2012.; PÁDUA et al., 2013). No Estado do Mato Grosso do Sul, foi observada a ocorrência de *Epistylis* em copepoditos, em fêmeas adultas do copépoda *Lernaea cyprinacea* e no híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* fêmea x *Colossoma macropomum* macho). Estes crustáceos podem provocar a disseminação da doença uma vez que a forma livre dos protozoários é responsável pela formação e dispersão de novas colônias (ISHIKAWA et al., 2012).

4.3 COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA

Dentre os organismos zooplanctônicos, rotíferos, cladóceros e copépodes possuem grande representatividade nos corpos de água lênticos do Brasil e do mundo (ROCHA e GÜNTZEL, 1999) e apresentam grande relevância ecológica nos ambientes aquáticos por serem organismos filtradores de material em suspensão de diferentes tamanhos, incluindo desde bactérias até algas filamentosas, utilizando diferentes estratégias de obtenção de alimentos (LIMA et al., 2012). Tanto cladóceros quanto copépodos são os mais importantes componentes do grupo dos crustáceos no zooplâncton de água doce e, além do consumo de bactérias, contribuem também com a predação sobre protozoários ciliados e flagelados (SHERR e SHERR, 2002; ZÖLLNER et al., 2003)

Estudos ecológicos do zooplâncton são importantes, pois estes organismos são conhecidos por manter o equilíbrio do ambiente aquático, podendo controlar a densidade da comunidade fitoplanctônica, servir de alimento para os peixes (ARAGÃO et al., 2004), assim transferir energia na cadeia trófica (ALMEIDA et al., 2010) e são considerados bons indicadores biológicos da

qualidade da água (LANSAC-TÔHA et al., 2004; MATSUMURA-TUNDISI e TUNDISI, 2005).

4.4 BACTERIVORIA

As bactérias são componentes chave das teias alimentares aquáticas devido à extraordinária diversidade de suas vias metabólicas e sua capacidade de processar substratos orgânicos e inorgânicos com grande eficiência e versatilidade (POMEROY et al., 2007). A visão clássica da função das bactérias nos ecossistemas sempre foi a de decomposição da matéria orgânica em gás carbônico e substâncias simples, húmicas e íons, contribuindo para a ciclagem de nutrientes e produção de alimentos para organismos de níveis tróficos superiores na cadeia alimentar (COLE, 1999). Além dessas funções, Azam et al. (1983) introduziu a teoria da “alça microbiana” (*microbial loop*), criada por Pomeroy (1974), na qual as bactérias, além de decompositoras, são também importantes como agentes transformadores da matéria orgânica dissolvida (MOD) nos ecossistemas aquáticos em matéria orgânica particulada (MOP), permitindo sua canalização para a cadeia alimentar via predação.

A alça microbiana é tradicionalmente formada por bactérias e protozoários, mas atualmente sabe-se que ela não pode ser vista de forma independente do restante da teia alimentar, pois é um componente de uma rede trófica muito mais complexa, formada por interações que incluem não somente protozoários e bactérias, mas todos os organismos procariontes e eucariontes autotróficos e heterotróficos dos sistemas aquáticos (SHERR e SHERR, 1988).

As interações planctônicas dirigem o fluxo de energia dentro da cadeia trófica microbiana (LOBÃO, 2009), sendo que uma enorme gama de fatores bióticos e abióticos pode influenciar a abundância e a produtividade das comunidades bacterianas. Em muitos sistemas aquáticos tais fatores foram apontados como sendo: disponibilidade de nutrientes (TOOLAN et al., 1991; WANG, MILLER e PRISCU, 1992; THOMAS e ESTEVES, 1997), predação (LANGHEDER e JÜRGENS, 2001; ROSELLI, 2008; SACCÁ et al., 2009), o

parasitismo (DUFFY et al.,2010), a competição (HIBBING et al.,2010), o comensalismo (BRATBACK e THINGSTAD, 1985), a lise viral (SUTTLE, 1994), e a temperatura (POMEROY e DEIBEL, 1986). Dentre estes fatores, a predação é capaz de influenciar a abundância, o tamanho, a composição, o comportamento e a morfologia das presas (ROSELLI, 2008) e constitui o chamado controle *top-down* proposto por Wright (1988), que, juntamente com a disponibilidade de nutrientes (controle *bottom-up*) merecem destaque, como sendo os principais responsáveis pelo controle das bactérias nos sistemas.

No plâncton de ambientes aquáticos, o controle *top-down* de bactérias é comumente exercido por protozoários e organismos zooplânctônicos, como rotíferos, cladóceros e copépodos (ALGASILD e NOGES, 2005; SACCA et al., 2009; ZÖLLNER et al., 2009). Dentre os protozoários, o maior consumo de bactérias ocorre principalmente por parte dos ciliados (ZINGEL et al., 2007) e nanoflagelados heterotróficos (NHF) (CLEVEN e WEISSE, 2001). A bacterivoria é vista como potencial reguladora das comunidades bacterianas e também como um mecanismo capaz de estimular a atividade bacteriana em muitos habitats, acelerando as taxas de ciclagem de matéria orgânica (MURASE et al., 2006).

Vários estudos têm usado diferentes técnicas a fim de registrarem os impactos causados pela predação em populações e comunidades bacterianas (LANGHEDER e JÜRGENS, 2001; REGALI-SELEGHIM, 2001). Dentre elas, as mais frequentes são experimentos de predação utilizando bactérias marcadas radioativamente, bactérias coradas com corantes fluorescentes e microesferas de látex inertes coradas com os mesmos fluorocromos. Esses trabalhos avaliaram o potencial bacterívoro do protozooplâncton (PACE e BAILIFF, 1987; HAHN e HÖFLE, 2001; PERNTHALER, 2005; HISATUGO et al., 2014a e MANSANO et al.,2014) bem como do zooplâncton (OOMS-WILMS et al.,1995; KIM, HWANG e JOO, 2000; LANGENHEDER e JÜRGENS, 2001, AGASILD e NÖGES, 2005; HISATUGO et al., 2014b; HAYASHI-MARTINS et al., 2017).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DE ESTUDO

O reservatório do Monjolinho (47° 52' W e 21° 59' S) é formado pelo represamento do Rio Monjolinho, situado no Campus da Universidade Federal de São Carlos, em uma área urbanizada da cidade de São Carlos - SP, Brasil. O reservatório é parte da sub-bacia hidrográfica do rio Monjolinho, localizada na região centro-norte do Estado de São Paulo (ESPÍNDOLA, 2000). O reservatório situa-se em região subtropical e a bacia possui área de 273,77m², perímetro de 84,75 Km, volume de 73.251m³ e profundidade média e máxima de 1,5 m e 3,0 m, respectivamente (REGALI-SELEGHIM, 2001). O clima da região é o subtropical úmido, Cwa, segundo a classificação de Köpen (1931), apresentando inverno seco (abril e setembro) e verão chuvoso (outubro a março). O reservatório é altamente instável devido a seu curto tempo de retenção, pequena dimensão e profundidade, precipitação e vento, que afetam as comunidades fitoplanctônicas, zooplanctônicas (NOGUEIRA e MATSUMURA-TUNDISI, 1996), protozooplanctônicas e bacterioplanctônicas (REGALI-SELEGHIM, 2001; REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004).

5.2 COLETAS

Foram realizadas coletas mensais durante o período de 2 anos (de novembro de 2015 a novembro de 2017), feitas apenas para análise qualitativa, na busca por epibiontes aderidos ao zooplâncton. Quando os organismos objetos de estudo foram encontrados, nos meses de julho e de agosto de 2016 e nos meses de agosto, setembro e outubro de 2017, as coletas foram repetidas a cada dois ou três dias até o desaparecimento dos epibiontes no ambiente. As amostras qualitativas foram obtidas por meio de arrastos horizontais da coluna d'água, utilizando-se uma rede de plâncton cônico-cilíndrica com malha de 20

μm e colocadas em frascos de vidro de 600 mL de capacidade, com tampa de rosca, e transportados para o laboratório em caixa de isopor.

No laboratório, os objetos de estudo (organismos zooplanctônicos com epibiontes aderidos) foram isolados em microscópio estereoscópico (Motic, SMZ168) e identificados em microscópio ótico (Leica DMLS, aumento de até 1000x), com auxílio de pipetas de Pasteur (com diâmetro aumentado e ponta arredondada para não danificar os organismos). A identificação taxonômica foi feita em nível de gênero e espécie, para os organismos zooplanctônicos de acordo com Edmondson (1959), Reid (1985), Matsumura-Tundisi (1996), Nogrady et al. (1993), Elmoor-Loureiro (1997), Santos-Silva (2000), Nogrady e Segers (2002), Silva e Matsumura-Tundisi 2005. Para os ciliados epibiontes a taxonomia foi baseada principalmente em Foissner e Berger (1996) e Foissner et al. (1999).

5.3 DENSIDADE DE BACTÉRIAS

Para a estimativa da densidade de bactérias planctônicas, uma amostra de água da sub-superfície do reservatório do Monjolinho (100 mL) foi coletada, acondicionada em frasco escuro, fixada no campo com solução de formalina neutra (concentração final 2%) e transportada para o laboratório, onde foi conservada na geladeira até o momento da contagem.

No momento da contagem, o frasco foi homogeneizado manualmente e uma alíquota foi corada com o fluorocromo 4',6'-diamidino-2-phenilindol (DAPI), segundo Porter e Feig (1980), e filtrada em membrana de policarbonato preta (Nuclepore®) de diâmetro de poro de 0,2 μm .

A membrana foi colocada entre lâmina e lamínula, com óleo de imersão não fluorescente e as bactérias foram contadas e medidas em microscópio de epifluorescência Olympus BHS-313, equipado com luz de mercúrio HBO 200 e conjunto de filtros para luz UV, utilizando-se filtro de excitação de 365-370 nm e emissão a 421 nm, em aumento de 1250X. A

densidade de bactérias mL⁻¹ foi calculada segundo Jones (1979), após a contagem de 300 células, de acordo com a equação:

$$D = \frac{Y \times A \times d}{a \times v}$$

onde:

D = densidade numérica (células mL⁻¹);

Y = número médio de células por área de contagem;

A = área de filtração da membrana (mm²);

d = diluição;

a = área do campo de contagem (mm²);

v = volume filtrado da amostra (mL).

Com base na razão comprimento/largura, as células bacterianas foram classificadas nos seguintes morfotipos (ZARITSKY, 1975): coco (razão de 1 a 1,25); cocobacilo (de 1,26 a 1,75); bacilo (de 1,76 a 5) e filamento (maior que 5). Foram também quantificados outros morfotipos como o víbrio.

5.4 DENSIDADE DE ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS.

Para as amostras quantitativas, no campo, foram filtradas em rede de plâncton de 20 µm 100L de água coletados com balde de 20L, as amostras foram preservadas em formol, com concentração final de 4%. No laboratório, rotíferos, cladóceros e copépodos foram quantificados utilizando-se cubeta de acrílico com fundo quadriculado em um microscópio estereoscópio (Motic, SMZ168). A taxonomia dos organismos foi realizada sob microscópio ótico (Leica DMLS, aumento de até 1000x) de acordo com as descrições da literatura.

5.5 SOBREVIVÊNCIA DE CLADÓCEROS

Exemplares de duas espécies de cladóceros abundantes no reservatório (uma de maior porte *Daphnia ambigua* Scourfield, 1947 e outra de pequeno porte *Bosminopsis deitersi* Richard, 1895), com e sem epibiontes aderidos, foram isolados a partir da amostra de campo, coletada com uma rede de plâncton cônico-cilíndrica com malha de 20 μm . Foram montados 6 béqueres contendo em cada um 500 mL de água do reservatório filtrada (3 vezes em rede de 10 μm de abertura de malha) e suspensão algal de *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Nygaard et al. 1987, na concentração de 1×10^5 células mL^{-1} . Em 3 béqueres foram colocados 10 indivíduos em cada de *D. ambigua* com epibiontes e nos outros 3, foram colocados em cada um, 10 indivíduos de *D. ambigua* sem epibiontes, os béqueres foram incubados em câmara germinadora a 25°C e fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro (Figura 2) por 5 dias, sendo adicionado suspensão algal a cada dois dias. Os cladóceros foram observados diariamente, bem como a presença ou ausência dos epibiontes ao longo do experimento. O mesmo experimento foi realizado utilizando-se a espécie *B. deitersi*.



Figura 2. Teste de sobrevivência dos cladóceros. Béqueres na câmara de germinação contendo cladóceros com e sem epibiontes, água do reservatório filtrada e suspensão algal. Fonte: Autoria própria (2017).

Em paralelo, outro experimento para observar a sobrevivência do cladóceros individualmente com e sem epibiontes foi realizado. Para isso, utilizou-se uma placa de cultivo celular de fundo chato estéril (Figura 3) com 24 poços, cada poço com capacidade máxima de 3,5mL, um indivíduo foi adicionado em cada poço da placa de cultura celular, contendo 2 mL de água do reservatório filtrada 3 vezes em malha de 10 μm e suspensão algal de *R. subcapitata*, na concentração de 1×10^5 células por mL. As placas foram tampadas para diminuir a evaporação do meio e incubadas em câmara germinadora a 25°C e fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro, os cladóceros foram observados de 12 em 12 horas, durante 48 horas. Observamos 20 indivíduos de *D. ambigua*, 10 com epibiontes e 10 sem epibiontes e 20 indivíduos de *B. deitersi*, 10 com epibiontes e 10 sem epibiontes.



Figura 3. Placa de cultura celular de fundo chato. Fonte: Autoria própria (2017).

5.6 TAXA DE DESPRENDIMENTO DO EPIBIONTE

Nas coletas onde os epibiontes aderidos ocorreram, estes estavam em várias espécies do zooplâncton encontrados no reservatório. Entretanto, os cladóceros com o epibionte *E. pygmaeum* foram os mais comuns nas amostras, e, por este motivo, foram usados para este experimento.

A metodologia para obtenção dos telotróquios e dos zoóides livre-natantes de *E. pygmaeum* foi baseada na técnica utilizada por Bickel et al. (2012) com adaptações.

O zooplâncton foi coletado no reservatório do Monjolinho através do arrasto horizontal da rede de plâncton de 20 μm , colocado em frascos de vidro contendo água do reservatório e transportado para o laboratório em caixa de isopor. No laboratório, com o auxílio do microscópio estereoscópico, cladóceros que transportavam o ciliado epibionte *E. pygmaeum* foram separados e colocados em béqueres contendo água do reservatório filtrada 3 vezes em rede de malha de 10 μm de abertura. Foram selecionados os indivíduos que possuíam infestação por *E. pygmaeum*, com no mínimo 10 zoóides aderidos em sua carapaça, sem formação de colônia.

Os cladóceros foram transferidos individualmente com uma pequena gota da água para uma lâmina com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O cladóceros foi morto esmagando seu posabdômen com a ponta de uma agulha de dissecação e o número total de epibiontes inicialmente aderidos à sua carapaça foi imediatamente contado usando um microscópio ótico (Leica DMLS), as observações foram realizadas a temperatura ambiente (21 ° C). O número de epibiontes que permaneceu ligado ao cladóceros foi contado a cada 5 min por até 40 minutos após a morte do mesmo. Foram analisados quinze indivíduos, 5 indivíduos de *D. ambigua*, 5 de *B. deitersi* e 5 de *Moina micrura* Kurz, 1874.

Durante o experimento de desprendimento do epibionte observou-se que algumas células de *E. pygmaeum* ao invés de se desprenderem prontamente como zoóides livre-natantes, se transformavam em telotróquios. Dessa forma, foi feito o acompanhamento individual através da observação em microscópio ótico (Leica DMLS), filmando e fotografando cada etapa da diferenciação celular de 10 zoóides de *E. pygmaeum* durante sua transformação de zoóide sésil, desde a morte do hospedeiro, até o desprendimento do telotróquio.

5.7 TAXA DE COLONIZAÇÃO/LIGAÇÃO DO EPIBIONTE

Cladóceros fortemente infestados por epibiontes (com mais de 20 zoóides de *E. pygmaeum* por indivíduo), coletados no reservatório do Monjolinho através do arrasto horizontal da rede de plâncton de 20 μm , no laboratório, foram isolados das amostras e colocados em béqueres contendo água do reservatório filtrada em rede de malha de 10 μm . Para a montagem do experimento, utilizou-se os epibiontes obtidos da carapaça de cladóceros fortemente infestados. A concentração de zoóides utilizada foi próxima à concentração de protozoários ciliados encontrados no ambiente onde foram coletados; 7 a 31 ind. mL^{-1} (HISATUGO, 2014). Os cladóceros com epibiontes separados no laboratório, foram transferidos individualmente cada um com uma pequena gota da água para uma lâmina com o auxílio de uma pipeta Pasteur (com diâmetro aumentado e ponta arredondada para não danificar os organismos). O cladócero foi morto pelo esmagamento de seu posabdômen ou sua cabeça com a ponta de uma agulha de dissecação. Cerca de 30 minutos após a morte do cladócero ocorreu o desprendimento dos protozoários. Após esse tempo, a carcaça do indivíduo morto foi retirada e a gota de água contendo os protozoários (de 20 a 30 zoóides) foi transferida para um poço de uma placa de cultura celular de fundo chato estéril (Figura 3) com 24 poços, cada poço com capacidade máxima de 3,5mL, contendo em cada um 2 mL de água do reservatório filtrada 3 vezes em malha de 10 μm e suspensão algal de *R. subcapitata*, na concentração de 1×10^5 células por mL. Em cada poço foi colocado um indivíduo zooplanctônico sem epibiontes aderidos. Foram selecionados 12 cladóceros (6 indivíduos de *D. ambigua* e 6 de *Bosmina hagmanni* Stingelin, 1904), 6 copépodos (6 indivíduos de *Thermocyclops decipiens* Kiefer, 1929) e 2 espécies de rotíferos (*Keratella cochlearis* Gosse 1851, e *Asplanchna priodonta* Gosse, 1850). As placas foram tampadas para diminuir a evaporação do meio e incubadas em câmara germinadora a 25°C e fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro, a observação foi realizada durante 48 horas nos seguintes intervalos 6, 12, 24, 30 e 48 horas do início do experimento, em cada período foi verificado se os protozoários se ligavam à algum dos basibiontes disponíveis e o local elegido para colonização.

5.8 SELEÇÃO DE HOSPEDEIROS (BASIBIONTES) PELOS EPIBIONTES

Para este experimento, com a finalidade de testar a seletividade do protozoário por hospedeiros e sítios de colonização, epibiontes de *E.pygmaeum* foram expostos a pares de possíveis hospedeiros: 2 cladóceros de espécies diferentes (*D. ambigua* e *B. hagmanni*); 2 cladóceros da mesma espécie com idades distintas (*D. ambigua* jovem e adulta e *B. hagmanni* jovem e adulta); 2 copépodos de espécies diferentes (uma espécie da Ordem Calanoida, *Notodiaptomus iheringi* Wright, 1935 e outra da Ordem Cyclopoida, *T. decipiens*); 1 cladóceros (*D. ambigua*) e 1 copépodo (*T. decipiens*); 5 rotíferos (3 *K. cochlearis* e 2 *A. priodonta*); 1 cladóceros (*B. hagmanni*) e 3 rotíferos (*K. cochlearis*); 1 copépodo (*T. decipiens*) e 3 rotíferos (*A. priodonta*).

Assim como nos experimentos das taxas de desprendimento e colonização, indivíduos zooplancctônicos fortemente infestados por epibiontes (*E. pygmaeum*), com mais de 20 zoóides por indivíduos, coletados no reservatório do Monjolinho através do arrasto horizontal da rede de plâncton de 20 μm , foram separados no laboratório. Os cladóceros com epibiontes separados no laboratório, foram transferidos individualmente cada um com uma pequena gota da água para uma lâmina com o auxílio de uma pipeta Pasteur (com diâmetro aumentado e ponta arredondada para não danificar os organismos). O cladóceros foi morto esmagando seu posabdômen ou sua cabeça com a ponta de uma agulha de dissecação. Após o desprendimento dos protozoários, cerca de 30 minutos após a morte do cladóceros, a carcaça do indivíduo morto foi retirada e a gota de água contendo os protozoários (de 20 a 30 zoóides) foi transferida para um poço de uma placa de cultura celular de fundo chato estéril (Figura 3) com 24 poços, contendo 2,5 mL de água do reservatório filtrada 3 vezes em malha de 10 μm e suspensão algal de *R. subcapitata*, na concentração de 1×10^5 células por mL. Em cada poço uma dupla de indivíduos zooplancctônicos foi colocada, repetindo-se o mesmo par de organismos em 6 réplicas. Observou-se durante 48 horas nos seguintes intervalos 6, 12, 24, 30 e 48 horas do início do experimento se os protozoários se ligavam à algum dos basibiontes disponíveis e o local elegido para colonização.

5.9 BACTERIVORIA (*GRAZING*)

5.9.1 Preparo das bactérias fluorescentes

Os experimentos de bacterivoria foram realizados utilizando-se bactérias marcadas fluorescentemente (*fluorescently labelled bacteria* - FLB). O método utilizado para a marcação das bactérias foi baseado na técnica descrita por Sherr, Sherr e Fallon (1987). O corante utilizado foi o fluorocromo 5-(4,6-diclorotriazina-2yl) aminofluoresceína (DTAF) que foi incorporado por bactérias cultivadas em laboratório da linhagem *Escherichia coli* ATCC 8739. A bactéria *E. coli* apresenta reação Gram-negativa, possui forma de bacilo e é aeróbia ou anaeróbia facultativa, o que a torna muito comum e capaz de se adaptar a uma grande variedade de ambientes. A escolha desta bactéria se baseou principalmente no fato de apresentar tamanho médio semelhante ao das bactérias mais frequentes no reservatório do Monjolinho e no fato do próprio reservatório conter elevada densidade populacional de *E. coli*. Em teste laboratorial, a linhagem de *E. coli* que foi utilizada, após fixação, apresentou uma relação comprimento/largura média de 1,28.

Para o cultivo das bactérias, uma alça padrão de *Escherichia coli* em cultura foi inoculada em 40 mL de Caldo Sintético (SILVA, 2008). A suspensão foi mantida em estufa, com agitação, a 37°C e as bactérias foram obtidas na fase log para evitar a formação de aglomerados. A fase log para essa bactéria, nessas condições de cultivo, foi determinada a partir de curva de crescimento elaborada por Silva (2008) e Silva et al. (2010) e se situa entre 3 e 5 horas.

As bactérias foram centrifugadas (5.410 x g por 5 minutos) e o material sedimentado ressuspense em 10 mL de tampão fosfato salino estéril (pH 9). Posteriormente, 2 mg do corante DTAF foi adicionado à suspensão, que foi, em seguida aquecida em banho a 60° C por 2 horas, a fim de se matar as bactérias. Após essa etapa, as células foram novamente centrifugadas e lavadas três vezes com 10 mL de solução salina tamponada. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de pirofosfato de tetrasódio

0,02 M, que tem efeito tampão. A suspensão foi agitada em vórtex por 1 minuto e alíquotas de 1 a 2 mL foram pipetadas em criotubos (Eppendorf®) que foram vedados e estocados em freezer. No momento do experimento de bacterivoria, as FLB estocadas foram descongeladas e colocadas em ultra-som (ultracleaner 1400, marca Unique) por 1 minuto a fim de se desfazer eventuais aglomerados.

Uma das amostras estocada em criotubos foi reservada para a determinação da concentração de FLB. Para isso, após descongelamento, uma alíquota (50 µL) da suspensão foi pipetada em 2 mL de solução de pirofosfato de tetrasódio 0,02 M, centrifugada (5.410 x g por 5 minutos), ressuspensa com 1 mL de água destilada, sonicada em um pulso de 1 minuto (ultrasom ultracleaner 1400, marca Unique) e filtrada em uma membrana de 0,2 µm de diâmetro de poro para contagem em microscopia de epifluorescência. A densidade bacteriana foi calculada segundo a equação de Jones (1979), já descrita. (Item 4.3. “Densidade de bactérias” em Material e Métodos).

5.9.2 Bacterivoria (*grazing*) *in vitro* de *E. pygmaeum* e de cladóceros com e sem epibiontes

O zooplâncton foi coletado no reservatório do Monjolinho através do arrasto horizontal da rede de plâncton de 20 µm. A amostra foi acondicionada em frascos de vidro contendo água do reservatório e transportada para o laboratório em caixa de isopor. No laboratório, com o auxílio do microscópio estereoscópico, as três espécies de cladóceros mais abundantes nas amostras que transportavam o ciliado epibionte *E. pygmaeum* foram separadas e colocados em béqueres contendo água do reservatório filtrada 3 vezes em rede de malha de 45 µm. Foram selecionados indivíduos que possuíam infestação por *E. pygmaeum*, com no mínimo 10 zoóides aderidos em sua carapaça, sem formação de colônia e também indivíduos das três espécies de cladóceros escolhidas sem a presença do epibionte.

Foram montados, 6 béqueres contendo em cada um 500 mL de água do reservatório filtrada (3 vezes em rede de 45 µm de abertura de malha) e suspensão algal de *R. subcapitata*, na concentração de 1×10^5 células mL⁻¹.

Em 3 béqueres, foi adicionado em cada um 15 cladóceros com epibiontes (5 *D. ambigua*, 5 *M. micrura* e 5 *B. deitersi*) e nos outros 3 béqueres, 15 cladóceros sem epibiontes (5 *D. ambigua*, 5 *M. micrura* e 5 *B. deitersi*).

Para os experimentos de bacterivoria foram adicionadas bactérias (*E. coli*) marcadas fluorescentemente (FLB) com o fluorocromo 5-(4,6-diclorotriazina-2yl) aminofluoresceína (DTAF). As bactérias marcadas foram sonicadas em um pulso de 1 minuto (ultrassom ultracleaner 1400, marca Unique), para evitar a formação de grumos, diluídas em solução salina 0,85% até a concentração final de 5 % da abundância bacteriana estimada previamente e adicionadas aos 3 béqueres contendo água filtrada do reservatório com os 15 cladóceros com epibiontes e os outros 3 béqueres com 15 cladóceros sem epibiontes. Após a adição das FLBs, os béqueres foram incubados por 30 minutos. Após esse período, o conteúdo dos béqueres foi filtrado em rede de malha de 10µm, os organismos retidos foram anestesiados com 10 mL de água mineral gaseificada Schincariol®, para impedir a evacuação do conteúdo intestinal e fixados com formaldeído (concentração final 4%). No momento da contagem, as amostras foram coradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Dihydrochloreto) e filtradas em membranas pretas de policarbonato de 0,8 µm de diâmetro de poro. As membranas foram posicionadas entre lâmina e lamínula, com o uso de óleo de imersão não fluorescente, levemente pressionadas de cima para baixo e analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BHS-313) equipado com luz de mercúrio HBO 200 e conjunto de filtros para luz azul, em aumento de 1250X. Os protozoários foram localizados utilizando o conjunto de filtros para a luz UV e, em seguida, os filtros para a luz azul foram utilizados para analisar os vacúolos dos protozoários e o tubo digestivo dos cladóceros para a avaliação da ingestão das FLB; foram analisados 9 indivíduos de cada espécie de cladócero testada com epibiontes, 9 indivíduos de cada espécie de cladócero sem epibiontes, 27 protozoários epibiontes e 27 protozoários livre-natantes (*E. pygmaeum*).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada utilizando-se Bartlett e Levene e a análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%. Nos dados dos experimentos onde as variâncias mostraram-se desiguais, utilizamos o teste de Welch. Todos os testes foram realizados através do software Action stat, desenvolvido pela Estatcamp.

6 RESULTADOS

A ocorrência de epibiontes durante o período de estudo foi de julho a agosto de 2016, e nos meses de agosto, setembro e outubro de 2017. Eles foram encontrados colonizando várias espécies do zooplâncton e o epibionte mais frequente foi o ciliado *Epistylis pygmaeum*, identificado com base no padrão de ramificação do pedúnculo, sua espessura e natureza não-contrátil; e o tamanho das células, que possuíam em média $45,8 \pm 3,7 \mu\text{m}$ de comprimento e $37,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$ de largura (Figura 4). Além desta espécie, na coleta de agosto de 2016, em dois cladóceros foi observado também o ciliado *Vorticella aquadulcis* Stokes, 1887; em agosto de 2017, foi verificado um exemplar de calanóide com quatro ciliados epibiontes *Trichodina domerguei megamicronucleata* Dogiel, 1940.



Figura 4. Zoóide sésil de *Epistylis pygmaeum* sobre a carapaça de *Daphnia ambigua*, coletado no Reservatório do Monjolinho em agosto de 2017. Aumento de 400x. Fonte: Autoria própria (2017).

6.1 DENSIDADE DE BACTÉRIAS

A densidade bacteriana do reservatório, avaliada no mês de agosto de 2016, foi de 3×10^6 cel. mL⁻¹. A forma bacilar foi a mais abundante, seguida da forma cocobacilar (Figura 5).

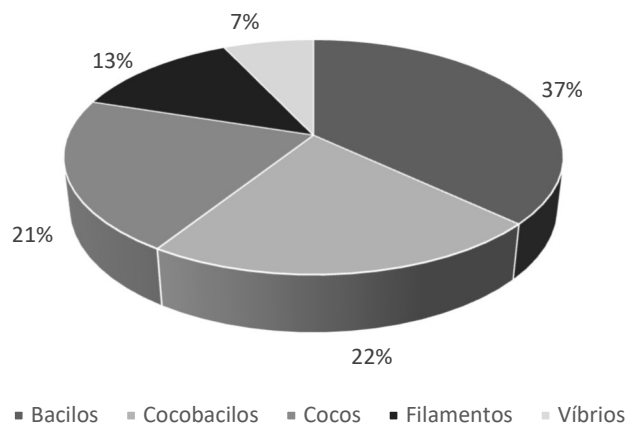


Figura 5. Abundância (em porcentagem) de cada morfotipo bacteriano encontrado no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016.

6.2 COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA

6.2.1 Densidade de rotíferos

A densidade média de rotíferos no reservatório foi de 1,98 ind. mL⁻¹. Foram encontrados 16 taxa, 11 gêneros e 6 famílias (Tabela 1). Os taxa mais abundantes foram: *Keratella cochlearis*, *Polyarthra remata* Skorikov, 1896, *Asplanchna priodonta* e *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1766.

Tabela 1. Densidade das espécies zooplanctônicas (rotíferos, cladóceros e copépodos) encontrados no reservatório do Monjolino, nos meses de agosto de 2016 e agosto de 2017.

	Densidade (ind. mL ⁻¹)	
	agosto/2016	agosto/2017
Rotíferos		
<i>Asplanchna priodonta</i>	0,035	0,12
<i>Brachionus calyciflorus</i>	0,173	0,11
<i>Brachionus rubens</i>	0,028	0
<i>Epiphanes brachionus</i>	0,024	0,09
<i>Filinia longiseta</i>	0,067	0,084
<i>Filinia terminalis</i>	0,041	0,09
<i>Keratella cochlearis</i>	0,936	0,69
<i>Lecane Lunaris</i>	0,053	0,07
<i>Lepadella ovalis</i>	0,034	0,048
<i>Mytilina ventralis</i>	0,032	0
<i>Platyas quadricornis</i>	0,014	0
<i>Polyarthra minor</i>	0,03	0,08
<i>Polyarthra remata</i>	0,464	0,26
<i>Polyarthra vulgaris</i>	0,25	0,12
<i>Trichocerca longiseta</i>	0,019	0
Cladóceros		
<i>Alona guttata</i>	0,003	0
<i>Bosmina hagmanni</i>	0	0,04
<i>Bosmina longirostris</i>	0,018	0,01
<i>Bosminopsis deitersi</i>	0,097	0,02
<i>Chydorus eurynotus</i>	0,003	0,03
<i>Daphnia ambigua</i>	0,036	0,11
<i>Moina micrura</i>	0,129	0,01
<i>Moina minuta</i>	0,014	0
Copépodos		
<i>Metacyclops mendocinus</i>	0,066	0
<i>Notodiaptomus iheringi</i>	0	0,05
<i>Thermocyclops decipiens</i>	0,134	0,03

Os rotíferos foram classificados de acordo com seus hábitos alimentares, sendo que 60% das espécies encontradas são preferencialmente bacterívoras e predadoras (Tabela 2). A representatividade dos onívoros se deve principalmente à alta densidade de *K. cochlearis*.

Tabela 2. Lista dos taxa de rotíferos encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, famílias e hábitos alimentares.

<i>Taxa</i>	Descritor	Comprimento médio (µm)	Família	Hábito Alimentar
<i>Asplanchna priodonta</i>	Gosse, 1850	112	Asplanchnidae	R
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Pallas, 1766	200	Brachionidae	O
<i>Brachionus rubens</i>	Ehrenberg, 1838	64	Brachionidae	Ba, R
<i>Epiphanes brachionus</i>	Ehrenberg, 1837	200	Brachionidae	Ba, R
<i>Filinia longiseta</i>	Ehrenberg, 1834	120	Testudinellidae	O
<i>Filinia terminalis</i>	Plate, 1886	190	Testudinellidae	O
<i>Keratella cochlearis</i>	Gosse, 1851	125	Brachionidae	O
<i>Lecani Lunaris</i>	Ehrenberg, 1832	90	Lecanidae	O
<i>Lepadella ovalis</i>	Müller, 1786	100	Brachionidae	Ba, R
<i>Mytilina ventralis</i>	Ehrenberg, 1832	160	Brachionidae	Ba, R, Al
<i>Platyas quadricornis</i>	Ehrenberg, 1832	100	Brachionidae	Ba, R
<i>Polyarthra minor</i>	Voigt, 1904	60	Synchaetidae	R, Ba
<i>Polyarthra remata</i>	Skorikov, 1896	60	Synchaetidae	R, Ba
<i>Polyarthra vulgaris</i>	Carlin 1943	120	Synchaetidae	R, Ba
<i>Trichocerca longiseta</i>	Schrank, 1802	130	Trichocercidae	O

Al = algas; Ba = bactérias; R = predadores (de protozoários e metazoários); O = onívoros

6.2.2 Densidade de cladóceros

A densidade média de cladóceros no reservatório foi de 0,26 ind. mL⁻¹. Foram encontrados 8 taxa diferentes, todos com hábito alimentar onívoro (Tabela 3). Na coleta quantitativa de agosto de 2016, o mais abundante, foi *Moina micrura* com 43%, o segundo *Bosminopsis deitersi*, com 32,33% , seguido por *Daphnia ambigua*, com 12% do total de cladóceros. Já na coleta de agosto de 2017 o taxa mais abundante foi *D. ambigua* com 50%, seguida de *Bosmina*

hagmanni com 18,18% e *B. deitersi* com 9,09% do total de cladóceros (Tabela 1).

Os taxa foram agrupados num total de 4 famílias. A família predominante foi Bosminidae, que apresentou maior abundância de espécies (37,5%). A segunda família mais abundante foi Moinidae com 25%. A família Daphnidae, embora com apenas uma representante, teve 12% de abundância de espécies em 2016 e 16,6% em 2017 e 50% da densidade total também em 2017. Já a família Chydoridae, com duas espécies, apresentou apenas 2% da abundância total de 2016 e em 2017, com apenas uma espécie, obteve 13,63% da abundância total.

Tabela 3. Lista dos taxa de cladóceros encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, famílias e hábitos alimentares.

<i>Taxa</i>	Descritor	Comprimento médio (mm)	Família	Hábito Alimentar
<i>Alona guttata</i>	Sars, 1862	~ 0,4	Chydoridae	O
<i>Bosmina hagmanni</i>	Stingelin, 1904	~0,4	Bosminidae	O
<i>Bosmina longirostris</i>	Müller, 1785	0,23 – 0,80	Bosminidae	O
<i>Bosminopsis deitersi</i>	Richard, 1895	~ 0,25	Bosminidae	O
<i>Chydorus eurynotus</i>	Sars, 1901	0,35 – 0,48	Chydoridae	O
<i>Daphnia ambigua</i>	Scourfield, 1947	1,0 – 2,0	Daphnidae	O
<i>Moina micrura</i>	Kurz, 1874	0,5 – 1,2	Moinidae	O
<i>Moina minuta</i>	Hansen, 1899	0,37 – 0,40	Moinidae	O

O = onívoros (alimentam-se por filtração de partículas finas, bactérias, algas e detritos)

6.2.3 Densidade de copépodes

A densidade de copépodes foi de 0,14 ind. mL⁻¹, apresentando somente 3 taxa diferentes (Tabela 1). Em 2016 o mais abundante foi *Thermocyclops decipiens* (67%), seguido do *Metacyclops mendocinus* Wierzejsk, 1892 com 33% da abundância. Os dois taxa encontrados pertencem

a Ordem Cyclopoida e à família Cyclopidae, sendo de hábito algívoro e também predador (de protozoários e metazoários). Em 2017 observamos *N. iheringi*, da família Diaptomidae, pertencente à Ordem Calanoida, com hábito alimentar algívoro e detritívoro, representando 62,5% da densidade daquele período e *T. decipiens* com 37,5% (Tabela 4).

Tabela 4. Lista dos *taxa* de copépodes encontrados no reservatório do Monjolinho em agosto de 2016 e agosto de 2017, seus descritores, comprimentos médios, família e hábitos alimentares.

<i>Taxa</i>	Descritor	Comprimento médio (mm)	Família	Hábito Alimentar
<i>Metacyclops mendocinus</i>	Wierzejski, 1892	1,5 – 3,0	Cyclopidae	R, Al
<i>Notodiaptomus iheringi</i>	Wright, 1935	1,3 – 1,5	Diaptomidae	Al, D
<i>Thermocyclops decipiens</i>	Kiefer, 1929	0,9 – 1,6	Cyclopidae	R, Al

Al = algas; D = detritos e partículas finas e R = predadores (de protozoários e metazoários)

6.3 EPIBIONTES NO ZOOPLÂNCTON

A Tabela 5 mostra a abundância em porcentagem e a proporção dos organismos zooplancônicos (Rotifera, Cladocera e Copepoda) infestados por epibiontes encontrados neste estudo nos dois períodos onde ocorreram os epibiontes.

No ano de 2016, os rotíferos constituíram a proporção mais rica da amostra, com 16 espécies, depois cladóceros com 7 espécies e finalmente copépodos com apenas 2 espécies. Dos vários organismos de zooplâncton, os rotíferos foram numericamente os mais abundantes (81,48%), seguidos dos cladóceros 11,11% e por último os copépodos (7,4%). Embora tenha sido o grupo de maior densidade, dentre os rotíferos observados, nenhum apresentava epibionte. Dos copépodos ciclopóides presentes nas amostras, poucos possuíam epibiontes (apenas 7,5% dos organismos observados).

No ano de 2017, os rotíferos ainda constituíram a proporção mais rica da amostra com 12 *taxa*, seguidos dos cladóceros com 6 espécies e

copépodos com 2 espécies. A densidade de rotíferos seguiu o ano anterior constituindo 85,45% da densidade total de indivíduos, seguidos dos cladóceros, (10,67%) e por fim, os copépodos com apenas 3,87% do total de indivíduos. Dos três grupos, cladóceros foram o que apresentaram maior infestação por epibiontes (42,5% dos indivíduos), seguidos por copépodos (5% dos indivíduos) e rotíferos, também com apenas 5% infestados por epibiontes.

Dos indivíduos com epibiontes a média de zoóides por organismo na amostragem de 2016 foi de $4,96 \pm 2,83$ e na amostragem de 2017 foi de $6,51 \pm 4,26$.

Tabela 5. Abundância de cada grupo zooplanctônico e a proporção de infestação por epibionte observada em agosto de 2016 e agosto de 2017 no reservatório do Monjolinho.

	Comunidade zooplanctônica (%)		Infestação por epibiontes (n=40)	
	2016	2017	2016	2017
Rotíferos	81,48	85,45	0	5
Cladóceros	11,11	10,67	75	42,5
Copépodos	7,40	3,87	7,5	5

6.4 SÍTIOS DE LOCALIZAÇÃO DE EPIBIONTES NOS ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS

Nos cladóceros, a região corporal de maior ocorrência de epibiontes foi a região dorsal inferior, seguida da região da cabeça e da região ventral (Figura 6).

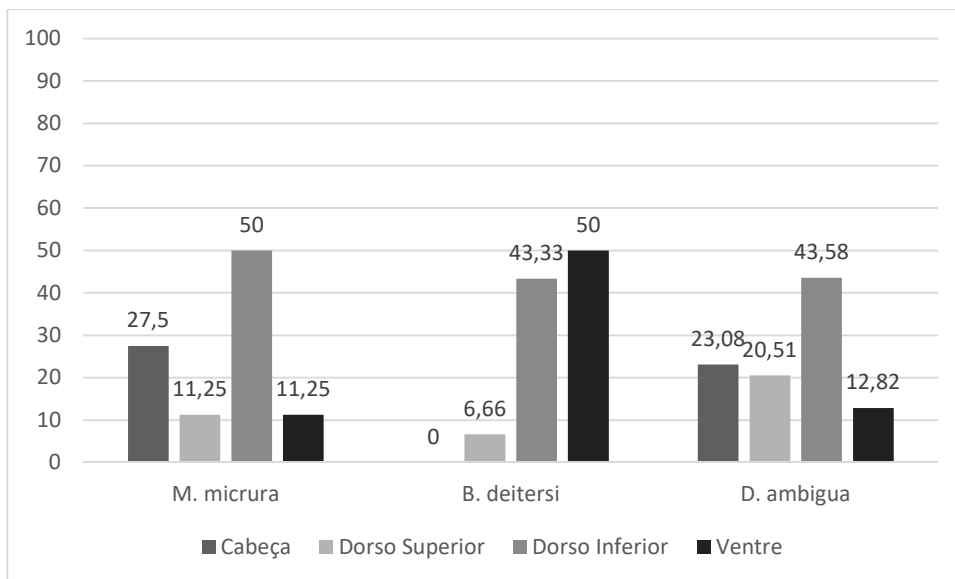


Figura 6. Distribuição da localização dos zoóides epibiontes (em porcentagem) nas diferentes regiões do corpo dos cladóceros: *M. micrura*, *B. deitersi* e *D. ambigua*.

Para *B. deitersi*, a média de zoóides por indivíduo foi 6, metade dos epibiontes observados estavam localizados na região ventral, seguida da região dorsal inferior, com 43%. Nos indivíduos observados, nenhum apresentava epibiontes na região da cabeça.

D. ambigua apresentou média de $4,87 \pm 1,88$ epibiontes por indivíduo, sendo que a maior parte dos zoóides epibiontes estavam localizados na região dorsal inferior (44%), seguida da região da cabeça (23%), que envolve antênula e antena também (Tabela 2 - Apêndice B).

M. micrura apresentou média de $4,7 \pm 3,35$ zoóides por indivíduo com metade dos epibiontes observados localizados na região dorsal inferior, seguida da região da cabeça, com 28%.

As tabelas com as distribuições dos protozoários epibiontes (*E. pygmaeum*) encontrados sobre a carapaça dos indivíduos das três espécies mais abundantes encontram-se no Apêndice B (Tabelas 1, 2 e 3).

6.5 SOBREVIVÊNCIA DE CLADÓCEROS

Para *D. ambigua*, embora o número médio de cladóceros sobreviventes após dois dias de duração do experimento com epibiontes seja levemente maior quando comparado aos experimentos com cladóceros sem epibiontes, verifica-se que não há diferença significativa entre a sobrevivência dos cladóceros com e sem epibiontes (WELCH, $p = 0,67983$). Já no quarto dia do experimento, ocorreu diferença significativa (WELCH, $p = 0,03208$) na sobrevivência dos cladóceros com e sem epibiontes. Pelo gráfico de efeitos observa-se que o número de sobreviventes com epibiontes é bem menor quando comparado ao sem epibiontes (Figura 7) .

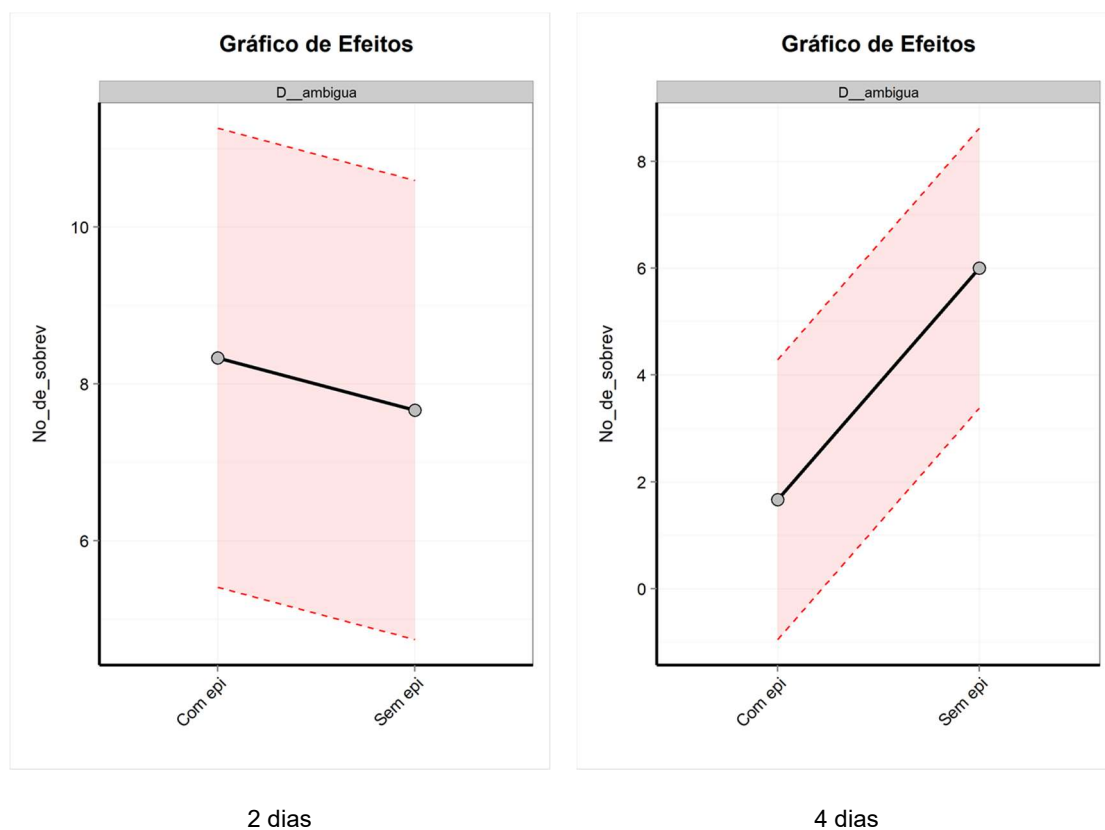


Figura 7. Gráficos de efeitos resultantes dos testes de Welch, para os dados coletados após 2 e 4 dias de duração do experimento de sobrevivência para o cladóceros *D. ambigua*. Onde: No_de_sobrev = Número médio de sobreviventes

Para *B. deitersi*, o número médio de cladóceros sobreviventes com epibiontes, com dois dias de duração do experimento, foi significamente menor

quando comparado ao dos sem epibiontes (WELCH, $p = 0,03565$). No quarto dia do experimento, também foi observado diferença significativa (WELCH, $p = 0,03267$) na sobrevivência dos cladóceros com e sem epibiontes, ou seja, desde os primeiros dias de experimento até os últimos, esta espécie de cladóceros já mostrou diferença na sobrevivência dos indivíduos quando possuíam ou não epibiontes. Os gráficos de efeitos demonstraram que o número de sobreviventes com epibiontes foi bem menor quando comparado ao número de sobreviventes sem epibiontes (Figura 8).

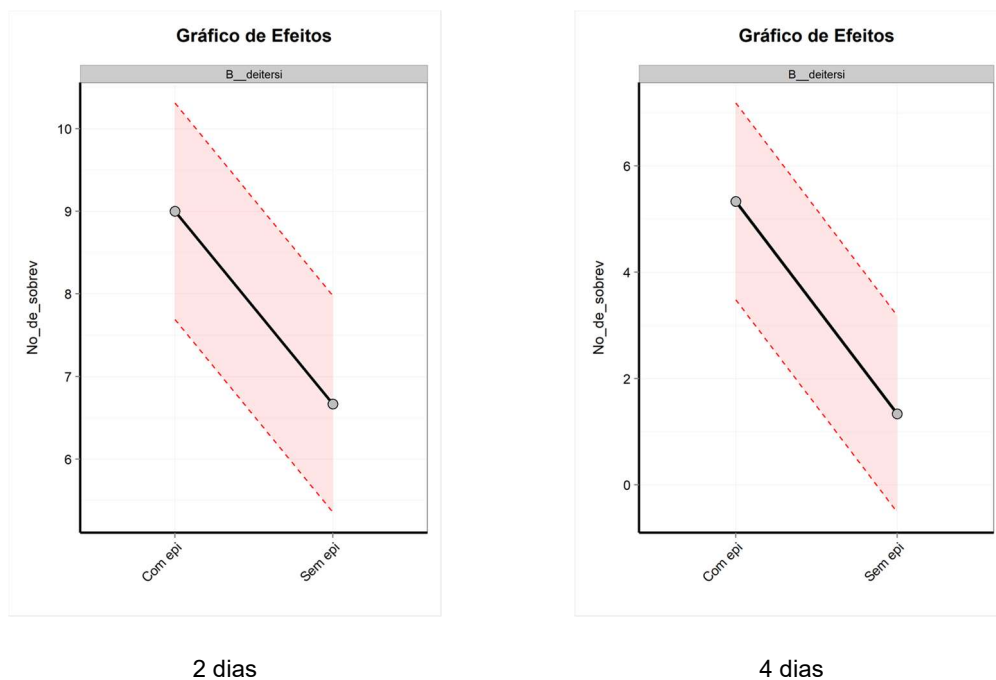


Figura 8. Gráficos de efeitos resultantes dos testes de Welch, para os dados coletados após 2 e 4 dias de duração do experimento de sobrevivência para a espécie de cladóceros *B. deitersi*. Onde: No_de_sobrev = Número médio de sobreviventes

O teste de sobrevivência dos cladóceros, teve duração de 5 dias. Após este período, todos os organismos testados morreram, tanto dos cladóceros com epibiontes aderidos quanto dos cladóceros sem epibiontes em sua superfície corporal. Os dados coletados nos 5 dias de duração do experimento para as duas espécies de cladóceros testadas encontram-se no Apêndice.

No experimento de sobrevivência realizado em placa de cultivo celular, para *D. ambigua* com epibiontes aderidos, dos 10 indivíduos iniciais sobreviveram 8 após 24h e apenas 4 após 48h. Para *D. ambigua* sem epibiontes, após 24h, sobreviveram 8 e após 48h, sobreviveram 5 indivíduos. Já para a espécie *B. deitersi*, dos indivíduos com epibiontes, após 24h, sobreviveram 9 e após 48h, sobreviveram 6; e para os indivíduos sem epibiontes, após 24h, sobreviveram 8 e após 48h, sobreviveram 6 indivíduos também.

6.6 TAXA DE DESPRENDIMENTO DO EPIBIONTE

Após a morte do basibionte, 30% dos epibiontes (*E. pygmaeum*) se desprenderam nos primeiros 5 minutos e 51,5% após 10 minutos. Desta forma, a meia vida esteve próxima aos 10 minutos. Durante o desprendimento, observamos dois tipos de formas celulares livre-natantes: zoóides natantes, que são os zoóides que se desprendem do pedúnculo, e os telotróquios, que constituem as células modificadas que aparentemente não se alimentam e nadam em busca de um substrato para adesão.

Durante o desprendimento, o ciliado realizou um movimento de balanço para se libertar da haste (Figura 9), deixando o pedúnculo ligado ao hospedeiro. Os zoóides, após se desprenderem da haste, nadavam de forma lenta e regular, em padrão espiral usando seus cílios orais, próximos ao colar peristomial. Os telotróquios (Figura 10), bem menores e com o peristômio contraído, nadavam mais rapidamente e de forma errática, usando seus cílios somáticos subequatoriais localizados na banda telotrocal.

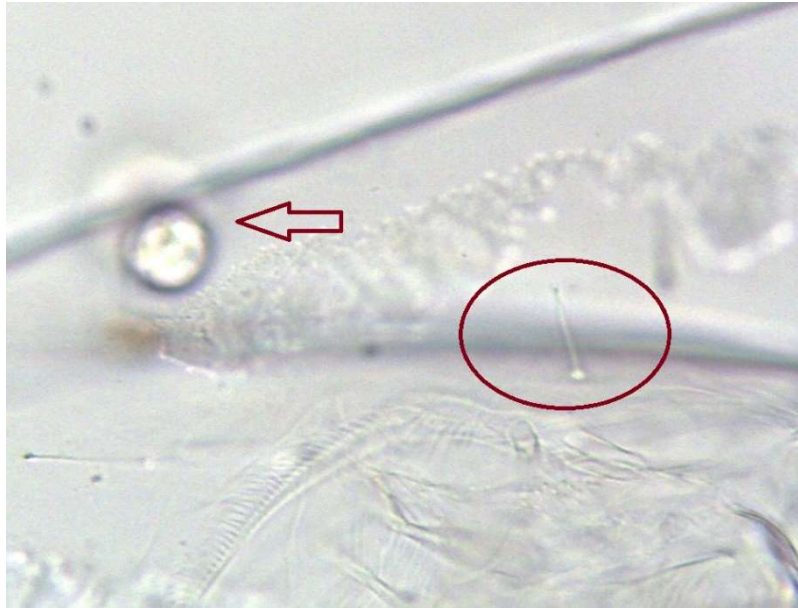


Figura 9. A seta vermelha indica o zoóide nadando próximo ao corpo do cladóceros após sua morte, o círculo mostra a haste abandonada pelo protozoário no momento do desprendimento. Fonte: Autoria própria (2017).



Figura 10. Telotróquio de *E. pygmaeum* momentos antes de se soltar do hospedeiro (*D. ambigua*), o peristômio encontra-se contraído e há o batimento dos cílios da banda telotrocal localizada logo abaixo da região mediana da célula. Fonte: Autoria própria (2017).

Após 35 min, 98,5% dos epibiontes havia se desprendido. A equação de decaimento exponencial descreve o desprendimento dos epibiontes do corpo dos cladóceros:

$$Y = Y_0 e^{k t}$$

onde:

Y = epibiontes que permaneceram aderidos ao corpo do cladóceros (em porcentagem);

Y₀ = valor inicial de epibiontes (quanto t=0);

K = constante de proporcionalidade.

Dessa forma, a função para os protozoários epibiontes que continuaram presos ao corpo cladóceros foi: $Y = 100 e^{-0,07 t}$

Em *B. deitersi*, após os primeiros 10 minutos do início do experimento, a carcaça do cladóceros possuía apenas 41,8% dos epibiontes aderidos, e após 25 minutos todos os epibiontes do início do experimento já haviam se desprendido (Figura 11).

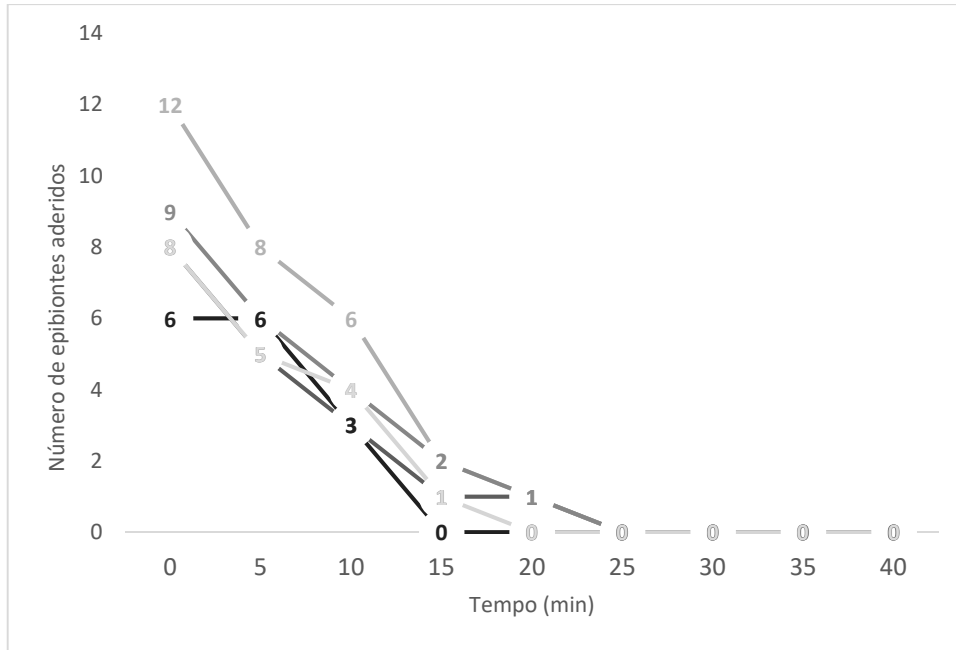


Figura 11. Número de epibiontes aderidos à carcaça de *B. deitersi* em cada intervalo de tempo (min).

Em *M. micrura* após os primeiros 10 minutos do início do experimento, a carcaça do cladóceros possuía 43,9% dos epibiontes aderidos, e após 35 minutos todos os epibiontes do início do experimento já haviam se desprendido (Figura 12).

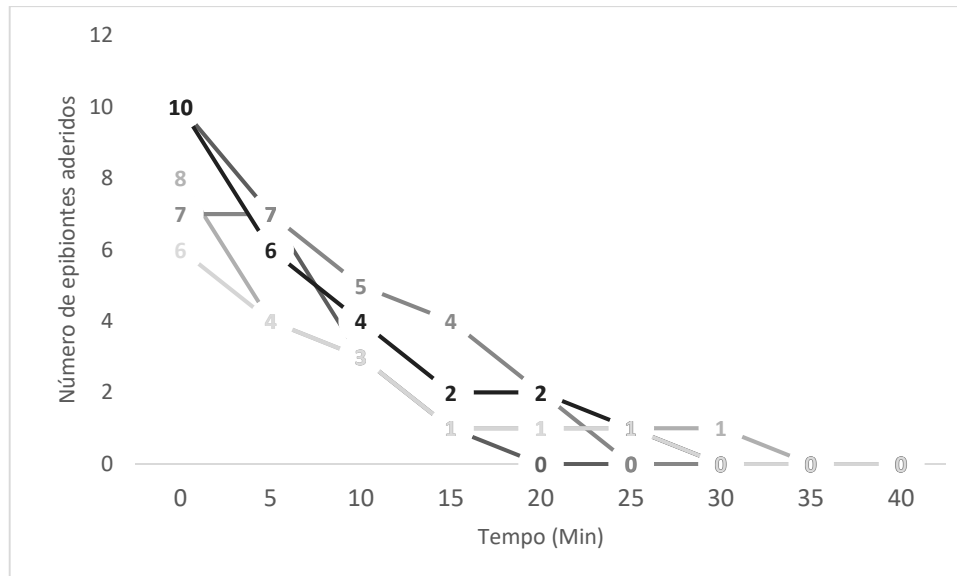


Figura 12. Número de epibiontes aderidos à carcaça de *M. micrura* em cada intervalo de tempo (min).

Para *D. ambigua* após os primeiros 10 minutos do início do experimento, a carcaça do cladóceros possuía 54,16% dos epibiontes aderidos, e após 40 minutos todos os epibiontes do início do experimento já haviam se desprendido (Figura 13).

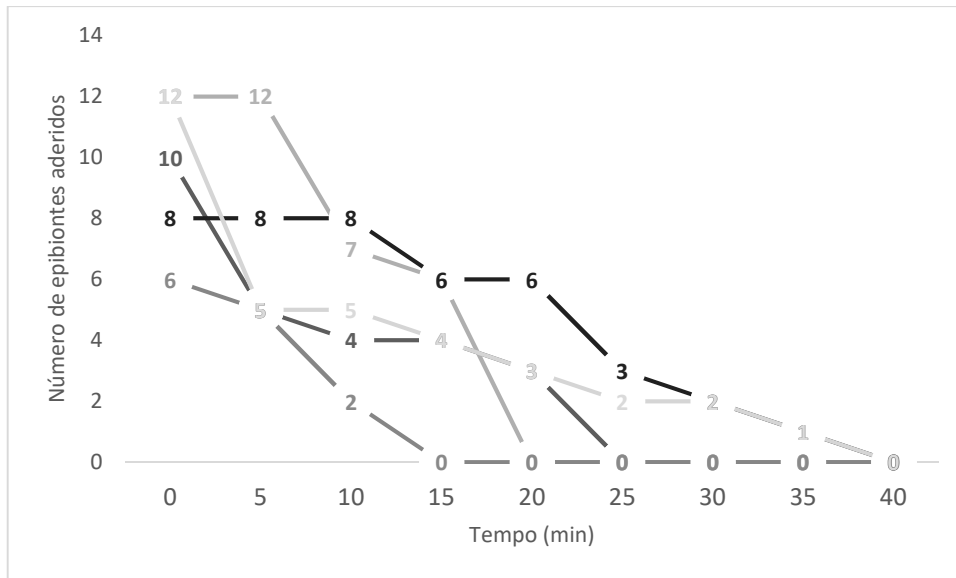


Figura 13. Número de epibiontes aderidos à carcaça de *D. ambigua* em cada intervalo de tempo (min).

A tabela 6 mostra as modificações observadas nos zoóides de *E. pygmaeum* durante sua transformação em telotróquio no tempo (min). A transformação dos zoóides ocorreu da seguinte maneira: inicialmente ocorre a contração do peristômio (Figura 14) e a modificação do formato celular passando da forma de cálice para uma forma mais globular/arredondada, em seguida há a formação da banda telotrocal e o batimento dos cílios da banda telotroquial (subequatoriais arranjados em fileiras curtas e obliquas), movimentação e desprendimento do protozoário em seu estágio de dispersão.

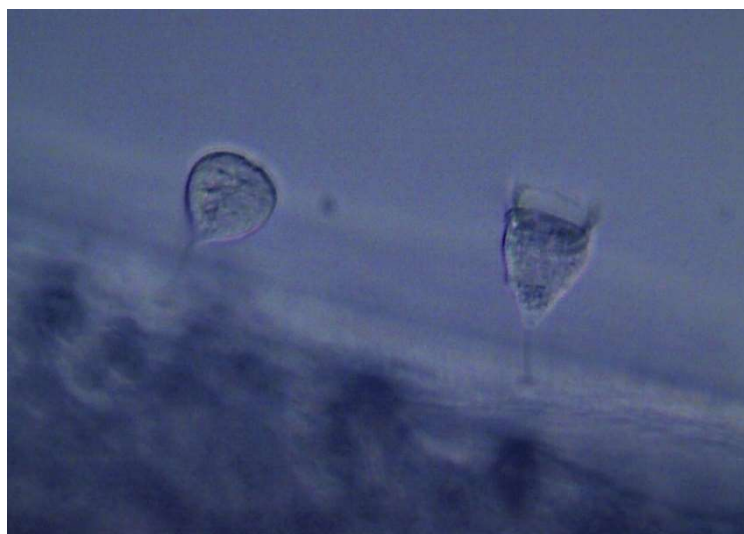


Figura 14. Dois zoóides de *E. pygmaeum* coletados no reservatório do Monjolinho sobre a superfície corporal de *D. ambigua*. O primeiro zoóide encontra-se com o peristômio contraído, o segundo encontra-se aberto com a ciliatura oral do colar peristomial batendo formando uma corrente de água. Fonte: Autoria própria (2017).

Tabela 6. Modificações do zoóide sésil de *E. pygmaeum* na transformação em telotróquio no tempo (min)

	Contração do peristômio	Formato globular	Formação da banda telotrocal	Fim da banda telotrocal	Desprendimento
Zoóide 1	7	20	22	34	41
Zoóide 2	2	6	8	26	30
Zoóide 3	1	8	10	22	23
Zoóide 4	3	8	8	19	27
Zoóide 5	4	16	16	28	33
Zoóide 6	9	13	15	19	21
Zoóide 7	6	18	23	30	35
Zoóide 8	12	20	20	28	40
Zoóide 9	5	19	22	30	36
Zoóide 10	4	10	16	22	25

Após a morte do cladóceros, a transformação da célula piriforme do epibionte *E. pygmaeus* para o formato arredondado/globular ocorreu em média 9,5 min após a contração do peristômio, a formação da banda telotroquial se deu 12,9 min após a modificação no formato celular e levou em média 9,8 min. O tempo que o telotróquio levou para se soltar da carcaça do hospedeiro após sua

transformação foi de 5,3 min. Do início da modificação celular até seu total desprendimento como telotróquio, o protozoário levou em média 31 min.

6.7 TAXA DE COLONIZAÇÃO/LIGAÇÃO DO EPIBIONTE NO BASIBIONTE

A ligação do epibionte *E. pygmaeum* à superfície corporal de *D. ambigua* ocorreu em 50% dos indivíduos nas primeiras 6h de experimento, em 83,3% colonizados em 12h decorridas do início do experimento e 100% dos indivíduos colonizados após 24h de experimento. O início da colonização sempre teve início no dorso (inferior e superior) do indivíduo, seguida do ventre e tendo a região da cabeça e apêndices sendo a última região a ser colonizada.

Em *B. hagmanni* a ligação do epibionte *E. pygmaeum* à superfície corporal do cladóceros teve início, na maioria dos indivíduos, após 12h de experimento, a colonização de 50% dos cladóceros ocorreu entre 12 e 24 horas, em apenas um indivíduo (16,6%) a colonização ocorreu entre 6 e 12h e a colonização de todos os indivíduos testados (100%) ocorreu após 48h do início do experimento. A ligação teve início, em 83,3% dos indivíduos no dorso (inferior e superior). Em um dos indivíduos (16,7%) a colonização teve início na região ventral.

Em nossos experimentos, durante as 48 horas observadas, *E. pygmaeum* não colonizou a superfície corporal nem do copépodo *T. decipiens* e nem do rotífero *A. priodonta*.

6.8 SELEÇÃO DE HOSPEDEIROS (BASIBIONTES) PELOS EPIBIONTES

Os dados de seletividade de *E. pygmaeum* em relação ao hospedeiro quando oferecemos duas opções como basibiontes são mostradas na Tabela 11 do Apêndice.

Entre os cladóceros testados, houve preferência dos zoóides livres por *D. ambigua* quando comparado à *B. hagemanni* (WELCH, $p = 0,01077$). A maior parte dos epibiontes se fixou após 12 horas do início do experimento. Entre a mesma espécie de cladóceros mas em estágio de vida distinto, houve preferência por indivíduos adultos (tanto para *D. ambigua* quanto para *B. hagemanni*). Em *D. ambigua*, após 48h do início do experimento, todos os indivíduos adultos possuíam epibiontes, com o número de zoóides variando de 1 a 7 por indivíduo, enquanto que apenas 1 indivíduo jovem possuía apenas 1 epibionte. Para *B. hagemanni*, quando testados jovens e adultos, nenhum jovem apresentou epibionte e dos 6 adultos, 5 apresentaram epibiontes aderidos, com o número de zoóides variando de 1 a 2 por cladóceros.

Ao testar a preferência de *E. pygmaeum* entre cladóceros e copépodos, tomou-se o cuidado de utilizar *Daphnia* no experimento por se tratar de uma espécie de maior porte, quando comparada às outras espécies de cladóceros presentes no reservatório do Monjolinho, para que o tamanho corporal influenciasse menos no teste, observou-se que o protozoário se ligou a 5 das 6 réplicas de cladóceros, com o número de zoóides por indivíduos variando de 1 a 5, e não se ligou a nenhum copépodo.

Ao testar a preferência do protozoário entre *B. hagemanni* e rotíferos (*K. cochlearis* e *A. priodontia*), o protozoário não se ligou a nenhuma das duas espécies de rotífero testada. Já no cladóceros, após 48h, 4 dos 6 indivíduos possuíam epibiontes, com o número de zoóides variando de 1 a 3 por indivíduo.

Nos copépodos, houve preferência pela ligação do epibionte ao saco ovífero, quando presente. Não ocorreu a ligação do epibionte à superfície das carapaças de nenhum náuplio ou copepodito. Quando houve disponibilidade como superfície para ligação copépodos adultos e náuplios, não ocorreu colonização em nenhum deles nas 6 réplicas, durante as 48h do experimento. Entre os copépodos adultos (tanto da ordem Calanoida como da ordem Cyclopoida) não constatou-se preferência e ligação de nenhum zoóide, apenas em um indivíduo Calanoida, quando o mesmo desenvolveu ovissaco durante o experimento (Figura 15). Observou-se uma forte colonização da superfície do

ovissaco e após sua eclosão, os zoóides não se ligaram ao corpo do indivíduo adulto e nem aos náuplios



Figura 15. Copéodo adulto da Ordem Calanoida com epibiontes ligados ao ovissaco. Fonte: Autoria própria (2017).

Em rotífera, duas espécies de tamanhos distintos (*A. priodonta* e *K. cochlearis*) foram testadas juntas e separadamente. Este experimento foi realizado pois *Asplanchna* é uma espécie predadora e se alimenta também de rotíferos menores, como por exemplo *Keratella*. Nas amostras de campo e durante os experimentos observou-se frequentemente *K. cochlearis* na cavidade oral de *A. priodonta*. Não foi constatado nenhum epibionte aderido à *A. priodonta* e em *K. cochlearis*, tanto quando colocadas juntas quanto separadas. Nas amostras ambientais raramente foram observados epibiontes em *K. cochlearis* e apenas quando possuíam ovos. Das 6 réplicas do experimento, houve ligação de 2 zoóides de *E. pygmaeum* em um indivíduo de *K. cochlearis* quando o mesmo estava com ovo.

6.9 BACTERIVORÍA *IN VITRO* DE *E. pygmaeum* E DE CLADÓCEROS COM E SEM EPIBIONTES

Os cladóceros (*B. deitersi*, *D. ambigua* e *M. micrura*) foram escolhidos para os experimentos de bacterivoria, pois foram encontrados diversos exemplares infestados por epibiontes, diferente dos rotíferos e copépodos observados neste estudo.

A ingestão média de bactérias (Figura 16) por *E. pygmaeum* foi maior nos ciliados em sua forma epibionte ($4,58 \pm 0,75 \times 10^3$ bactérias Indivíduo⁻¹ hora⁻¹) quando comparada à do protozoário em sua forma livre-natante ($3,45 \pm 0,64 \times 10^3$ bact. Ind.⁻¹ h⁻¹). Por outro lado, nos cladóceros (Figura 17) que carregavam protozoários em sua carapaça a ingestão média de bactérias foi menor ($2,55 \pm 0,50 \times 10^5$ bact. Ind.⁻¹ h⁻¹) quando comparada a taxa aos cladóceros sem epibiontes ($3,14 \pm 0,59 \times 10^5$ bact. Ind.⁻¹ h⁻¹). A tabela de valores contendo as espécies de cladóceros analisadas, com e sem epibiontes aderidos e as taxas de ingestão dos cladóceros e do protozoário encontram-se no apêndice.

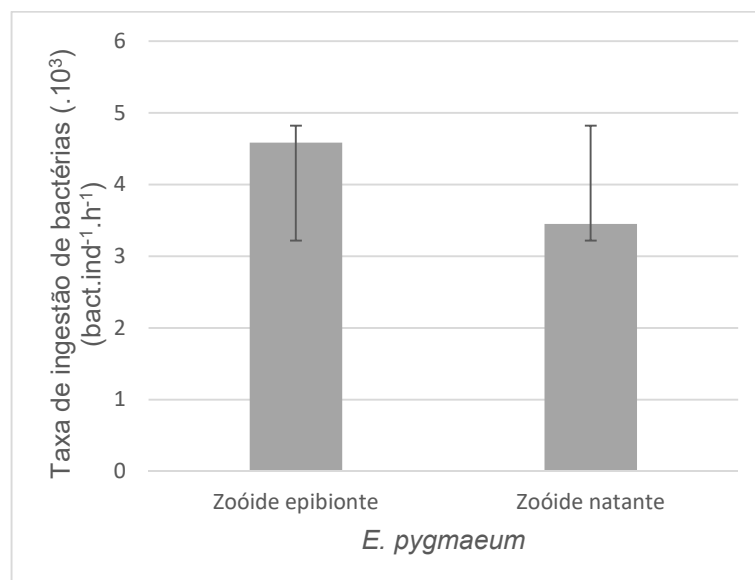


Figura 16. Bacterivoria pelo protozoário *E. pygmaeum* em sua forma epibionte e livre-natante; bactérias ingeridas por indivíduo após 30 min de incubação.

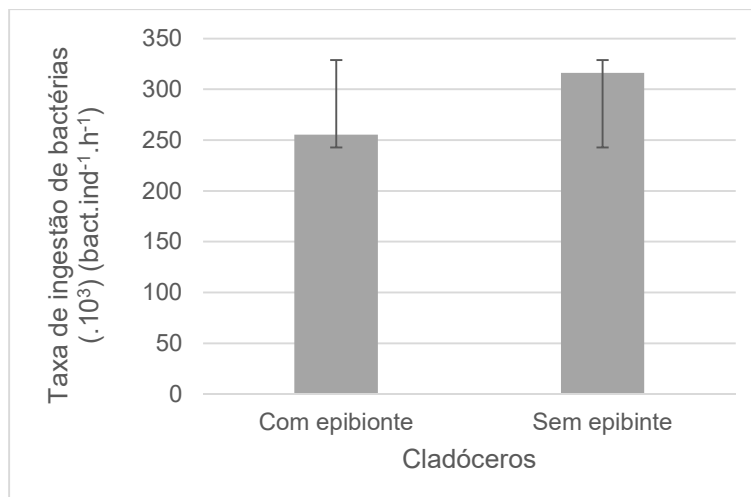


Figura 17. Bacterivoria por cladóceros com e sem infestação por epibiontes; bactérias ($\times 10^3$) ingeridas por indivíduo após 30 min de incubação.

Comparando-se o consumo médio de bactérias entre os cladóceros com e sem epibiontes (ANOVA, $p = 0,000009$) e as espécies analisadas (ANOVA, $p = 0,000024$), observa-se que há diferença significativa entre cladóceros com e sem epibiontes. Existe também diferença significativa entre as espécies de cladóceros estudadas, e não há diferença significativa entre a interação fator A e fator B (ANOVA, $p = 0,404148$), ou seja, não há diferença significativa entre a relação cladóceros com e sem epibiontes e as espécies de cladóceros. O Gráfico de efeitos (Figura 18) mostra o consumo médio de bactérias pelo cladóceros com e sem epibiontes nas 3 espécies analisadas. Pelo gráfico pode-se observar um menor consumo de bactérias por *B. deitersi* e um maior consumo por *D. ambigua*, quando comparados entre as 3 espécies estudadas, tanto nos cladóceros com epibiontes como também nos cladóceros sem epibiontes aderidos.

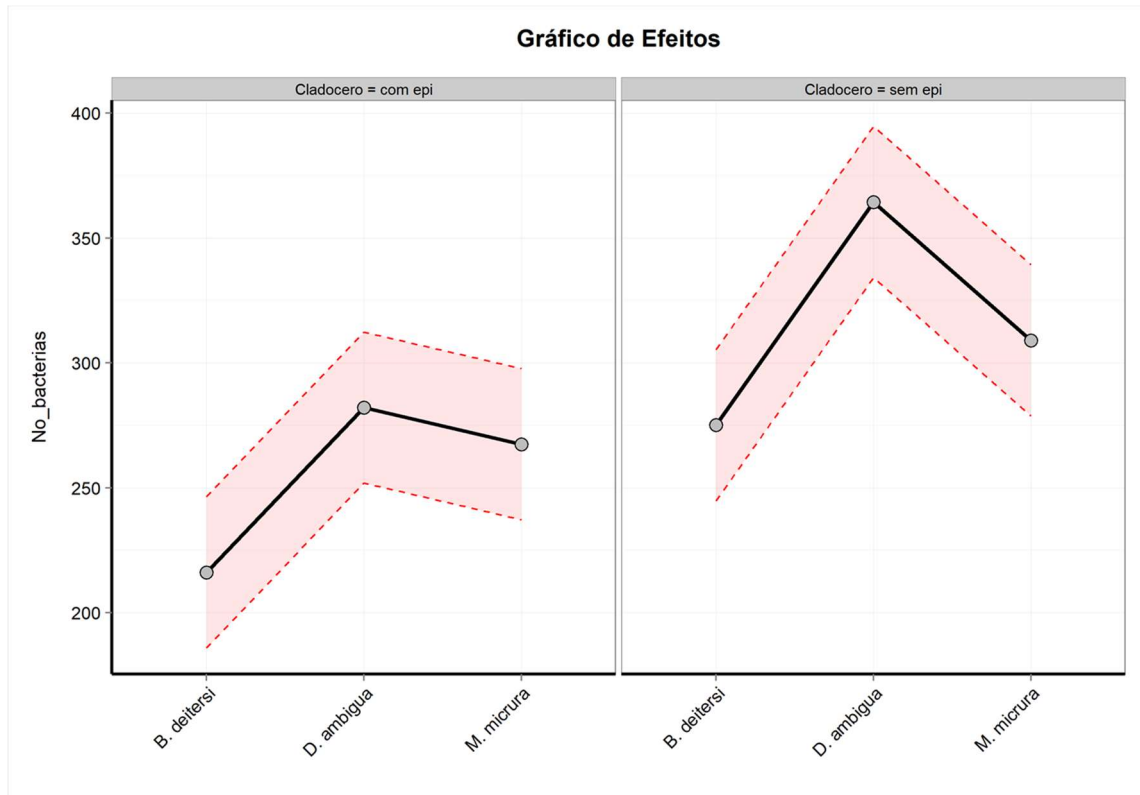


Figura 18. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao analisarmos o consumo médio de bactérias pelas três espécies de cladóceros estudadas (*B. deitersi*, *D. ambigua* e *M. micrura*) com e sem a presença do epibionte *E. pygmaeum*. No_bacterias = Número de bactérias ingeridas (10^3). Epi = epibiontes

Comparando-se o consumo de bactérias pelo protozoário, em sua forma epibionte e a livre-natante (ANOVA, $p = 0,00027$), observa-se que há diferença significativa entre elas. O gráfico de efeito (Figura 19) mostra claramente um maior número de bactérias consumidas pela espécie de protozoário estudada em sua forma epibionte. Ao testarmos se a presença do protozoário epibionte influencia no consumo de bactérias por parte dos cladóceros (ANOVA, $p = 0,01336$), notamos que existe diferença significativa, ou seja, o número médio de bactérias consumidas difere em cladóceros com e sem epibiontes (Figura 20).

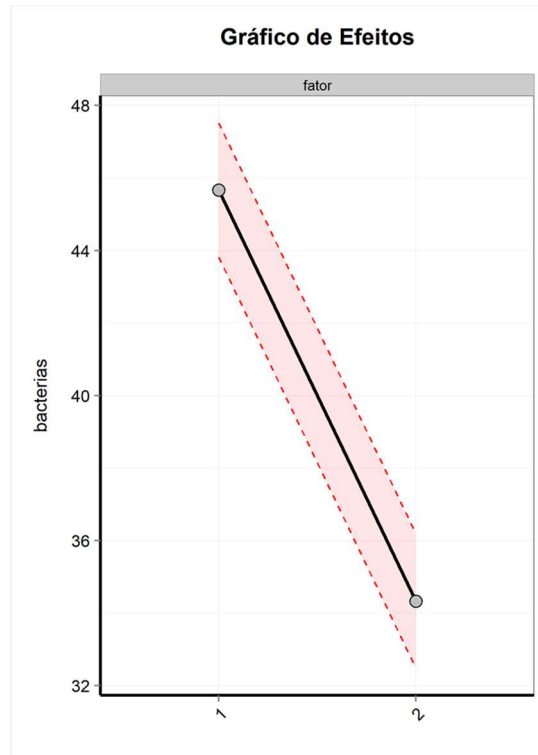


Figura 19. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao compararmos se há diferença significativa no consumo de bactérias entre a forma epibionte e a forma livre-natante do protozoário *E. pygmaeum*. No gráfico, eixo x, 1 = *E. pygmaeum* em sua forma epibionte e 2 = *E. pygmaeum* em sua forma livre-natante; eixo y, bactérias = número de bactérias consumidas x 10.

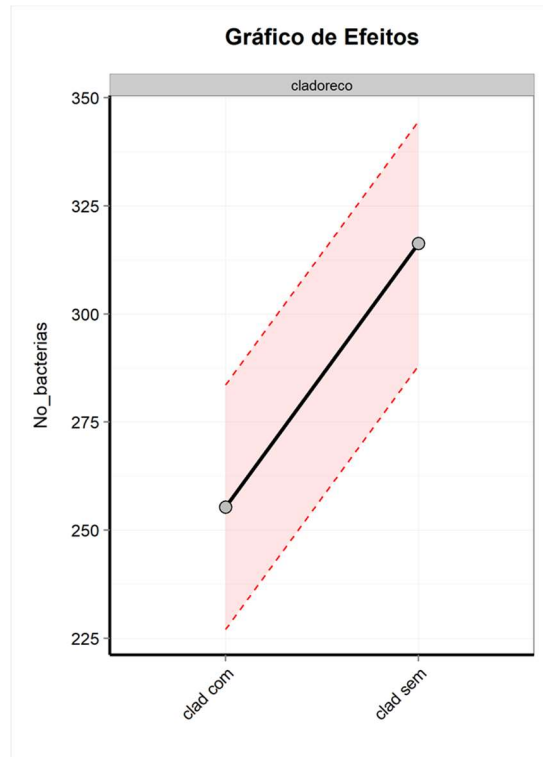


Figura 20. Gráfico de efeitos gerado pela ANOVA ao testarmos se a epibiose (ou seja, a presença de epibiontes sobre o corpo dos cladóceros) influencia significativamente o consumo de bactérias.

7 DISCUSSÃO

7.1 DENSIDADE DE BACTÉRIAS

A densidade bacteriana encontrada no reservatório do Monjolinho no ano de 2016 (3×10^6 cel. mL⁻¹) está acima do obtido por Regali-Seleghim (2001) que obteve densidade variando de 2,3 a 18×10^5 cel. mL⁻¹, sendo o valor médio anual de $5,8 \times 10^5$ cel. mL⁻¹. No entanto, o valor observado no presente estudo foi próximo ao valor encontrado por Hisatugo (2012), que obteve como média anual de $4,7 \times 10^6$ cel. mL⁻¹ ($\pm 2,3 \times 10^6$ cel. mL⁻¹), de acordo com a autora, este fato sugere que o aumento da densidade bacteriana no reservatório pode estar relacionado com um grau de trofia no sistema. Embora se observe uma tendência de sistemas com maior grau de trofia apresentarem alta produtividade bacteriana, esta deve ser contrabalançada por outros fatores, como a predação. No reservatório do Monjolinho, as comunidades bacterianas sofrem pressão de predação não apenas por nanoflagelados heterotróficos, mas também pelo zooplâncton local (REGALI-SELEGHIM, 2001; HISATUGO et al., 2014b). A pressão sofrida pelas bactérias pode ser evidenciada pelo predomínio de bactérias com morfotipo celular bacilar, uma vez que sob pressão de predadores, as bactérias tendem a modificar seu formato em resposta à predação (JÜRGENS et al., 1999) e alongar seu comprimento, tornando-se bacilares (RACY, 2004; 2005). Em estudos anteriores, Hisatugo (2012) obteve resultados semelhantes e atribuiu as maiores densidade de bacilos ao aumento das pressões de predadores.

7.2 COMUNIDADE ZOOPLANCTÔNICA

7.2.1 Densidade de rotíferos

Dentre os grupos de organismos zooplanctônicos presentes no reservatório do Monjolinho, os rotíferos foram os dominantes numericamente.

Eles são frequentemente dominantes na maioria dos ambientes aquáticos do Brasil, tanto em abundância quanto em biomassa. Coelho-Botelho (2003) associa a dominância de rotíferos (animais de pequeno porte) no plâncton com tendência à eutrofia. Em ambientes oligotróficos, mais caracterizados por uma elevada transparência da água, baixas concentrações de clorofila-*a* devido à redução da biomassa fitoplanctônica, e baixa disponibilidade de nutrientes, ocorre uma predominância de zooplâncton de grande porte, como os copépodos calanóides e os cladóceros (CUTOLO, 1998).

De acordo com Nogueira e Matsumura-Tundisi (1996), a dominância e elevada abundância dos rotíferos em ambientes tropicais e subtropicais também está provavelmente associada ao ciclo biológico de menor duração destes organismos, que atingem a maturidade mais cedo e apresentam taxas de reposição mais rápidas que a dos microcrustáceos, principalmente em reservatórios pequenos e rasos como é o caso no Monjolinho (HISATUGO, 2012). Por serem organismos oportunistas, adaptam-se com facilidade às mudanças das condições ambientais e, assim, dificilmente se encontra um padrão constante de composição e ocorrência de espécies no espaço e no tempo (RODRIGUEZ e MATSUMURA-TUNDISI, 2000).

A dominância de algumas espécies e a sua associação com o grau de trofia do ambiente já foi apresentada por diversos autores (MATSUMURA-TUNDISI et al., 1990). Espécies como *Brachionus calyciflorus*, *Filinia longiseta*, registradas neste trabalho, são potenciais indicadoras de eutrofização (SERAFIM-JÚNIOR et al., 2010), assim como *Keratella cochlearis*, cuja presença, como uma das espécies mais abundantes, indica um ambiente mais eutrofizado.

7.2.2 Densidade de cladóceros

A densidade de cladóceros encontrada ficou acima da obtida por alguns autores da literatura em reservatórios brasileiros (RAMOS et al., 2008). Em comparação com os outros grupos, a densidade de cladóceros foi próxima à

de copépodos e menor quando comparada à de rotíferos. A competição de cladóceros principalmente com rotíferos pode ser um fator regulador das populações de cladóceros no reservatório do Monjolinho, pois tanto cladóceros quanto rotíferos são animais essencialmente filtradores e competem pelo consumo de algas, bactérias e detritos (GILBERT, 1985). Fatores biológicos como a competição, intensidade de predação e composição fitoplanctônica exercem influência sobre a estrutura das comunidades zooplanctônicas, refletindo seus efeitos no número de espécies e tamanho dos organismos. Dentre os três fatores biológicos citados, a epibiose afeta diretamente dois deles: a competição é afetada tanto no que diz respeito à concorrência por alimento entre epibionte e basibionte, como também entre basibiontes; quanto à intensidade de predação, a epibiose pode afetar o hospedeiro, dificultando seu escape, bem como dificultando sua natação, contribuindo para a menor densidade dos organismos afetados.

A baixa riqueza de espécies de cladóceros é característica comum em reservatórios e pode estar relacionada à baixa estabilidade, devido aos mecanismos de funcionamento e por apresentar uma menor quantidade de habitats quando comparados a outros ambientes lênticos (PIYASIRI e JAYAKODY, 1991). A baixa diversidade de dafinídeos parece ser uma característica marcante das comunidades de cladóceros em sistemas tropicais, tanto oligotróficos quanto eutróficos. Matsumura-Tundisi (1984, 1989) encontrou apenas 10 espécies de crustáceos na lagoa do Bispo (D. Helvécio), no Parque Estadual do Rio Doce – MG, e relatou apenas três espécies do gênero *Daphnia* para todos os sistemas de água doce do Brasil, onde *Diaphanosoma* spp., *Moina* spp. e *Bosmina* sp. são os gêneros de cladóceros dominantes.

Pinto-Coelho (2005) associa a baixa diversidade de crustáceos zooplanctônicos encontrada nos reservatórios tropicais do Brasil à predação de peixes e à biogeografia. A geomorfologia e a geografia da América do Sul podem ter resultado no isolamento geográfico e influenciado na história da colonização das espécies.

Observamos 8 espécies diferentes de cladóceros com tamanho que variou de 0,20 a 2,00 mm. Houve predomínio de espécies menores como *B.*

deitersi, *B. hagmanni* e *B. longirostris*. A predominância de organismos de pequeno porte, como rotíferos e pequenos cladóceros, está associada à predação por parte de peixes planctívoros, como o lambari (*Astianax fasciatus*), que ocorre neste sistema e que pode selecionar as espécies de maior porte de Cladocera e Copepoda (NOGUEIRA e MATSUMURA-TUNDISI, 1996). A predação destes organismos maiores sobre os cladóceros também explica a menor densidade de Cladocera no estudo.

Bosminopsis deitersi é uma espécie de ampla distribuição em águas tropicais e *Bosmina longirostris* demonstra ter preferência diversa quanto à trofia do meio aquático (CUTOLO, 1998). *Moina* é um possível gênero indicador de poluição, *M. minuta* parece ser predominante em ambientes oligo-mesotróficos, enquanto *M. micrura* é mais característica de ambientes poluídos, turbidos e altamente eutróficos (ROCHA e GÜNTZEL, 1999). Ambas espécies de *Moina* foram observadas, sendo *M. micrura* mais abundante.

7.2.3 Densidade de copépodos

As densidades de copépodes encontradas no reservatório ficaram abaixo das obtidas em reservatórios brasileiros (RAMOS et al., 2008). Como 100 % das espécies de copépodos encontradas possuem hábito alimentar algívoro, sendo duas também predadoras e uma detritívora; a escassez dessas espécies, pode estar relacionada com a baixa disponibilidade de alimento.

As variáveis como tempo de residência da água, turbulência e presença de macronutrientes, além dos fatores climáticos, exercem forte pressão de seleção sobre a comunidade planctônica (NOGUEIRA, 1990). A baixa densidade de copépodos (apenas 3 espécies durante o período de estudo), assim como de cladóceros, pode ser explicada por características do reservatório do Monjolinho, como a instabilidade e homogeneidade, que permitem a predominância de grupos zooplancônicos com um ciclo de vida mais curto, como os rotíferos (REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004). A densidade de rotíferos, cladóceros e copépodos no nosso trabalho corroboram esta

hipótese; sendo os rotíferos (ciclo de vida curto) os mais abundantes e os copépodos (ciclo de vida mais longo dentre os três) os menos abundantes.

Outra teoria que explica as menores abundâncias de organismos zooplanctônicos de grande porte, é a ocorrência de intensa predação por peixes planctívoros, que selecionam presas maiores de zooplâncton, provocando modificações na estrutura da comunidade, induzindo à dominância de formas menores (OKANO, 1994; NOGUEIRA e MATSUMURA-TUNDISI, 1996). É importante lembrar que náuplios não foram quantificados e que a abundância de copépodes corresponde apenas às formas adultas destes organismos. Por serem de grande porte, os adultos são mais selecionados como presa de organismos maiores, diminuindo a densidade de copépodes adultos em decorrência desta predação (PINTO-COELHO, 2005).

A composição zooplanctônica encontrada neste estudo foi semelhante as espécies de rotíferos, cladóceros e copépodos relatadas por Regali-Selegim e Godinho (2004) e Hisatugo (2012), entretanto a diversidade de espécies encontrada foi menor quando comparada aos estudos citados, isso se deve provavelmente ao levantamento apenas de um período a cada ano deste trabalho e não anualmente.

7.3 TEMPORALIDADE DA OCORRENCIA DE EPIBIONTES

A ocorrência de *E. pygmaeum* no final da estação seca (julho e agosto) do ano de 2016 e agosto, setembro e outubro de 2017 pode estar relacionada com o aumento do suprimento de alimentos para os diferentes componentes da cadeia alimentar. Regali-Selegim e Godinho (2004) relataram em seu trabalho que a população de epibiontes segue o aumento da densidade bacteriana no período de floração algal, e também está associada às densidades altas de zooplâncton, possivelmente devido ao aumento da superfície de adesão. A epibiose permite o crescimento normal das populações hospedeiras quando presente, mas não em infestações severas. A alta incidência de infestação pode ser um agente de controle direto e / ou indireto que influencia a

sucessão sazonal das populações zooplanctônicas (REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004).

7.4 DENSIDADE DE EPIBIONTES

O epibionte *E. pygmaeum* foi encontrado em uma variedade de organismos zooplanctônicos em diversos estágios de vida, entretanto parece haver alguma preferência em relação aos cladóceros. Tanto no ano de 2016, com 75% de infestação, como no ano de 2017, com 42,5%, os cladóceros tiveram maior infestação por epibiontes, enquanto apenas 7,14% e 5% em copépodos carregavam epibiontes e 5% em rotíferos apenas no ano de 2017. Bickel et al. (2012) ao estudar epibiose por *Epistylis* sp em nove lagos da Alemanha, observaram baixo grau de especificidade do hospedeiro que colonizou copépodos e cladóceros, entretanto notaram diferenças na ocorrência de epibiontes entre as espécies de zooplâncton no mesmo lago, e entre os diferentes lagos para as mesmas espécies de zooplâncton. Como cladóceros e copépodos são cobertos por carapaça quitinosa, é pouco provável que a diferença de prevalência seja resultado de diferenças na química de superfície corporal. Em experimentos de laboratório, Gilbert e Shroder (2003) mostraram que *E. pygmaeum* aderiu preferencialmente a algumas espécies de zooplâncton, mas outras não, mas a causa permaneceu desconhecida.

Em um estudo realizado por Bozkurt e Genc (2009), no qual relataram pela primeira vez a presença de *Epistylis* sp sobre o zooplâncton do Rio Asi, na Turquia, foi registrado a ocorrência deste epibionte em apenas 2 dos 58 taxa encontrados de rotífera. Segundo estes autores, os organismos maiores são alvos mais fáceis para os epibiontes, quando comparados aos menores, mesmo que estes sejam mais abundantes. Seleghim e Godinho (2004) alegaram que a infestação está associada à superfície corporal disponível para adesão oferecida por cada grupo (tamanho do hospedeiro e área disponível) e também com a duração dos seus ínstares. Além disso, de acordo com Threlkeld et al. (1993), a relação positiva entre a carga de infestação e o tamanho corporal do

organismo pode ser explicada, pois, os organismos maiores são alvos mais fáceis para epibiontes passivamente e aleatoriamente dispersos.

Nas amostras ambientais deste estudo, *Epistylis* foi encontrado mais comumente em indivíduos adultos do zooplâncton, fato já observado por Sherman e Schaner (1965). Esses autores declararam que a falta de *Epistylis* nos estágios mais jovens de copépodos poderia ser devido à ecdise, o que efetivamente remove os epibiontes que estavam presos à exúvia.

7.5 SÍTIOS DE LOCALIZAÇÃO DOS EPIBIONTES NOS ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS

A escolha dos sítios de localização no corpo do basibionte normalmente não ocorre de forma aleatória e sim determinada pelas necessidades ecológicas do epibionte, bem como pelo comportamento, biologia e fisiologia do basibionte. Os peritríqueos epibiontes tendem a colonizar com maior frequência regiões expostas a um maior suprimento de oxigênio e alimento, e que forneçam proteção contra danos mecânicos causados pela movimentação dos hospedeiros (COOK et al., 1998; DIAS et al., 2009; HANAMURA, 2000; REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004; UTZ e COATS, 2005). Ao colonizarem a superfície de basibiontes com corpos segmentados, tal como crustáceos, os peritríqueos tendem a se estabelecer em regiões de baixa mobilidade como o cefalotórax e o abdômen (UTZ e COATS, 2005), com maior aderência e oxigenação como antenas, antênulas e pereiópodes (MAYÉN-ESTRADA e ALADRO-LUBEL, 2002), e sujeitas à menor abrasão durante a movimentação do basibionte como a região ventral em anfípodas (FERNANDEZ-LEBORANS et al. 2006). Em nosso estudo, foi observada colonização diferencial entre os sítios, apesar da ocorrência de peritríqueos epibiontes em praticamente todas as regiões do corpo dos cladóceros. A distribuição esteve mais concentrada em sítios situados na região dorsal inferior, que pode estar relacionada à baixa mobilidade e pode sugerir determinada proteção à raspagem ou fricção por parte do basibionte. Já o segundo sítio de localização mais ocupado, a região da cabeça, que engloba as antênulas e antenas, há

controvérsias em relação à vantagem ou desvantagem da fixação neste local. O movimento da água realizado através dos apêndices pode fornecer um maior suprimento de oxigênio e alimento, por outro lado, os epibiontes podem ser perdidos através do desgaste causado pelos movimentos destes apêndices (REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004). De acordo com Green (1974), o movimento frequente da antena do hospedeiro interrompe a alimentação dos peritríquios epibiontes, pois causa a contração dos zoóides.

No cladócero *B. deitersi* a região mais infestada por epibiontes foi a região ventral. Dias et al. (2009) ao estudar sítios de localização de protistas peritríquios epibiontes sobre ninfas de *Kempnyia klapalek* encontrou *Epistylis* sp. localizados predominante na região ventral e relacionou a colonização preferencial em locais mais oxigenados e com menor atrito, tal como relatados por outros estudos (ROBERTS e CHUBB, 1998; DIAS et al., 2007; DIAS et al., 2009).

As associações epibióticas podem modificar as interações do basibionte com o meio em que ele vive, atuando como agente controlador da população de hospedeiros, comprometendo a sua fecundidade e sobrevivência (GILBERT e SCHRÖDER, 2003; HENEBRY e RIDGEWAY, 1979; WAHL, 1989; WAHL et al. 1997). A elevada intensidade de infestação, em alguns casos, pode reduzir a velocidade de locomoção do cladócero, devido ao aumento da superfície de atrito com a água e do sobrepeso. A presença de formas coloniais, pode aumentar a visibilidade do basibionte aos predadores tornando-os mais susceptíveis à predação.

7.6 SOBREVIVÊNCIA DOS CLADÓCEROS

No que se refere à sobrevivência do basibionte na presença ou ausência do epibionte, para *D. ambigua* (espécie de maior porte), a influência do epibionte parece ter sido menor quando comparada a *B. hagmanni* (espécie de porte pequeno). Esta diferença pode ser observada pela análise estatística para a espécie maior, logo nos primeiros dias de experimento. Não havia diferença significativa entre as dáfnias com e sem epibiontes, entretanto, para a espécie

de menor porte, houve diferença significativa logo nos primeiros 2 dois dias de experimento. Em ambientes naturais, os ciliados epibiontes raramente causam a morte de seus basibiontes, mas podem causar doenças provenientes das incrustações superficiais e das altas infestações, tipicamente sob condições estressantes (LIGHTNER, 1996). Essa influência, embora não leve a óbito o basibionte, afeta indiretamente a sua sobrevivência.

O teste de sobrevivência dos cladóceros teve duração de 5 dias, pois, após este período, 100% da metade dos organismos testados morreu, tanto dos cladóceros com epibiontes aderidos quanto aqueles sem, mesmo tendo fatores como fotoperíodo, temperatura e alimentação controlados. Tendo a morte dos indivíduos ocorrido tanto com basibiontes com epibiontes, como sem, o alto índice de óbito dos indivíduos parece estar mais relacionado à qualidade da água de cultivo, do que à epibiose propriamente dita.

Uma outra forma da epibiose afetar a sobrevivência do basibionte no ambiente é que, os adultos fortemente infestados podem ter um maior risco de predação do que os menos infestados ou sem infestação de epibiontes, uma vez que os epibiontes aumentam o tamanho aparente dos indivíduos e os tornam visíveis aos peixes predadores. Willey et al. (1990) demonstraram que a prevalência de *Colacium vesiculosum* em *Daphnia spp.* foi significativamente menor nos tanques experimentais que continham peixes comparados aos tanques de controle, sugerindo que os epibiontes tornaram o hospedeiro mais suscetível à predação, aumentando o tamanho e o contraste do mesmo. Além disso, os epibiontes podem afetar o comportamento de natação e os movimentos de escape, aumentando as forças de arrasto e tornando os hospedeiros também mais suscetíveis aos peixes (WILLEY et al., 1990; CHIAVELLI et al., 1993).

7.7 TAXA DE DESPRENDIMENTO DO EPIBIONTE

O comportamento do epibionte referente ao seu vertiginoso desprendimento após a morte do basibionte sugere que o epibionte possui a capacidade de detectar rapidamente uma alteração na condição do hospedeiro, que faz com que a adesão não seja mais vantajosa. Utz e Coats (2005)

sugeriram que alguns sinais químicos ou elétricos podem percorrer a haste do epibionte até o zoóide. Alterações deste tipo podem ocorrer durante a ecdise ou após a morte do cladóceros e desencadear o desprendimento. Neste estudo, o número de epibiontes aderidos aos cladóceros diminuiu exponencialmente após sua morte. Em experimento realizado por Bickel et al. (2012) com *Epistylis* sp. e o copépodo calanóida *Eudiaptomus gracilis* este mesmo comportamento foi observado, também no ciliado marinho *Zoothamnium intermedium* que se despreendeu dos copépodos calanoides *Acartia tonsa* e *Eurytemora affinis* (UTZ, 2008). Os epibiontes em nosso estudo tiveram uma "meia-vida" de separação de 10 min; isto é, cerca de 50% dos epibiontes se separaram dentro de 10 min após a morte do hospedeiro e 98% se destacaram dentro de 30 min, intervalo de tempo bem próximo ao observado por Bickel et al. (2012), que relataram meia-vida de 5 min. Em contraste, *Z. intermedium* despreendeu-se com uma taxa muito mais baixa: 50 e 90% após 3 e 7 h após a morte do hospedeiro, respectivamente (UTZ, 2008).

Gilbert e Shröder (2003) observaram dois padrões de natação distintos entre os diferentes estágios de vida de *E. pygmaeum* na sua forma móvel: (I) zoóides separados nadando lentamente em um padrão circular, e (II) telotróquios rápidos e de natação errática. Eles sugeriram que *Epistylis* possui a capacidade de alternar entre as duas formas. No nosso estudo também observamos os dois tipos celulares e seus respectivos padrões de natação, sendo os zoóides livre-natantes os primeiros a se desprenderem do hospedeiro e posteriormente os telotróquios. Bickel et al. (2012) descreve uma diferença temporal entre a ocorrência das duas formas natantes, e atribui este ocorrido como resultado do tempo necessário para mudanças fisiológicas durante a transformação da forma sésil para zoóide livre e/ou telotróquio. Nossos resultados corroboram essa afirmação, uma vez que o desprendimento da maioria dos zoóides livre-natantes ocorreu nos primeiros minutos e o desprendimento dos telotróquios foi observado posteriormente, após a transformação de suas células.

A existência de dois tipos de células móveis e a possibilidade de transformação é importante para a espécie, pois sugere-se que a forma de

telotróquio de natação rápida não se alimenta e funciona principalmente como uma maneira de encontrar novos sítios (*hosts*), enquanto que o zoóide lento e de natação livre pode se alimentar e se reproduzir, permitindo que as populações persistam quando os hospedeiros são raros (GILBERT e SHRÖDER , 2003).

Quanto à diferenciação celular em *E. pygmaeum*, assim como pesquisas com outras espécies peritriquidas (NENNINGER, 1948; GUHL, 1979), mostraram que os zoóides sésseis podem produzir telotróquios (via 3 da Figura 1, via transformação ou divisão celular) e zoóides livre-natantes (via 2 da Figura 1, via desprendimento ou divisão celular). Nosso estudo demonstrou que os zoóides sésseis de *E. pygmaeum* também produzem os dois tipos de células móveis observadas nas populações desta espécie.

Segundo Matthes e Scheubel (1970), zoóides sésseis de *Epistylis galea* podem se transformar diretamente em telotróquios, já Guhl (1979) afirma que a formação do telotróquio é precedida por uma divisão celular. Neste estudo observamos que os telotróquios de *E. pygmaeum* podem ter origem da diferenciação celular das células sésseis (via transformação), não havendo necessidade da divisão celular.

É provável que apenas telotróquios possam se ligar aos hospedeiros e metamorfosear em zoóides sésseis, entretanto, Gilbert e Schroder (2003) relataram a possibilidade de que zoóides livre-natantes também possam fazer o mesmo. A capacidade de *E. pygmaeum* para se reproduzir como células móveis e de vida livre deve facilitar muito a dispersão e a manutenção da população, especialmente se os hospedeiros forem raros. Se um telotróquio produzido a partir de um zoóide sésil não conseguir localizar um hospedeiro, ele pode se transformar em um zoóide livre-natante que pode se alimentar e se multiplicar para produzir tanto zoóides livre-natantes como telotróquios. Desta forma, uma população de vida livre poderia crescer e produzir periodicamente telotróquios para localização e colonização do hospedeiro.

7.8 TAXA DE COLONIZAÇÃO/LIGAÇÃO DO EPIBIONTE

A localização do protozoário no hospedeiro é específica e não aleatória. Os motivos da especificidade dos protozoários para os locais de colonização em seus hospedeiros são diversos e estão principalmente relacionados aos hábitos do hospedeiro. As correntes de água formadas pelos hospedeiros que transportam partículas de alimentos são amplamente exploradas pelos epibiontes (MORADO e SMALL, 1995). Observamos o início da colonização em *D. ambigua* ocorrer em um intervalo de tempo menor, quando comparada à *B. hagmanni*. Uma das razões para a infestação em animais maiores é o tamanho da carapaça, que serve como substrato para o epibionte, com mais área superficial disponível para fixação (OVERSTREET, 1983), além disso, com áreas maiores, o encontro do epibionte ao substrato para fixação é dedutivamente facilitado e mais rápido.

Com relação ao local de colonização, observamos com frequência a colonização tendo início na região dorsal em *D. ambigua* e na maioria das *B. hagmanni* também na região dorsal. Posteriormente, outras regiões também foram colonizadas, o que sugere que os protozoários, além de distinguir, são capazes de selecionar o local da fixação, o que reforça a ideia de que a colonização não é meramente ocasional.

De acordo com literatura, os epibiontes fixam-se aos locais no hospedeiro onde as chances de obter alimentos são maiores. *E. pygmaeum* foi observado em toda carapaça dos cladóceros, com alguns sítios de localização favoritos, mas não colonizou o pós-abdomen de nenhum deles, sugerindo que a fixação necessita de um substrato mais duro e/ou menos flexível. Além disso, a colonização preferencial observada em *E. pygmaeum* não demonstrou, aparentemente, estar relacionada à disponibilidade de alimentos, mas pode estar relacionada ao tipo de superfície, e à mobilidade das partes do corpo do hospedeiro. A baixa intensidade de infestação nas antenas, que são usadas pelo cladóceros para natação e alimentação, prova que os epibiontes são capazes de se ligarem à essas partes do corpo, principalmente em grandes infestações, e podem crescer, mas raramente formam colônias. A baixa densidade de colônias nas partes móveis indica que são mais difíceis de serem colonizadas quando

comparadas ao dorso ou ventre, e também podem se desprender devido ao atrito (RAJABUNIZAL e RAMANIBAI, 2011).

7.9 SELEÇÃO DE HOSPEDEIROS (BASIBIONTES) PELOS EPIBIONTES

A colonização do basibionte geralmente acontece ao acaso, entretanto, observavou-se que *E. pygmaeum* é capaz de escolher, o basibionte durante o processo de colonização. Além do hospedeiro, a fixação das células móveis parece ser controlada pelo reconhecimento de alguma propriedade/característica da superfície que pode estimular ou inibir a fixação. Os experimentos de seleção de hospedeiro demonstraram que *E. pygmaeum* pode se ligar à uma variedade de organismos do zooplâncton, em especial cladóceros. As células móveis de *E. pygmaeum* estabeleceram-se fortemente em *D. ambigua* e *B. hagmanni* e nos sacos ovígeros de copépodos, mas elas demonstraram ser menos propensas a se instalar na superfície corporal de copépodos e rotíferos. Dentre as duas espécies testadas houve preferência por *D. ambigua* quando comparada à *B. hagmanni*, assim como por cladóceros adultos quando comparados às suas formas jovens. Esta preferência observada pode estar mais relacionada ao tamanho corporal dos indivíduos hospedeiros e assim maior superfície disponível para ligação do epibionte; além disso, no ambiente, constata-se menos cladóceros em suas formas juvenis contendo epibiontes por sofrem mudas mais frequentemente, abandonando sua carapaça antiga periodicamente.

Nos experimentos com copépodos verificou-se uma preferência muito forte pelos ovissacos, em todos os testes de seleção de hospedeiro com copépodos, tanto ciclopóidas quanto calanóidas, os zoóides raramente se ligavam ao corpo dos copépodos. Este fenômeno ocorreu para adultos, copepoditos e náuplios, entretanto os zoóides se ligaram fortemente aos sacos ovígeros. O mesmo padrão foi observado nas amostras ambientais. Em apenas duas ocasiões, os zoóides foram encontrados no corpo de copépodos, um indivíduo de *T. decipiens*, coletado do ambiente e um calanóida *N. iheringi* do

teste de ligação durante o último dia do experimento, no entanto, os zoóides foram observados ligados ao corpo das fêmeas somente quando elas carregavam sacos ovíferos. Nos experimentos de seleção de sites e hospedeiros, as células móveis preferiram se unir somente quando o hospedeiro deste grupo possuía ovos. Após a eclosão do ovissaco e liberação dos náuplios, os zoóides não se ligaram ao corpo da fêmea e nem aos náuplios. Nenhum copépodo juvenil testado apresentou zoóides sobre sua superfície corporal, enquanto que 100% dos adultos ovíferos tinham zoóides.

Os Copepoda apresentam ciclo de vida com reprodução sexuada obrigatória; os ovos fertilizados eclodem em estágios larvais de vida livre, os náuplios. Um número variável de ovos após o cruzamento é depositado no interior de um ovissaco preso ao segmento genital feminino (MELÃO, 1999). O desenvolvimento ocorre inteiramente no plâncton, passando por diversos estágios de desenvolvimento, sofrendo uma ecdise em cada estágio. Do ovo nasce o náuplio que passa por seis ínstaes (náuplios 1, 2, 3, 4, 5 e 6) para se transformar no estágio de copepodito, que passa também por seis ínstaes (copepoditos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) atingindo neste último a fase adulta. Após estas fases o crescimento cessa e os adultos não sofrem mais ecdises (mudas) como ocorre com os cladóceros e outros grupos de crustáceos. As bolsas ovíferas de copépodos se rompem rapidamente, fornecendo assim um substrato muito mais temporário que o corpo do crustáceo. Por exemplo, o tempo de desenvolvimento dos ovos para *N. iheringi* em cerca de 25 ° C é relatado como sendo cerca de 1,75 dias (OKUMURA, 2011) em contraste, a vida média desses copépodos é de cerca de 20 dias. Embora Foissner et al. (1999) descrevam *E. pygmaeum* como bacterívoro, é provável que também seja capaz de ingerir pequenas partículas de matéria orgânica excretada pelo hospedeiro. Assim, ainda que os ovissacos dos copépodos forneçam apenas um substrato provisório, eles são presos ao seguimento genital feminino e podem estar em um local onde o alimento é especialmente concentrado. Além do mais, o material que compõe os ovissacos não é tão quitinoso e rígido quanto o resto do corpo, provavelmente deve ser de um material mais sujeito ao ataque enzimático bacteriano e, portanto, deve possuir mais bactérias na superfície e no entorno.

Proporcionando, por conseguinte, mais alimento próximo dos zoóides de epibiontes. As partículas de matéria orgânica do saco são enriquecidas de bactérias que podem servir como alimento para os epibiontes, assim como a própria matéria orgânica particulada.

O comportamento de seleção de *Epistylis sp* no zooplâncton explica o desenvolvimento de zoóides com tamanhos diferentes de hastes e colônias. Os zoóides fixados aos ovissacos normalmente são individuais e possuem hastes curtas. Provavelmente isso ocorre porque os sacos ovígeros possuem curto tempo de desenvolvimento, portanto, fornecem substrato mas dão aos zoóides pouco tempo para o desenvolvimento do talo e a divisão em colônias. Além disso, pela maior proximidade com as bactérias aderidas à superfície do saco ovígero e se beneficiando também daquelas que eventualmente se desprendem do mesmo. Esses organismos podem ser facilmente interpretados como pertencentes ao gênero *Rhabdostyla* (FOISSNER et al., 1999). Por outro lado, os zoóides anexados ao corpo dos cladóceros adultos têm um substrato mais permanente, pois os adultos geralmente vivem por mais de uma semana a 25 ° C. Assim, os zoóides podem desenvolver hastes longas e se dividir formando colônias ramificadas (GILBERT e SCHRÖDER, 2003).

Durante o trabalho raramente foi observado *E. pygmaeum* aderido ao corpo dos rotíferos e, quando presentes, estes carregavam ovos. Ilustrações publicadas por Foissner et al. (1999) que mostram muitos zoóides no corpo de uma fêmea de *Brachionus* adulta, provavelmente *B. angularis*, mas nenhum no ovo, contrapõem os dados obtidos por Gilbert e Schröder (2003), que apontaram uma forte preferência de *Epistylis* pelos ovos de *Brachionus*. Os resultados do nosso teste de preferência, onde os protozoários não se ligaram aos corpos dos rotíferos, fato que ocorreu apenas em um exemplar, quando o mesmo apresentou ovo, reforçam os resultados de Gilbert e Schröder (2003). Além disso, ainda em seu trabalho eles supõem que as condições experimentais utilizadas podem ter superestimado a tendência natural de *E. pygmaeum* de se instalar nos locais e *taxa* menos preferidos (utilizou densidade acima de 50 – 100 cel. mL⁻¹; no nosso trabalho, utilizamos a concentração de zoóides próximas à

concentração de protozoários ciliados encontrados no ambiente onde foram coletados; 7 a 31 ind. mL⁻¹). Há ainda possibilidade dos rotíferos predarem as células móveis de *E. pygmaeum* pois Gilbert cita como exemplo a raridade de células móveis deste protozoário em uma grande cultura de *B. calyciflorus* e associa à grande habilidade do rotífero de ingerí-las.

Os locais (dorso inferior e superior da superfície corporal dos microcrustáceos) e os hospedeiros (cladóceros adultos) selecionados apontados no presente trabalho foram freqüentemente colonizados mais fortemente e antes que os outros comesçassem a ser colonizados. A colonização extensiva em substratos preferidos pode inibir a colonização adicional nesses substratos e induzir as células móveis a se ligarem também aos locais menos elegidos, pela falta de espaço disponível. No meio ambiente, alguns locais escolhidos podem ser menos propensos a serem fortemente colonizados devido a baixas densidades de telotróquios ou células livre-natantes ou pela disponibilidade de sítios e hospedeiros preferidos.

7.10 BACTERIVORIA IN VITRO DE *E. pygmaeum* E DE CLADÓCEROS COM E SEM EPIBIONTES

A associação a um hospedeiro é um comportamento adaptativo que pode resultar no aumento das taxas de alimentação (CHRISTENSEN-DALSGAARD e FENCHEL, 2003; JONSSON et al., 2004). No entanto, existem também desvantagens pois restringe o movimento do ciliado e leva-o à exposição aos mesmos riscos de predação experimentados pelo hospedeiro, ou até mesmo aumenta o risco de predação do hospedeiro (WILLEY et al., 1990). Para epibiontes tais como *Epistylis* sp, a fixação permanente representa um investimento de energia significativa sob a forma de produção de pedúnculo. Utilizando-se do pedúnculo para fixação, ele restringe o movimento do ciliado, colocando-o em um risco ainda maior do que outros epibiontes móveis como *Trichodina* sp. A partir de uma perspectiva custo *versus* benefício, não é surpreendente que a taxa de re-ligação seja inferior à taxa de desprendimento,

pois os ciliados tem de ser capaz de escolher cuidadosamente um bom local para fixação, mas devem rapidamente abandoná-lo sob condição desfavorável (por exemplo, morte do hospedeiro). O investimento considerável de energia para a produção do pedúnculo e os riscos associados também implica que o ciliado deve ser capaz de extrair benefícios substanciais para se fixar ao substrato. Um desses benefícios pode ser a melhoria da eficiência alimentar, como demonstrado em nossos experimentos de bacterivoria.

Assim como em nossos resultados, Bickel et al. (2012) também encontraram maior ingestão de bactérias por *Epistylis* quando associados a crustáceos. Protozoários epibiontes aderidos a seus hospedeiros possuem uma eficiência de alimentação mais elevada do que sua forma livre-natante. O maior consumo de bactérias pelos indivíduos associados oferece um benefício claro pela fixação epibionte (BICKEL et al., 2012). A cinética de movimento da água em pequena escala em torno de um metazoário e suas habilidades na obtenção de alimento e oxigênio são um fator importante na determinação da distribuição dos epibiontes ciliados no hospedeiro (FERNANDEZ-LEBORANS et al., 2006). Como o zooplâncton se movimenta pela água, o fluxo da mesma sobre a superfície do corpo é alta, permitindo que os epibiontes se alimentem a uma taxa superior.

A alta eficiência da bacterivoria dos cladóceros está relacionada à elevada capacidade de filtração destes animais. As diferenças nas taxas médias de consumo de bactérias entre as espécies de cladóceros estudadas podem ser explicadas pelo tamanho corporal de cada espécie, *B. deitersi* possui comprimento médio de 0,25 mm enquanto que *D. ambigua* possui cerca de 0,9 mm (ELMOOR-LOUREIRO, 1997).

Em ambientes com altas concentrações de alimento, organismos filtradores ingerem alimento até atingir o chamado *incipient limiting level*, ou seja, a concentração máxima de alimento, obtida através da taxa de filtração máxima. A partir desta concentração, eles realizam um ajuste muito preciso da sua taxa de filtração apenas para manter a quantidade de alimentos obtida constante (KMET e STRASKRABA, 2004). Assim, a eficiência de filtração desses organismos é dependente da concentração de alimento no meio. De acordo com

Lehman (1976), é um processo ótimo que tende a ser maior em ambientes com maior abundância de alimento e menor em ambientes com menor concentração de alimento. Em altas infestações por epibiontes, a taxa de ingestão de bactérias pode ser menor nos cladóceros com epibiontes quando comparada a taxa de ingestão de seus coespecíficos que não possuem epibiontes, pois além da concorrência pelas bactérias disponíveis, com os epibiontes também consumindo bactérias, a concentração de bactérias disponíveis no meio pode ter sido menor.

Outro fator que pode ter levado à menor taxa de ingestão de bactérias dos cladóceros com epibiontes pode estar relacionado com a dificuldade de movimentação (maior carga carregada e por atrapalharem os movimento dos apêndices)

Estudos sobre o impacto do *grazing* realizado por ciliados planctônicos são freqüentemente focados em espécies de vida livre, enquanto que o impacto de bacterivoria de epibiontes ciliados ligados ao zooplâncton raramente é medido. A alimentação seletiva por epibiontes pode influenciar a composição da comunidade bacteriana de vida livre. A elevada taxa de ingestão individual dos epibiontes significa que cada ciliado processa uma grande quantidade de biomassa bacteriana por dia. Para ciliados, o crescimento pode se manifestar como produção de pedúnculo e multiplicação celular. À medida que a colônia epibionte cresce, a proporção de biomassa do pedúnculo também aumenta. À medida que a estrutura do pedúnculo cresce, ele move os ciliados para mais longe da superfície do hospedeiro, o que pode ajudar a aumentar a eficiência de alimentação pela redução da formação de vórtices de pequena escala perto da superfície (PEPPER et al., 2010).

Em resumo, ciliados epibiontes demonstraram altas taxas de ingestão individuais, corroborando o favorecimento do mesmo ao se fixar a um hospedeiro. Embora haja gasto energético e suposta susceptibilidade à predação, há benefícios. Já para o hospedeiro, a relação é desfavorável e o mesmo acaba sendo prejudicado, tanto no que diz respeito à alimentação, quanto à natação, podendo afetar também a sua sobrevivência, em especial na presença de predadores ou na ocorrência de competição. Pesquisas adicionais

para a dinâmica populacional, pastagem e bioenergética dos epibiontes ajudariam na compreensão das funções ecológicas desses organismos, bem como, entender seu papel na dinâmica do ecossistema atuando na comunidade bacteriana e zooplanctônica.

8 CONCLUSÕES

Através deste estudo conclui-se que a epibiose é uma relação favorável para *E. pygmaeum*, os ciliados epibiontes demonstraram altas taxas de alimentação, corroborando o favorecimento dos mesmos ao se fixar à um hospedeiro, embora haja gasto energético e suposta susceptibilidade à predação.

Para o hospedeiro, a relação é desfavorável, sendo prejudicado tanto no que diz respeito à alimentação, natação, demanda de energia e sobrevivência.

Pesquisas adicionais sobre a dinâmica populacional, pastagem e bioenergética dos epibiontes ajudariam na compreensão da atuação destes organismos na comunidade bacteriana e zooplanctônica

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGASILD, H. e NÖGES, T. Cladoceran and rotifer grazing on bacteria and phytoplankton in two shallow eutrophic lakes: in situ measurement with fluorescent microspheres. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n.11, p. 1155–1174, 2005.
- ALMEIDA, V. L. S. et al. O zooplâncton de água doce e seu estudo em reservatórios do Nordeste do Brasil. In: MOURA, A. N. et al. (eds.). **Reservatórios do Nordeste do Brasil: biodiversidade, ecologia e manejo**, Bauru: Canal 6. p. 441-475, 2010.
- ARAGÃO, C. et al. Aminoacid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. **Aquaculture**, v. 234, p. 429 – 445, 2004.
- AZAM, F. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257-263, 1983.
- BALDOCK, B. M. Peritrich ciliates on larvae of *Brachycentrus subnubilus* (Trichoptera): importance in relation to the total protozoan population in streams. **Hydrobiologia**, v. 132, p. 125–131, 1986.
- BICKEL, S. L.; TANG, K. W.; GROSSART, H-P. Ciliate Epibionts Associated with Crustacean Zooplankton in German Lakes: Distribution, Motility, and Bacterivory. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 243, 2012.
- BOZKURT, A. e GENÇ, E. First record of the epibiont protozoan *Epistylis* sp. on zooplankton (Copepoda, Cladocera, and Rotifera) from the Asi River, Turkey. **Crustaceana**, v. 82, n. 5, p. 515-530, 2009.
- BULUT, H. e SALER, S. Presence of an epibiont *Epistylis* sp. (Protozoa, Ciliophora) on some zooplankton. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 26, n. 11, p. 6334-6339, 2017
- BRATBAK, G. e THINGSTAD, T. F. Phytoplankton-bacteria interaction: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. **Marine Ecology Progress Series**, v. 25, p. 23–30, 1985.
- BRONSTEIN, J. L.; ALARCÓN, R. e GEBER, M. The evolution of plant-insect mutualisms. **New Phytologist**, v. 172, p. 412-428, 2006.
- CHIAVELLI, D. A.; MILLS, E. L. e THRELKELDS, S. T. Host preference, seasonality, and community interactions of zooplankton epibionts. **Limnology and Oceanography**, v. 38, p. 574–583. 1993.
- CHRISTENSEN-DALSGAARD, K. K.; e FENCHEL, T. Increased filtration efficiency of attached compared to free-swimming flagellates. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 33, p. 77–86, 2003.

CLEVEN, E. J.; WEISSE, T. Seasonal succession and táxon-specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, p. 147-161, 2001.

COELHO-BOTELHO, M. J. Dinâmica da comunidade zooplantônica e sua relação com o grau de trofia em reservatórios. **CETESB**, São Paulo, 2003.

COLE, J. J. Aquatic microbiology for ecosystem scientists: New and recycled paradigms in ecological microbiology. **Ecosystems**. v. 2, p. 215-225. 1999.

COOK J. A.; CHUBB J. C.; VELTKAMP J. Epibionts of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda): an SEM study. **Freshwater Biology**. v. 39, p. 423–438. 1998.

CORLISS, J. O. **The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature**. Pergamon Press, Oxford, 1979.

CUTOLO, S. A. **Comunidade zooplanctônica na represa de Guarapiranga – SP – Brasil**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, p. 1 – 11, 1998.

D'ÁVILA, S.; LAMEGO, A. C. R. Vai uma carona aí? **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 17, n. 2, p. 55-57, 2016.

DIAS, R. J. P.; CABRAL, A. F.; STEPHAN, N. N. C.; MARTINS, R. T.; SILVA - NETO, I. D. ALVES, R. G.; D'AGOSTO, M. Record of *Rhabdostyla chironomi* Kahl, 1933 (Ciliophora, Peritrichia) Epibiont on Chironomidae larvae (Diptera, Chironomidae) in a lotic system in Brazil, **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p.783 – 785, 2007.

DIAS, R. J. P.; D'ÁVILA, S.; WIELOCH, A. H.; D'AGOSTO, M. Protozan ciliate epibionts on the freshwater apple snail *Pomacea figulina* (Spix, 1827) (Gastropoda, Ampullariidae) in an urban stream of south - east Brazil, **Journal of Natural History**, v. 42, n. 19 - 20, p. 1409-1420, 2008.

DIAS, R. J. P.; CABRAL, A. F.; MARTINS, R. T.; STEPHAN, N. N.; SILVA-NETO, I. D.; ALVES, R. G. e D'AGOSTO, M. The peritrichous ciliate *Rhabdostyla* (Ciliophora, Peritrichia) attached to the limnic oligochaeta *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta, Tubificidae) in a urban stream. **Journal of Natural History**, v. 43, p. 1-15. 2009

DUFFY, M. A.; CÁCERES, C. E.; HALL, S. R.; TESSIER, A. J.; IVES, A. Temporal, spatial and between-host comparisons of patterns of parasitism in lake zooplankton. **Ecology**, v. 91, p.3322-3331, 2010.

EDMONDSON, W.T. **Freshwater Biology**. 2 ed. John Wiley & Sons Inc, New York. 1959.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. **Manual de identificação de Cladóceros límnicos do Brasil**. Brasília: Editora Universa, 156 p., 1997.

ESPÍNDOLA, E. L. G. O rio do Monjolinho: um estudo de caso. **A bacia hidrográfrica do rio do Monjolinho**. In: E.L.G. Espíndola, J.S.V. Silva, C.E. Martinelli & M.M. Abdon (orgs.). p. 36-40., 188p., Rima, São Carlos, SP., 2000.

EQUIPE ESTATCAMP Software Action. Estatcamp - Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil, 2014. URL <http://www.portalaction.com.br/>.

EVANS, M. S., SICKO-GOAD, L. M. e OMAIR, M. Seasonal occurrence of *Tokophrya quadripartita* (suctoria) as epibionts on adult *Limnocalanus macrurus* (copepoda: calanoida) in southeastern Lake Michigan. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 98, n. 1, p. 102–109, 1979.

FARREN, M. H.; DONOVAN, D. A. Effects of sponge and barnacle encrustation on survival of the scallop *Chamys hastate*. **Hydrobiologia**, v. 612, p.21-27, 2007.

FENCHEL, T. On the ciliate fauna associated with the marine species of the amphipod genus *Gammarus* J.G. Fabricius. **Ophelia**, v. 2, p. 281–303, 1965.

FERNANDEZ-LEBORANS, G. A review of recently described epibioses of ciliate Protozoa on Crustacea. **Crustaceana**, v. 82, n.2, p. 167–189, 2009.

FERNANDEZ-LEBORANS, G. e TATO-PORTO, M. L. A review of the species of protozoan epibionts on crustaceans. I. Peritrich ciliates. **Crustaceana**, v. 73, p. 643–683, 2002.

FERNANDEZ-LEBORANS, G.; CÓRDOBA, M. J. H.; ARCO, P. G. D. Distribution of ciliate epibionts on the portunid crab *Liocarcinus depurator* (Decapoda: Brachyura), **Invertebrate Biology**, Lawrence, v.116, p. 171-177, 1997.

FOISSNER, W.; BERGER, H. e SCHAUMBURG, J. **Identification and Ecology of Limnetic Plankton Ciliates**, Munich: Bavarian State Office for Water Management, 793 p., 1999.

FOISSNER, W., BERGER, H.; KOHMANN, F. **Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien-systems – Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida**. Informationsberichte des Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 1992.

FOISSNER, W. e BERGER, H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes and waste waters with notes on their ecology. **Freshwater Biology**, v. 35, p. 375-482, 1996.

FOISSNER, W.; BLAKE, N.; WOLF, K.; BREINER, H. W.; STOECK, T. Morphological and molecular characterization of some peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from tank bromeliads including two new genera: *Orborhabdostyla* and *Vorticellides*. **Acta Protozoologica**, v.48, p. 291-319, 2009.

GILBERT, J. J. e SHRÖDER, T. The ciliate epibiont *Epistylis pygmaeum*: selection for zooplankton hosts, reproduction and effect on two rotifers. **Freshwater Biology**, v.48, p. 878–893, 2003.

GILBERT, J. J. Competition between rotifers and *Daphnia*. **Ecology**, v. 66, p.1943-1950, 1985.

GREEN, J. Parasites and epibionts of Cladocera. **Transactions of the Zoological Society of London**, n. 32, p. 417– 515, 1974.

GUHL, W. Beitrag zur Systematik, Biologie und Morphologie der Epistylidae (Ciliata, Peritricha). **Archiv für Protistenkunde**, v.121, p.417-483, 1979.

HAHN, M. W.; HÖFLE, M.G. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 113-121, 2001.

HANAMURA, Y. Seasonality and infestation pattern of epibiosis in the beach mysid *Archaeomysis articulata*. **Hydrobiologia**, v. 427, p. 121-127, 2000.

HAZEN, T. C.; RAKER, M. L.; ESCH, G. W.; FLIERMANS, C. B. Ultrastructure of red-sore lesions on Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*): association of the ciliate *Epistylis* sp. and the bacterium *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Protozoology**, v. 25, p. 351–355, 1978.

HAYASHI-MARTINS, L. H.; MANSANO, A. S.; HISATUGO, K. F.; ROCHA, O.; SELEGHIM, M. H. R. *In vitro* evaluation of the bacterivore potential of three Cladoceran species occurring in tropical and subtropical regions. **Brazilian Journal of Biology**, v.77, n.4, p. 840-847, 2017.

HENEGBRY, M. S. e RIDGEWAY, B. T. Epizootic ciliated protozoa of planktonic copepods and cladocerans and their possible use as indicators of organic water pollution. **Transactions of the American Microscopical Society**, n. 98, p. 495–508, 1979.

HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p.15–25, 2010.

HISATUGO, K. F. **Avaliação do consumo de bactérias pelo zooplâncton em um reservatório eutrófico raso (reservatório do Monjolinho - São Carlos - SP)**. 148p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

HISATUGO, K. F.; MANSANO, A. S.; SELEGHIM, M. H. R. Protozoans bacterivory in a subtropical environment during a dry/cold and a rainy/warm season. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 143-151, 2014a.

HISATUGO, K. F.; MANSANO, A. S.; HAYASHI, L. H.; REGALI-SELEGHIM, M. H. Ingestion of bacteria in a eutrophic subtropical reservoir pond with food web mainly controlled by zooplankton grazing. **Limnologia**, v. 44, p. 98-106, 2014b.

HOEKSEMA, J. D.; BRUNA, E. M. Pursuing the big questions about interspecific mutualism: a review of theoretical approaches. **Oecologia**, v.125, p.321-330, 2000.

ISHIKAWA, M. M.; PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; JERÔNIMO, G. T.; RUSSO, M. R.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; MARTINS, M. L. **Biologia e estratégias na sanidade de alevinos de bagres carnívoros**. Embrapa Agropecuária Oeste. p. 1-35, 2012.

JONES J.G. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. **Freshwater Biology**, v. 7, p. 67 - 91, 1979.

JONSSON, P. R.; JOHANSSON, M.; PIERCE, R. W. Attachment to suspended particles may improve foraging and reduce predation risk for tintinnid ciliates. **Limnology and Oceanography**, v. 49, p. 1907–1914, 2004.

KAHL, A. Peritrichia und Chonotricha. In: Fischer G. **Urtiere Oder Protozoa Deutschlands**. p. 651-885, 1935.

KANKAALA P. e ELORANTA P. Epizoic ciliates (*Vorticella* sp.) compete for food with their host *Daphnia longispina* in a small polyhumic lake. **Oecologia**, v. 73, p. 203-206, 1987.

KIM, H. W.; HWANG, S. J. e JOO, G.J. Zooplankton grazing on bacteria and phytoplankton in a regulated large river (Nakdong River, Korea). **Journal of Plankton Research**. n. 22, p. 1559–1577, 2000.

KMET, T. e STRASKRABA M., Feeding adaptations of filter feeders: *Daphnia*. **Ecological Modelling** v.178, p. 313 – 327, 2004.

KÖPPEN, W. **Grundriss der klimakunde**. Walter de Gruyter & Co., Berlin, DE. 388p, 1931.

KUDO, R. R. **Protozoology**. 5th edition. Charles C. Thomas, Illinois, 1174 p., 1966.

LAIRD, M. Parasites of Singapore mosquitoes with particular reference to the significance of larval epibionts as an index of habitat pollution. **Ecology**, v. 40, p. 206-221, 1959.

LAMEGO, A. C. R. **Aspectos ecológicos e distribuição dos moluscos límnicos e seus epibiontes ciliados em quatro municípios da microrregião de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil**. 129p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, Juiz de Fora, 2015.

LANGENHEDER, S.; JÜRGENS, K. Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. **Limnology and Oceanography**, v. 46, n. 1, p. 21-134, 2001.

LANSAC-TÔHA, F. A.; BONECKER, C. C.; VELHO, L. F. M. Composition, species richness and abundance of zooplankton community. In: SALGADO-MALDONADO, G.; ALDRETE, A. N. G.; VIDALMARTÍNEZ, V. M. **Metazoan parasites in the tropics: a systematic and ecological perspective**. Universidad Nacional Autónoma (UNAM), Mexico. p. 25-60, 2004.

LAUDIEN, J.; WAHL, M. Indirect effects of epibiosis on host mortality: seainstar predation on differently fouled mussels. **Marine Ecology**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 35-47, 2004.

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

LIGHTNER, D. V. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, 1996.

LIMA, P. V.; LOVERDE-OLIVEIRA, S. M.; SILVA, M. C., OLIVEIRA, V. A. Variação na riqueza das espécies zooplanctônicas em lagoas marginais do rio Cuiabá (pantanal – MT). **Biodiversidade**, v. 11, n. 1, p. 57 - 68, 2012.

LOBÃO, L. M. **Fatores reguladores do bacterioplâncton: implicações na estrutura e nas interações tróficas planctônicas**. 76p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-graduação em Ecologia, Juiz de Fora, 2009.

LYNN, D. H. **The ciliated Protozoa: characterization, classification, and guide to the literature**, 3rd ed, New York: Springer, 605 p., 2008.

MANSANO, A. S.; HISATUGO, K. F.; HAYASHI, L. H.; REGALI-SELEGHIM, M. H.. The importance of protozoan bacterivory in a subtropical environment (Lobo-Broa Reservoir, SP, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 569-578, 2014.

MARTINS, M. L.; CARDOSO, L.; MARCHIORI, N.; PÁDUA, S. B. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 2015.

MATSUMURA-TUNDISI, T. Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil. **Hydrobiologia**, n. 112, p. 161–165, 1984.

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

MATSUMURA-TUNDISI, T. Composition and vertical distribution of zooplankton in lake D. Helvécio (Minas Gerais, Brazil). In **Studies on Rio Doce Valley lakes**. Vol. 1. Edited by J. Tundisi e T. Saijo. Cooperation Project Brazil–Japan, Brazilian Academy of Sciences, São Paulo, Brazil. p. 129–139, 1989.

MATSUMURA-TUNDISI T. et al. Eutrofização da represa de Barra Bonita: Estrutura e organização da comunidade de Rotifera. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 923-935, 1990.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). **Hydrobiologia**, Aquatic Biodiversity II, v. 542, n. 1, p. 367-378. 2005.

MATTHES, D.; SCHEUBEL, J. *Epistylis galea* Ehrenberg, ein polymorphes Peritrich. **Archiv für Protistenkunde**, v. 112, p. 221-341, 1970.

MAYÉN-ESTRADA, R.; ALADRO-LUBEL, A. Distribution and prevalence of 15 species of epibiont peritrich ciliates on the crayfish *Cambarellus patzcuarensis* Villalobos, 1943 in lake Pátzcuaro, Michoacán, México. **Crustaceana**, v. 74, n. 11, p.1213-1224, 2002.

MELÃO, M. G. G. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. In: PÔMPEO, M. L. M. (ed.) **Perspectivas na limnologia do Brasil**, 1999.

MORADO, J. F.; SMALL, E. B. Ciliate parasites and related diseases of crustácea: A review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 3, n. 4, p. 275-354, 1995.

MOSS, A. G.; ESTES, A. M.; MUELLNER, L. A.; MORGAN, D. D. Protistian epibionts of the ctenophore *Mnemiopsis mccradyi* Mayer. **Hydrobiologia**, v. 451, p. 295-304, 2001.

MURASE, J.; NOLL, M.; FRENZEL, P. Impact os protistis on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 5436-5444, 2006.

NENNINGER, U. Die Peritrichen der Umgebung von Erlangen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Wirtsspezifität. Zoologische Jahrbuecher. Abteilung fuer Systematic Oekologie und Geographie der Tiere. **Germany**, v. 77, n. 3 - 4, p. 169 - 266, 1948.

NOGUEIRA M. G. **Dinâmica das populações planctônicas e fatores físico-químicos de um pequeno sistema artificial raso (represa do Monjolinho, São Carlos, SP)**. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. 244 p. 1990

NOGRADY, T. e SEGERS, H. The Asplanchnidae, Gastropodidae, Lindiidae, Microcodinidae, Synchaetidae, Trochosphaeridae. **Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World**. Backhuys Publishers BV, Dordrecht The Netherlands. 2002.

NOGRADY, T., WALLACE, R. L. e SNELL, T. W. Rotifera: biology, ecology and systematic. In **Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world** (DUMONT, H. J. F. ed.). Netherlands: SPB Academic Publishing, v.1, p.1-142, 1993.

NOGUEIRA, M. G. e MATSUMURA-TUNDISI, T. Limnologia de um sistema artificial raso (Monjolinho Reservoir - São Carlos, SP). Dinâmica das populações planctônicas. **Acta Limnologia Brasiliensia**, n. 8, p. 149–168, 1996.

NYBAKKEN, J. W. **Marine Biology: na Ecological Approach**. São Francisco, Benjamin Cummings, 516 p., 2003.

OKANO, W. Y. **Análise da estrutura e dinâmica populacional da comunidade zooplânctônica de um reservatório artificial (represa do Monjolinho, São Carlos – SP)**. 128p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

OKUMURA, D. T. **Estudos ecotoxicológicos com as espécies *Argyrodiaptomus furcatus* e *Notodiaptomus iheringi* (Copepoda, Calanoida)**. 312 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

OOMS-WILMS, A. L.; POSTEMA, G. e GULATI, R. D. Evaluation of bacterivory of Rotifera based on measurements of in situ ingestion of fluorescent particles, including some comparisons with Cladocera. **Journal of Plankton Research**, n. 17, p. 1057–1077, 1995.

OVERSTREET, R. M. Metazoon symbionts of crustaceans. In: **The Biology of Crustacea**. Bliss, D. E. Pathobiology. A.J. Provenzano, Jr., ed. New York: Academic Press, v. 6, p. 155–250, 1983.

PACE, M. L.; BAILIFF, M. D. An evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. **Marine Ecology Progress Series**, v. 40, p. 185-193, 1987.

PÁDUA, S. B.; MARTINS, M. L.; CARRASCHINI, S. P.; CRUZ, C.; ISHIKAWA, M. M. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae): a new parasite for *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae). **Zootaxa**, v. 3422, p. 62-68, 2012.

PÁDUA S.B.; ISHIKAWA M.M.; VENTURA A.S.; JERÔNIMO G.T.; MARTINS M.L; TAVARES L.E.R. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score. **Parasitology Research**, v. 112, p. 443-446, 2013.

PEPPER, R. E.; ROPER, M.; RYU, S.; MATSUDAIRA, P.; STONE, H. A. Nearby boundaries create eddies near microscopic filter feeders. **Journal of Royal Society Interface**, v. 7, p. 851–862, 2010.

PERNTHALER, J. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 537-546, 2005.

PICCINNI, E.; GUTIÉRREZ. J. Protists as bioindicators in the environment. **Protistology Actualities**, v. 1, p. 173-184, 1995.

PINTO-COELHO, R. M.; PINEL-ALLOUL, B.; MÉTHOT, G.; HAVENS, K. Crustacean zooplankton in lakes and reservoirs of temperate and tropical regions: variations with trophic status. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 61, n. 2, p. 348-361, 2005.

PIYASIRI, S.; JAYAKODY, J. K. U. Ecology of zooplankton in Victoria Reservoir, Sri-Lanka: I. Composition and population structure of the zooplankton. *Verh. Int. Verein. Limnology*, Stuttgart, v. 24, p.1430-1436, 1991.

POMEROY, L.R.; DEIBEL, D. Temperature regulations of bacterial activity during the spring bloom in Newfoundland coastal waters. **Science**, v. 233, p. 359-361, 1986.

POMEROY, L. R.; WILLIAMS, P. J. I.; AZAM, F; HOBBIE, J. E. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28-33, 2007.

POMEROY, L. R. The ocean's food web, a changing paradigm. **BioScience**, v. 24, n. 9, p. 499-504, 1974.

PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnology and Oceanography**, n. 25, p. 943-948, 1980.

PRATT, J. R.; CAIRNS, J. R. Functional groups in the Protozoa: roles in differing ecosystems. **Journal of Protozoology**. Lawrence. v. 32, p. 415-422, 1985.

PUCKETT, G. I.; CARMAN, K. R. Ciliate Epibiont Effects on Feeding, Energy Reserves, and Sensitivity to Hydrocarbon Contaminants in an Estuarine Harpacticoid Copepod, **Estuaries and Coasts**, v. 25, N. 3, p. 372–381, 2002.

RACY, F. **Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 65 p., 2004.

RACY, F. et al. Assessment of the applicability of morphological and size diversity indices to bacterial populations of reservoirs in different trophic states. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 17, p. 395-408, 2005.

RAJABUNIZAL, K.; RAMANIBAI R. Presence of an Epibiont *Epistylis niagarae* (Protozoa, Ciliophora) on *Mesocyclops aspericornis* in Velachery Lake Chennai India. **Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 189-195, 2011.

RAMOS, J. D.; MELLO, H. O. O.; LIMA, L. Análise da composição, abundância e distribuição vertical das populações de Rotifera, Cladocera e Copepoda no reservatório de Emborcação (Araguari – MG). **Em extensão**, v. 7, p. 80-94, 2008.

REGALI-SELEGHIM, M. H.; GODINHO, M. J. L. Peritrich epibiont protozoans in the zooplankton of a subtropical shallow aquatic system (Monjolinho Reservoir, São Carlos, Brazil). **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 5, p. 501-508, 2004.

REGALI-SELEGHIM, M. H. **Rede trófica microbiana em um sistema eutrófico raso (reservatório do Monjolinho - São Carlos - SP) - Estrutura e função.** Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Programa de Pós-graduação em ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 92p., 2001.

REID, J. W. **Chave de identificação para as espécies continentais sulamericanas de vida livre da Ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda).** Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

ROBERTS, G. N. e CHUBB, J. C. The distribution and location of the symbiont *Lagenophrys aselli* on the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. **Freshwater Biology**. Oxford, v. 40, p.671 - 677, 1998.

ROCHA, O. e GUNTZEL, A. Crustacea Brachiopoda. In: ISMAEL, D.; VALENTE, W. C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O. (ORG.). **Invertebrados de Água Doce**, 1 ed., São Paulo/SP, FAPESP, v. 1, p. 109-120, 1999.

RODRIGUEZ, M. P.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Variation of density, species composition and dominance of rotifers at a shallow tropical reservoir (Broa reservoir, SP, Brazil) in a short scale time, **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n. 1, p. 1-9, 2000.

ROSELLI, I. M. **The influence of predator detection on life history strategies in *Ceriodaphnia reticulata* (Cladocera: Daphnidae).** Mestrado, Eastern New Mexico University, New Mexico, 49 p.,2008.

SANTOS-SILVA, E. N. **Revisão das espécies do “complexo nordestinus” (Wright, 1935) de *Notodiaptomus* Kiefer, 1936 (Copepoda: Calanoida:**

Diaptomidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo/Instituto de Biociências. 196p, 2000.

SACCÁ, A. B.; BORREGO, C. M.; RENDA, R.; TRIADÓ-MARGARIT, X.; BRUNI, V. GUGLIELMO L. Predation impact of ciliated and flagellated protozoa during a summer bloom of brown sulfur bacteria in a meromictic coastal lake. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, p.42-53, 2009.

SCHUWERACK, P. M. M.; LEWIS, J. W., JONES, P. W., Pathological and physiological changes in the South African freshwater crab *Potamonautes warreni* Calman indicated by microbial gill infestations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 4, p. 269–279, 2001.

SERAFIM-JÚNIOR, M.; PERBICHE-NEVES, G.; BRITO, L.; GHIDINI, A. R.; CASANOVA, S. M. C. Variação espaço temporal de Rotíferos em um reservatório eutrofizado no sul do Brasil. Iheringia série. **Zoologia**, v. 100, n. 3, p. 233-241, 2010.

SHERMAN, K.; SCHANER, E. G. *Paracineta* sp., an epizoic suctorian found on Gulf of Maine Copepoda. **The Journal of Protozoology**, v. 12, p. 618 –625. 1965.

SHERR, B. F.; SHERR, E. B. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 293–308, 2002.

SHERR, B. F.; SHERR, E. B.; FALLON R. D. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 958–965, 1987.

SHERR, B.; SHERR, E. e RASSOULZADEGAN, F. Rates of Digestion of Bacteria by Marine Phagotrophic Protozoa: Temperature Dependence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1091 – 1095, 1988.

SILVA L. P. **Determinação do efeito de diferentes concentrações de um derivado de Quitosana (DQ) no crescimento de *Escherichia coli***. 74p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso de graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SILVA L. P.; BRITTO D.; SELEGHIM M. H. R.; ASSIS O. B. G. *In vitro* activity of watersoluble quaternary chitosan chloride salt against *E. coli*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 2089-2092. 2010.

SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 908–916, 2012.

SILVA, W. M. e MATSUMURA-TUNDISI, T. Taxonomy, ecology, and geographical distribution of the species of the genus *Thermocyclops* Kiefer, 1927 (Copepoda, Cyclopoida) in São Paulo state, Brazil, with description of a new species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n.3, p. 521-531. 2005.

- SPARAGANO, O.; GROLILÈRE, C. A. Evaluation de la qualité des eaux d'une rivière avec les protozoaires ciliés comme bioindicateurs de pollution. Comparaison avec la physico-chimie. **Hydroecologie Applique**, v. 1, p. 43-62, 1991.
- SUTTLE, C. A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. **Microbial Ecology**, v. 28, p. 237-243, 1994.
- TAYLOR, P. D. A new terminology for marine organisms inhabiting hard substrates. *Palaios*. **Tulsa**, v. 17, p.522-525, 2002.
- THOMAZ, S. M.; ESTEVES, F. A. Bacterial dynamics in periphyton from different regions of a tropical coastal lagoon. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 139, p. 495-507, 1997.
- TOOLAN, T.; WEHR, J. D.; FINDLAY, S. Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a meso-eutrophic lake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2074-2078., 1991.
- THRELKELD, S. T.; CHIAVELLI, D. A.; WILLEY, R. L. The organization of zooplankton epibiont communities. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 317-321, 1993.
- UTZ, L. R. P.; COATS, D. W. Spatial and temporal patterns in the occurrence of peritrichsciliates as epibionts on calanoid copepods in the Chesapeake Bay, USA. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 236-244. 2005.
- UTZ, L. R. P. First record of *Epistylis plicatilis* (Ciliophora: Peritrichia) attached to *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda) in Southern Brazil, **Zootaxa**, v. 1454, p. 49-57, 2007.
- UTZ, L. R. P. Attachment of the peritrich epibiont *Zoothamnium intermedium* Precht, 1935 (Ciliophora, Peritrichia) to artificial substrates in a natural environment. **Brazilian Journal of Biology** [online]. v.68, n.4, p.795-798. 2008. ISSN 1519-6984. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842008000400013>.
- VERNI, F. e GUALTIERI, P. Feeding behaviour in ciliated protists. **Micron**, v. 28, p. 487 – 504, 1997.
- WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p. 175-189, 1989.
- WAHL, M. Epibiosis. In: DÜRR, S., THOMASON, J. C. (Eds.) **Biofouling**. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 100-120, 2010.
- WAHL, M. e MARK, O. The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. **Marine Ecology Progress Series**. v. 187, p. 59-66, 1999.
- WAHL, M. e SÖNNICHSEN, H. Marine epibiosis. IV. The periwinkle *Littorina littorea* lacks typical antifouling defences – why are some populations so little fouled. **Marine Ecology Progress Series**, v. 88, p. 225-235, 1992.
- WAHL, M.; HAY, M. E.; ENDERLEIN, P. Effects of epibiosis on consumer – prey interactions. **Hydrobiologia**, v. 355, p. 49-59, 1997.

- WANG, L., MILLER, T. D.; PRISCU, J. C. Bacterioplankton nutrient deficiency in a eutrophic lake. **Arch. Hydrobiol.** v.125, p. 423-439, 1992.
- WEISSMAN, P., LONSDALE, D. J.; YEN, J. The effect of peritrich ciliates on the production of *Acartia hudsonica* in Long Island Sound. **Limnology and Oceanography**, v. 38, p. 613–622, 1993.
- WILLEY, R. L., CANTRELL, P. A.; THRELKELD, S. T. Epibiotic euglenoid flagellates increase the susceptibility of some zooplankton to fish predation. **Limnology and Oceanography**, v. 35, p. 952–959, 1990.
- WILLEY, R. L.; WILLEY, R. B. Planktivore effects on zooplankton epibiont communities: Epibiont pigmentation effects. **Limnology Oceanography**, v. 38, n.8, p.1818-1822, 1993.
- WILLEY R. L.; THRELKELD S. T. Colonization, interaction and organization of cladoceran epibiont communities. **Limnology and Oceanography**. Baltimore, v. 38, n. 3, p. 584-591, 1993.
- WRIGHT, R. T. A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing. **Hydrobiologia**, v. 159, p. 111-117, 1988.
- XU, Z.; BURNS, C. W. Effects of the epizoic ciliate, *Epistylis daphniae*, on growth, reproduction and mortality of *Boeckella triarticulata* (Thomson) (Copepoda: Calanoida). **Hydrobiologia**, v. 209, p. 183–189, 1991.
- XU, Z. The abundance of epizoic ciliate *Epistylis daphniae* related to their host *Moina macrocopa* in an urban stream. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p.197–200, 1992.
- ZARITSKY A. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 54, p. 243-248, 1975.
- ZINGEL, P.; AGASILD, H.; NOGES, T.; KISAND, V. Ciliates are the dominant grazers on pico and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 134-142, 2007.
- ZÖLLNER, E., SANTER, B.; BOERSMA, M.; HOPPE, H. G.; JÜRGENS, K. Cascading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbial food web components. **Freshwater Biology**, v. 48, p. 2174–2193, 2003.
- ZÖLLNER, E., HOPPE, H. G., SOMMER, U., JÜRGENS, K. Effect of zooplankton-mediated trophic cascades on marine microbial food web components (bacteria, nanoflagellates, ciliates). **Limnology and Oceanography**. v.54, n.1, p. 262–275, 2009.

APÊNDICE A

1 COLETAS PRELIMINARES – TESTE DA METODOLOGIA / REPRESA DO LOBO

1.1 INTRODUÇÃO

Epibiose é um tipo de interação ecológica facultativa na qual um organismo, o epibionte, durante uma fase do seu ciclo de vida coloniza a superfície de um substrato vivo, o basibionte (WAHL, 1989).

Os protozoários ciliados são importantes componentes da microbiota de ecossistemas aquáticos, são os principais predadores de bactérias e também de outros protozoários, disponibilizando, desta forma, nutrientes para níveis tróficos mais elevados (DOPHEIDE et al., 2009). Os ciliados pertencentes à subclasse Peritrichia, Stein 1859 são comumente encontrados em ambientes marinhos e dulcícolas, sendo a maior parte dos representantes desse grupo bacterívoros e de hábito sésil, fixando-se à superfície de substratos vivos ou inanimados (FOISSNER et al., 1992; VERNI e GUALTIERI, 1997; CABRAL et al., 2009; DIAS et al., 2010).

No plâncton, rotíferos, copépodos, cladóceros e protozoários podem ter pequenos organismos epibiontes ou ectobiontes como bactérias, fungos, algas, protozoários ou rotíferos aderidos à sua superfície corporal. Várias espécies de protozoários pertencentes ao grupo peritriquida, podem ser encontradas colonizando organismos do zooplâncton (REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004).

Apesar dos estudos sobre registros de ciliados epibiontes serem abundantes na literatura, pouco se sabe sobre os aspectos ecológicos desta relação em ecossistemas tropicais (REGALI-SELEGHIM e GODINHO, 2004). Uma vez que, o zooplâncton e protozooplâncton desempenham papel fundamental no fluxo de energia e na ciclagem da matéria nos ambientes aquáticos, estudar as interações entre o zooplâncton e o protozooplâncton é de

fundamental importância para compreender a dinâmica destes ecossistemas (BULUT e SALER, 2017).

1.2 OBJETIVOS

Estudar a relação entre epibiontes e basibiontes nos ambientes aquáticos de água doce e testar a metodologia para os experimentos de bacterivoria e verificar se a epibiose afeta o potencial bacterívoro dos organismos envolvidos.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Zooplâncton foi coletado na Represa do Lobo - SP, Brasil, em outubro de 2015 (realizamos outras coletas na represa nos seguintes períodos: setembro de 2015, fevereiro de 2016 e abril de 2016, mas apenas nesta coleta encontramos epibiontes aderidos ao zooplâncton). Obtivemos as amostras através de arrastos verticais e horizontais na coluna d'água, com uma rede de plâncton cilíndrico-cônica, com malha de 68 μm , as amostras foram colocadas em frascos de vidro de 600 mL de capacidade, com tampa de rosca, e transportados para o laboratório em caixa de isopor. As análises qualitativas foram realizadas através de microscópio estereoscópio (Motic, SMZ168) e microscópio ótico (Leica DMLS, aumento de até 1000x). Cladóceros da mesma espécie (*Ceriodaphnia cornuta* Sars, 1885 fa rigaudi) com e sem epibiontes aderidos foram colhidos da amostra de campo e separados para utilização nos testes de bacterivoria.

Os experimentos de bacterivoria foram realizados conforme descrito no item 5. 9. 1. Preparo das bactérias fluorescentes em Material e Métodos, utilizando-se bactérias marcadas fluorescentemente (fluorescently labelled bacteria - FLB). O método para marcação das bactérias foi baseado na técnica descrita por Sherr, Sherr e Fallon (1987). O corante utilizado foi o fluorocromo 5-(4,6-diclorotriazina-2yl) aminofluoresceína (DTAF), incorporado

por bactérias cultivadas em laboratório (*Escherichia coli* ATCC 8739). Foram montados, 6 béqueres contendo em cada um 500 mL de água do reservatório filtrada (3 vezes em rede de 45 µm de abertura de malha). Em 3 béqueres colocamos em cada um 10 cladóceros com epibiontes e nos outros 3 béqueres, 10 cladóceros sem epibiontes

Adicionamos as FLBs na concentração de 5% do total de bactérias presentes nos béqueres (previamente estimadas) e incubamos por 30 min, após esse período o conteúdo do béquer foi filtrado e fixado com formol na concentração final de 4%. No momento da contagem das bactérias marcadas, as amostras foram coradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), filtradas em membranas pretas de polycarbonato de 0,8 µm e analisadas em microscópio de epifluorescência.

1.4 RESULTADOS

Com o intuito de fazer a identificação do epibionte, repetimos outra coleta no mesmo ponto amostral uma semana após a data da coleta onde encontramos o epibionte, entretanto, não encontramos mais exemplares aderidos ao zooplâncton.

Por meio da metodologia testada, conseguimos quantificar as taxas de ingestão de bactérias tanto do protozoário em sua forma sésil e livre-natante, como do cladóceros com e sem zoóides aderidos.

A taxa de ingestão de bactérias foi maior nos protozoários ciliados epibiontes ($5,4 \times 10^3$ bact.ind⁻¹.h⁻¹), quando comparada à dos protozoários em sua forma livre-natante ($3,9 \times 10^3$ bact.ind⁻¹.h⁻¹). Para os exemplares de *C. cornuta* com epibiontes, a taxa de ingestão foi menor (191×10^3 bact.ind⁻¹.h⁻¹), quando comparada a taxa destes cladóceros sem epibiontes (265×10^3 bact.ind⁻¹.h⁻¹).

1.5 DISCUSSÃO

As técnicas de quantificação da bacterivoria por protozoários e cladóceros possuem particularidades para cada grupo de organismos; como tempo de incubação, concentração de bactérias marcadas, manipulação dos indivíduos, e utilização de um fixador adequado. Com o intuito de testar a metodologia e o delineamento experimental a ser empregado na quantificação da bacterivoria em cladóceros e protozoários epibiontes realizamos alguns experimentos levando em conta dados obtidos na literatura para o tempo adequado de incubação.

O aumento na taxa de ingestão observado nos protozoários epibiontes quando comparada a taxa de ingestão das formas livre-natantes pode estar associado ao aumento dos limites da área onde o organismo pode explorar ao seu redor.

Por outro lado, nos cladóceros que carregavam protozoários em sua carapaça a taxa de ingestão de bactérias foi menor quando comparada com cladóceros sem epibiontes, a infestação por protozoários pode, entre outros efeitos, ter dificultado a locomoção dos indivíduos.

1.6 REFERÊNCIAS

BULUT, H. e SALER, S. Presence of an epibiont *Epistylis* sp. (Protozoa, Ciliophora) on some zooplankton. **Fresenius Environmental Bulletin**. v. 26, n. 11, p. 6334-6339, 2017.

CABRAL, A. F. **Aspectos morfológicos e ecológicos do protista ciliado *Rhadostyla chironomi* Kahl, 1933 (Ciliophora, Peritrichia) epibionte de larvas de quironomídeos em um córrego urbano do sudeste do Brasil**. Tese (Dissertação de mestrado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 128p. 2009.

CABRAL, A. F.; DIAS, R. J. P.; UTZ, L. R. P.; ALVES, R. G. e D'AGOSTO, M. Spatial and temporal occurrence of *Rhadostyla* cf. *Chironomi* Kahl, 1933 (Ciliophora, Peritrichia) as an epibiont on chironomid larvae in a lotic system in the neotropics. **Hydrobiologia**, v. 644, p. 351-359, 2010.

DIAS, R. J. P.; CABRAL, A. F.; MARTINS, R. T.; STEPHAN, N. N.; SILVA-NETO, I. D.; ALVES, R. G. e D'AGOSTO, M. The peritrichous ciliate *Rhadostyla* (Ciliophora, Peritrichia) attached to the limnic oligochaeta *Limnodrilus*

hoffmeisteri (Oligochaeta, Tubificidae) in a urban stream. **Journal of Natural History**, v. 43, p. 1-15. 2009

DIAS, R. J. P.; D'AVILA, S.; WIELOCH, H. e D'AGOSTO, M. Protozoan ciliate epibionts on the freshwater Apple snail *Pomacea figulina* (Spix, 1827) (Gastropoda, Ampullariidae) in an urban stream of southeast Brazil. **Journal of Natural Histoty**, v. 42, n.19, p. 1409-1420. 2008.

DOPHEIDE, A.; LEAR, G., STOOO, R., LEWIS, G. Relative diversity and community structure of ciliates in stream biofilms according to molecular and microscopy methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 165261-5272, 2009

FOISSNER, W.; BERGER, H. e KOHMANN, F. **Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida**. Informationsberichte des Bayer Landesamtes für Wasserwirtschaft, Munich, p. 502, 1992.

REGALI-SELEGHIM, M. H.; GODINHO, M. J. L. Peritrich epibiont protozoans in the zooplankton of a subtropical shallow aquatic system (Monjolinho Reservoir, São Carlos, Brazil). **Journal of Plankton Research**, v. 26, n. 5, p. 501-508, 2004.

VERNI, F. e GUALTIERI, P. Feeding behaviour in ciliated protists. **Micron**, v. 28, p. 487 – 504, 1997.

WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p.175-189, 1989.

2 COLETAS PRELIMINARES – TANQUES DE PISCICULTURA

2.1 INTRODUÇÃO

O zooplâncton possui papel fundamental na dinâmica de um ecossistema aquático, atuando como consumidor primário e como elo de ligação entre produtores e consumidores (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1994; SOARES et al., 1997). Em decorrência da elevada produção primária em tanques utilizados para criação de peixes, resultante da alta taxa de nutrientes disponíveis, há o incremento da produtividade biológica nos demais níveis da cadeia alimentar (O'BRIEN, 1990).

Na piscicultura, a produção de plâncton é um fator importante, uma vez que constitui o alimento mais adequado para alevinos e peixes jovens. A presença destes organismos na rede trófica pode permitir melhor desenvolvimento de peixes nas fases iniciais de vida (NEGREIROS et al., 2009).

Algumas espécies do plâncton podem estar relacionadas com doenças em peixes, sendo que os ectoparasitos são os principais responsáveis por provocar enfermidades na piscicultura de água doce (MORAES e MARTINS, 2004). O protozoário peritriquida *Epistylis* sp. merece atenção, pois coloniza uma ampla gama de organismos aquáticos e também é encontrado no tegumento e brânquias de peixes, podendo ser visto em todas as espécies de peixes de água doce (PAVANELLI et al., 2013; PÁDUA et al., 2013) e sua presença geralmente está relacionada a infecções bacterianas (MARTINS et al., 2015), caracterizando a doença denominada epistilíase.

2.2 OBJETIVOS

Os tanques de piscicultura, por se tratarem de ambientes ricos em nutrientes, supõe-se que também são ambientes propícios para o

desenvolvimento do plâncton: cladóceros, copépodos, rotíferos e protozoários dentre eles, protozoários epibiontes, importantes como indicadores ecológicos e também por abranger um dos responsáveis pela epistilíase, doença que acomete peixes de água doce, que afeta o cultivo, o equilíbrio do ambiente e pode causar prejuízos financeiros ao aquicultor. O objetivo deste trabalho foi buscar epibiontes nas amostras protozooplânctônicas dos tanques de duas pisciculturas existentes na cidade de São Carlos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para tentar obter organismos zooplânctônicos com protozoários epibiontes aderidos fizemos oito coletas em duas pisciculturas localizadas na cidade de São Carlos – SP, Brasil. Sendo duas no período seco (abril a setembro) e duas no período chuvoso (outubro a março). Na piscicultura Orlagos realizamos as coletas em novembro de 2015, janeiro de 2016, maio de 2016 e junho de 2016. Na piscicultura São Matheus as coletas foram feitas duas em março de 2016, julho de 2016 e agosto de 2016

As coletas para amostras qualitativas foram feitas através de arrastos horizontais no comprimento do viveiro, na camada subsuperficial da água, com uma rede de plâncton cilíndrico-cônica, com malha de 20 μm . As amostras foram colocadas em frascos de vidro de 600 mL de capacidade, com tampa de rosca, e transportados para o laboratório em caixa de isopor.

Buscamos a presença de epibiontes nas amostras através da análise de toda amostra, com o auxílio de microscópio estereoscópio (Motic, SMZ168) e microscópio ótico (Leica DMLS, aumento de até 1000x).

Na piscicultura Orlagos foram analisadas 3 amostras de cada coleta. Duas de viveiros escavados forrados com lona, sem contato direto do solo com a água, de aproximadamente 12 m^3 utilizados para cultivo de peixes ornamentais de pequeno porte e uma de um reservatório maior com aproximadamente 10000 m^3 utilizados para criação de tilápias.

Na piscicultura São Matheus foram analisadas 7 amostras de cada coleta. Compreendendo diversos tipos de tanque, sendo dois de alvenaria com criação de peixes ornamentais, um para criação de tartarugas, dois viveiros escavados sem o forro de lona, utilizados para cultivo de peixes e macrófitas e dois lagos artificiais com peixes.

2.4 RESULTADOS

De todas as amostras obtidas nas duas pisciculturas estudadas em nenhuma delas observamos a presença de epibiontes, tanto na época seca como na chuvosa. Dentre os grupos planctônicos observados nas amostras, encontramos poucos cladóceros e copépodos, e uma grande quantidade de rotíferos e protozoários. Observamos que o zooplâncton se apresentava na maioria das coletas ainda que pouco, diverso.

2.5 DISCUSSÃO

A abundância maior para o grupo Rotifera, seguido por Copepoda e Cladocera é um padrão em tanques de piscicultura e é característico de espécies com tempos de geração curtos e rotatividade rápida, como rotíferos e pequenos cladóceros. De acordo com Roche e Rocha (2005), a presença de peixes geralmente reduz a abundância do zooplâncton maior, especialmente os cladóceros, favorecendo o aumento do zooplâncton de menor tamanho, como rotíferos. As espécies maiores (como *Daphnia*) podem ser fortemente selecionadas como alimento por peixes. No entanto, a presença de peixes que se alimentam por filtração pode levar a um aumento de copépodos, cujo mecanismo de escape é bem desenvolvido, fato que poderia suprimir os rotíferos (NEGREIROS et al., 2009).

Diferente da ideia inicial de que os tanques de piscicultuta são ambientes com grande densidade de zooplâncton devido à grande quantidade e

riqueza de nutrientes, na prática, observou-se uma baixa densidade de cladóceros e copépodos.

Diante da ausência de epibiontes e da baixa densidade de cladóceros e copépodos, sugerimos as seguintes hipóteses:

- Há grande pressão do controle *top down* realizado pelos peixes cultivados que regula as populações de basibiontes zooplactônicos maiores, como cladóceros e copépodos, diminuindo a superfície de substratos vivos para a adesão do epibionte. Além disso, considerando que para o epibionte, as vantagens da colonização ficam evidentes em ambientes superpopulosos, onde a competição por espaço e alimento é alta e um substrato vivo pode colocá-lo em posição hidrodinâmica favorável (WAHL, 1989), em ambientes onde não esteja ocorrendo superpopulação devido à predação, não há vantagem na adesão a um basibionte selecionado pelo predador.

- Na ocorrência da epibiose, os efeitos negativos que a relação causa para o basibionte podem atrapalhar sua sobrevivência diminuindo sua população.

2.6 REFERÊNCIAS

MARTINS, M. L.; CARDOSO, L.; MARCHIORI, N.; PÁDUA, S. B. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 2015.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Favorable Conditions and Principal Teleostean Diseases in Intensive Fish Farming. In: **Special Topics in Tropical Intensive Freshwater Fish Farming**. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). Tec Art Publ, p. 343-383, 2004.

NEGREIROS, N. F., ROJAS, N. E., ROCHA, O. e SANTOS WISNIEWSKI, M. J. Composition, diversity and short-term temporal fluctuations of zooplankton communities in fish culture ponds (Pindamonhangaba), SP. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n.3, p.785-794, 2009.

O'BRIEN, W. J., BROWMAN, H. I. e EVANS, B. I.: Search strategies of foraging animals. **American Scientific**, v. 78, p. 152-160, 1990.

PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M.; VENTURA, A. S.; JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L.; TAVARES, L. E. R. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp.

(Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score. **Parasitology Research**, v. 112, p. 443-446, 2013.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. (Org.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Eduem, p. 452, 2013.

ROCHE, K. F. e ROCHA, O. Aspectos de predação por peixes e, lagos e represas, com enfoque na planctivoria. In ROCHE, K.F. e ROCHA, O. (Org.). **Ecologia trófica de peixes com ênfase na planctivoria em ambientes lênticos de água doce no Brasil**. 1 ed. São Carlos: Rima. p. 1-24, 2005.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. e MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista UNIMAR**, v. 16, n. 4, p. 229-242, 1994.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; FURUYA, W. M.; FURUYA, V. R. B.; MARANHÃO, T. C. F. Alimentação natural de larvas do cascudo preto *Rhinelepis aspera* Agassiz, 1829 (Osteichthyes - Loricariidae) em tanques de cultivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24(especial), p.109-117, 1997.

WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p.175-189, 1989.

APÊNDICE B

Tabela 1. Distribuição dos protozoários epibiontes (*E. pygmaeum*) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie *B. deitersi*.

	Cabeça	Dorso Superior	Dorso Inferior	Ventre	Total
<i>B. deitersi</i>	0	0	3	5	8
<i>B. deitersi</i>	0	1	4	4	9
<i>B. deitersi</i>	0	0	2	2	4
<i>B. deitersi</i>	0	0	4	0	4
<i>B. deitersi</i>	0	1	0	4	5

Tabela 2. Distribuição dos protozoários epibiontes (*E. pygmaeum*) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie *D. ambigua*.

	Cabeça	Dorso Superior	Dorso Inferior	Ventre	total
<i>D. ambigua</i>	0	0	2	1*	3
<i>D. ambigua</i>	0	0	3	0	3
<i>D. ambigua</i>	2	2	0	2	6
<i>D. ambigua</i>	2	0	4	2	8
<i>D. ambigua</i>	0	3	0	0	3
<i>D. ambigua</i>	4	0	0	0	4
<i>D. ambigua</i>	0	2	4	0	6
<i>D. ambigua</i>	1	1	4	0	6

Tabela 3. Distribuição dos protozoários epibiontes (*E. pygmaeum*) encontrados sobre a carapaça de indivíduos da espécie *M. micrura*.

	cabeça	Dorso Superior	Dorso Inferior	Ventre	total
<i>M. micrura</i>	0	0	4	0	4
<i>M. micrura</i>	0	0	1	4	5
<i>M. micrura</i>	7	1	7	0	15
<i>M. micrura</i>	2	0	0	0	2
<i>M. micrura</i>	0	1	4	0	5
<i>M. micrura</i>	2	0	0	0	2
<i>M. micrura</i>	2	1	0	1	4
<i>M. micrura</i>	2	1	1*	0	4
<i>M. micrura</i>	1	2	0	0	3
<i>M. micrura</i>	0	0	4	0	4
<i>M. micrura</i>	1	0	2	0	3

<i>M. micrura</i>	2	1	7	0	10
<i>M. micrura</i>	0		2	4	6
<i>M. micrura</i>	0	1	4	0	5
<i>M. micrura</i>	1	0	4	0	5
<i>M. micrura</i>	2	0	0	0	2
<i>M. micrura</i>	0	1	0	0	1

Tabela 4. Número de sobreviventes durante os cinco dias de experimentos para a espécie de cladóceros *D. ambigua* com e sem epibiontes aderidos na carapaça.

	Réplica	T0	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
Com epibionte	A	10	10	9	9	3	0
	B	10	10	10	6	2	0
	C	10	10	6	5	0	0
Sem epibionte	D	10	8	6	6	5	0
	E	10	10	9	8	8	0
	F	10	10	8	8	5	0

Tabela 5. Número de sobreviventes durante os cinco dias de experimentos para a espécie de cladóceros *B. deitersi* com e sem epibiontes aderidos na carapaça.

	Réplica	T0	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
Com epibionte	A	10	10	9	9	5	0
	B	10	8	8	6	6	0
	C	10	10	10	8	5	0
Sem epibionte	D	10	8	6	5	1	0
	E	10	9	7	4	0	0
	F	10	7	7	4	3	0

Tabela 6. Número de sobreviventes durante as 48 horas de experimento para a espécie de cladóceros *D. ambigua*, quando testada individualmente em placa de cultivo celular, com e sem epibiontes aderidos na carapaça.

	12h	24h	36h	48
Com epibionte	10	8	6	4
Sem epibionte	10	8	6	5

Tabela 7. Número de sobreviventes durante as 48 horas de experimento para a espécie de cladóceros *B. deitersi*, quando testada individualmente em placa de cultivo celular, com e sem epibiontes aderidos na carapaça.

	12h	24h	36h	48
Com epibionte	10	9	8	6
Sem epibionte	9	8	7	6

Tabela 8. Taxa de colonização/ligação do epibionte *E. pygmaeum* no cladóceros *D. ambigua*. Os números indicam a quantidade de zooides observados a cada período de tempo após o início do experimento e a localização nos mesmos. DI = região dorsal inferior, DS = região dorsal superior, V = região ventral e C= região da cabeça e antenas.

	6 h	12 h	24 h	30 h	48 h
<i>D. ambigua</i> 1	2 DI	2 DI 1V	2 DI 1V	3DI 3V 1C	3DI 3V 1C
<i>D. ambigua</i> 2	0	1DS	1DS	1DS	1DS
<i>D. ambigua</i> 3	1 DI	1DI	3DI 2V	4DI 1DS 2V 1C	4DI 1DS 2V 1C
<i>D. ambigua</i> 4	2DI 1 DS	2DI 1DS	2DI 1DS	2DI 1DS	2DI 1DS
<i>D. ambigua</i> 5	0	0	1DS	1DS	1DS
<i>D. ambigua</i> 6	0	1V	1 V	1V	1V
Média total	1	1,5	2,3	3,5	3,5

Tabela 9. Taxa de colonização/ligação do epibionte *E. pygmaeum* no cladóceros *B. hagmanni*. Os números indicam a quantidade de zooides observados a cada período de tempo após o início do experimento e a localização nos mesmos. DI = região dorsal inferior, DS = região dorsal superior, V = região ventral e C= região da cabeça e antenas.

	6 h	12 h	24 h	30 h	48 h
<i>B. hagmanni</i> 1	0	0	0	2DI	2DI
<i>B. hagmanni</i> 2	0	0	1DS	1 DS	DS
<i>B. hagmanni</i> 3	0	1V	1V	1V	1V
<i>B. hagmanni</i> 4	0	0	0	1DI	1DI
<i>B. hagmanni</i> 5	0	0	0	0	2DS
<i>B. hagmanni</i> 6	0	0	2DI	2DI	2DI 1C
Média total	0	0	2	2	3

Tabela 10. Seletividade de *E. pygmaeum* por basibiontes.

		6h	12h	24h	30h	48h	Total
<i>D. ambigua</i> x <i>B. hagmanni</i>	Rep1	0	0	2 <i>D. amb</i>	2	5	5
	Rep2	0	1 <i>D. amb</i>	1	3	3	3
	Rep3	0	1 <i>D. amb</i> e 1 <i>B. hag</i>	1 e 1	1 e 1	1 e 1	1 e 1
	Rep4	0	1 <i>D. amb</i>	3	3	3	3
	Rep5	0	0	1 <i>D. amb</i>	1	1	1
	Rep6	0	0	2 <i>D. amb</i> e 1 <i>B. hag</i>	2 e 1	4 e 1	4 e 1
<i>D. ambigua</i> x. <i>adult</i> <i>ovada</i>	Rep1	0	1 adulta	1	1	1	1
	Rep2	0	1 adulta	1 adulta e 1 jovem	1 e 1	1 e 1	1 e 1
<i>D. ambigua</i> x. <i>adult</i> <i>ovada</i>	Rep3	1 adulta	1	1	3	3	3
	Rep4	2 adulta	2	2	2	2	2
	Rep5	0	0	1 adulta	1	4	4
	Rep6	0	0	1 adulta	5	7	7
<i>B. hagmanni</i> x. <i>adult</i> <i>ovada</i>	Rep1	0	0	1 adulta	1	1	1
	Rep2	0	1 adulta	1	1	1	1
	Rep3	0	0	0	0	0	0
	Rep4	0	0	1 adulta	1	2	2
	Rep5	0	0	2 adulta	2	2	2
	Rep6	0	0	0	0	1 jovem	1
<i>T. decipens</i> x <i>N. iheringi</i>	Rep1	0	0	0	0	0	0
	Rep2	0	0	0	0	0	0
	Rep3	0	0	0	0	0	0
	Rep4	0	0	0	0	0	0
	Rep5	0	0	0	16Ovissaco	20	20
	Rep6	0	0	0	0	0	0
<i>N. iheringi</i> saco	Rep1	0	0	0	0	0	0
	Rep2	0	0	0	4 Saco ovígero	9	9
<i>N. com</i>	Rep3	0	0	0	0	0	0

	Rep4	0	0	0	1	saco ovígero	5	5		
	Rep5	0	0	0	0		6	saco ovígero	6	
	Rep6				3	saco ovígero	10	0*	Eclosão do ovissaco	0
x	Rep1	0	0	2 <i>D. amb</i>	3		0		3	
<i>D. ambigua</i> <i>T. decipiens</i>	Rep2	0	1 <i>D. amb</i>	1	2		5		5	
	Rep3	0	0	1 <i>D. amb</i>	1		2		2	
	Rep4	0	0	0	0		0		0	
	Rep5	0	1 <i>D. amb</i>	1	1		1		1	
	Rep6	0	2 <i>D. amb</i>	3	4		4		4	
	<i>B. haggmanni</i> x 3 <i>K. cochlearis</i>	Rep1	0	0	0	0		0		0
Rep2		0	0	1 <i>B. hag</i>	1		1		1	
Rep3		0	0	0	0		1	<i>B. hag</i>	1	
Rep4		0	0	1 <i>B. hag</i>	1		3		3	
Rep5		0	0	0	0		1	<i>B. hag</i>	1	
Rep6		0	0	0	0		0		0	
<i>T. decipiens</i> x 3 <i>A. priodonta</i>	Rep1	0	0	0	0		0		0	
	Rep2	0	0	0	0		0		0	
	Rep3	0	0	0	0		0		0	
	Rep4	0	0	0	0		0		0	
	Rep5	0	0	0	0		0		0	
	Rep6	0	0	0	0		2	<i>T. dec</i>	2	
3 <i>K. cochlearis</i> x 2 <i>A. priodonta</i>	Rep1	0	0	0	0		0		0	
	Rep2	0	0	0	1	ovo <i>K. cochlearis</i>	2		2	
	Rep3	0	0	0	0		0		0	
	Rep4	0	0	0	0		0		0	
	Rep5	0	0	0	0		0		0	
	Rep6	0	0	0	0		0		0	

Tabela 11. Bactérias consumidas (x 10³) pelos cladóceros testados, *M. micrura*, *D. ambigua* e *B. deitersi* no experimento de bacterivoria *in vitro*.

	Cladóceros								
	<i>M. micrura</i>			<i>D. ambigua</i>			<i>B. deitersi</i>		
Com	230	265	312	316	273	294	220	250	178
epibiontes	322	216	241	285	190	235	270	185	196
	304	240	277	319	255	372	260	196	190
Sem	357	330	250	402	327	351	288	268	290
epibiontes	248	430	336	415	356	405	328	276	220
	285	298	247	412	305	307	286	240	280

Tabela 12. Bactérias consumidas (x 10³) pelo protozoário *E. pygmaeum* em sua forma epibionte e livre natante no experimento de bacterivoria *in vitro*.

Epibionte	3,9	4,4	4,6	4,8	6,2	2,9	5,1	3,7	4,2
	4,3	5,4	4,5	5,8	4,6	5,2	4,9	4,8	3,2
	4,8	4,9	5,7	3,8	5,0	4,6	4,1	4,5	3,9
Livre	3,0	3,3	4,5	3,4	3,7	3,3	3,0	2,9	4,0
	2,2	4,5	2,7	2,9	4,1	4,3	2,5	3,3	3,6
	2,9	4,0	4,2	3,4	2,8	3,1	3,2	4,0	4,4