



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CAMPUS RECIFE**

**LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI**

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DA ZOOXANTELA *DURUSDINIUM GLYNNII* À  
CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO CRU**

**RECIFE, PERNAMBUCO**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CAMPUS RECIFE**

**BACHARELADO EM OCEANOGRAFIA**

**LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI**

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DA ZOOXANTELA *DURUSDINIUM GLYNNII* À  
CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO CRU**

TCC apresentado ao Curso de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

**Orientador(a):** Marius Nils Müller

**RECIFE, PERNAMBUCO**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Jannuzzi, Luiz Gustavo de Sales .

Avaliação fisiológica da zooxantela *Durusdinium glynnii* à contaminação por petróleo cru / Luiz Gustavo de Sales Jannuzzi. - Recife, 2023.  
46 : il., tab.

Orientador(a): Marius Nils Müller

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Oceanografia - Bacharelado, 2023.

1. Derramamento de petróleo. 2. zooxantela. 3. isótopos estáveis. 4. HPAs. 5. Recifes de coral. I. Müller, Marius Nils . (Orientação). II. Título.

550 CDD (22.ed.)

LUIZ GUSTAVO DE SALES JANNUZZI

**AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DA ZOOXANTELA *DURUSDINIUM GLYNNII* À  
CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO CRU**

TCC apresentado ao Curso de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marius Nils Müller (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando Antônio do Nascimento Feitosa (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Carlos Yure Barbosa de Oliveira (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

MSc. Alef Jonathan da Silva (Membro suplente)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, meu pai e minha avó, minhas maiores inspirações, que sempre me apoiaram e me auxiliaram durante esta jornada, os quais não tenho palavras suficientes para agradecer.

Ao meu orientador, Marius, por todos os conselhos, risadas, ensinamentos e oportunidades. Meus mais sinceros agradecimentos pelos 4 anos de trabalho juntos até agora, que me fizeram crescer na vida pessoal/acadêmica.

Ao meu amor, Liana, que mesmo chegando nos momentos finais desta trajetória, pode me amparar, me dar forças e confiança para continuar. Agradeço pelos momentos vividos, companheirismo e pela paciência durante os momentos de ausência.

À minha irmã, Manoela, pelo apoio e incentivo, que mesmo de longe me deu forças para continuar.

À todos os meus amigos: Júlio César, Lia Mara, Levi Lima, Bruno Rodrigues, e Tibni Aquino, que são poucos, mas são para sempre. Agradeço pelos incontáveis momentos de risadas durante a árdua trajetória até aqui. Mesmo alguns estando longe, foram capazes de me animar e me tirar de alguns dos momentos mais difíceis da minha vida, dando-me forças e confiança para permanecer no caminho certo.

Ao projeto EducaOcean, seus integrantes e coordenador, que foram extremamente importantes no meu crescimento pessoal e acadêmico.

À Mario, prof. de engenharia de pesca da UFS, que me apresentou o encantador mundo da oceanografia.

Por último, mas não menos importante, agradeço a UFPE e aos programas PIBIC da FACEPE e CNPq pela concessão de bolsas que me proporcionaram recursos para continuar mantendo-me distante de casa e estudando.

“O mar não apenas é o veículo de uma sobrenatural e prodigiosa existência, não apenas é movimento, é amor, é o infinito vivo”

- Jules Verne, 20.000 léguas submarinas

## RESUMO

O fitoplâncton são algas microscópicas que, no geral possuem baixa capacidade de resistência e alta capacidade de resiliência. Danos fisiológicos são quase que imediatamente refletidos na flutuabilidade da densidade das populações. Diversos estudos avaliam a capacidade de resistência do fitoplâncton aos aumentos nas concentrações de Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são poluentes orgânicos persistentes com caráter mutagênico e carcinogênico. Dentre os impactos, observa-se declínios no crescimento, mudanças na integridade das paredes celulares e redução da taxa fotossintética. Dessa forma, o trabalho objetivou avaliar a capacidade de resistência e resiliência de um dinoflagelado simbiote de invertebrados marinhos à contaminação por petróleo cru. As células de *D. glynnii* foram incubadas em diluições de 0%, 50% e 100% de FSA (Fração solúvel do óleo), tendo parâmetros como taxa de crescimento, aspect ratio e tipo celular (cocóide vs mastigote) monitorados. A concentração total de HPAs foi 1704,75 ng L<sup>-1</sup>, que acabou causando uma redução de 50% na taxa de crescimento (ErC50) da espécie (0,66 para 0,33 d<sup>-1</sup>; p < 0,05) no experimento 1. O aumento nos valores do aspect ratio indicou um aumento no arredondamento das células, sendo confirmado pelo aumento na porcentagem de células cocóide. Isso pode ser causado por um aumento na fase de replicação do DNA do ciclo celular, a fase S. Após a contaminação, as células foram incubadas em água do mar sem contaminantes (experimento 2), onde os mesmos parâmetros foram monitorados para determinar a capacidade de resiliência. No experimento 2, o tratamento de 50% mostrou uma capacidade de resiliência, com taxas de crescimento e valores de desvio padrão semelhantes ao controle (p > 0,05). A taxa de crescimento do tratamento de 100% não apresentou diferenças significativas com o controle (p > 0,05). Porém, o alto desvio padrão (0% = 0,07, 50% = 0,02, 100% = 0,17) indica que algumas réplicas ainda não se recuperaram, podendo ser um sinal de danos genéticos que se estendem por mais gerações. Os altos desvios padrões no aspect ratio e na porcentagem do tipo de células também são uma indicação de uma recuperação parcial do tratamento de 100%. A taxa de crescimento de *Durusdinium glynniil* foi afetada com o aumento da concentração de HPAs. Ademais, alterações no ciclo celular podem ter sido identificadas com o aumento da porcentagem de células do tipo cocóide. Em contrapartida, após colocados sob meio de cultivo sem contaminantes, culturas cultivadas sob concentração menor que FSA 100% possuíram uma capacidade de recuperação em relação as cultivadas sob maior concentração, que apresentaram efeitos crônicos prolongados para gerações subsequentes

**Palavras-chave:** Derramamento de petróleo; zooxantela; isótopos estáveis; HPA; coral

## ABSTRACT

Phytoplankton are microscopic algae that have low resistance and high resilience capacity. Physiological damage is almost immediately reflected in population density fluctuations. Several studies evaluate the resilience of phytoplankton to increases in the concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), which are persistent organic pollutants with mutagenic and carcinogenic characteristics. The impacts include declines in growth rate, changes in cell wall integrity and reduced photosynthetic rate. This work aimed to evaluate the resistance and resilience of a marine invertebrate symbiont species, *Durusdinium glynnii*, in two experiments, the contamination experiment (experiment 1) and the recovery experiment (experiment 2). For this, cells were incubated in dilutions of 0%, 50% and 100% WSF (Water Soluble Fraction), having parameters such as growth rate, aspect ratio and cell type (coccoid and mastigote) monitored. The total concentration of PAHs was 1704.75 ng L<sup>-1</sup>, which ultimately caused a 50% reduction in the growth rate (ErC50) of the species (0.66 to 0.33 d<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ) in experiment 1. The increase in aspect ratio values indicated an increase in cell rounding, and was confirmed by an increase in the percentage of coccoid cells. This may be caused by an increase in the DNA replication phase of the cell cycle, the S phase. After contamination, the cells were incubated in seawater without contaminants, where the same parameters were monitored to determine resilience. In experiment 2, the 50% treatment showed resilience, with growth rates and standard deviation values similar to the control ( $p > 0.05$ ). The growth rate of the 100% treatment, on the other hand, showed no significant differences with the control ( $p > 0.05$ ). However, the high standard deviation indicates that some replicates have not yet recovered, which may be a sign of genetic damage extending over several generations. The high standard deviations in aspect ratio and percentage of cell type confirm the partial recovery from the 100% treatment. The growth rate of *Durusdinium glynnii* was affected with increasing HPAs concentration. Furthermore, changes in the cell cycle may have been identified with increasing percentage of coccoid type cells. In contrast, after placed under normal culture medium, cultures grown at concentrations less than the total concentration showed a capacity to recover, while the one grown at the total concentration of PAHs showed chronic effects, which are transferred to subsequent generations.

**Keywords:** Oil spill; zooxanthellae; stable isotopes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo da vida de <i>Symbiodinium</i>	15
Figura 2 – Concentrações dos 16 HPAs tidos como prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) em comparação com o de MÜLLER et al. (2021)	28
Figura 3 – Gráficos de densidade populacional para o experimento de contaminação. A) 0% FSA; B) 50% FSA e C) 100% FSA	29
Figura 4 – Taxas de crescimento das 3 amostras para o experimento 1	31
Figura 5 – Porcentagens entre as células mastigote, cocóide e não identificadas para no experimento 1	32
Figura 6 – Valores de aspect ratio para o experimento 1	33
Figura 7 – Gráficos de densidade populacional do experimento 2. A) tratamento 0%; B) tratamento 50%; C) tratamento 100%	34
Figura 8 – Taxas de crescimento para o experimento 2	35
Figura 9 – Porcentagens dos tipos de células mastigote, cocóide e não identificadas para o experimento 2	36
Figura 10 –Valores de aspect ratio para o experimento 2	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos, massas utilizadas e concentrações finais do meio F/2	20
Tabela 2– Volumes de meio F/2, meio com FSA e as suas respectivas concentrações de HPAs finais	23
Tabela 3 – Analitos, números de anéis benzênicos e suas respectivas concentrações medidas na FSA	26
Tabela 4 – Valores de C/N, $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para os dois experimentos	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>CULTIVO FOTOTRÓFICO DA ESPÉCIE .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>PREPARAÇÃO DO MEIO F/2 CONTAMINADO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISE DE HPAs DISSOLVIDOS NA ÁGUA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>EXPERIMENTOS DE CONTAMINAÇÃO E RECUPERAÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE ISOTÓPICA CELULAR E RAZÃO ATÔMICA DO C:N.....</b>	<b>24</b>
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>FUTUROS PASSOS .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra fitoplâncton vem do grego ‘*phyton*’ (planta) e ‘*planktos*’ (errante), sendo composto por algas microscópicas que são carregadas pelos movimentos dos corpos d’água (CHEN; ZHANG; GUAN, 2018; “phytoplankton | Definition, Examples, & Facts | Britannica”, 2019). Através da fotossíntese, a energia química do fitoplâncton é obtida utilizando a energia solar, nutrientes inorgânicos e água, resultando em moléculas orgânicas e oxigênio. As microalgas são responsáveis pela produção de mais de 50% do oxigênio atmosférico, com estimativas chegando em 80% (WITMAN, 2017). O fitoplâncton possui um papel fundamental no ambiente, sendo a base da cadeia alimentar e transferindo energia para os níveis tróficos superiores, além de participar da alça microbiana e dos ciclos biogeoquímicos (HOPPENRATH; JUAN, 2012). Os dinoflagelados são um grupo de eucariotos unicelulares pertencentes ao filo Dinoflagellata. Espécies de dinoflagelados são comumente consideradas algas, fazendo parte em sua maioria do plâncton marinho, podendo também habitar ambientes de água doce (SARJEANT, 1974).

O termo dinoflagelado tem origem do grego *dinos*, que significa “rodopio” e do latim, *flagellum*, que se refere a um “chicote” (CARTY; PARROW, 2015). O primeiro termo se refere ao padrão de natação bastante característico dos dinoflagelados, que geralmente é rápido, em movimentos circulares e impulsionado para a frente, devido a presença de um flagelo longitudinal e um transversal (DIPPER, 2022). O segundo termo se dá principalmente pela presença destes flagelos. Células de dinoflagelados possuem clorofila *a* e *c*, alguns pigmentos acessórios como dinoxantina e peridinina (BERCOVICI; VELEKOOP 2017), cromossomos condensados e um núcleo permanente (STEIDINGER, 1997). Os dinoflagelados podem produzir energia para suprir o seu metabolismo por meio da fotossíntese, ou podem obter energia por meio da fagotrofia, garantindo a eles a mixotrofia (PLACE et al. 2012). Alguns podem produzir potentes neurotoxinas, capazes de causar mortalidade desde copépodes até leões marinhos (ANDERSON, 1989; CARTY; PARROW, 2015). Atualmente, dinoflagelados tem recebido mais atenção por conta de espécies que podem ser utilizadas na produção de biocombustível, podendo ser retirados além do conteúdo lipídico, metabólitos especiais para medicina e a biomassa excedente, utilizada para digestão anaeróbica, resultando na produção do gás metano ou biogás (GRÜNEWALD, 2012).

A família *Symbiodiniacea* é datada do meio da era mesozoica, mais especificamente no período jurássico, aproximadamente 160 milhões de anos atrás (BOUCKAERT et al. 2014), e é a família de dinoflagelados endossimbiontes mais conhecida (STAT et al. 2006), tendo suas espécies comumente denominadas de zooxantelas. LAJEUNESSE et al. (2018) revisou sistematicamente o táxon *Symbiodiaceae* e observou entre os trabalhos diferenças na morfologia, bioquímica, fisiologia, comportamento e na genética das células. Análises filogenéticas propuseram que o gênero *Symbiodinium* é composto por espécies que possuem linhagens com diferentes características evolucionárias (ROWAN; POWERS, 1991), separando o gênero em 9 clados, identificados inicialmente por letras do alfabeto, de A-I. Posteriormente, mediante revisão sistemática, a nomenclatura por letras do alfabeto foi substituída por outras baseadas no acervo de informações biológicas disponível, definindo assim 6 novos gêneros. Primeiramente, a nomenclatura do gênero *Symbiodinium* foi transferida para o clado A. Cada clado, do A até o G recebeu uma nova nomenclatura. O gênero *Durusdinium* foi designado para o clado D (LAJEUNESSE et al. 2018)

Células de *Symbiodiniacea* são encontradas como um cisto vegetativo marrom/amarelado (STAT et al. 2006), e podem ficar em simbiose com diversos invertebrados marinhos, como tridacnas, foraminíferos, moluscos, esponjas e cnidários (CARLOS et al. 1999). O sucesso evolucionário dos ecossistemas recifais tem sido associado com a simbiose entre os corais e as zooxantelas (MULLER-PARKER et al., 2015). Diante tantas, as principais contribuições desta microalga para os corais são a aquisição de nutrientes inorgânicos, aumento das taxas de calcificação e a fotoautotrofia como meio de nutrição (STAT et al. 2008). Além disso, a plasticidade fenotípica entre os clados de *Symbiodinium* faz com que a simbiose seja um meio de resistência a mudanças dos parâmetros ambientais (BOTANA et al. 2022; RUSSNAK et al. 2021). Essa plasticidade confere as espécies de *Symbiodinium* a possibilidade de sobreviver/resistir em uma gama de regiões, como no oceano Índico (YANG et al., 2012;), no caribe (LAJEUNESSE et al., 2010<sup>a</sup>; LAJEUNESSE, 2002), no atlântico sul (RABELO et al., 2014) e no oceano pacífico (Rowan, 1998; BAKER et al., 2004; LAJEUNESSE et al., 2004). Além de serem encontradas em simbiose, células de *Symbiodinium* podem viver também na coluna d'água (GRANADOS-CIFUENTES et al. 2015; ZHOU et al. 2012; YAMASHITA; KOIKE, 2012). Quando em simbiose, as células podem ser encontradas na forma

cocóide, que é a forma imóvel do gênero (BLANK, 1987). Porém, as células possuem duas formas, uma móvel, denominada de mastigote, e uma imóvel, denominada de cocóide (LAJEUNESSE et al. 2012), possuindo alternância entre as duas durante o ciclo reprodutivo. Durante a noite, as células iniciam um ciclo de divisão nuclear, e quando expostas a luz, uma célula gera duas ou três novas células móveis (LAJEUNESSE et al. 2012). Para isso, as células perdem o seu flagelo e param de nadar, sofrendo depois uma rápida mudança para a forma cocóide (Fig. 1).

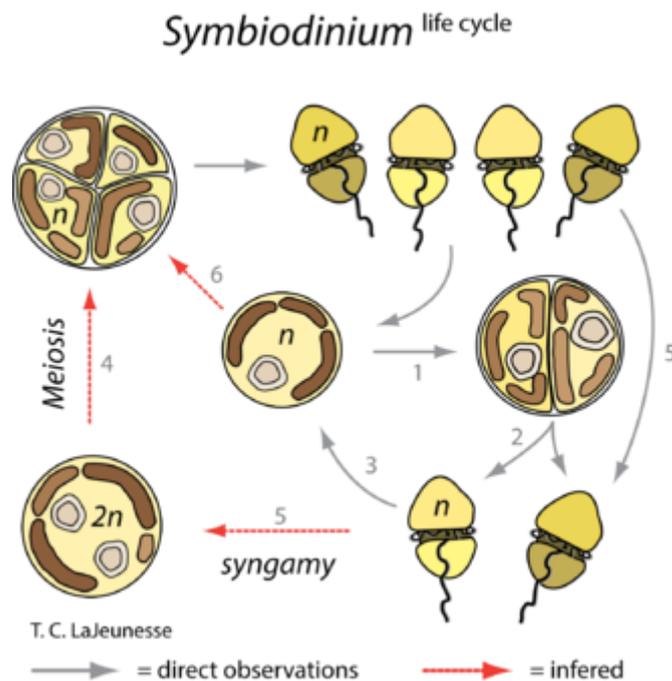


Figura 1: ciclo da vida de células de *Symbiodinium*. Fonte: Wikipédia

A resistência é um dos aspectos da tão complexa e estudada estabilidade ecológica, sendo definida como a capacidade de tolerância de comunidades, populações ou espécies a distúrbios em curto prazo (LEVIN et al., 2009). A resistência do fitoplâncton está associada a características individuais de cada célula. Por exemplo, experimentos realizados por MOOSER et al. (1972 a,b) demonstraram que a espécie de diatomácea *Thalassiosira pseudonana* é altamente sensível a bifenilos policlorados (PCBs), enquanto células de *Dunaliella tertiolecta* apresentaram resistência a altas concentrações desses compostos. Já a resiliência, é tida como a propriedade de retorno aos estados normais após uma perturbação (FOLKE et al., 2004). Diferente da resistência, a resiliência não depende das características de um só indivíduo, mas da população no geral. Geralmente, espécies de fitoplâncton possuem uma capacidade maior de resiliência do que de

resistência. Porém, a capacidade do fitoplâncton de ser resiliente a estressores específicos pode diminuir com a adição de efeitos aditivos, sinérgicos e antagonísticos de outras perturbações. Sejam elas físicas, químicas e/ou biológicas (CARPENTER; PACE; WILKINSON, 2022). Diversos estudos buscam avaliar a capacidade de resiliência de espécies de fitoplâncton (CARPENTER; PACE; WILKINSON, 2022; CARPENTER et al., 2001; ELSER et al., 1998; KOVAČ; PLATT; SATHYENDRANATH, 2020). Populações de fitoplâncton possuem alta variabilidade genética em populações naturais (COLLINS; ROST; RYNEARSON, 2013), podendo estar associada com a distância geográfica (CASTELEYN et al., 2010; DEBORA IGLESIAS-RODRIGUEZ et al., 2006) e/ou outros fatores (RICHLEN et al., 2012; RYNEARSON; VIRGINIA ARMBRUST, 2004). Nos casos de crescimento em condições ambientais diversas, o sucesso reprodutivo pode ser recuperado aos poucos por meio da aclimação, podendo se estender por até 500 gerações no caso de aclimação à acidificação oceânica da espécie *Emiliana huxleyi*, cultivada em condições laboratoriais (LOHBECK; RIEBESELL; REUSCH, 2012). Assim, acredita-se que esta alta variabilidade genética atrelada ao curto tempo de mudança de geração faça com que as espécies de fitoplanctons marinhos sejam candidatos fortes à adaptação a alterações ambientais como a acidificação oceânica (COLLINS; ROST; RYNEARSON, 2013) sem saber é claro os requisitos e o tempo necessário para que isso ocorra.

Organismos modelo são espécies de seres vivos que são utilizadas em laboratório para ajudar os cientistas a elucidar processos biológicos e fisiológicos (ANKENY; LEONELLI, 2020), necessitando de facilidade para cultura em laboratório, tempo de geração curto e altas taxas reprodutivas. Espécies modelo são escolhidas para gerar informações que irão além do organismo original, podendo ser estendidas para outros organismos de outros níveis. Trabalhar com organismos modelo é trabalhar com parte da natureza que eles representam, sendo espelhos da variabilidade de uma população. Entender como os organismos reagem em relação a mudanças dos parâmetros ambientais é de extrema importância para saber como outros organismos que interagem ou dependem deles irão se comportar também, e assim por diante. Por exemplo, MÜLLER et al. (2021) utiliza *Durusdinium glynnii* em parte do seu experimento para entender como se dá a acumulação dos compostos do petróleo cru nas células. Tal experimento seria passível de continuação, com a

premissa de elucidar como é a transferência desses compostos para o nível trófico superior por meio da alimentação.

O petróleo é formado principalmente de carbono e hidrogênio. Porém, apresenta-se como um complexado de misturas de compostos químicos que podem ser perigosos (SULLIVAN, 2005). Dentre eles destacam-se as parafinas, os compostos naftênicos e os hidrocarbonetos aromáticos. Além deles, elementos traço como enxofre, oxigênio, nitrogênio, metais e até elementos radioativos podem estar presentes na composição do petróleo cru (GAD, 2014). Cada petróleo possui a sua “assinatura”, variando na composição geoquímica e concentração dos compostos (STAUFFER; DOLAN; NEWMAN, 2008). Focando nos hidrocarbonetos, que constituem entre 50% e 98% do petróleo, há dois tipos principais, os alifáticos e os aromáticos (GAD, 2014). Os hidrocarbonetos alifáticos são os mais abundantes na composição, sendo caracterizados por moléculas de lineares ou ramificadas de cadeia aberta (MACAYA et al., 2019), sendo representados pelos n-alcenos, isoalcenos, cicloalcenos, etc. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos com dois ou mais anéis benzênicos (MEADOR, 2008), fazendo parte dos poluentes orgânicos persistentes (POPs). Devido a sua capacidade de dispersão, potencial mutagênico, carcinogênico e por estarem entre os poluentes mais abundantes do planeta (UNEP, 1992; THUY; LOAN; PHUONG, 2018). Com o crescente desenvolvimento urbano e industrialização, ficou ainda mais fácil dos HPAs chegarem aos oceanos, ocorrendo principalmente em operações de perfuração, refinamento, combustão, acidentes que causam derrame e problemas durante o transporte (GAD, 2014), causando danos imprevisíveis devido sua complexa mistura de diversos compostos.

Por conta da variabilidade da composição e concentração dos compostos no petróleo cru, a reação das espécies de fitoplâncton não pode sempre ser prevista, levando muitas vezes a surpresas. Para entender de onde vem o principal efeito, pode-se submeter as espécies a apenas um HPA, ao invés da mistura, contrariando o que geralmente ocorre no ambiente, mas gerando dados importantes para entender qual HPA possui maior toxicidade para tal espécie e qual efeito irá predominar quando a espécie for submetida a uma mistura. MÜLLER et al., (2021) observou que o cultivo de culturas de *Durusdinium glynnii* sob condições de contaminação com HPAs causou uma bioacumulação ativa dos compostos do petróleo. A acumulação dos HPAs pode ser alterada pela diferença do conteúdo

lipídico na parede celular das algas (MARTÍNEZ; JARILLO; ORÚS, 1991). Algumas espécies de algas possuem maior facilidade de acumulação, enquanto outras possuem uma maior facilidade de degradação dos compostos (HONG et al., 2008; KIRSO; IRHA, 1998). Em relação a efeitos individuais dos HPAs em espécies de fitoplâncton, MARWOOD et al., (1999) investigou o potencial fotossintético de uma comunidade e observou que em uma concentração significativa de 200.000 ng L<sup>-1</sup> de antraceno, a toxicidade do petróleo só era significativa no período da manhã. Alguns anos depois MARWOOD et al., (2003), com concentrações de antraceno em 357.000 ng L<sup>-1</sup>, pequenas diferenças de toxicidade foram observadas durante o período matutino e noturno, havendo diminuição no potencial fotossintético das células. RIMET et al., (2004) observou mudanças na estrutura da comunidade fitoplanctônica submetida a contaminações de fluoranteno, além de alterações na morfologia das frústulas de diatomáceas. Além desses efeitos, os HPAs podem interferir no conteúdo lipídico das células, fluorescência, integridade da membrana, genética e crescimento do fitoplâncton (BEN OTHMAN et al., 2023).

Assim, é de extrema importância saber como a importante espécie simbiote de corais *Durusdinium glynnii* se comporta com a contaminação por uma mistura de HPAs na fração solúvel em água do petróleo (FSA), e se ela é capaz de se recuperar, fisiologicamente falando. MÜLLER et al. (2021) avaliou a resposta fisiológica de *Durusdinium glynnii* à fração acomodada em água do petróleo (FAA). A diferença entre FAA e FSA consiste na filtração da solução após a preparação. Após a preparação da FSA, a solução é filtrada, ao contrário da FAA.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a resposta fisiológica e capacidade de resiliência de *Durusdinium glynnii* à contaminação por petróleo cru

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os efeitos da água do mar contaminada com petróleo cru à fisiologia de *Durusdinium glynnii*;
- Determinar o limite fisiológico (ErC50) de *Durusdinium glynnii* ao petróleo cru;

- Determinar possíveis danos permanentes ao material genético da espécie, assim como a sua aptidão competitiva sob condições contaminadas;
- Identificar possíveis mudanças na composição isotópica celular e na razão estequiométrica do C e N particulado;
- Identificar uma possível capacidade de recuperação da espécie através do monitoramento dos parâmetros e da composição isotópica celular

### **3 METODOLOGIA**

Para atingir os objetivos supracitados, o trabalho foi dividido em dois experimentos, um de contaminação e outro de recuperação. Para dados obtidos no experimento 1 (contaminação), a nomenclatura dada será de 0% FSA, 50% FSA e 100% FSA, e para dados obtidos no experimento 2 (recuperação), a nomenclatura utilizada será tratamento 0%, tratamento 50% e tratamento 100%.

#### **3.1 CULTIVO FOTOTRÓFICO DA ESPÉCIE**

Os experimentos foram executados em uma sala climatizada com acesso restrito à maioria das pessoas, diminuindo assim a entrada de sujeira e as trocas de calor. Nessa sala, a espécie foi mantida em uma estante próxima a parede com lâmpadas de LED de 9 watts na parte de trás. O fluxo fotônico utilizado foi de  $115 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que foi mensurado com o auxílio de um lux\u00f4metro, possuindo seu valor convertido utilizando uma constante para o tipo de lâmpada, com valor de 0,018 (l\u00e2mpada LED 6000 K). Foi determinado um fotoper\u00edodo de 12:12 horas de altern\u00e2ncia entre claro e escuro. A temperatura da sala foi mantida constante em  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para fornecer os nutrientes necess\u00e1rios para o crescimento da esp\u00e9cie, foi utilizado um meio de cultura est\u00e9ril f/2 dissolvido em \u00e1gua do mar natural delineado por GUILLARD (1975), com os respectivos nutrientes, metais tra\u00e7o, vitaminas, solu\u00e7\u00e3o quelante e as suas concentra\u00e7\u00f5es elucidadas na Tabela 1. Vale ressaltar que o composto que cont\u00e9m silicato n\u00e3o foi adicionado, visto que a esp\u00e9cie n\u00e3o possui fr\u00fascula silicosa como as diatom\u00e1ceas. As concentra\u00e7\u00f5es de nutrientes e elementos necess\u00e1rios para o crescimento da esp\u00e9cie s\u00e3o devidamente proporcionados por esse meio de cultura, aumentando assim a confiabilidade dos dados obtidos. Para evitar a limita\u00e7\u00e3o de nutrientes, as culturas eram mantidas sempre em baixas densidades de c\u00e9lulas.

Tabela 1: Compostos, massas utilizadas e concentrações finais do meio F/2 (GUILLARD, 1975)

Composto	Concentração (g)/100 mL	Concentração final ( $\mu$ M)
NaNO <sub>3</sub>	7,50	883,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,50	36,30
Na <sub>2</sub> EDTA <sup>+</sup>	4,36/900 mL	11,70
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	3,15/900 mL	11,70
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,98	0,04
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,20	0,08
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,00	0,05
MnCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	18,0	0,09
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,63	0,09
Tiamina HCl	0,10	3,31
Biotina	$5 \times 10^{-4}$	20,46
Cobalamina	$5 \times 10^{-4}$	3,68

Para preparar o meio de cultivo, um litro de água do mar foi pré-filtrada utilizando filtros de ~20  $\mu$ m de porosidade, eliminando assim partículas maiores. Após isso, a água pré-filtrada foi separada em um Erlenmeyer e filtrada em um filtro de porosidade 0,22  $\mu$ m com o auxílio de uma bomba à vácuo. É importante salientar que os nutrientes são adicionados antes de se realizar a filtração e que todo o material utilizado na filtração é submetido a um processo de esterilização, com o uso

de uma autoclave (Modelo AV- 18, marca Phoenix, Brasi). A água do mar utilizada no meio de cultivo foi coletada antes do derramamento de óleo em 2019, e vem tendo os seus parâmetros (i.e. salinidade e pH) monitorados desde então. Caso haja mudança nos parâmetros, antes de se realizar o enriquecimento com o meio f/2, é feito o ajuste dos valores. A salinidade da água do mar foi mantida em 35, e o pH entre 8,0 e 8,1. Caso necessário, o pH da água era ajustado com a adição ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. Para garantir que a espécie estivesse sempre em condições “saudáveis” para a realização dos experimentos, os cultivos foram sempre renovados cerca de duas semanas após a inoculação, antes da espécie entrar no fim do seu crescimento exponencial, evitando assim a limitação de nutrientes e uma possível alteração na reprodutibilidade celular, mantendo as células sempre em fase de crescimento exponencial, o chamado estado firme ou crescimento balanceado ( LOURENÇO, 2006).

### **3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO F/2 CONTAMINADO**

Para preparar o meio de cultivo contaminado com HPAs, fez-se necessário obter a fração solúvel em água (FSA) do óleo cru. Para isso, foram separados cinco béqueres em um sistema de agitação jar test, onde em cada béquer continha 1,8 litros de água do mar estéril e 200 g de petróleo cru, em uma proporção de 1:9 óleo:água. O petróleo foi fatiado em pedaços de 1 cm para que houvesse um maior contato da superfície com a água. O sistema foi mantido em agitação durante 24 horas, em uma temperatura entre  $25 \pm 1$  °C. É importante ressaltar que a agitação a que o sistema foi submetido foi baixa, em torno de 180-240 rpm, evitando assim a formação de vórtices. Como o óleo coletado na praia possuía fragmentos de sedimento foi necessária a realização da filtração da mesma, utilizando filtros GF/F (porosidade 0,70  $\mu\text{m}$ ), com o auxílio de uma bomba a vácuo. A FSA filtrada foi armazenada em frascos âmbar de 1 litro. Um desses frascos contendo um litro de água do mar com FSA foi levado para posterior extração de HPAs e análise mediante cromatografia gasosa.

### **3.4 ANÁLISE DE HPAs DISSOLVIDOS NA ÁGUA**

Toda a vidraria utilizada na análise dos compostos orgânicos foi limpa de acordo com o protocolo delineado por MOURA e YOGUI (2012). O material foi imerso em uma solução 2 % de micro detergente (Extran MA 01 alcalino) por 24

horas. Após isso, foi feito um primeiro enxágue com água da torneira e depois com água destilada. Vidrarias comuns foram secas na estufa durante 24h em temperaturas de 60 °C. Vidrarias volumétricas foram secas em temperatura ambiente, evitando assim dilatação do material. Depois de secas, as vidrarias foram embaladas em papel alumínio e colocadas na mufla a 450 °C durante 4 horas. Antes de ser usada na extração dos compostos orgânicos do petróleo, a vidraria foi lavada duas vezes com dois solventes orgânicos, o diclorometano e o n-hexano, respectivamente. Para realizar a extração dos HPAs dissolvidos ou dispersos na água do mar, foi utilizado um método descrito por SANTOS (2017), onde 20 mL de n-hexano foram adicionados em um litro de água do mar dentro de uma garrafa âmbar. Após isso, a extração foi feita por meio de uma intensa agitação manual de cerca de 2 minutos, gerando assim um extrato hexânico. Tal extrato foi posteriormente separado da água do mar por um sistema de extração líquido-líquido. Após a separação, o extrato hexânico foi concentrado em cerca de 1 mL usando um rota-evaporador, que consiste em um sistema de evaporação rotativa à vácuo. Após a concentração, foram adicionados os padrões internos no extrato, contendo 100 µL de fluoreno-D<sub>10</sub> e benzo(a)antraceno-D<sub>12</sub> (AccuStandard, 1000 ng mL<sup>-1</sup>). Após toda a análise, para calcular a porcentagem de recuperação, foram adicionados 100 µL de compostos deuterados como padrões internos cromatográficos ou padrões de recuperação, o acenafteno-D<sub>10</sub>, criseno-D<sub>12</sub> e o fenantreno-D<sub>10</sub> (AccuStandard, 1000 ng mL<sup>-1</sup>). A análise dos HPAs dissolvidos em água foi feita por meio de um sistema cromatográfico a gás (7820A GC System, Agilent Technologies, Estados Unidos) acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent Technologies 5975 series MSD). Seguindo o método descrito por SANTOS (2017), foi injetado 1 µL de cada extrato em uma coluna cromatográfica modelo HP-5ms, possuindo 25 metros de comprimento, 0,250 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme. O gás hélio (grau de pureza: 99,999 %) foi utilizado como gás de arraste, possuindo um fluxo constante de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A programação da rampa de temperatura do forno foi feita da seguinte forma: aquecimento até uma temperatura inicial de 60 °C durante 15 minutos, até 150 °C durante 5 min, até 220 °C durante 10 min até a temperatura final de 300 °C, permanecendo assim estável nesta temperatura durante 10 minutos. O espectrômetro de massas foi operado com ionização por elétrons, com o sistema em modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, *selected ion monitoring*). A recuperação dos padrões internos

cromatográficos variou de 75,9 a 88,4 %, sendo aceitável segundo LAUENSTEIN E CANTILLO (1998).

### 3.5 EXPERIMENTOS DE CONTAMINAÇÃO E RECUPERAÇÃO

O trabalho foi dividido em dois experimentos, o primeiro de avaliação da resposta à contaminação por HPAs, e o segundo a avaliação da capacidade de recuperação da espécie a tal contaminação. A salinidade máxima do primeiro experimento foi de 40, enquanto a do segundo experimento foi mantida em 35. O primeiro experimento foi realizado em réplicas. As algas foram inoculadas em balões volumétricos de borosilicato de 250 mL, em três amostras com diferentes concentrações de HPAs, de forma que o volume final fosse sempre de 200 mL (concentrações e volumes na Tabela 2).

Tabela 2: volumes de meio F/2, meio com FSA e as suas respectivas concentrações de HPAs finais

<b>Amostra</b>	<b>Meio f/2 (mL)</b>	<b>Meio com FSA (mL)</b>	<b>HPAs (ng L<sup>-1</sup>)</b>
0 %	200	0	0
50 %	100	100	861,57
100 %	0	200	1723,15

Antes de se realizar o monitoramento populacional, as culturas foram mantidas durante 4 dias no laboratório com homogeneização diária, fazendo assim com que as células se aclimassem com o novo ambiente no qual foram inseridas. Após 4 dias de aclimação, a densidade populacional foi monitorada mediante contagem diária de células. Para realizar a contagem, as culturas eram homogeneizadas e cerca de 5 mL eram retirados, sendo posteriormente fixados com uma solução de lugol 2 %. Após fixadas, as células foram contadas com um auxílio de um analisador de partículas de fluxo do tipo *FlowCam* (Modelo C71 com seringa, Estados Unidos), equipado com uma célula de fluxo do tipo FC80-7FV, com profundidade de 80 µm, largura de 700 µm e diâmetro interno da tubulação de 0,16 cm. A contagem foi feita durante 5 ou 6 dias, dependendo do crescimento e densidade populacional. Após a contagem, os dados brutos foram filtrados no

próprio equipamento (*Software Visual Spreadsheet*), eliminando assim possíveis partículas e elementos que modificassem o real valor da densidade populacional e dos parâmetros celulares, aumentando assim a confiabilidade dos resultados. Obtendo o número de células em diversos pontos de tempo, pode-se calcular a taxa de crescimento por meio de um método de regressão exponencial. Além da taxa de crescimento exponencial, com o auxílio do *FlowCam*, foi medido o aspect ratio (i.e. comprimento/largura) celular. Com as fotos tiradas pelo equipamento e análises visuais, a porcentagem de células mastigote e coccoid foi estimada para cada tratamento. Na análise visual, as imagens foram categorizadas em três formas. (1) células mastigote, (2) células coccoid e (3) partícula não identificada. A terceira categoria foi criada para englobar partículas não identificáveis ou fotos mal tiradas (i.e cortadas ou desfocadas) ou para células mal posicionadas nas quais não fosse possível identificar em qual estágio da vida estavam. No segundo experimento, para indicar se há uma recuperação celular, uma alíquota das culturas previamente contaminadas foi separada e inoculada em meio f/2 estéril sem contaminação por petróleo. Seguindo o mesmo procedimento supracitado, o número de células, densidade populacional, aspect ratio e porcentagem do tipo de célula foram monitorados. Ao invés de triplicatas, a segunda parte do experimento foi realizada em quadruplicatas, visando assim uma melhor análise estatística dos dados. Assim como a primeira parte, manteve-se 3 amostras, a controle, a cultura previamente contaminada com 50 % da concentração de FSA e a cultura previamente contaminada com 100 % da concentração de FSA. Cada parte do experimento possuía uma cultura controle, que foi usada posteriormente para realizar análises estatísticas comparativas com cada parte do experimento. A porcentagem das células mastigote e coccoid foi calculada por meio da equação:

Onde:  $N^{\circ}$  cel é o número de células contadas de cada categoria, e o total é o número total de células contadas.

### **3.6 ANÁLISE ISOTÓPICA CELULAR E RAZÃO ATÔMICA DO C:N**

Para realização da análise da composição isotópica celular e da razão atômica do C:N, inicialmente, as culturas foram filtradas com o auxílio de uma bomba à vácuo em filtros de porosidade 0,7  $\mu\text{m}$  (Whatman, modelo GF/F). A pressão da bomba foi mantida estável em aproximadamente -200 mbar, evitando a danificação dos materiais biológicos. Para garantir que não houvesse contaminação

por carbono orgânico nas amostras, todo o material foi previamente muflado a 450 °C durante 4 horas. Após a filtração, os filtros com biomassa foram colocados na estufa a 60 °C durante 24h. Finalizado esse procedimento, foi feita a descarbonatação dos filtros, utilizando o método proposto por LORRAIN et al., 2003, que utiliza vapores de ácido clorídrico concentrado (12 M) durante 4 h em um dessecador. Após a descarbonização, os filtros foram levados à estufa por 24 h a 60 °C, retirando assim o excesso do ácido. Seguindo o método proposto por YOGUI e SCHWAMBORN (2019), os filtros descarbonatados foram cortados em parcelas aproximadas de 1/8 do filtro completo, que foram embrulhadas em discos de estanho. Já embaladas, a composição elementar e isotópica foi feita por meio de um analisador elementar (EuroVector, modelo EA3000 Single) acoplado a um espectrômetro de massas de razão isotópica (Thermo Scientific, modelo Delta V Advantage). A temperatura do forno para pirólise das amostras no analisador elementar foi mantida em 980 °C, contendo um reator de 18 mm de diâmetro, que foi preenchido da base para o topo com óxido de cobalto envelopado com prata (20 mm), cobre reduzido (70 mm) e óxido de cromo (55 mm). O hélio (pureza: 99,999 %) foi utilizado como gás de arraste, sendo mantido em um fluxo constante de 93 mL min<sup>-1</sup>. Os gases gerados na combustão foram retidos momentaneamente e separados em uma coluna cromatográfica, sendo transferidos em seguida para o espectrômetro de massas de razão isotópica. Para garantir a qualidade dos dados, foram feitas análises de branco de filtro, branco de disco e do material de referência, que nesse caso foi a spirulina. A razão atômica do carbono e nitrogênio foi calculada de acordo com o método descrito por HEDGES e STERN (1984), seguindo a equação:

$$\frac{C}{N} = \frac{(CO)}{(NT)} * 1,167$$

Onde CO é a porcentagem de carbono orgânico na amostra, e NT é a porcentagem de nitrogênio orgânico na amostra. A constante tem como função corrigir os percentuais de carbono e nitrogênio da amostra para uma base estequiométrica.

Os resultados da assinatura isotópica foram calculados pela diferença da razão isotópica entre a amostra e o material de referência utilizado, como descrito por FRY (2006):

$$\delta E = \left[ \left( \frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} \right) - 1 \right] * 1000$$

Onde  $\delta E$  é o isótopo do elemento expresso,  $R_{amostra}$  é a razão da quantidade do isótopo pesado e o leve da amostra, e o  $R_{padrão}$  é a razão da quantidade do isótopo pesado e o leve do material de referência.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realizar a comparação entre as médias dos tratamentos, foi utilizado o teste t não pareado para duas amostras, assumindo um nível de significância onde  $p < 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica dos HPAs gerou um gradiente de 0 a 1704,75 ng L<sup>-1</sup>, resultante da presença de 13 dos 16 HPAs tidos como prioridade pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (KEITH, 2014) . Dentre eles, o fenantreno foi o composto com maior concentração (751,82 ng L<sup>-1</sup>), representando 44,10% da concentração total. A segunda maior concentração foi a do fluoreno (377,75 ng L<sup>-1</sup>), representando 22,15% da concentração total. MOODY et al. (2001) pontua que o fenantreno não oferece risco elevado aos humanos. Porém, pode ser bastante tóxico para algas e peixes.

Tabela 3: Analitos, números de anéis benzênicos e suas respectivas concentrações medidas na FSA

Analito	Nº de anéis	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água em 25 °C (mg L <sup>-1</sup> )
Naftaleno	2	12,28	31,6
Acenaftileno	3	0,00	16
Acenafteno	3	258,45	4,5
Fluoreno	3	377,75	1,8
Fenantreno	3	751,82	1,3
Antraceno	3	86,75	0,07
Fluoranteno	4	21,11	0,24
Pireno	4	116,13	0,14
Benzo[a]antraceno	4	11,73	0,01
Criseno	4	58,83	0,003
Benzo[b]fluoranteno	5	3,64	<0,001

Benzo[k]fluoranteno	5	1,09	<0,001
Benzo[a]pireno	5	5,17	<0,001
Dibenzo[a,h]antraceno	5	0,00	<0,001
Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	0,00	<0,001
Benzo[ghi]perileno	6	0,00	<0,001
Total		1704,75	

Seguindo uma metodologia similar, MÜLLER et al. (2021) realizou um experimento que gerou um gradiente de 0 a 2315 ng L<sup>-1</sup> de HPAs. Considerando que se trata do mesmo petróleo, coletado no mesmo derramamento, e mantido congelado, a diferença de concentração entre os dois trabalhos se dá provavelmente pela filtração que ocorreu neste experimento. O petróleo foi coletado junto com partículas de sedimento agregadas, necessitando assim de filtração, ao contrário do experimento realizado por MÜLLER et al. (2021). Apesar da concentração de HPAs deste trabalho ser 26,36% menor do que a do trabalho supracitado, ela representa fielmente as condições de contaminações ambientais já registradas (GONZÁLEZ et al. 2006, BOEHM et al. 2006), sendo possível que os organismos marinhos sejam submetidos a tais concentrações de HPAs, principalmente nos oceanos subtropicais e tropicais, onde as concentrações das fases dissolvidas dos HPAs podem ser muito maiores (ECHEVESTE et al. 2011) Pode-se tomar como exemplo o derramamento de óleo em *North Cape*, nos Estados Unidos, chegando a concentrações de 115.000 ng L<sup>-1</sup> (REDDY; QUINN, 1999). Na Figura (2), representada em escala logarítmica, há a comparação da concentração dos 16 HPAs prioritários em cada trabalho. Nota-se além da diferença na concentração, a presença de mais 3 HPAs de peso molecular maior, sendo eles benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e benzo[a]pireno, todos possuindo descrições de efeitos carcinogênicos em organismos (EPA, 2016). Isso pode ter acontecido por conta da certa discrepância entre os métodos. A metodologia usada neste trabalho incluiu 182 gramas adicionais de petróleo, e o fatiamento aumentou a superfície disponível do petróleo para contato com a água, facilitando assim a dissolução de HPAs de maior peso

molecular. Porém, as concentrações poderiam ser maiores caso não houvesse a filtração, que retira grande parte dos HPAs maiores. Benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno causaram tumores na pele e pulmões de ratos, além de câncer nos locais de aplicação (IARC, 1973; DEUTSCH WENZEL et al. 1983). Estudos com benzo[a]pireno indicaram que a formação de tumores pode se dar por outras formas como inalação e na dieta, que foi testado com acompanhamento de espécies de peixes e roedores (HENDRICKS et al. 1985, BLACK et al. 1988, TOTH 1980).

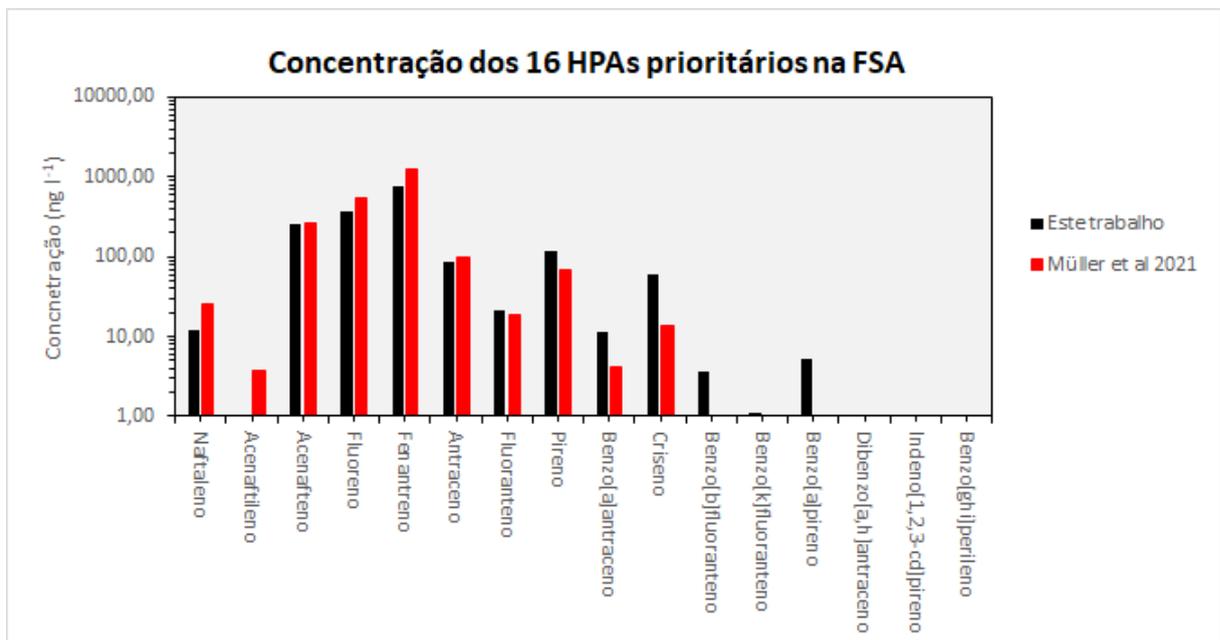


Figura 2: Concentrações dos 16 HPAs tidos como prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) neste trabalho e no trabalho de MÜLLER et al (2021).

Na Figura 3 são apresentados os dados de densidade celular para cada FSA e suas respectivas réplicas. Os dados desse gráfico são importantes e necessários para se garantir que as células se mantiveram durante todo o experimento no crescimento exponencial. Caso as culturas tivessem entrado no crescimento estacionário e por conta da deficiência de nutrientes, a curva começaria a tomar uma forma sigmoideal (i.e. em forma de "S"), o que caracterizaria uma redução constante no crescimento, até que houvesse a estabilização da cultura.

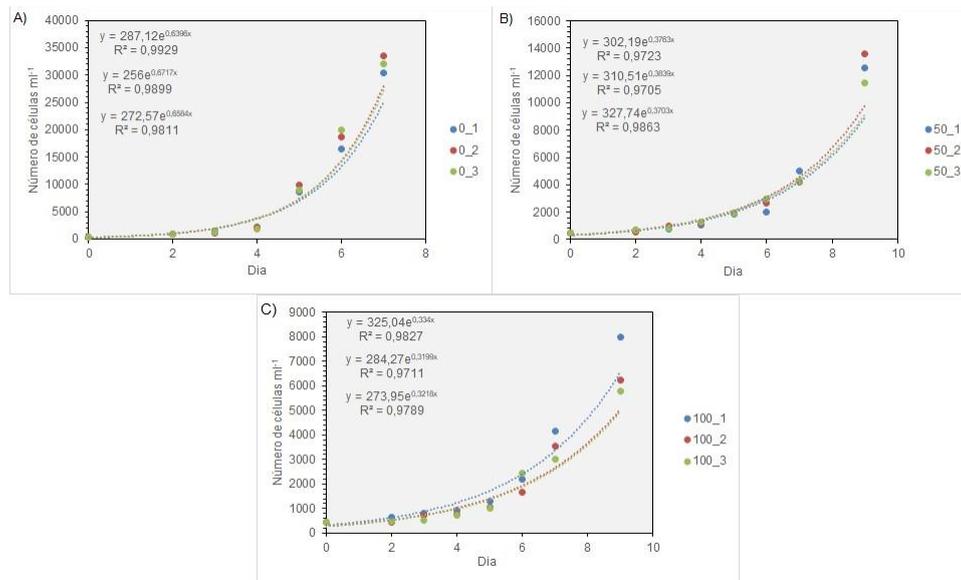


Figura 3: Gráficos de densidade populacional para o experimento de contaminação. A) 0% FSA; B) 50% FSA e C) 100% FSA.

Com o aumento da concentração de HPAs, houve o declínio da taxa de crescimento exponencial das culturas (Fig. 4), com valores de tratamento de  $0,66 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ ,  $0,38 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$  e  $0,33 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$  para a FSA de 0%, 50% e 100%, respectivamente. As médias foram comparadas com o auxílio do teste t não paramétrico, indicando que há uma diferença extremamente significativa entre a taxa de crescimento das culturas com 0% e 50% ( $n = 3$ ,  $t = 34,26$  e  $p < 0,0001$ ), 0% e 100% ( $n = 3$ ,  $t = 40,16$  e  $p < 0,0001$ ) e 50% e 100% ( $n = 3$ ,  $t = 6,12$  e  $p < 0,05$ ) de concentração de FSA. A diferença explícita representada pelos dados estatísticos comprova que houve um declínio da taxa de crescimento exponencial, causada pelo aumento da concentração de HPAs, visto que os outros parâmetros que poderiam causar influência nos resultados foram mantidos sob controle durante o experimento. Diversos parâmetros celulares e fisiológicos podem ser afetados pelos HPAs (e.g. crescimento, integridade da membrana, conteúdo lipídico, produção de clorofila a, etc.). Porém, as taxas fotossintéticas parecem ser o processo mais afetado pelo aumento da concentração desses contaminantes (BEN OTHMAN et al., 2023). Estudos mostram que o antraceno foto modificado pode produzir compostos que são capazes de inibir a fotossíntese, causando assim a diminuição da produção de energia necessária para o crescimento, acarretando na diminuição das taxas de reprodução das células (HUANG et al. 1997; MALLAKIN et al 1999). Além disso, já é

conhecido que os HPAs podem causar alterações genéticas nas microalgas (BEN OTHMAN et al., 2023). Dentre elas, pode haver a redução da síntese de DNA, diminuindo a porcentagem de células que iniciam a mitose e que são capazes de se reproduzir (CEREZO; AGUSTÍ, 2015). Para que isso aconteça, as células tendem a se manterem estagnadas na fase S do ciclo celular, fase na qual ocorre a síntese de DNA para replicação. MÜLLER et al (2008) também explicitou resultados similares quando cultivou células de *Emiliana huxleyi* sob condições de limitação de fósforo, fazendo com que a divisão celular se prolongasse na fase G1 do ciclo celular, que antecede a fase S, causando assim uma diminuição da taxa de crescimento das culturas. MÜLLER et al (2021) utilizou um modelo de regressão para calcular a concentração em que a taxa de crescimento seria reduzida em 50% (ErC50), resultando em um valor de cerca de 2800 ng L<sup>-1</sup>. Porém, utilizando o mesmo óleo, a redução de 50% da taxa de crescimento se deu na concentração de 1704,75 ng L<sup>-1</sup>. Isso pode ter sido causado pela presença dos 3 HPAs extras, que possuem peso molecular maior, principalmente o benzo[a]pireno, que é considerado um, ou senão o mais tóxico do mundo (JUNG et al. 2010). Claro que, apesar de outros HPAs (e.g. Naftaleno, acenafteno e fluoreno) serem menos tóxicos para as microalgas (BEN OTHMAN et al., 2023), o papel dos efeitos sinérgicos e aditivos dos HPAs de baixo e alto peso molecular não deve ser descartado, podendo também ser responsável por efeitos que causem a diminuição da reprodutibilidade das células.

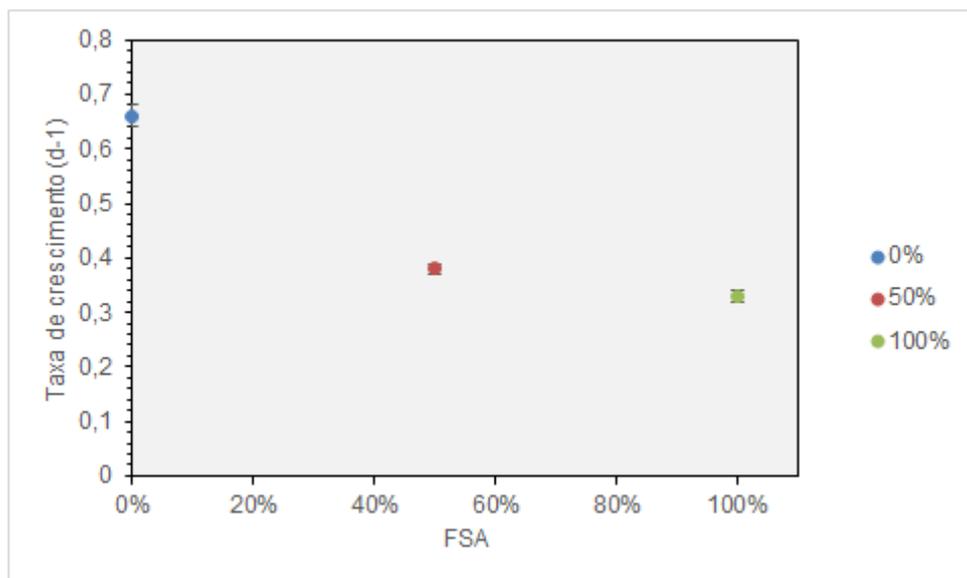


Figura 4: Médias com desvio padrão das taxas de crescimento das 3 amostras para o experimento 1 (n = 3).

Para fortalecer a inferência supracitada, foi verificada a porcentagem da presença de cada fase da vida nas culturas. Com os resultados pode-se notar que

com o aumento da concentração de HPAs no meio de cultura, há o aumento da porcentagem de células do tipo cocóide nas culturas, havendo um aumento significativo de 47% ( $p < 0,05$ ) entre a FSA de 0% e o de 100%. Entre a amostra com nenhuma concentração e a intermediária, o aumento na porcentagem de células do tipo cocóide foi de 20% ( $p < 0,05$ ). Em *Durusdinium glynnii*, o estágio da vida que antecede a mitose é o coccoid (LAJEUNESSE et al. 2012). Segundo o autor, antes de realizar a divisão, a célula no formato mastigote libera o flagelo e cessa a natação, sofrendo uma rápida transformação para a forma cocóide, fase na qual ocorre a replicação do DNA. Assim, o aumento da porcentagem de células da forma cocóide nos tratamentos pode compactuar com inferência de que há um prolongamento da fase S do ciclo celular. Os valores completos das análises estatísticas para as porcentagens encontram-se listados na legenda da Figura 5.

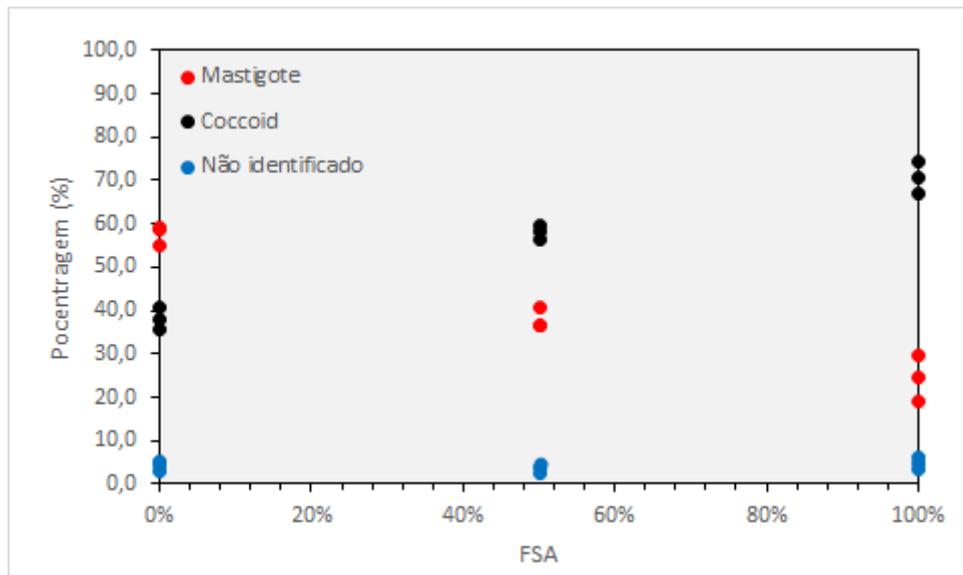


Figura 5: Porcentagens entre tipos de célula mastigote, cocóide e não identificadas. Mastigote 0% FSA x 50% FSA ( $n = 3$ ,  $t = 10,65$  e  $p < 0,05$ ), Mastigote 0% x 100% ( $n = 3$ ,  $t = 10,35$ ,  $p < 0,05$ ), cocóide 0% x 50% ( $n = 3$ ,  $t = 12,46$ ,  $p < 0,05$ ), cocóide 0% x 100% ( $n = 3$ ,  $t = 12,96$ ,  $p < 0,05$ ), não identificadas 0% x 50% ( $n = 3$ ,  $t = 0$ ,  $p > 0,05$ ), não identificados 0% x 100% ( $n = 3$ ,  $t = 0,90$ ,  $p > 0,05$ ).

As células de *durusdinium glynnii* com formato mastigote possuem um tamanho médio entre 4 e 8  $\mu\text{m}$ , podendo variar entre as espécies (BLANK; HUSS, 1989), já células com o formato cocóide possuem um tamanho entre 6 e 13  $\mu\text{m}$ , sendo caracterizadas por um formato esférico. Dessa forma, a predominância de células do tipo cocóide nas amostras com maior porcentagem de FSA fez com que houvesse uma alteração significativa no aspect ratio ( $p < 0,05$ ), havendo um aumento de 0,84 no tratamento de 0% para 0,97 no tratamento de 100%. É

importante ressaltar que o valor máximo deste parâmetro é de 1, que indica o mais próximo de uma esfera. Os dados estatísticos completos encontram-se na legenda da Figura 6.

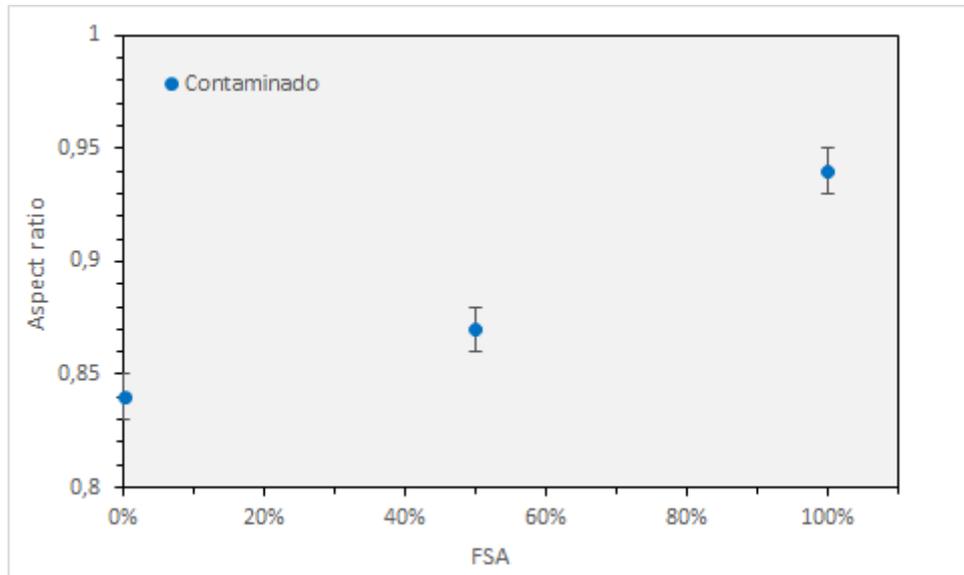


Figura 6: valores médios com desvio padrão do aspect ratio para o experimento 1. Aspect ratio 0% x 50% ( $n = 3$ ,  $t = 3,67$ ,  $p < 0,05$ ), aspect ratio 0% x 100% ( $n = 3$ ,  $t = 12,24$ ,  $p < 0,05$ ).

No experimento 2, pode-se notar pelos gráficos na Figura 7, que a grande maioria das culturas se mantiveram em crescimento exponencial durante todo o experimento. As réplicas de número 3 e 4 do tratamento de 100% possuíram um crescimento exponencial menos acelerado (Fig. 7 C.), indicando assim que apenas parte das culturas conseguiram se recuperar. O que expressa isso no gráfico são as curvas de crescimento, onde a diferença entre a inclinação é nítida.

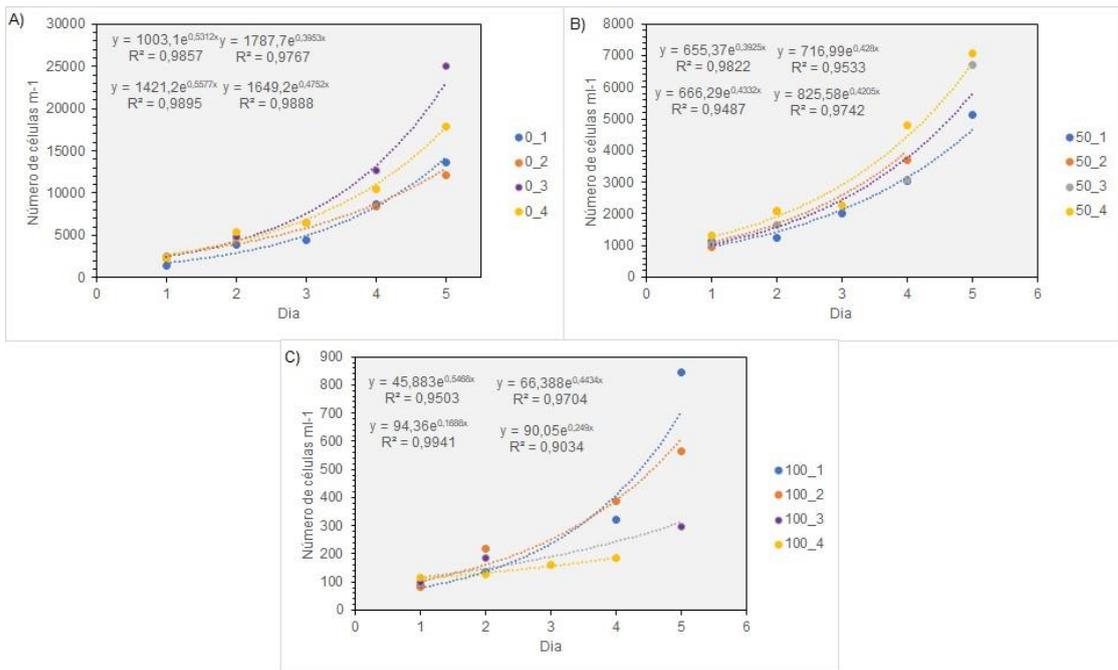


Figura 7: gráficos de densidade populacional do experimento 2. A) tratamento 0%; B) tratamento 50%; C) tratamento 100%.

Quanto à taxa de crescimento, as médias de cada tratamento foram  $0,489 \pm 0,07$ ,  $0,418 \pm 0,02$  e  $0,352 \pm 0,17$ , para os tratamentos de 0%, 50% e 100%, respectivamente. Os tratamentos de 0% e 50% não apresentaram diferença significativa ( $n = 4$ ,  $t = 1,95$  e  $p > 0,05$ ), assim como os de 0% e 100% ( $n = 4$ ,  $t = 1,49$  e  $p > 0,05$ ). Porém, apesar de não apresentar diferença, é notável que o tratamento de 100% de FSA não se recuperou tão bem quanto o de 50%, por conta do alto desvio entre as réplicas ( $DP = 0,17$ ). Assim, dentro do tratamento de 100%, certas réplicas não apresentaram uma boa capacidade de recuperação. Isso pode acontecer por conta de células ainda não recuperadas dentro das culturas, fazendo com que as taxas de crescimento de duas réplicas diminuíssem, aumentando assim o desvio padrão. A não recuperação das réplicas pode ser um sinal de que os HPAs presentes na FSA ocasionaram danos genéticos que são passíveis de transferência ao longo das gerações subsequentes (MÜLLER et al. 2021). As réplicas do tratamento de 50% se mantiveram crescendo exponencialmente (Figura 7 B). Assim, crescendo bem e não havendo diferença estatística na taxa de crescimento, pode-se dizer que houve uma recuperação do tratamento de 50%.

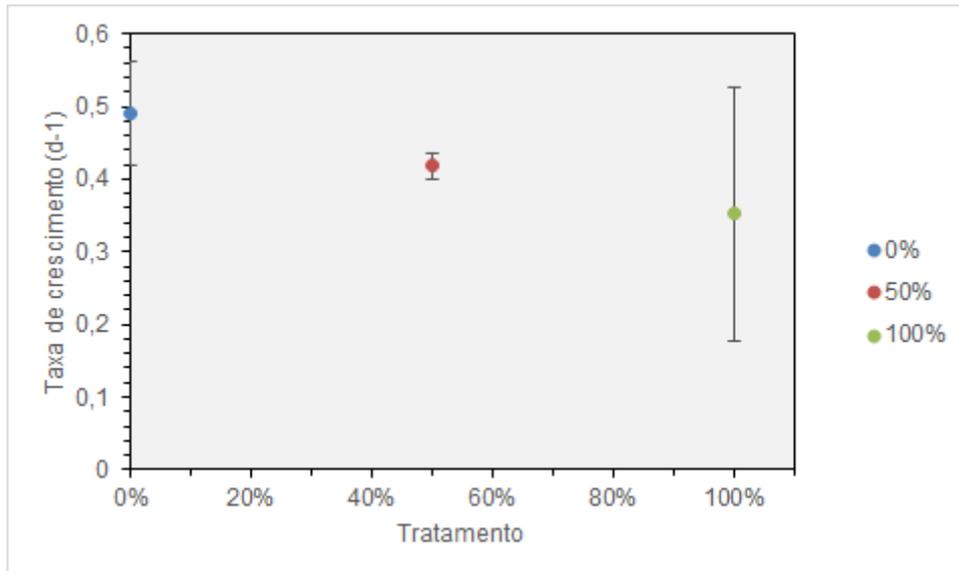


Figura 8: médias com desvio padrão das taxas de crescimento para o experimento 2 (n = 4).

Apesar de visivelmente recuperada, a porcentagem de células do tipo mastigote dos tratamentos de 0% e 50% apresentaram diferenças significativas (n = 4, t = 2,66, p < 0,05), com valores médios de  $60 \pm 2,08$  e  $57 \pm 2,04$ , respectivamente. Por outro lado, os valores de porcentagem de cocóide não apresentaram diferença significativa (n = 4, t = 0,57, p > 0,05), com valores médios de  $36 \pm 2,3$  e  $37 \pm 2,05$  para os tratamentos de 0% e 50%, respectivamente. Levando em consideração os valores estatísticos, nem as porcentagens de células do tipo cocóide (n = 4, t = 0,19, p > 0,05) e mastigote (n = 4, t = 2,07, p > 0,05) do tratamento de 100% possuíam diferença em relação ao tratamento de 0%. Entretanto, sabe-se pelas curvas e valores de crescimento que não houve a recuperação total deste tratamento. As médias da porcentagem de células mastigote e cocóide foram de  $53 \pm 7,10$  e  $36 \pm 2$ , respectivamente. Nota-se o alto desvio entre as réplicas na porcentagem de mastigote, causado principalmente por uma das duas réplicas que não cresceram corretamente no experimento 2. Não se sabe ainda o que houve com a outra réplica para que ela exercesse influência sobre o desvio da média. Os valores médios de porcentagem de células não identificadas aumentaram com o tratamento, todos possuindo diferença significativa em relação ao tratamento de 0%, mais uma vez com o tratamento de 100% possuindo o maior desvio. Isso pode ter acontecido por conta de células ainda em recuperação que possuíam formas identificáveis, possuindo maior porcentagem no tratamento de 100%, que se recuperou parcialmente.

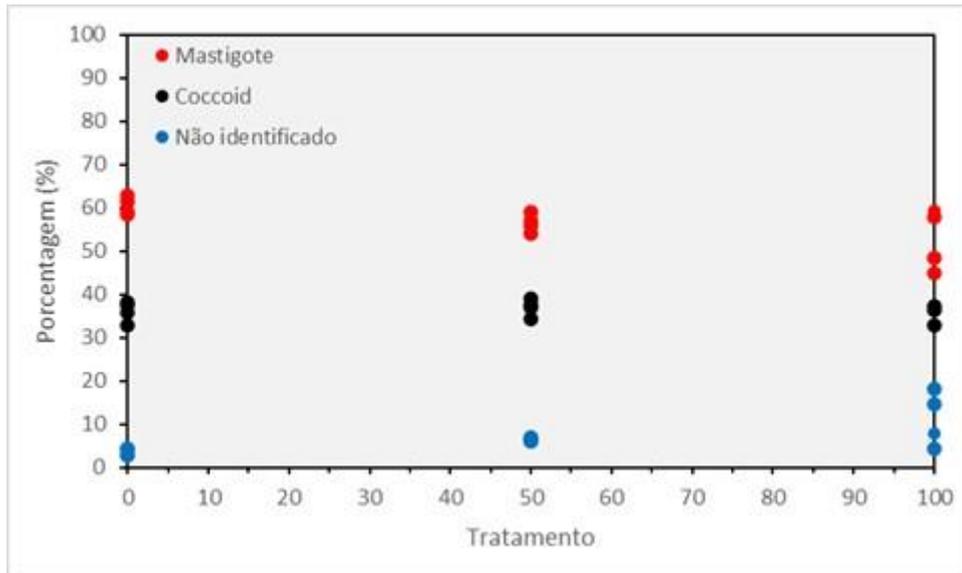


Figura 9: Porcentagens dos tipos de células mastigote, cocóide e não identificadas para o experimento 2. Mastigote 0% x 50% ( $n = 4$ ,  $t = 2,66$ ,  $p < 0,05$ ), mastigote 0% x 100% ( $n = 4$ ,  $t = 2,07$ ,  $p > 0,05$ ), cocóide 0% x 50% ( $n = 4$ ,  $t = 0,57$ ,  $p > 0,05$ ), cocóide 0% x 100% ( $n = 4$ ,  $t = 0,19$ ,  $p > 0,05$ ), não identificadas 0% x 50% ( $n = 4$ ,  $t = 7,02$ ,  $p < 0,05$ ) e não identificadas 0% x 100% ( $n = 4$ ,  $t = 2,46$ ,  $p < 0,05$ ).

As médias do aspect ratio não possuíram diferença significativa, o que matematicamente falando indicaria uma recuperação dos tratamentos previamente contaminados. Entretanto, o valor do aspect ratio do tratamento de 100% apresentou um valor maior, resultado da recuperação parcial e menor porcentagem de células do tipo mastigote, que causam uma diminuição no valor do aspect ratio.

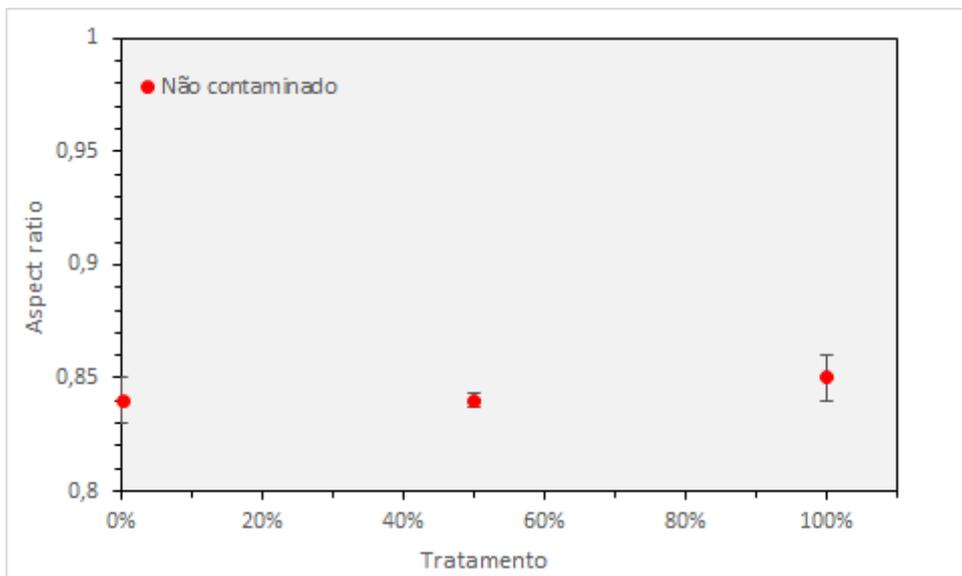


Figura 10: valores médios com desvio padrão do aspect ratio para o experimento 2. Aspect ratio 0% x 50% ( $n = 4$ ,  $t = 0$ ,  $p > 0,05$ ) e aspect ratio 0% x 100% ( $n = 4$ ,  $t = 1,41$ ,  $p > 0,05$ ).

Para complementar os dados do experimento 1 e 2, foram realizadas análises isotópicas e elementares para ver como se daria a assimilação dos componentes do petróleo cru. De acordo com resultados do isótopo de carbono e dos valores de carbono e nitrogênio pode-se saber se os compostos do petróleo foram incorporados ativamente ou passivamente pelas células (MÜLLER et al 2021). Com diminuição da assinatura do  $^{13}\text{C}$  e aumento da razão C/N, pode-se dizer que os compostos foram incorporados passivamente no interior das células. Caso a razão C/N permaneça constante, os compostos do petróleo cru foram incorporados ativamente pelas células. Os dados obtidos nas análises são controversos, e indicam contaminação por carbono inorgânico (BRUNET et al. 2005) na amostra do tratamento de 100%, na qual a análise foi repetida para confirmação do valor, que foi mais positivo, com valores de  $-7,90\text{ ‰}$  e  $-8,08\text{ ‰}$ . Não se sabe como pode ter ocorrido essa contaminação, por conta do processo de descarbonatação. Talvez, enquanto as amostras estavam na estufa (inicialmente só para elas), amostras podem ter sido inseridas, fazendo com que compostos evaporassem de outras amostras e contaminassem o experimento. O valor de 0% FSA do experimento 1 foi de  $-23,74\text{ ‰}$ , contrariando os valores da assinatura em condições controladas descritas por MÜLLER et al (2021) e HOINS et al. (2016), que são de aproximadamente  $-14,15\text{ ‰}$ , indicando assim contaminação da amostra. Entretanto, o tratamento de 0% do experimento 2 apresentou o valor normal supracitado. Em resumo, apenas as amostras FSA 50%, tratamento 50% e tratamento 0% possuem dados confiáveis. Em teoria, com maiores valores de HPA, a assinatura de  $^{13}\text{C}$  deveria ser mais negativa, indicando maior acumulação dos componentes do petróleo nas algas (MÜLLER et al 2021). Porém, na amostra 100% FSA o valor foi mais positivo, indicando assim que houve um erro na análise, processamento da amostra, ou algum tipo de contaminação. A concentração de 50% FSA apresentou um valor de  $^{13}\text{C}$  mais negativo, aproximando-se da faixa relatada por YEH e EPSTEIN (1981) para o petróleo cru ( $-32,5\text{ ‰}$  a  $-23,3\text{ ‰}$ ). No tempo de incubação destinado para o experimento 2, de recuperação, observa-se que o valor de  $^{13}\text{C}$  do tratamento 50%, até então com a taxa de crescimento recuperada aumentou  $1,84\text{ ‰}$ , sendo também um possível indicador de recuperação. Porém, para saber se a espécie é capaz de retornar a sua assinatura isotópica “normal”, é necessário mais tempo de incubação para a recuperação, realizando amostragens semanais para monitorar a assinatura isotópica.

Tabela 4: Valores de C/N,  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  para os dois experimentos

Amostra	C/N (mol:mol)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Branco do filtro	-	-27,25	-
FSA 0%	-	-23,74	-
FSA 50%	4,75	-22,85	5,58
FSA 100%	-	-20,30	-
Tratamento 0%	5,55	-14,94	1,60
Tratamento 50%	5,45	-21,90	2,13
Tratamento 100%	5,89	-8,08	1,84
Tratamento 100% (repetição)	6,35	-7,90	1,71

A diferença expressiva entre as taxas de crescimento do controle dos dois experimentos ( $0,66 \text{ d}^{-1}$  e  $0,48 \text{ d}^{-1}$ ) pode se dar por conta da diferença de tratamento entre eles, fazendo com que não haja a possibilidade de realização de uma análise comparativa entre os dois experimentos deste trabalho. A água do mar na qual foram adicionados os nutrientes do meio de cultivo do experimento 1 possuía salinidade máxima de 40 para o controle, 37,5 para o 50% FSA e 35 para o 100% FSA, enquanto no experimento 2 a salinidade foi de 35 para todas as amostras. SIDDIQUA (2021) descreve o crescimento de *Symbiodinium* sp. em diferentes salinidades, observando que na salinidade de 40 houveram as maiores densidades de células nas culturas, maior eficiência na fotossíntese e maiores concentrações de clorofila *a*. Entre as salinidades de 30 e 50 não houve diferença significativa nos valores de taxa de crescimento. Porém, o maior valor da taxa de crescimento foi o da cultura que foi cultivada em salinidade 40. Comparado com o experimento 1, os valores das taxas de crescimento no experimento realizado por MÜLLER et al (2021) foram menores do que os deste trabalho, e a concentração que diminuiria em 50% a taxa de crescimento de foi maior. Os valores de aspect ratio do trabalho supracitado se mantiveram abaixo de 0,90, enquanto os deste trabalho foram acima, indicando

assim um maior impacto na reprodução, podendo ser resultado da prolongação do ciclo celular em um maior número de células. Em relação às porcentagens do tipo de célula presente nas culturas, os dois trabalhos possuíram resultados bastante semelhantes. O petróleo é famoso por possuir concentrações de números de HPAs bastante variados, e dificilmente irá se encontrar amostras de petróleo com perfis cromatográficos iguais (CLAYTON, 2005). Observando os perfis de HPAs para os dois trabalhos (Fig. 2), observa-se que a proporção entre os HPAs é parecida. Porém, devido a metodologia, a água do mar entrou em contato com uma superfície maior do óleo cru, sendo o motivo que provavelmente resultou no aparecimento de 3 HPAs de maior peso molecular, um deles sendo considerado o mais tóxico para as microalgas (BEN OTHMAN et al., 2023). Com isso, os efeitos sinérgicos e aditivos entre os compostos, o potencial mutagênico e carcinogênico dos HPAs (PASHIN; BAKHITOVA, 1979) e a presença de HPAs de pesos moleculares maiores e mais tóxicos podem ter sido responsáveis pela intensificação dos efeitos quando comparados ao trabalho de MÜLLER et al. (2021).

## 5 CONCLUSÃO

O aumento da concentração de HPAs no meio de cultivo de *Durusdinium glynnii* causa uma diminuição da taxa de crescimento, associada a um aumento no aspect ratio, sendo resultado de uma possível alteração no ciclo celular. Devido a contaminações/ erros analíticos, não pode ser constatada a bioacumulação dos compostos do petróleo cru em todas as amostras, apenas na concentração de 50%, que apresentou valores de  $^{13}\text{C}$  mais negativos e próximos ao do petróleo cru. No tratamento de 100%, foram observados efeitos crônicos mais prolongados, refletindo na capacidade de reprodução e acumulação dos compostos em gerações futuras, presumivelmente causado pelo potencial mutagênico/carcinogênico dos HPAs presentes no petróleo cru. A não-recuperação do tratamento de 100% é um sinal de que pode haver danos genéticos que podem ser transferidos ao longo das gerações. Porém, como uma forma de esperança para o ambiente, a espécie *Durusdinium glynnii* é sim passível de recuperação a um derramamento de petróleo, avaliando claro cada caso, composição e concentração dos compostos presentes no local.

## **6 FUTUROS PASSOS**

Posteriormente, para sanar as lacunas deixadas, objetiva-se prolongar o tempo do experimento 2 (recuperação), visando assim determinar o número de gerações necessárias para que se haja a recuperação, de acordo com a concentração e composição específica dos HPAs. Além disso, realizar repetições das análises isotópicas que, infelizmente, não foi possível obter dados concretos neste trabalho. Além disso, investigar um parâmetro adicional, como concentração de clorofila ou eficiência fotossintética seria interessante para complementar os resultados. Por fim, devido o resultado não significativo entre as taxas de crescimento, tornando-se assim inconclusivo, faz-se necessário a adição de indicadores de recuperação, ou seja, parâmetros além da taxa de crescimento que indiquem a recuperação da espécie.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON D. M. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. 1989
- ANDERSON D.M., NEMOTO T. (eds) Red tides: biology, environmental science, and toxicology. Elsevier, New York, pp 11–16
- ANKENY, R. A.; LEONELLI, S. Model Organisms. *Elements in the Philosophy of Biology*, 1 nov. 2020.
- BAKER, A. C. et al. Corals' adaptive response to climate change. *Nature*, v. 430, n. 7001, p. 741–741, ago. 2004.
- BEN OTHMAN, H. et al. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on marine and freshwater microalgae – A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 441, p. 129869, jan. 2023.
- BERCOVICI, A., & VELLEKOOP, J.. *Methods in Paleopalynology and Palynostratigraphy. Terrestrial Depositional Systems*, 127–164. 2017
- BLACK, J. J.; MACCUBBIN, A. E.; JOHNSTON, C. J. Carcinogenicity of benzo[a]pyrene in rainbow trout resulting from embryo microinjection. *Aquatic Toxicology*, v. 13, n. 4, p. 297–308, dez. 1988.
- BLANK, R. J.; HUSS, V. A. R. DNA divergency and speciation in Symbiodinium (Dinophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 163, n. 3-4, p. 153–163, 1989.
- BLANK, R. J.; HUSS, V. A. R. DNA divergency and speciation in Symbiodinium (Dinophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 163, n. 3-4, p. 153–163, 1989.
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, v. 10, n. 4, p. e1003537, 10 abr. 2014.
- BRUNET, F. et al.  $\delta^{13}\text{C}$  tracing of dissolved inorganic carbon sources in Patagonian rivers (Argentina). *Hydrological Processes*, v. 19, n. 17, p. 3321–3344, 15 nov. 2005.
- CARLOS, A. A. et al. phylogenetic position of symbiodinium (dinophyceae) isolates from tridacnids (bivalvia), cardiids (bivalvia), a sponge (porifera), a soft coral (anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, v. 35, n. 5, p. 1054–1062, out. 1999.
- CARPENTER, S. et al. From Metaphor to Measurement: Resilience of What to What? *Ecosystems*, v. 4, n. 8, p. 765–781, dez. 2001.
- CARPENTER, S. R.; PACE, M. L.; WILKINSON, G. M. DOC , grazers, and resilience of phytoplankton to enrichment. *Limnology and Oceanography Letters*, 5 set. 2022.
- CARTY, S. DINOFLAGELLATES. *Freshwater Algae of North America*, p. 685–714, 2003.
- CASTELEYN, G. et al. Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 29, p. 12952–12957, 6 jul. 2010.

CEREZO, M. I.; AGUSTÍ, S. PAHs reduce DNA synthesis and delay cell division in the widespread primary producer *Prochlorococcus*. *Environmental Pollution*, v. 196, p. 147–155, jan. 2015.

CHEN, W.; ZHANG, T.; GUAN, L. Radiation Transfer in the Ocean and Ocean Color. *Comprehensive Remote Sensing*, p. 43–78, 2018.

CLAYTON, C. PETROLEUM GEOLOGY | Chemical and Physical Properties. *Encyclopedia of Geology*, p. 248–260, 2005.

COLLINS, S.; ROST, B.; RYNEARSON, T. A. Evolutionary potential of marine phytoplankton under ocean acidification. *Evolutionary Applications*, v. 7, n. 1, p. 140–155, 25 nov. 2013.

COSPER, E. M.; WURSTER, C. F.; GEORGE ROWLAND, R. PCB resistance within phytoplankton populations in polluted and unpolluted marine environments. *Marine Environmental Research*, v. 12, n. 3, p. 209–223, jan. 1984.

DEBORA IGLESIAS-RODRIGUEZ, M. et al. intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliana huxleyi* (pymnesiophyceae): the use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies. *Journal of Phycology*, v. 42, n. 3, p. 526–536, jun. 2006.

DEUTSCH-WENZEL RP, BRUNE H, GRIMMER G, DETTBARN G, MISFELD J. Experimental Studies in Rat Lungs on the Carcinogenicity and Dose-Response Relationships of Eight Frequently Occurring Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, set. 1983.

DIPPER, F. Open water lifestyles: marine plankton. *Elements of Marine Ecology*, p. 193–228, 2022.

ECHEVESTE, P.; AGUSTÍ, S.; DACHS, J. Cell size dependence of additive versus synergetic effects of UV radiation and PAHs on oceanic phytoplankton. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 5, p. 1307–1316, maio 2011.

ELSER, J. J. et al. Stoichiometric Constraints on Food-Web Dynamics: A Whole-Lake Experiment on the Canadian Shield. *Ecosystems*, v. 1, n. 1, p. 120–136, 1 jan. 1998.

EPA. 2016. Chemical Data Reporting Summary: Benzo[a]pyrene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[j]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Dibenz[a,h]acridine, Dibenz[a,j]acridine, Dibenz[a,h]anthracene, 7H-Dibenzo[c,g]carbazole, Dibenzo[a,e]pyrene, Dibenzo[a,h]pyrene, Dibenzo[a,i]pyrene, Dibenzo[a,l]pyrene, 5-Methylchrysene. U.S. Environmental Protection Agency. <https://chemview.epa.gov/chemview> and search on CAS number or substance name and select Manufacturing, Processing, Use, and Release Data Maintained by EPA and select Chemical Data Reporting Details.

FOLKE, C. et al. Regime Shifts, Resilience, and Biodiversity in Ecosystem Management. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 35, n. 1, p. 557–581, 15 dez. 2004.

FRY, B. *Stable Isotope Ecology*. New York, NY: Springer New York, 2006.

- GAD, S. C. Petroleum Hydrocarbons. *Encyclopedia of Toxicology*, p. 838–840, 2014.
- GRANADOS-CIFUENTES, C. et al. Genetic diversity of free-living *Symbiodinium* in the Caribbean: the importance of habitats and seasons. *Coral Reefs*, v. 34, n. 3, p. 927–939, 6 maio 2015.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, p. 29–60, 1975.
- HEDGES, J. I.; STERN, J. H. Carbon and nitrogen determinations of carbonate-containing solids<sup>1</sup>. *Limnology and Oceanography*, v. 29, n. 3, p. 657–663, maio 1984.
- HENDRICKS JD, MEYERS TR, SHELTON DW, CASTEEL JL, BAILEY GS.; Hepatocarcinogenicity of Benzo[a]pyrene to Rainbow Trout by Dietary Exposure and Intraperitoneal Injection<sup>23</sup>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, abr. 1985.
- HONG, Y.-W. et al. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, v. 56, n. 8, p. 1400–1405, ago. 2008.
- HOPPENRATH, MONA; JUAN, F. 2012. Dinoflagellates. Version 15 December 2012 (under construction). <http://tolweb.org/Dinoflagellates/2445/2012.12.15> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- HUANG, X.-D. et al. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, n. 8, p. 1707–1715, ago. 1997.
- IARC. 1973. Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 3. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 271 pp
- IVES, A. R.; CARPENTER, S. R. Stability and Diversity of Ecosystems. *Science*, v. 317, n. 5834, p. 58–62, 6 jul. 2007.
- JUNG, K. H. et al. Assessment of Benzo(a)pyrene-equivalent Carcinogenicity and Mutagenicity of Residential Indoor versus Outdoor Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposing Young Children in New York City. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 7, n. 5, p. 1889–1900, 27 abr. 2010.
- KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v. 35, n. 2-4, p. 147–160, 8 dez. 2014
- KIRSO, U.; IRHA, N. Role of Algae in Fate of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 41, n. 1, p. 83–89, set. 1998.
- KOVAČ, Ž.; PLATT, T.; SATHYENDRANATH, S. Stability and resilience in a nutrient-phytoplankton marine ecosystem model. *ICES Journal of Marine Science*, v. 77, n. 4, p. 1556–1572, 29 jun. 2020.

- LAJEUNESSE, T. C. et al. Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Journal of Biogeography*, v. 37, n. 5, p. 785–800, maio 2010.
- T., L. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, v. 141, n. 2, p. 387–400, 1 ago. 2002.
- LAJEUNESSE, T. et al. Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Marine Ecology Progress Series*, v. 284, p. 147–161, 2004.
- LAJEUNESSE, TODD, JOHN E. PARKINSON, AND ROBERT K. TRENCH. 2012. *Symbiodinium*. Version 04 July 2012. <http://tolweb.org/Symbiodinium/126705/2012.07.04> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- LAJEUNESSE, TODD, JOHN E. PARKINSON, AND ROBERT K. TRENCH. 2012. *Symbiodinium*. Version 04 July 2012. <http://tolweb.org/Symbiodinium/126705/2012.07.04> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- LAUENSTEIN, G. G.; CANTILLO, ADRIANA Y. (1998). Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project : 1993-1996 update.
- LEVIN, S. A. et al. (EDS.). *The Princeton Guide to Ecology*. 27 jul. 2009.
- LOHBECK, K. T.; RIEBESELL, U.; REUSCH, T. B. H. Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience*, v. 5, n. 5, p. 346–351, 8 abr. 2012.
- LORRAIN, A. et al. Decarbonation and preservation method for the analysis of organic C and N contents and stable isotope ratios of low-carbonated suspended particulate material. *Analytica Chimica Acta*, v. 491, n. 2, p. 125–133, set. 2003.
- MACAYA, C. C. et al. Bioremediation of Petroleum. Reference Module in Life Sciences, 2019.
- MALLAKIN, A. et al. Impacts of Structural Photomodification on the Toxicity of Environmental Contaminants: Anthracene Photooxidation Products. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 43, n. 2, p. 204–212, jun. 1999.
- MARTÍNEZ, F.; JARILLO, J. A.; ORÚS, M. I. Interactions between trichlorfon and three Chlorophyceae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 46, n. 4, p. 599–605, abr. 1991.
- MARWOOD, C. A. et al. Intact and Photomodified Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Inhibit Photosynthesis in Natural Assemblages of Lake Erie Phytoplankton Exposed to Solar Radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 44, n. 3, p. 322–327, nov. 1999.
- MARWOOD, C. A. et al. Photoinduced Toxicity to Lake Erie Phytoplankton Assemblages from Intact and Photomodified Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Great Lakes Research*, v. 29, n. 4, p. 558–565, jan. 2003.

- MEADOR, J. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Encyclopedia of Ecology*, p. 2881–2891, 2008.
- MOODY, J. D. et al. Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1476–1483, abr. 2001.
- MOURA, J.A.S.; YOGUI, G.T. 2012. Limpeza e preparação de vidrarias para análise de compostos orgânicos. Procedimento Operacional Padrão OrganoMAR-2012-05, Revisão nº 1. Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinheiros, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, 6p.
- MÜLLER, M. N.; ANTIA, A. N.; LAROCHE, J. Influence of cell cycle phase on calcification in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, v. 53, n. 2, p. 506–512, mar. 2008.
- MÜLLER, M. N. et al. Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. *Environmental Pollution*, v. 289, p. 117938, nov. 2021.
- MULLER-PARKER, G.; D'ELIA, C. F.; COOK, C. B. Interactions Between Corals and Their Symbiotic Algae. *Coral Reefs in the Anthropocene*, p. 99–116, 2015.
- PASHIN, Y. V.; BAKHITOVA, L. M. Mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives*, v. 30, p. 185–189, jun. 1979.
- phytoplankton | Definition, Examples, & Facts | Britannica. , 2019. (Nota técnica).
- PLACE, A. R. et al. *Karlodinium veneficum*—The little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae*, v. 14, p. 179–195, fev. 2012.
- RABELO, E. F. et al. *Symbiodinium* diversity associated with zoanthids (Cnidaria: Hexacorallia) in Northeastern Brazil. *Symbiosis*, v. 64, n. 3, p. 105–113, nov. 2014.
- REDDY, C. M.; QUINN, J. G. GC-MS analysis of total petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples after the North Cape oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, v. 38, n. 2, p. 126–135, fev. 1999.
- RICHLIN, M. L. et al. Extensive genetic diversity and rapid population differentiation during blooms of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) in an isolated salt pond on Cape Cod, MA, USA. *Ecology and Evolution*, v. 2, n. 10, p. 2588–2599, 13 set. 2012.
- RIMET, F. et al. IMPACTS OF FLUORANTHENE ON DIATOM ASSEMBLAGES AND FRUSTULE MORPHOLOGY IN INDOOR MICROCOSMS. *Vie et Milieu / Life & Environment*, p. 145, 2004.
- ROWAN R. ; Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J Phycol*34: 407–417. 1989
- ROWAN, R.; POWERS, D. A. A Molecular Genetic Classification of Zooxanthellae and the Evolution of Animal-Algal Symbioses. *Science*, v. 251, n. 4999, p. 1348–1351, 15 mar. 1991.

RUSSNAK, V.; RODRIGUEZ-LANETTY, M.; KARSTEN, U. Photophysiological Tolerance and Thermal Plasticity of Genetically Different Symbiodiniaceae Endosymbiont Species of Cnidaria. *Frontiers in Marine Science*, v. 8, 1 abr. 2021.

RYNEARSON, T. A.; VIRGINIA ARMBRUST, E. GENETIC DIFFERENTIATION AMONG POPULATIONS OF THE PLANKTONIC MARINE DIATOM DITYLUM BRIGHTWELLII (BACILLARIOPHYCEAE)1. *Journal of Phycology*, v. 40, n. 1, p. 34–43, 29 jan. 2004.

SANTOS, R.H.A. 2017. Origem e distribuição de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas águas e sedimentos do Estuário do Rio Goiana (PE/PB - Brasil). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 83p.

SARJEANT, W. A. S. Living Dinoflagellates: Ecology. *Fossil and Living Dinoflagellates*, p. 1–12, 1974.

SIDDIQUA, A. Salinity Effects on Symbiodinium sp. growth rate in Controlled conditions and produced Biomass Biochemical Characterization. *Building Resilience at Universities: Role of Innovation and Entrepreneurship*, 20 out. 2021.

STAT, M.; CARTER, D.; HOEGHGULDBERG, O. The evolutionary history of Symbiodinium and scleractinian hosts—Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 8, n. 1, p. 23–43, 27 set. 2006.

STAT, M.; MORRIS, E.; GATES, R. D. Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 27, p. 9256–9261, 30 jun. 2008.

STAUFFER, E.; DOLAN, J. A.; NEWMAN, R. Flammable and Combustible Liquids. *Fire Debris Analysis*, p. 199–233, 2008.

STEIDINGER, K. A.; JANGEN, K. Dinoflagellates. *Identifying Marine Phytoplankton*, p. 387–584, 1997.

SULLIVAN, M. J. Oil, Crude. *Encyclopedia of Toxicology*, p. 292–295, 2005.

BOTANA, M. T. et al. Thermal plasticity of coral reef symbionts is linked to major alterations in their lipidome composition. *Limnology and Oceanography*, v. 67, n. 7, p. 1456–1469, 10 maio 2022.

THUY, H. T. T.; LOAN, T. T. C.; PHUONG, T. H. The potential accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in phytoplankton and bivalves in Can Gio coastal wetland, Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 18, p. 17240–17249, 12 maio 2018.

TOTH, B. Tumorigenesis by Benzo(a)pyrene Administered Intracolonicly. *Oncology*, v. 37, n. 2, p. 77–82, 1980.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME Determination of petroleum hydrocarbons in sediments Reference Methods For Marine Pollution Studies No. 20 Prepared in co-operation with IOC IAEA. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/31506/rsrm020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 18 fev. 2023.

WITMAN, S. World's Biggest Oxygen Producers Living in Swirling Ocean Waters. *Eos*, 13 set. 2017.

YAMASHITA, H.; KOIKE, K. Genetic identity of free-living *Symbiodinium* obtained over a broad latitudinal range in the Japanese coast. *Phycological Research*, v. 61, n. 1, p. 68–80, 21 dez. 2012.

YANG, S.-Y. et al. Diversity and Distribution of *Symbiodinium* Associated with Seven Common Coral Species in the Chagos Archipelago, Central Indian Ocean. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e35836, 2 maio 2012.

YEH, H.-W.; EPSTEIN, S. Hydrogen and carbon isotopes of petroleum and related organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 45, n. 5, p. 753–762, maio 1981.

YOGUI, G.T.; SCHWAMBORN, R. 2019. Composição isotópica do material orgânico particulado e do zooplâncton na bacia de Sergipe e sul de Alagoas. In: Moreira, D.L.; Carneiro, M.E.R.; Silva, A.P.; Schwamborn, R. (Eds.). *Ambiente Pelágico da Bacia de Sergipe-Alagoas*. Editora UFS, São Cristóvão, pp. 502-555.

ZHOU, G. et al. Genetic diversity of potentially free-living *Symbiodinium* in the Xisha Islands, South China Sea: Implications for the resilience of coral reefs. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, v. 15, n. 2, p. 152–160, abr. 2012.