



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Tecnologia e Geociências**  
**Departamento de Oceanografia**  
**Programa de Pós-Graduação em Oceanografia**



**Nathália Lins Silva**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MESOZOOPLÂNCTON E DAS PARTÍCULAS EM  
SUSPENSÃO EM DOIS AMBIENTES COSTEIROS, PERNAMBUCO, BRASIL**

**Recife**

**2016**

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Tecnologia e Geociências**  
**Departamento de Oceanografia**  
**Programa de Pós-Graduação em Oceanografia**

**Nathália Lins Silva**

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MESOZOOPLÂNCTON E DAS PARTÍCULAS EM  
SUSPENSÃO EM DOIS AMBIENTES COSTEIROS, PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (PPGO-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Área de concentração: Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Ralf Schwamborn

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte

Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

S586a Silva, Nathália Lins.

Análise comparativa do mesozooplâncton e das partículas em suspensão em dois ambientes costeiros, Pernambuco, Brasil / Nathália Lins Silva. - Recife: O Autor, 2016.

77 folhas, il.

Orientador: Prof. Dr. Ralf Schwamborn.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-graduação em Oceanografia, 2016.

Inclui Referências, anexos e apêndice.

Texto em português e inglês.

1. Oceanografia. 2. Biomassa. 3. Volume. 4. Peso úmido. 5. Zooscan. I. Schwamborn, Ralf (Orientador). II. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.)

BCTG/2016-277

ANÁLISE COMPARATIVA DO MESOZOOPLÂNCTON E DAS PARTÍCULAS EM  
SUSPENSÃO EM DOIS AMBIENTES COSTEIROS, PERNAMBUCO, BRASIL

Nathália Lins Silva

Dissertação submetida ao curso de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 29 de junho de 2016.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Ralf Schwamborn (Orientador) – Presidente  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sigrid Neumann Leitão – Titular Interno  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

---

Prof. Dr. Mauro de Melo Júnior – Titular Externo  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria da Glória Cunha – Suplente Interno  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enide Eskinazi Leça – Suplente Externo  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)

*Dedico esta obra ao grandioso Deus pela permissão do  
Dom da vida e por seu acolhimento.*

*Aos meus pais, Simone Sueli e Cláudio Antonio por se  
anularem por um único objetivo: educar as suas filhas.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todas as bênçãos, dádivas, dificuldades enfrentadas ao longo da minha existência e a permissão para que eu chegasse até aqui.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pela concessão da bolsa de mestrado (Nº do Processo: IBPG-0937/1.08/13).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do Projeto St - ESPLAN-Tropic (“Séries Temporais de Espectros de Tamanho do Zooplâncton Marinho Tropical, com ênfase nas larvas de Decapoda”, CNPq Nº do Processo: 471038/2012-1).

Ao INCT AmbTropic (CNPq/FAPESB/FAPEX/CAPES) pelo apoio financeiro (aquisição de equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento desse estudo).

À Petrobrás pela aquisição do equipamento ZooScan utilizado neste estudo.

Ao Departamento de Oceanografia da UFPE e ao Museu de Oceanografia da UFPE pela disponibilização da infraestrutura, veículos e todo o suporte ofertado para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da UFPE (PPGO).

A todos os funcionários e professores que fazem parte do Departamento de Oceanografia da UFPE, importantes na minha formação.

À equipe do Centro de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Nordeste - CEPENE, pela disponibilização da infraestrutura e das lanchas utilizadas durante as coletas na Baía de Tamandaré.

A todos os barqueiros por todo o suporte durante e após a realização das coletas e a todas as pessoas que um dia embarcaram em prol do projeto ST-ESPLAN-Tropic.

Ao meu orientador, Ralf Schwamborn, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas horas de atenção dedicadas à orientação, pelo apoio, confiança, estímulo em sempre propôr diferentes abordagens ao decorrer da minha carreira acadêmica “*vamos caminhando*”.

À minha amiga Catarina Marcolin, por ter tanta paciência em meus momentos de desespero e por me acolher na sua casa em um período tão conturbado, dedicando a mim sua atenção e compartilhando os seus conhecimentos na vida acadêmica e sobretudo, na Vida. “Cat”, você foi essencial na realização deste trabalho.

A Leandro Ticlia, por toda a sua paciência, humor negro e apoio nos momentos em que eu precisava derrubar a barreira de um mundo desconhecido, o Matlab.

A Marc Picheral (LOV, France) pela assistência com o equipamento ZooScan sempre que este simplesmente resolvia não funcionar corretamente.

Aos amigos do Laboratório do Zooplâncton por toda a ajuda em todo e qualquer problema que eu tivesse e por compartilharem de tantos momentos de agonia durante a minha reta final nesta etapa da minha vida. Foi um grande prazer trabalhar com cada um de vocês. Em especial, agradeço a Simone Lira por me ajudar nos primeiros passos com o ZooScan, pelos muitos conselhos, sua ajuda foi crucial. A Renata Campelo por toda a dedicação e empenho na correção da minha escrita. A Glenda Mugrabe e Gleice Santos pelo auxílio prestado durante os inúmeros atropelos ocorridos. A Cynthia Lima, pela cumplicidade e compartilhamento de TODAS as etapas vividas desde o processo seletivo do Mestrado. A Dani Melo, pelas palavras de apoio, incentivo, ajuda nas validações e na padronização das referências. A Igor Ávila por sua descontração na abordagem de assuntos polêmicos cumplicidade e por me ajudarem tantas vezes nas identificações dos organismos. A Simone Jorge por me transmitir confiança. Obrigada por cada momento vivido com vocês, pelas conversas, ensinamentos e bons conselhos, saibam que vocês foram e sempre serão essenciais em minha trajetória e a todos os que fizeram do laboratório do zooplâncton um lugar acolhedor.

Às colegas do laboratório de fitoplâncton que foram tão importantes ao longo dessa jornada.

A João Marcelo, pela ajuda na elaboração do mapa da área de estudo.

Aos meus pais, Cláudio Silva e Simone Lins, pelo amor incondicional, pelo eterno apoio, paciência, ensinamentos, confiança e por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida e em nas minhas decisões.

À minha irmã Anna Cláudia Lins, por toda a sua chatice, amizade, cumplicidade, apoio e conselhos apresentados.

Ao meu noivo Sidnaldo Oliveira por estar ao meu lado desde antes da graduação me incentivando e me dando força, aguentando e compreendendo as minhas ausências durante este período e por estar sempre torcendo por mim.

Aos meus familiares por todo o apoio e entusiasmo aprestado durante todos os períodos da minha vida e, que eu sei que torceram e sempre torcerão para o meu sucesso e

realização tanto pessoal quanto profissional e estão felizes e honrados com a conclusão desta fase da minha vida.

À amiga que conquistei desde a graduação e que espero levar por toda a minha vida, Natache Ferrão (Tachinha), obrigada por sua amizade sincera, por seus inúmeros ensinamentos, pela ajuda e companheirismo prestados, estarei sempre solícita a você amiga.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho; meus sinceros agradecimentos.



## RESUMO

Material particulado em suspensão (séston) em ecossistemas aquáticos contém dois compartimentos: organismos (plâncton) e partículas. Conhecimento sobre a contribuição das partículas para o séston é essencial para a compreensão da dinâmica de fluxos tróficos em ecossistemas marinhos. Este estudo tem como objetivo medir a biomassa sestônica úmida total e avaliar as contribuições relativas do mesozooplâncton e das partículas em suspensão em amostras de plâncton. As amostras foram obtidas no estuário do Rio Formoso e na Baía de Tamandaré (Pernambuco, Brasil). Arrastos subsuperficiais horizontais foram realizados durante dois anos (junho / 2013 a maio / 2015) em intervalos bimestrais com redes de plâncton (malhas: 200 e 300  $\mu\text{m}$ ) durante as estações seca e chuvosa. Um total de 155 amostras foram analisadas para estimar a biomassa sestônica úmida total e posterior identificação e estimativa de densidade e volume do zooplâncton e das partículas usando o equipamento ZooScan. Foram detectados, identificados, quantificados e medidos 26 grupos taxonômicos do zooplâncton. Dentre estes os grupos mais abundantes foram Copepoda (Calanoida e Cyclopoida), zoeas de Brachyura, outros decápodes, apendiculárias e náuplios de crustáceos. Foram detectadas 15 categorias de partículas, entre elas, as partículas opacas, transparentes e escuras, fibras vegetais, e exúvias de copépodos foram as mais abundantes. O ambiente estuarino apresentou os maiores valores de biomassa sestônica úmida, densidade e volume, e, também apresentou as maiores concentrações de partículas e contribuições relativas em termos de volume (72% e 59% do volume, para as malhas de 200 e 300 micrômetros, respectivamente). No entanto, o ambiente marinho também mostrou concentrações e volumes de partículas muito elevadas (32% e 44% do volume, para as malhas de 200 e 300 micrômetros, respectivamente). Zooplâncton e partículas mostraram maiores densidades durante o período seco. A comparação entre os volumes totais obtidos com medidas semi-automáticas de imagens digitalizadas e a biomassa sestônica úmida revelou uma relação linear significativa ( $R^2 = 0,73$ ;  $p < 0,0001$ ). Este estudo confirma a importância de mesopartículas (maiores do que 200 micrômetros) na estrutura do séston em áreas costeiras tropicais.

**Palavras-chave:** Biomassa. Volume. Peso úmido. ZooScan

## ABSTRACT

Suspended particulate matter (seston) in aquatic ecosystems contains two compartments: organisms (plankton) and particles. Knowledge on the contribution of particles to the seston is essential in understanding the dynamics of trophic energy flows in marine ecosystems. This study aims to measure the total wet seston biomass (wet weight) and to assess the relative contributions of zooplankton and particles to plankton net samples. The samples were obtained in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay (Pernambuco State, Brazil). Subsurface horizontal tows were performed during two years (June / 2013 to May / 2015) at bimonthly intervals with plankton nets (meshes: 200 and 300  $\mu\text{m}$ ) during dry and rainy seasons. 155 samples were analyzed to estimate the total wet seston biomass and subsequent identification and estimation of density and zooplankton volume and particle volume using a ZooScan equipment. 26 taxonomic groups of zooplankton were detected, identified, quantified, and measured. The most abundant were Copepoda (Calanoida and Cyclopoida), brachyuran zoea, other decapods, appendicularians and crustacean nauplius. 15 categories of particles were detected, among these, opaque, transparent and dark particles, plant fibers, and copepod exuviae were the most abundant. The estuarine environment showed the highest values of wet seston biomass, density and volume and also had the highest particle concentrations and relative volume contributions, (72% and 59% volume, for 200 and 300  $\mu\text{m}$  mesh nets, respectively). However, the marine environment also showed very high concentrations and volumes of particles (32% and 44% volume, for 200 and 300  $\mu\text{m}$  mesh nets, respectively). Zooplankton and particles showed highest densities during the dry period. The comparison between total volumes obtained with semi-automatic measurements of scanned images with wet seston biomass revealed a significant linear relationship ( $R^2 = 0.73$ ;  $p < 0.0001$ ). This study underlines the importance of particles (greater than 200 micrometers) in the structure of the seston in tropical coastal areas.

**Keywords:** Biomass. Volume. Wet weight. ZooScan.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

**Figura 1:** Ambientes coteiros amostrados e suas respectivas estações de coleta: Estuário do rio Formoso (E1, E2 e E3) e baía de Tamandaré (B1, B2 e B3) durante o período de junho de 2013 à maio de 2015 no Litoral Sul do Estado de Pernambuco (Brasil). Fonte: Nathália L. Silva. A) Vista parcial do Estuário do rio Formoso. Fonte: Nathália L. Silva. B) Vista parcial da baía de Tamandaré. Fonte: Google imagens.....22

**Capítulo 1:** Using image analysis to distinguish the contributions of zooplankton and particles to the seston biomass in two tropical costal environments.

**Figure 1:** Map of the sampling stations at the coast of Pernambuco State, Brazil. Three stations were sampled at Rio Formoso estuary (E1, E2, and E3) and three in Tamandaré Bay (B1, B2, and B3). Fonte: Nathália L. Silva.....34

**Figure 2:** Time series of salinity, water temperature (°C) and transparency (Secchi depth, m). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Fonte: Nathália L. Silva.....38

**Figure 3:** Total seston wet biomass according to seasons (wet and dry), areas (Rio Formoso estuary [white] and Tamandaré Bay [gray], and mesh size [200 µm and 300 µm]). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Fonte: Nathália L. Silva.....39

**Figure 4:** Examples of images (vignettes) obtained with the ZooScan equipment. a) Examples of the five most abundant zooplankton groups. I: Calanoida; II: Cyclopoida; III: Brachyuran larvae (zoea); IV: Decapoda (others); V: Appendicularia. b) Examples of the five most abundant categories of particles. VI: opaque particles; VII: dark particles; VIII: transparent particles; IX: zooplankton exuviae; X: plant fibers. Fonte: Nathália L. Silva.....40

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 5:</b> Relative contributions (% counts) of zooplankton and particles to the samples analyzed with the ZooScan equipment, according to sampling area (Rio Formoso estuary and Tamandaré Bay), and mesh size (200 µm and 300 µm). Fonte: Nathália L. Silva.....                                                                                             | 41 |
| <b>Figure 6:</b> Time series of zooplankton and particle densities in the Rio Formoso estuary (Brazil), according to sampling stations (stations E1 to E3) and mesh size (200 µm and 300 µm). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.....                                                                            | 42 |
| <b>Figure 7:</b> Time series of zooplankton and particle densities in Tamandaré Bay (Brazil), according to sampling stations (stations B1 to B3) and mesh size (200 µm and 300 µm). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.....                                                                                      | 44 |
| <b>Figure 8:</b> Relative contributions (% volume) of zooplankton and particles to the total volume of samples analyzed with the ZooScan equipment, according to sampling area (Rio Formoso estuary and Tamandaré Bay), and mesh size (200 µm and 300 µm). Fonte: Nathália L. Silva.....                                                                             | 45 |
| <b>Figure 9:</b> Time series of zooplankton and particle volumes in the Rio Formoso estuary (Brazil), according to sampling stations (stations E1 to E3) and mesh size (200 µm and 300 µm). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015.....                                                                                                        | 46 |
| <b>Figure 10:</b> Time series of zooplankton and particle volumes in Tamandaré Bay (Brazil), according to sampling stations (stations B1 to B3) and mesh size (200 µm and 300 µm). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.....                                                                                       | 47 |
| <b>Figure 11:</b> Linear correlations between $\log_{10}(\text{total particles})$ and $\log_{10}(\text{total zooplankton})$ , in units of density and volume. Black circles: rainy season. Grey triangles: dry season. Samples were taken from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil (n = 155 samples). Fonte: Nathália L. Silva..... | 49 |

**Figure 12:** Relationship between  $\log_{10}(\text{seston biomass (mg m}^{-3}\text{)})$  and  $\log_{10}(\text{total volume (mm}^3\text{ m}^{-3}\text{)})$ . Seston biomass was measured as wet weight, total volume (particles + zooplankton) was obtained thorough image analysis (ZooScan). Samples ( $n = 148$ ) were taken from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Fonte: Ralf Schwamborn.....50

## LISTA DE TABELAS

**Capítulo 1:** Using image analysis to distinguish the contributions of zooplankton and particles to the seston biomass in two tropical costal environments.

**Table 1.** Wet seston biomass (mg. m<sup>-3</sup>) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200 µm and 300 µm mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.....39

**Table 2.** Density of zooplankton (ind.m<sup>-3</sup>) and particles (m<sup>-3</sup>) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200 µm and 300 µm mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.....43

**Table 3.** Total volume of zooplankton (mm<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>) and total volume of particles (mm<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200 µm and 300 µm mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.....48

## LISTA DE ANEXOS

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo I</b> – 26 categorias de zooplâncton que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier (PKID).....            | 61 |
| <b>Anexo II</b> – 12 categorias de partículas que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier (PKID).....            | 62 |
| <b>Anexo III</b> – 3 categorias de artefatos de escaneio que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier (PKID)..... | 63 |

## **LISTA DE APÊNDICE**

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Apêndice A</b> – Manual prático passo a passo dos procedimentos com o equipamento ZooScan..... | 64 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## SUMÁRIO

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                                        | 19 |
| 2. HIPÓTESE .....                                                                | 21 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                | 22 |
| 3.1 Objetivo geral .....                                                         | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                  | 22 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                       | 22 |
| 4.1 Áreas de estudo .....                                                        | 22 |
| 4.2 Atividades de campo.....                                                     | 24 |
| 4.3 Atividades laboratoriais.....                                                | 25 |
| 4.3.3 Biomassa sestônica úmida .....                                             | 25 |
| 4.3.4 Procedimentos com o ZooScan.....                                           | 25 |
| 5. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....                                                | 27 |
| 6. REFERÊNCIAS .....                                                             | 28 |
| Capítulo 1 .....                                                                 | 32 |
| Introduction.....                                                                | 32 |
| Methods .....                                                                    | 34 |
| <i>Study area</i> .....                                                          | 34 |
| <i>Plankton sampling</i> .....                                                   | 35 |
| <i>Wet seston biomass</i> .....                                                  | 36 |
| <i>Image acquisition and analysis</i> .....                                      | 36 |
| <i>Zooplankton and particle volumes</i> .....                                    | 37 |
| <i>Statistical analyses</i> .....                                                | 37 |
| Results .....                                                                    | 38 |
| <i>Environmental variables</i> .....                                             | 38 |
| <i>Seston biomass</i> .....                                                      | 39 |
| <i>Density and composition and of zooplankton and particles</i> .....            | 40 |
| <i>Particle and Zooplankton Volume</i> .....                                     | 45 |
| <i>Correlations between zooplankton and particle densities and volumes</i> ..... | 49 |
| <i>Total volume vs seston biomass</i> .....                                      | 50 |
| Discussion.....                                                                  | 51 |

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Seasonal and spatial variability in hydrographic conditions and biomass</i> ..... | 51 |
| <i>Zooplankton density and seasonal variation</i> .....                              | 52 |
| <i>Net selectivity</i> .....                                                         | 53 |
| <i>Zooplankton volume</i> .....                                                      | 53 |
| <i>Zooplankton and particles: comparison of methods</i> .....                        | 53 |
| <i>Dynamics of zooplankton and particles</i> .....                                   | 54 |
| Conclusion.....                                                                      | 55 |
| Acknowledgements .....                                                               | 55 |
| References .....                                                                     | 55 |
| CONCLUSÕES GERAIS .....                                                              | 61 |
| ANEXO I.....                                                                         | 61 |
| ANEXO II .....                                                                       | 62 |
| ANEXO III .....                                                                      | 63 |
| APÊNDICE A .....                                                                     | 64 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Todo o material particulado, seja ele orgânico ou inorgânico, que se encontra suspenso na coluna d'água é definido como séston. A matéria orgânica particulada do séston tem origem autóctone ou alóctone, refletindo a biogeoquímica do ambiente aquático (BLANCHOT et al., 1989; WEN, 1992; NAKAJIMA et al., 2010 e referências contidas). O séston é composto por um agrupamento heterogêneo de elementos do bacterioplâncton, fitoplâncton, organismos do plâncton e por detritos (BLANCHOT et al., 1989; WEN, 1992; ODUM, 2004; GLADSTONE-GALLAGHE et al., 2016).

Dentre os organismos planctônicos, a comunidade do zooplâncton desempenha um papel fundamental nas teias alimentares, pois representam o elo que transmite a energia sintetizada pelo fitoplâncton para os consumidores de níveis tróficos mais elevados (SCHWAMBORN et al., 1999; BOLTOVSKOY, 1999; MELO JÚNIOR et al., 2007; SANTOS et al., 2009), contribuindo para a ciclagem e exportação de nutrientes orgânicos e inorgânicos presentes na coluna de água (GROSS & GROSS, 1996).

Por possuírem um ciclo de vida curto, muitos organismos do zooplâncton são utilizados como indicadores biológicos, refletindo rapidamente as mudanças provenientes da ação antrópica, tendo a sua distribuição espacial e temporal sujeita à variabilidade física e química do ambiente (BERNARDI, 1984; SANTOS et al. 2009; GARRISON, 2010). Neste aspecto, os processos de distribuição das comunidades zooplanctônicas têm sido cada vez mais estudados, não só pela importância ecológica, mas também por estarem envolvidas em vários processos que garantem a biodiversidade e o estado de conservação do ecossistema pelágico analisado (PARSONS et al., 1984; OMORI & IKEDA, 1984; NEUMANN-LEITÃO et al., 1999; LOPES et al., 1998).

Visando o conhecimento desta comunidade, uma grande quantidade de estudos têm sido realizados em ambientes costeiros tropicais, especialmente em áreas estuarinas e marinhas (NASCIMENTO-VIEIRA et al., 1985; VEGA-PÉREZ 1993, PARK & MARSHALL 2000, ELLIOTI & KAUFMANN, 2007; MELO JÚNIOR et al., 2007; ARAUJO et al., 2008; SCHWAMBORN et al., 2008). No entanto, esses estudos abordam a estrutura da comunidade do zooplâncton com base na composição, diversidade e biomassa sestônica, sem considerar outros aspectos relevantes no estudo da comunidade planctônica como por exemplo, a contribuição das partículas em suspensão para a biomassa sestônica.

Além do zooplâncton, as partículas são elementos-chave nos ecossistemas marinhos e nos ciclos biogeoquímicos (CHECKLEY et al., 2008), podendo ocupar uma parte significativa do séston numa amostra de plâncton obtida com rede, acarretando em uma superestimação da biomassa do zooplâncton (NAKAJIMA et al., 2010). Tal problema pode ser ainda mais grave em águas estuarinas e costeiras, pois, estes ambientes estão mais propensos a elevadas concentrações de partículas de detritos, a exemplo das algas, exúvias, partículas vegetais, plásticos, fibras de nylon, dentre outros, devido à sua proximidade com os ecossistemas adjacentes, a exemplo dos manguezais e os recifes de corais e à ação antrópica. Estas partículas geralmente ficam presas às malhas das redes resultando na agregação do zooplâncton a estas partículas, ocasionando em uma tarefa praticamente impossível, isolar os indivíduos das partículas para identificação, enumeração e quantificação da biomassa (ALCARAZ et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2010).

Em estudos de dinâmica trófica marinha, é sempre necessário medir com precisão a biomassa do zooplâncton (HARRIS et al., 2000; ALCARAZ et al., 2003; LEHETTE & HERNANDEZ-LEON, 2009; NAKAJIMA et al., 2010; CRIPPS et al., 2016). Inúmeros são os métodos para a quantificação da biomassa, porém, ainda não são padronizados (JACOBS & GRANT, 1977; HARRIS et al., 2000; ALCARAZ et al., 2003; PINTO-COELHO et al., 2005). Alguns métodos buscam mensurar a biomassa da forma mais precisa possível, porém, outros apenas retratam uma medida aproximada. A mensuração direta da biomassa é frequentemente representada por uma medida de peso sestônico das amostras de plâncton (McCAULEY, 1984; ALCARAZ et al., 2003; PINTO-COELHO et al., 2005; MELO JÚNIOR et al., 2007). Apesar desta ser uma forma prática de estimar a biomassa, este método convencional é prejudicado pela impossibilidade de separação e classificação dos diferentes componentes do plâncton, sejam eles organismos ou partículas em suspensão (ALCARAZ et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2010).

Um dos grandes desafios da oceanografia tem sido diferenciar os componentes do séston para quantificar a contribuição real do zooplâncton e das partículas. Métodos alternativos para estudar o plâncton incluem sistemas de análises de imagem (SCHUMANN & RENTSCH, 1998; GROSJEAN et al., 2004; GORSKY et al., 2010), sendo métodos promissores por permitirem a aplicação entre diferentes ecossistemas (GORSKY et al., 2010). Com base nisto, métodos ópticos utilizados *in situ* estão sendo desenvolvidos e aprimorados, dentre eles, o Video Plankton Recorder, VPR (DAVIS et al., 1992), Underwater Video Profilers, UVP (GORSKY et al., 2000) e o Laser Optical Particle Counter, LOPC (HERMAN

et al., 2004), são os três primeiros instrumentos de alta resolução de imagens criados para a quantificação de pequenos organismos e partículas (< 2 mm). No Brasil, um dos poucos estudos que abordaram a contribuição de partículas em suspensão na coluna de água fez uso *in situ* de um contador de partículas (LOPC), no Banco dos Abrolhos e adjacências, no entanto, não distingue as contribuições em termos de biomassa das partículas no plâncton (MARCOLIN et al., 2013). No entanto, estes equipamentos não envolvem a metodologia convencional na coleta de plâncton, a utilização de arrastos de rede e malhas que retém indivíduos e partículas fisicamente maiores e menos frágeis.

O ZooScan é um equipamento similar a um escâner comercial, com resolução taxonômica variável que possibilita uma classificação rápida das amostras fixadas de plâncton e pode auxiliar também nos cálculos de contagem para uma variedade de estudos ecológicos, uma vez que medidas morfométricas e ópticas são obtidas para cada partícula escaneada (>300 µm), de amostras processadas em laboratório em um menor tempo de análise (GROSJEAN et al., 2004; GORSKY et al., 2010; VANDROMME et al., 2012; FOREST, et al., 2012). O ZooScan integrado aos softwares ZooProcess e Plankton Identifier (PKID) e ao conjunto de dados fornecidos por eles, permitem o estudo dos diferentes componentes do plâncton. E, representam um ótimo meio para o monitoramento do estado dos ecossistemas plactônicos (VANDROMME et al., 2012).

O presente trabalho propõe produzir novos conhecimentos sobre a estrutura dos ecossistemas estuarinos e marinhos tropicais em relação à contribuição de organismos e partículas em termos de biomassa sestônica, representando o primeiro esforço em se estimar a abundância e o volume das partículas de detritos através da combinação de métodos direto e indireto (peso úmido e análise de imagem, respectivamente) em amostras de plâncton previamente preservadas.

## 2. HIPÓTESE

Partículas não-vivas têm contribuição relevante para a biomassa sestônica em amostras de plâncton costeiro.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar e comparar a contribuição das partículas em suspensão nas amostras de séston obtidas com redes de coleta de plâncton em dois ecossistemas costeiros tropicais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- i. Identificar os componentes correspondentes ao zooplâncton e às partículas em suspensão nos cálculos de biomassa sestônica;
- ii. Identificar os principais grupos taxonômicos e as principais categorias de partículas que contribuem para os valores de biomassa sestônica;

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

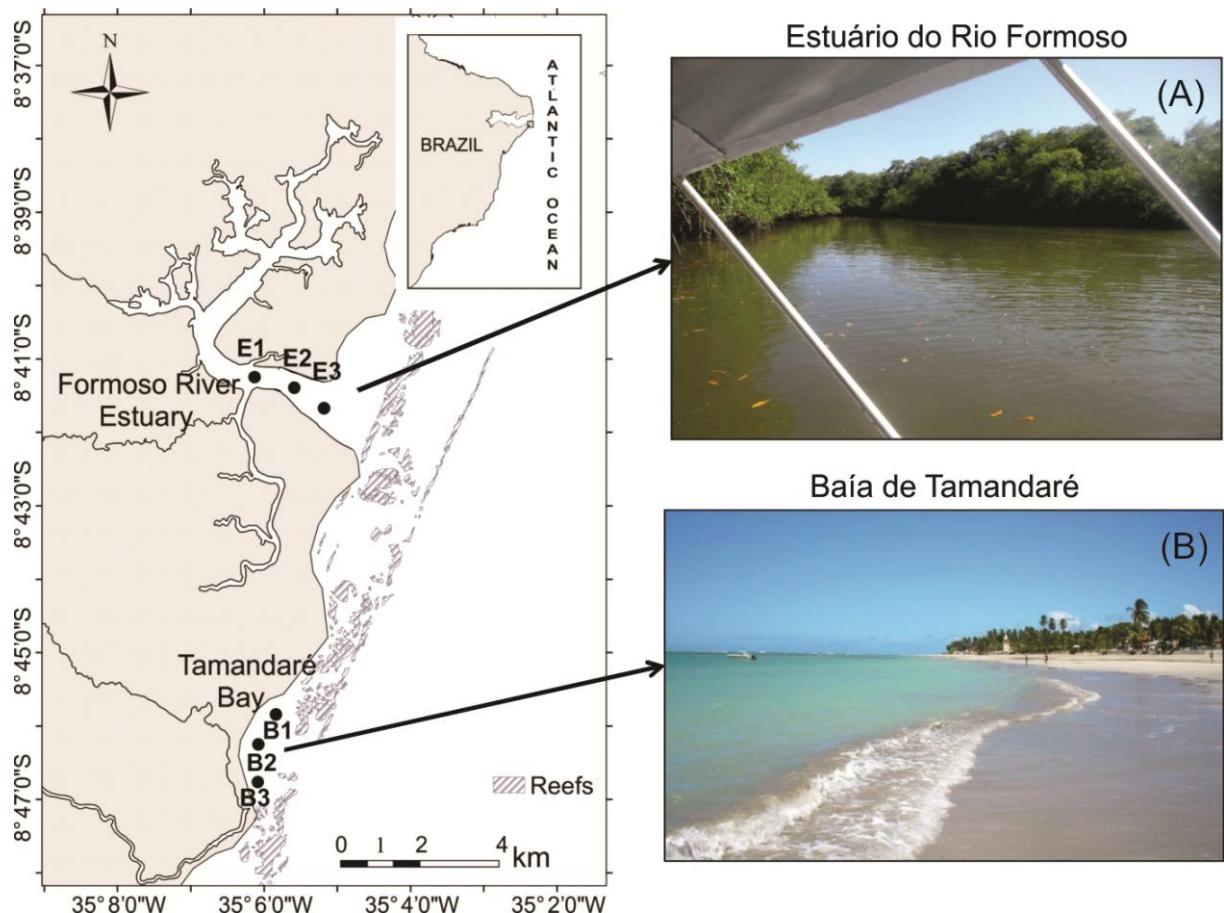
#### **4.1 Áreas de estudo**

Este estudo faz parte integrante do projeto St-ESPLAN-Tropic, conduzido na região Nordeste do Brasil e abrange a camada subsuperficial da coluna d'água do estuário do rio Formoso (Fig. 1) e da baía de Tamandaré (Fig. 2). Ambas as áreas apresentam um clima do tipo As', tropical quente e úmido, com elevada precipitação pluviométrica anual com maiores concentrações entre os meses de março e julho, caracterizando o período chuvoso e os meses de agosto a fevereiro caracterizam o período seco (APAC - <http://www.apac.pe.gov.br>).

O município de Rio Formoso está localizado a 92 km de Recife. Parte de seu território está incluída em uma Área de Proteção Ambiental – APA através do Decreto Estadual nº 19.635, de 13 de março de 1997, APA de Guadalupe. Hidrograficamente este município está inserido nas bacias dos rios Formoso, dos Passos, Lemenho e Porto das Pedras, a noroeste, e pelo rio Ariquindá, ao sul (FIDEM, 1987). Neste complexo fluvial, destaca-se o estuário do rio Formoso, situado entre as coordenadas geográficas 8°39' - 8°42'S e 35°10' - 35°05'W, com uma área aproximada de 2.724 hectares com uma extensão de 12 km e, ao longo do seu

percurso recebe despejos domésticos e resíduos advindos da agroindústria açucareira (SILVA, et al., 2009). A área estuarina é de planície alagada, margeada em toda sua extensão por mangues das espécies *Rhizophora mangle* Linnaeus (mangue vermelho), *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn (mangue branco), *Avicenia schaueriana* Stapf. e Leechman (mangue preto) e *Canocarpus erectus* Linnaeus (mangue botão) (SILVA, 2003). Existe o predomínio de sedimentos lamosos de coloração escura ricos em matéria orgânica, os quais parecem constituir a fonte mais importante de material em suspensão no estuário (LIRA et al., 1979).

**Figura 1.** Ambientes coteiros amostrados e suas respectivas estações de coleta: Estuário do rio Formoso (E1, E2 e E3) e baía de Tamandaré (B1, B2 e B3) durante o período de junho de 2013 à maio de 2015 no Litoral Sul do Estado de Pernambuco (Brasil). Fonte: Nathália L. Silva. A) Vista parcial do Estuário do rio Formoso. Fonte: Nathália L. Silva. B) Vista parcial da baía de Tamandaré. Fonte: Google imagens.



A baía de Tamandaré localiza-se na cidade de Tamandaré, cerca de 110 km ao sul da cidade de Recife. O litoral do município está localizado entre as latitudes 8°42,602' S e 8°46,671' S e tem sua área costeira dividida em três praias: Carneiros ao norte, Campas ao centro e ao sul, a propriamente dita, baía de Tamandaré (MAIDA & FERREIRA, 1995; CAMARGO et al., 2007). A baía de Tamandaré trata-se de uma enseada aberta e com cerca

de 3 Km<sup>2</sup> de superfície, com formato semicircular com concavidade voltada para o leste (MOURA, 1991; MOURA & PASSAVANTE, 1993), destacando-se por possuir uma linha de recifes, separando-o do mar-aberto e constituindo um “quebra-mar” natural (REBOUÇAS, 1966). Seu sedimento é classificado como carbonático com predomínio de macroalgas, com altas taxas de sedimentação e baixa hidrodinâmica, em decorrência de barreiras de arenito paralelas à costa que criam um aprisionamento das águas (REBOUÇAS, 1966; CAMARGO et al, 2007).

## **4.2 Atividades de campo**

O material coletado foi obtido através de arrastos horizontais subsuperficiais, em intervalos bimestrais com duração de 5 minutos em cada coleta, em três estações de coleta no estuário do rio Formoso e três estações na baía de Tamandaré (Fig. 3) com uma embarcação com velocidade de 2 a 3 nós.

As amostras foram obtidas através de duas redes de plâncton com aberturas de malhas de 200 µm e 300 µm (com diâmetro de boca de 30 cm e 60 cm, respectivamente). Na boca das redes foi acoplado um fluxômetro para os cálculos de volume de água filtrada. Em seguida, as amostras coletadas foram fixadas em formaldeído (4% de concentração final) tamponada com tetraborato de sódio (5 g\*L<sup>-1</sup>) conforme as recomendações descritas em Omori & Ikeda (1984) e Harris (2000) para a obtenção do peso úmido e posterior digitalização e análise de imagens.

Durante a coleta dos dados bióticos, também foram registradas a temperatura da água em graus Celsius (°C), salinidade em UPS (Unidade Padrão de Salinidade), e profundidade local através de um mini-CTD (marca CastAway - YSI) e a transparência da água (m) através do disco de Secchi.



## **4.3 Atividades laboratoriais**

### **4.3.1 Biomassa sestônica úmida**

No laboratório de zooplâncton, localizado no Museu de Oceanografia da UFPE, foram analisadas um total de 155 amostras. Estas foram filtradas usando filtros de nylon com abertura de malha de 120  $\mu\text{m}$ , removida a água intersticial com o auxílio de papel toalha e pesadas em uma balança analítica de precisão (0,001 g) para a obtenção do peso úmido de cada amostra, de acordo com as técnicas descritas em e Newell & Newell (1963) e Omori & Ikeda (1984). Os macrodetritos, caracterizados assim por fragmentos de macroalgas, fanerógamas, manguezais e plásticos cujo tamanho foi igual ou maior que 1 cm foram retirados das amostras e pesados separadamente.

### **4.3.2 Procedimentos com o ZooScan**

O equipamento ZooScan foi utilizado para quantificar a densidade e o volume dos organismos e das partículas das amostras do plâncton, além de possibilitar a identificação automatizada. Para gerar imagens no ZooScan, cada amostra foi colocada em um béquer adicionando-se água doce filtrada para diluição. Em seguida, cada amostra foi cuidadosamente homogeneizada com uma concha sueca e retirada uma subamostragem de 10 ml para que fosse possível a obtenção de um número amostral representativo. Ao final, o número de objetos contidos por amostra variou entre 400 e 4.000 partículas escaneadas.

As amostras de zooplâncton foram digitalizadas (GROSJEAN et al., 2004). As imagens foram geradas em tons de cinza a uma resolução de 2.400 dpi. Posteriormente, as imagens geradas foram analisadas com o software ZooProcess (versão 7.19) (<http://www.obs-uvfr.fr/LOV/ZooPart/ZooScan>). Este software isola as imagens, conhecidas como vinhetas. Para cada vinheta, inúmeros parâmetros relativos ao tamanho, nível de cinza e forma foram armazenados em um arquivo de extensão (\* .pid), que foi posteriormente carregado no software Plankton Identifier (versão 1.3.4) (GORSJEAN et al., 2004; GORSKY et al. 2010). As vinhetas então foram classificadas manualmente usando o modelo Cross-validation 6 (Random Forest) e armazenadas gerando um banco de dados a fim de obter um conjunto de treinamento (training sets) para uma posterior identificação automatizada dos organismos e das partículas em suspensão que compuseram as amostras de plâncton. Para corrigir possíveis

erros da classificação semi-automática entre as categorias de organismos e partículas, todas as vinhetas foram identificadas manualmente (validação).

As vinhetas dos organismos e das partículas que compuseram o conjunto de treinamento dos dados do ZooScan foram distribuídos em 41 diferentes categorias, sendo que 26 para os organismos (**ANEXO I**), 12 para as partículas (**ANEXO II**) e 3 para os artefatos de escaneio (**ANEXO III**).

Após validação da base de treinamento, observou-se que as amostras eram compostas por organismos do holoplâncton e do meroplâncton, representados pelos seguintes grupos taxonômicos: Copepoda, Appendicularia, Decapoda, Chaetognatha, Gastropoda, Cnidaria, Polychaeta, Euphausiacea, Cirripedia, Teleostei (ovos e larvas), Bryozoa e Bivalvia. Além dos grupos zooplancônicos, foram identificadas partículas de fibras, detritos e fragmentos de macroalgas. As fibras foram subdivididas em dois tipos: as semelhantes a fios e as de origem vegetal. Os detritos foram classificados em 5 categorias distintas estabelecidas com base na tonalidade de cinza e na forma: 1) Múltiplos (partículas e / ou organismos aglomerados formando uma única estrutura); 2) Detritos vegetais escuros (fragmentos de folhas de manguezal); 3) Detritos vegetais cilíndricos (partículas vegetais com formato cilíndrico, por exemplo raízes); 4) Detritos transparentes (partículas de diferentes formatos e com coloração atingindo o cinza claro, provavelmente oriundas de organismos gelatinosos) e 5) Detritos opacos (partículas com formas semelhantes às encontradas na categoria dos detritos transparentes, porém com coloração cinza médio). As categorias de detritos escuros, transparentes e opacos foram subdivididas de acordo com a sua forma, esférica (ou roliças) e achatadas (ou planas).

Também houve a detecção da categoria “fora de foco”, correspondente as imagens embaçadas, fora da zona de nitidez. Também foram detectados diversas partículas de escaneio, como bolhas de ar (“Bolhas”) e manchas opacas no vidro semelhante à digitais (“Artefatos”). No entanto, estas três categorias (“Fora de Foco”, “Bolhas” e “Artefatos”), assim como a categoria “Múltiplos”, foram, posteriormente, excluídas das análises.

## 5. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A utilização da tecnologia nos estudos oceanográficos está ganhando cada vez mais destaque. Estudos realizados com o plâncton muitas vezes envolvem atividades árduas que demandam muitos tempo, comprometendo assim, a análise dos resultados. O equipamento ZooScan, juntamente com os seus softwares integrados, passam a ser um exemplos de ferramentas úteis que fornecem estimativas relativamente rápidas e confiáveis para várias medidas morfométricas, reduzindo, assim, o tempo de análise dos dados, representando assim, uma ótima alternativa para o monitoramento dos ecossistemas planctônicos.

Esta dissertação está formatada como manuscrito para publicação e apresenta a relação existente entre as contribuições dos organismos e das partículas em suspensão encontradas no plâncton, diferenciados através da análise de imagem, para a biomassa sestônica úmida, em dois ambientes costeiros tropicais.

Em anexo, são apresentados detalhes sobre as imagem das categorias de organismos, das partículas e dos artefatos de escaneio que compuseram o conjunto de aprendizagem do ZooScan. E em apêndice, fornece um manual de técnicas práticas de procedimentos com o equipamento ZooScan.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, M., SAIZ, E., CALBET, A., TREPAT, I., & BROGLIO, E. (2003). Estimating zooplankton biomass through image analysis. **Marine Biology**, 143(2), 307-315.
- ARAÚJO, H. M. P., NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., NEUMANN-LEITÃO, S., SCHWAMBORN, R., LUCAS, A. P. O., & ALVES, J. P. H. (2008). Zooplankton community dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 68(4), 751-762.
- BERNARDI, R. D. (1984). **Methods for the estimation of zooplankton abundance. A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters**, 2nd ed. IBP Handbook, 17, 59-86.
- BOLTOVSKOY, D. **South Atlantic Zooplankton**. Leiden: Backhuys Publishers. 1706. p., 1999.
- CAMARGO, J. M. R., ARAÚJO, T. C. M., MAIDA, M. & USHIZIMA, T. M., (2007). Morfologia da plataforma continental interna adjacente ao município de Tamandaré, Sul de Pernambuco- Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica** vol.25, pp. 79-89.
- CHECKLEY, D. M., DAVIS, R. E., HERMAN, A. W., JACKSON, G. A., BEANLANDS, B., & REGIER, L. A. (2008). Assessing plankton and other particles in situ with the SOLOPC. **Limnology and Oceanography**, 53(5), 2123.
- CRIPPS, G., FLYNN, K. J., & LINDEQUE, P. K. (2016). Ocean Acidification Affects the Phyto-Zoo Plankton Trophic Transfer Efficiency. **PloS one**, 11(4), e0151739.
- DAVIS, C. S., GALLAGER, S. M., BERMAN, M. S., HAURY, L. R., & STRICKLER, J. R. (1992). The video plankton recorder (VPR): design and initial results. **Arch. Hydrobiol. Beih**, 36, 67-81.
- ELLIOTT, D. T., & KAUFMANN, R. S. (2007). Spatial and temporal variability of mesozooplankton and tintinnid ciliates in a seasonally hypersaline estuary. **Estuaries and coasts**, 30(3), 418-430.
- FERREIRA, B. P.; MAIDA, M. & SOUZA, A. L. T. (1995). Levantamento inicial das comunidades de peixes recifais da região de Tamandaré - PE. **Boletim Técnico Científico CEPENE**, Tamandaré, v. 3, n. 1, p. 211-230.
- FIDEM (1987). **Proteção de áreas estuarinas**. Séries Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente, 40 pp. Recife.
- FOREST, A., STEMMANN, L., PICHERAL, M., BURDORF, L., ROBERT, D., FORTIER, L., & BABIN, M. (2012). Size distribution of particles and zooplankton across the shelf-basin system in southeast Beaufort Sea: combined results from an Underwater Vision Profiler and vertical net tows. **Biogeosciences**, 9(4), 1301-1320.
- GORSKY, G., PICHERAL, M., & STEMMANN, L. (2000). Use of the Underwater Video Profiler for the study of aggregate dynamics in the North Mediterranean. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 50(1), 121-128.

- GORSKY, G., OHMAN, M. D., PICHERAL, M., GASPARINI, S., STEMMANN, L., ROMAGNAN, J. B. & PREJGER, F. (2010). Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. **Journal of Plankton Research**, 32(3), 285-303.
- GROSJEAN, P., PICHERAL, M., WAREMBOURG, C., & GORSKY, G. (2004). Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. **ICES Journal of Marine Science**, 61(4), 518-525.
- GROSS, M. G & GROSS, E. (1996). **Oceanography a view of earth**. Printice hall, New Jersey, 472 pp.
- HARRIS, R., WIEBE, P., LENZ, J., SKJOLDAL, H. R., & HUNTLEY, M. (Eds.). (2000). **ICES zooplankton methodology manual**. Academic Press.
- HERMAN, A. W., BEANLANDS, B., & PHILLIPS, E. F. (2004). The next generation of optical plankton counter: the laser-OPC. **Journal of Plankton Research**, 26(10), 1135-1145.
- JACOBS, F., & GRANT, G. C. (1978). **Guidelines for zooplankton sampling in quantitative baseline and monitoring programs** (No. 83). for sale by the National Information Service.
- LEHETTE, P., & HERNÁNDEZ-LEÓN, S. (2009). Zooplankton biomass estimation from digitized images: a comparison between subtropical and Antarctic organisms. **Limnology Oceanography: Methods**, 7, 304–308
- LIRA, L.; ZAPATA, M. C. & FONSECA, V. G.. Aspectos da dinâmica do estuário do Rio Formoso, Pernambuco. **Caderno Ômega**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, v. 3, n. 1/2, p. 133-156, 1979.
- LOPES, R. M., DO VALE, R., & BRANDINI, F. P. (1998). Composição, abundância e distribuição espacial do zooplâncton no complexo estuarino de Paranaguá durante o inverno de 1993 e o verão de 1994. **Revista Brasileira de Oceanografia**, 46(2), 195-211.
- MARCOLIN, C. R., SCHULTES, S., JACKSON, G. A., & LOPES, R. M. (2013). Plankton and seston size spectra estimated by the LOPC and ZooScan in the Abrolhos Bank ecosystem (SE Atlantic). **Continental Shelf Research**, 70, 74-87.
- MCCAULEY, E. (1984). The estimation of the abundance and biomass of zooplankton in samples. **A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters**, 228-265.
- MELO JÚNIOR, M. D., PARANAGUÁ, M. N., SCHWAMBORN, R., LEITÃO, S. N., & EKAU, W. (2007). Fluxes of zooplankton biomass between a tidal estuary and the sea in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55(4), 239-249.
- MOURA, R. T. (1991). Biomassa, produção primária do fitoplâncton e alguns fatores ambientais da Baía de Tamandaré, Rio Formoso, Pernambuco, Brasil. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. **Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica)** Departamento de Oceanografia. Universidade Federal de Pernambuco. 290f.
- MOURA, R. T. & PASSAVANTE, J. Z. O. (1993). Taxa de Assimilação do Fitoplâncton da baía de Tamandaré – Rio Formoso – PE. Brasil. - **Boletim Técnico Científico CEPENE**, Rio Formoso, 1 (11): 7-23.

- NAKAJIMA, R., YOSHIDA, T., OTHMAN, B. H. R., & TODA, T. (2010). High detritus/phytoplankton content in net-plankton samples from coral reef water: source of over-estimation in zooplankton biomass by measuring seston weight. **Plankton and Benthos Research**, 5(2), 69-73.
- NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., VIEIRA, H. L. F., & LIMA, T. V. C. (1985). Zooplâncton da região costeira do Estado de Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos** Universidade Federal de Pernambuco, 55-72.
- NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., FIGUEIREDO, F., PORTO NETO, F. (2010) Mesozooplâncton de área recifal do Atlântico Sudoeste tropical. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 38, n. 1, p. 47-59.
- NEUMANN-LEITÃO, S., SOUZA, M. R. M., PORTO NETO, F., MOURA, M. C. O., SILVA, A. P., & GUSMÃO, L. M. O. (1999). Zooplâncton do estuário do rio São Francisco, Nordeste do Brasil. **Trabalhos Oceanográficos** da Universidade Federal de Pernambuco.
- NEWELL, G.; NEWELL, R. (1963). **Marine plankton a practical guide**. London: H. Educat., 221 p.
- OMORI, M. & IKEDA, T. (1984). **Methods in marine zooplankton ecology**. John Willey; Sons, New York, p. 332.
- PARK, G. S., & MARSHALL, H. G. (2000). Estuarine relationships between zooplankton community structure and trophic gradients. **Journal of Plankton Research**, 22(1), 121-136.
- PARSONS, T. R., MAITA, Y., & LAI, C. I. I. (1984). **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Pergamon Press, Oxford, UK, 1, 73.
- PINTO-COELHO, R. M., & BEZERRA-NETO, J. F. (2005). Effects of eutrophication on size and biomass of crustacean zooplankton in a tropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, 65(2), 325-338.
- REBOUÇAS, A. C. (1966). Sedimentos da baía de Tamandaré, Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos** da Universidade Federal de Pernambuco, 7(9): 187-206.
- SANTOS, T. G., GUSMÃO, L. M. O., NEUMANN-LEITÃO, S., & CUNHA, A. G. (2009). Zooplâncton como indicador biológico da qualidade ambiental nos estuários dos rios Carrapicho e Botafogo, Itamaracá-PE. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, 4, 1.
- SCHUMANN, R., & RENTSCH, D. (1998). Staining particulate organic matter with DTAF-a fluorescence dye for carbohydrates and protein: a new approach and application of a 2D image analysis system. **Marine Ecology Progress Series**.
- SCHWAMBORN, R., EKAU, W., PINTO, A. S., SILVA, T. A., & SAINT-PAUL, U. (1999). The contribution of estuarine decapod larvae to marine macrozooplankton communities in northeast Brazil. **Archive of fishery and marine research**, 47182. 167.
- SCHWAMBORN, R., MELO JÚNIOR, M., NEUMANN-LEITÃO, S. & PARANAGUÁ, W. E. M. N. (2008). Dynamic patterns of zooplankton transport and migration in Catuama Inlet (Pernambuco, Brazil), with emphasis on the decapod crustacean larvae. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 36, 1.

SILVA, M. H. D., SILVA-CUNHA, M. D. G. G., PASSAVANTE, J. Z. D. O., GREGO, C. K. D. S., & MUNIZ, K. (2009). Estrutura sazonal e espacial do microfitoplâncton no estuário tropical do rio Formoso, PE, Brasil. **Acta botanica**, 23(2), 355-368.

SILVA, T. A. (2003). Zooplâncton demersal na Área de Proteção Ambiental de Tamandaré (APA dos corais) Pernambuco (Brasil). 89 folhas. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Pernambuco. CTG.Oceanografia.

VANDROMME, P., STEMMANN, L., GARCÍA-COMAS, C., BERLINE, L., SUN, X., & GORSKY, G. (2012). Assessing biases in computing size spectra of automatically classified zooplankton from imaging systems: a case study with the ZooScan integrated system. **Methods in Oceanography**, 1, 3-21.

VEGA-PÉREZ, L. A. (1993). Estudo do zooplâncton da região de Ubatuba, Estado de São Paulo. **Publicação Especial do Instituto Oceanográfico**, 10, 65-84.

## Capítulo 1

### Using image analysis to distinguish the contributions of zooplankton and particles to the seston biomass in two tropical coastal environments

#### Introduction

Suspended particulate matter (seston) in aquatic ecosystems can be divided into two basic groups: organisms (plankton) and particles. Knowledge on the contribution of particles to the seston is essential in understanding the dynamics of trophic energy flows in marine ecosystems (BLANCHOT et al., 1989; ODUM, 2004; LI et al., 2012; GLADSTONE-GALLAGHE et al., 2016). Until recently, it was impossible to distinguish between the biomass fractions of zooplankton and particles in standard formaline-preserved plankton samples. Recent studies conducted with optical *in situ* equipment measured particles (SCHULTES & LOPES 2009; OHMAN et al., 2012; MARCOLIN et al., 2013) or used stable isotope tracers (SCHWAMBORN et al., 2002), but none have been able to distinguish between particle and zooplankton density and determine their relative biomass in samples obtained with standard plankton nets. Image analysis equipment *in situ* they are often not able to distinguish the zooplankton of suspended particles and therefore its application in water with high particle loads is not recommended (SCHULTES & LOPES 2009). Equipment used in laboratory benchtop, like the ZooScan with plankton samples preserved allow better resolution of images enabling to accurately distinguish the zooplankton of the detritus particles in suspension.

Biogenic detritus particles are important structures in the pelagic zone of the aquatic ecosystems because they can be relevant food sources for zooplankton organisms (SCHUMANN & RENTSCH 1998; SCHWAMBORN et al., 2002; SCHWAMBORN et al., 2006; OHMAN et al., 2012). Since the particles of anthropogenic debris, such as plastic, paper, glass, wood, among others, arrive to the marine and coastal environments from various sources, and are some of the major marine pollutants (COE & ROGERS, 2000). Particles serve as important physical substrate for several taxa, from bacteria to complex metazoans, such as microbryozoans (PALUMBO et al., 1984) or many zooplanktonic organisms.

A large amount of studies have been conducted on mesozooplankton (>200 micrometers) community structure in tropical coastal environments, especially in estuaries areas (NASCIMENTO-VIEIRA et al., 1985, VEGA-PÉREZ 1993, PARK & MARSHALL



2000, ELLIOTI & KAUFMANN 2007, ARAUJO et al., 2008, SCHWAMBORN et al., 2008). However, these studies addressed only the total wet biomass and the structure of the zooplankton community based on the composition and diversity, without considering the contribution of particles to seston biomass. In Brazil, one of the few studies that addressed the contribution of suspended mesoparticles in the water column made use of an in situ LOPC equipment at the Abrolhos Bank and adjacent areas, however without being able to distinguish biomass contributions of particles and plankton (MARCOLIN et al., 2013).

The presence of non-organism mesoparticles (>200 micrometers) in plankton samples has widely been ignored. One of the few studies on this subject assessed the contribution of mesoparticles to the seston in a Malaysian coastal area, assessed by the difference between total seston biomass and zooplankton biomass, without actually counting and measuring any particles (NAKAJIMA et al., 2010).

Biomass measurements are necessary steps to quantify the transfer of organic matter and energy flows through planktonic food webs (ALCARAZ et al., 2003; LEHETTE & HERNANDEZ-LEON 2009; CRIPPS et al., 2016). There are countless methods for the quantification of biomass, but they are not yet well standardized (see JACOBS & GRANT, 1978, HARRIS et al, 2000; ALCARAZ et al., 2003, PINTO-COELHO, 2004). Direct measurement of biomass is often represented by a measure of volume or weight of the samples (OMORI & IKEDA, 1984; ALCARAZ et al., 2003; PINTO-COELHO, 2004; MELO JÚNIOR et al., 2007). Although these are quick, easy and practical ways to estimate the biomass, these simple, direct methods are hampered by being unable to separate and classify the different components of the seston and plankton (ALCARAZ et al., 2003).

Alternative methods to study plankton include image analysis systems (DAVIS et al., 1992; SCHUMANN & RENTSCH 1998; GROSJEAN et al., 2004; GORSKY et al., 2010). These methods are promising for allowing a fast, semi-automatic application in different ecosystems (GORSKY et al., 2010). One of the most commonly used image acquisition equipments is the ZooScan (GORSKY et al., 2010), which, integrated with the ZooProcess and Plankton Identifier softwares, allows the generation, analysis and classification of digital images from formaline preserved plankton samples. This semi-automatic approach does facilitate and assist in the identification and counting, and allows the fast calculation of size, area and volume for a variety of taxa and ecosystems (GROSJEAN et al., 2004, GORSKY et al., 2010, VANDROMME et al., 2012).

Here we present the relative abundance and volume of particles through a combination of direct and indirect methods (wet weight and image analysis, respectively). It aims to investigate the existence of possible relationships between mesozooplankton and mesoparticles, and to test the hypothesis, that mesoparticles may constitute a relevant component of the seston biomass in tropical costal ecosystems.

## Methods

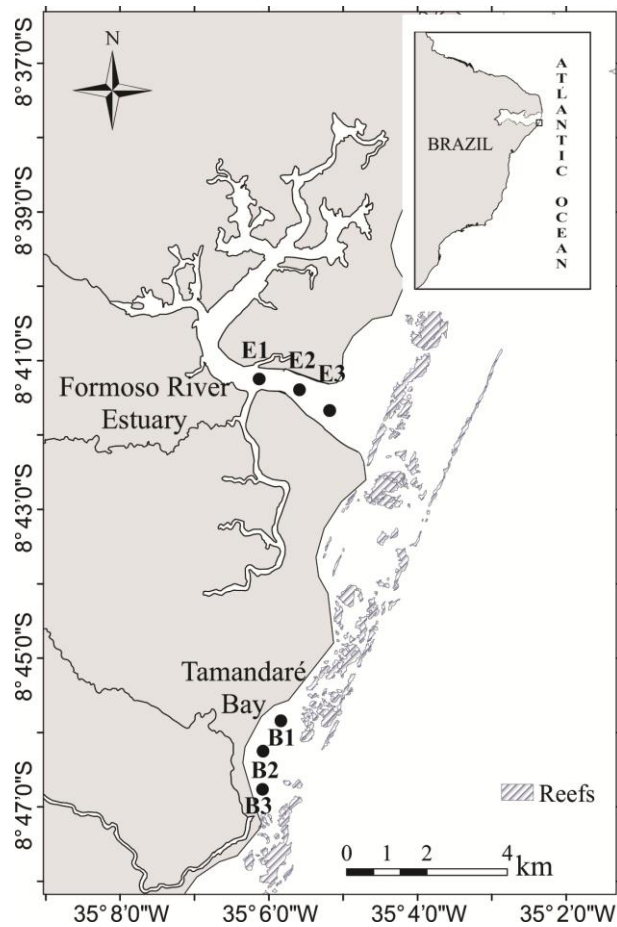
### Study area

Sampling was performed in two coastal environments in northeastern Brazil (Fig. 1). The Rio Formoso estuary is located between 8° 39' - 8° 42' S and 35 ° 10' - 35 ° 05' W. This is the second largest estuarine system in Pernambuco State, formed by two rivers (Rio Formoso and Rio Ariquindá). Local depth in the three sampling stations, placed at the estuarine inlet (Fig. 1), varied from 2.9 m to 11.6 m, depending on the tides (average depth: 6.3 m). It presents extensive riverine mangrove forests, that line the estuarine margins (SILVA, 2003). Four mangrove tree species occur in this ecosystem (*Rhizophora mangle* Linnaeus, *Laguncularia racemosa* Gaertn., *Avicennia shaueriana* Staf. e Leechman e *Conocarpus erectus* Linnaeus.), forming a complex ecosystem. There is a predominance of muddy sediments, rich in organic matter, which seem to be the most important source of suspended matter in the estuary (LIRA et al., 1979). Artisanal fisheries, tourism and the collection of crabs and mollusks are the main human activities in the estuary (SILVA, 2003; SILVA et al., 2009).

Tamandaré Bay (8° 44' - 8° 47' S and 30° 0.5' - 35.07' W) is a shallow coastal embayment that is protected by several parallel sandstone barriers (REBOUÇAS, 1966). The bottom of the bay is covered with coarse sand, and surrounded by a mosaic of complex reef ecosystems (REBOUÇAS, 1966; CAMARGO et al, 2007). At the three sampling stations (Fig.1), local depth varied from 2.7 m to 8.7 m, depending on the tides (average depth: 6.3 m). Two small creeks discharge into the bay. Tourism and artisanal fisheries are the main human activities in this region (MOURA & PASSAVANTE, 1993; ARAÚJO & COSTA, 2004.).

This coastal region is characterized by a high and irregular annual rainfall (Average: 2,788.4 mm) with higher values usually in the rainy season, from March to July (<http://www.tamandare.pe.gov.br>; APAC - <http://www.apac.pe.gov.br>). Both study areas are part of a large Marine Protected Area (FERREIRA & MAIDA, 2006).

**Figure 1.** Map of the sampling stations at the coast of Pernambuco State, Brazil. Three stations were sampled at Rio Formoso estuary (E1, E2, and E3) and three in Tamandaré Bay (B1, B2, and B3). Fonte: Nathália L. Silva.



### ***Plankton sampling***

A total of 155 plankton samples were collected. Sampling was performed at six stations: three stations in the Rio Formoso estuary and three stations in Tamandaré Bay (Fig. 1). Samples were collected bimonthly during two years, between June 2013 and May 2015, always during the day, during ebb tides (Formoso River) and flood tides (Tamandaré Bay) and always within two days after new moon (i.e., always during spring tide).

Tows were performed using two conical- cylindrical plankton nets with 200- $\mu$ m-mesh (diameter: 30 cm) and 300- $\mu$ m-mesh (diameter: 60 cm), this nets are meshes this minimum limits for the resolution of ZooScan equipment, through simultaneous subsurface horizontal tows lasting five minutes at a speed of 2 to 3 knots. A flowmeter (Hydro-Bios, Kiel) was coupled to the mouth of the nets to estimate the filtered volume. Samples were immediately fixed in formaldehyde (4% final concentration), according to Omori & Ikeda (1984), buffered

with sodium tetraborate ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Transparency was estimated using a Secchi disk (CIALDI & SECCHI, 1865). *In situ* measurements of salinity and temperature were obtained using a CastAway (YSI) CTD.

### ***Wet seston biomass***

In the laboratory, samples were filtered using acrylic sieve with a mesh of  $120 \mu\text{m}$  and washed with fresh water to remove the formaldehyde. Then, interstitial water was gently removed with paper towels placed under the sieves. This procedure took 1 to 15 minutes, to stop wetting the paper, depending on the amount of suspended material in each sample. Finally, each sample was weighted on a precision balance ( $\pm 0.001 \text{ g}$ ) to obtain the wet weight (OMORI & IKEDA, 1984; JACOBI & GRANT, 1978; HARRIS, 2000). Macrodetritus such as mangrove leaf fragments, macroalgae and plastics larger than  $1 \text{ cm}$  were removed from the samples before weighing and weighed separately. Seston biomass was obtained using the formula:  $B = WW * V^{-1}$ , Where B: total wet seston biomass ( $\text{mg m}^{-3}$ ), WW = wet weight (mg); V: filtered volume ( $\text{m}^3$ ).

### ***Image acquisition and analysis***

Plankton samples were digitalized using a ZooScan (Hydroptic model ZSCAN03) with a 2400 dpi resolution, following the protocol established by Grosjean et al. (2004; <http://www.zooscan.obs-vlfr.fr/>). Each sample was diluted in fresh water in a beaker for a given volume, according to the concentration of organisms to get a representative sample number. Then, a fraction of 10 ml of each plankton sample was obtained. The number of objects contained in each scanned fraction ranged from 400 to 4,000 objects with average of 2,500 scanned objects per sample.

Images were processed using the ZooProcess software (Version 7.19). The smallest particle size recognition was set to  $300 \mu\text{m}$  equivalent spherical diameter (ESD). The ZooProcess software isolates images, known as vignettes. For each vignette, various parameters for particle size, gray level, and shape are stored in a \*.pid file, which were loaded into Plankton Identifier (GORSKY et al. 2010). In Plankton Identifier (version 1.3.4), we built a training set to provide an algorithm for the automatic classification of vignettes into taxonomic categories. The Random Forest algorithm was chosen following Grosjean et al. (2004). All vignettes were manually validated to correct for misclassification errors. Size

parameters were converted from pixels to micrometers, according to the scanner resolution (1 pixel: 10.58  $\mu\text{m}$ ).

### ***Zooplankton and particle volumes***

To determine the volume ( $\text{mm}^3$ ) of all zooplankton and all particles of spherical or ellipsoid shape, we calculated the ellipsoid volume for each vignette, based on the lengths of the major and minor axes of the equivalent ellipse (i.e., an ellipse with the same area and similar height/width ratio as the original vignette). Ellipsoid volume was calculated as:  $V = \frac{4}{3}\pi * a^2 * b$ , where  $a$  = minor axis and  $b$  = major axis (VANDROMME et al. 2012; STEMMANN & BOSS 2015).

The volume ( $\text{mm}^3$ ) of flat particles was calculated based on the surface area ( $\text{mm}^2$ ) and the thickness of each particle (GROSJEAN et al. 2004). Thickness was measured under a stereomicroscope (Zeiss, Stemi SV6 model). We used 30 plankton samples, randomly distributed, to take 50 particles for each of three different flat particle categories (opaque, dark, and transparent flat particles), classified according to their shape and grey level. For opaque and dark particles, average thickness was 781  $\mu\text{m}$ , whereas for transparent flat particles, average thickness was 319.2  $\mu\text{m}$ . Then, the volume of flat particles was calculated by multiplying the area (“area\_exc” in ZooProcess) of each particle with the average thickness.

### ***Statistical analyses***

All data sets were tested for normality and homoscedasticity using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. Before the tests,  $\log x+1$  - transformation was applied to improve normality and homocedasticity. Differences between seasons (dry vs rainy), mesh sizes (200 vs 300) and sampling areas (Rio Formoso Estuary vs Tamandaré Bay) were tested using non-parametric Mann-Whitney tests. Kruskal-Wallis ANOVA was used to test for differences between sampling stations.

Linear regression was used to investigate the relationships between pairs of variables (e.g. zooplankton and particle volumes). In the linear regression between total volume and wet biomass sestonic the outliers were removed by residual analysis, with a threshold of  $\pm 2$  standard deviations. All analyses were conducted  $p < 0.05$  (ZAR, 1996).

## Results

### *Environmental variables*

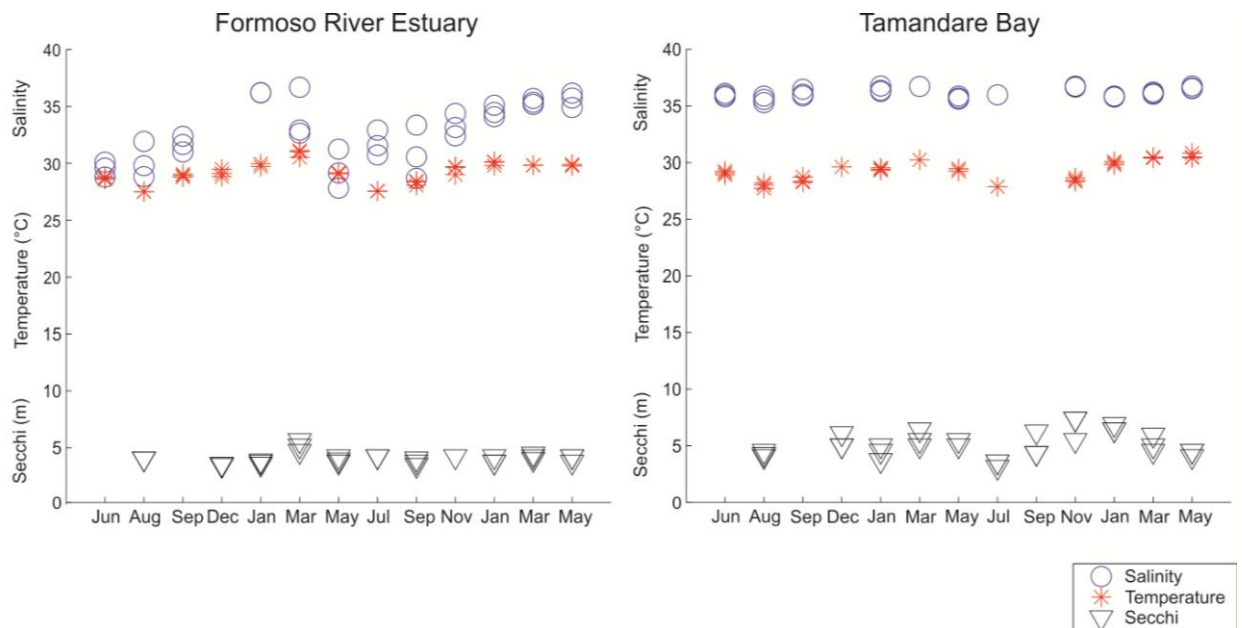
Both areas (Rio Formoso Estuary and Tamandaré Bay) showed characteristic hydrographic conditions, with lower salinity and lower transparency of water in the estuary (Fig. 2). Euhaline conditions were always predominant in the bay while mesohaline to euhaline conditions were observed in the estuary.

Temperature and salinity showed clear seasonal patterns in both areas (Rio Formoso estuary and Tamandaré Bay), with a gradual increase in both parameters through the dry season (September to March). An abrupt drop in salinity was observed in the estuary at the onset of the rainy season in May 2014 (Fig. 2).

In the estuary, average water temperature was 28.3°C (26.7 to 30.5°C) in the rainy season, in the dry season the average was 28.5 °C (27.3 to 29.5°C). Average salinity was 31.7 in the rainy season (27 to 36.4) and 32.6 (27.9 to 35.9) in the dry season. Average water transparency was 2.1 m (1.5 to 3.5 m) in the rainy season, in the dry season the average was 1.5 m (1.2 to 2 m). As the estuary waters were always brown and very turbid, Secchi depth did not show a significant difference between both seasons and areas.

In the bay, average water temperature was 28.7°C (27 to 30.2°C) in the rainy season and average was 28.4°C (27.5 to 29.5°C) in the dry season. Average salinity was 35.7 in the rainy season (35 to 36.5) and 36.1 (35.5 to 36.5) in the dry season. ). The average water transparency was 2.7 m (1 to 4.5 m) in the rainy season, in the dry season the average was 3.6 m (1.6 to 5.5 m).

**Figure 2.** Time series of salinity, water temperature (°C) and transparency (Secchi depth, m). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Fonte: Nathália L. Silva.



### ***Seston biomass***

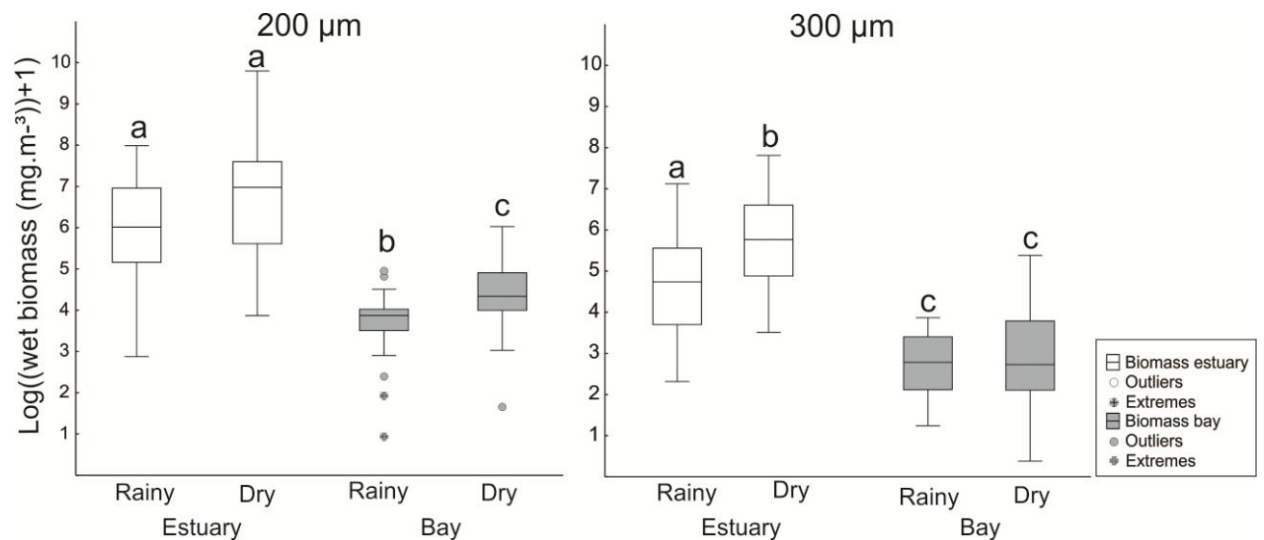
Wet seston biomass showed considerable variation throughout the study period, ranging from 0.5 to 17,949.1 mg m<sup>-3</sup> (Table 1), with significantly ( $p < 0.0001$ ) higher biomass in the estuary than in the bay. This difference was observed in both nets (200 and 300- $\mu$ m mesh size) and in both seasons (dry and rainy). Biomass was always higher in the 200- $\mu$ m net samples ( $p < 0.01$ ) and in the dry season ( $p < 0.05$ ).

The differences between seasons were not as consistent as the differences between areas. Significant differences between dry and rainy seasons were only found in two situations: in the estuary, considering the 300- $\mu$ m net ( $p = 0.008$ ) and in the bay, considering the 200- $\mu$ m net ( $p = 0.02$ ) (Table 1, Fig. 3).

**Table 1.** Wet seston biomass (mg. m<sup>-3</sup>) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200 µm and 300 µm mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.

| Place                                         | Rio Formoso estuary |          |         |         | Tamandaré Bay |       |        |       |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------|---------|---------|---------------|-------|--------|-------|
| Mesh                                          | 200 µm              |          | 300 µm  |         | 200 µm        |       | 300 µm |       |
| Period                                        | Rainy               | Dry      | Rainy   | Dry     | Rainy         | Dry   | Rainy  | Dry   |
| <b>Parameter</b>                              |                     |          |         |         |               |       |        |       |
| <i>Wet seston biomass (mg.m<sup>-3</sup>)</i> |                     |          |         |         |               |       |        |       |
| Average                                       | 715.9               | 2,952.4  | 213.6   | 585.3   | 52.7          | 106.1 | 18.3   | 35.6  |
| Minimum                                       | 16.7                | 46.8     | 9.1     | 32.4    | 1.5           | 4.3   | 2.4    | 0.5   |
| Maximum                                       | 2,941.9             | 17,949.1 | 1,239.6 | 2,469.5 | 139.0         | 413.3 | 46.2   | 216.3 |

**Figure 3.** Total seston wet biomass according to seasons (wet and dry), areas (Rio Formoso estuary [white] and Tamandaré Bay [gray]), and mesh size [200 µm and 300 µm]). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Fonte: Nathália L. Silva.



### ***Density and composition of zooplankton and particles***

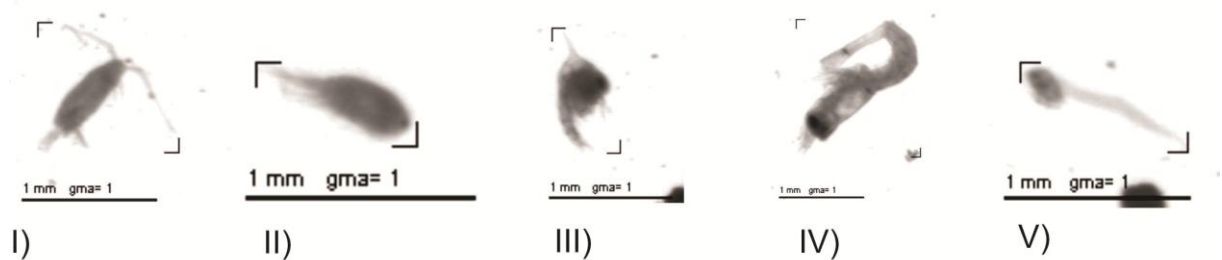
Twenty-six zooplankton taxa were identified. The most abundant were copepods (Calanoida and Cyclopoida), brachyuran zoea larvae, other decapods, and appendicularians



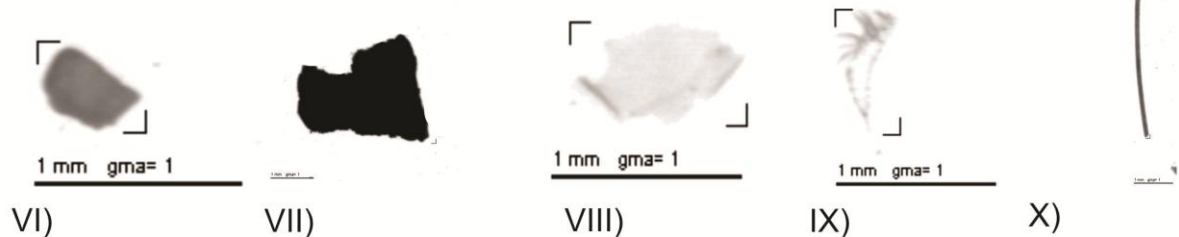
(Fig. 4a). Particles were classified into 15 categories. The most abundant were: opaque, dark, and transparent particles, zooplankton exuviae and plant fibers (Fig. 4b).

**Figure 4.** Examples of images (vignettes) obtained with the ZooScan equipment. **A)** Examples of the five most abundant zooplankton groups. I: Calanoida; II: Cyclopoida; III: Brachyuran larvae (zoea); IV: Decapoda (others); V: Appendicularia. **B)** Examples of the five most abundant categories of particles. VI: opaque particles; VII: dark particles; VIII: transparent particles; IX: zooplankton exuviae; X: plant fibers. Fonte: Nathália L. Silva.

### (A) Zooplankton

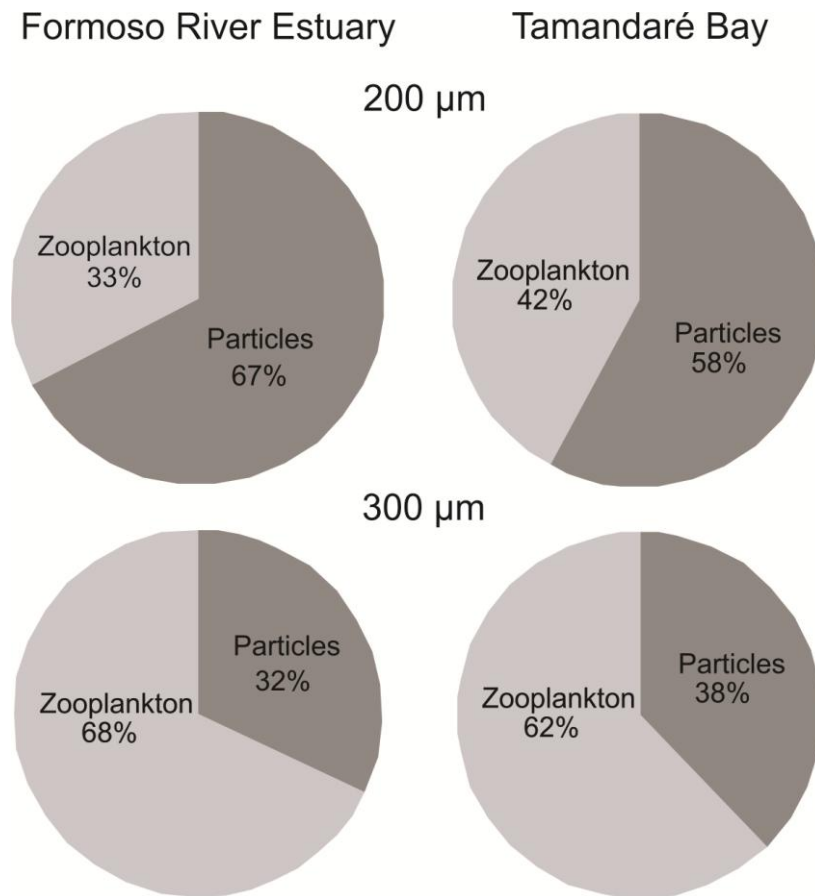


### (B) Particles



Particles were very abundant in both areas, with 13% counts (Tamandaré Bay) to 69% counts (Rio Formoso) to (overall mean: 41% counts) of the total objects detected in the ZooScan. Zooplankton was relatively more abundant in the 300- $\mu$ m net whereas particles were more abundant in the 200- $\mu$ m net in both areas (Fig. 5). However, no significant differences were evident in the relative abundance (%) ratio zooplankton / particles between areas.

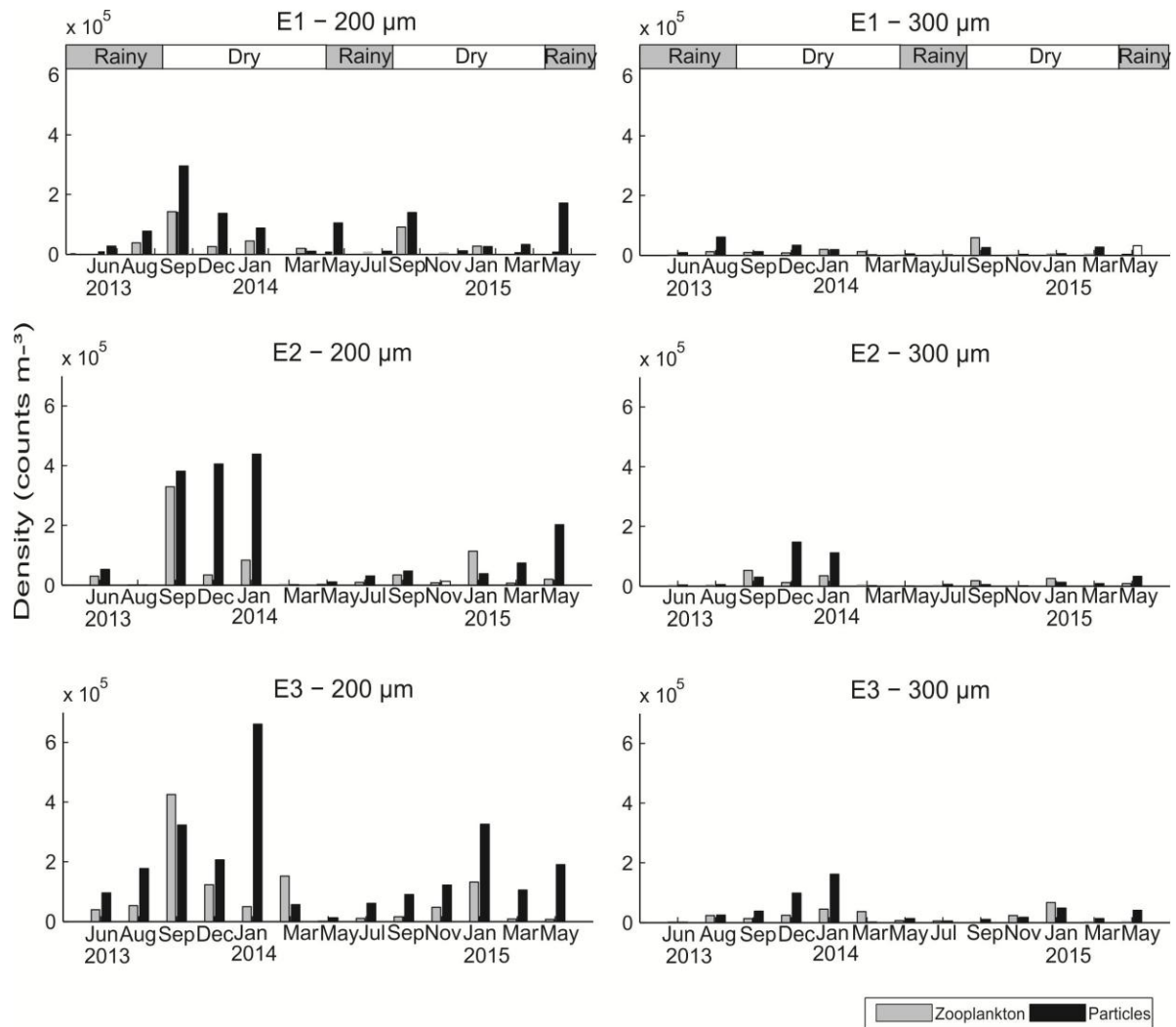
**Figure 5.** Relative contributions (% counts) of zooplankton and particles to the samples analyzed with the ZooScan equipment, according to sampling area (Rio Formoso estuary and Tamandaré Bay), and mesh size (200  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$ ). Fonte: Nathália L. Silva.



The density of zooplankton showed a high variability, ranging from 1.6 to 42,536 ind.  $\text{m}^{-3}$ . Zooplankton was generally more abundant in the 200- $\mu\text{m}$  net and in the dry season. Higher values of zooplankton density were generally observed in the estuary (Fig. 6), except for the 200- $\mu\text{m}$  samples in the rainy season, when zooplankton densities were not significantly different between areas (Table 2). The differences between seasons were not as consistent as the differences between areas. Significant differences between seasons were only found in the estuary, in both 200- $\mu\text{m}$  ( $p = 0.006$ ) and 300- $\mu\text{m}$  nets ( $p = 0.003$ ), with the highest values found during the dry season. In Tamandaré Bay (Fig. 7), there was no significant difference between seasons (Table 2).

The density of particles also showed a high variability, ranging from 4.9 to 66,052 counts  $\text{m}^{-3}$  (Table 2). Density of particles was also higher in the 200- $\mu\text{m}$  net and during dry season. The particles showed significantly higher values in term of density ( $p < 0.0001$ ) in the estuary (Fig. 7) than in the bay.

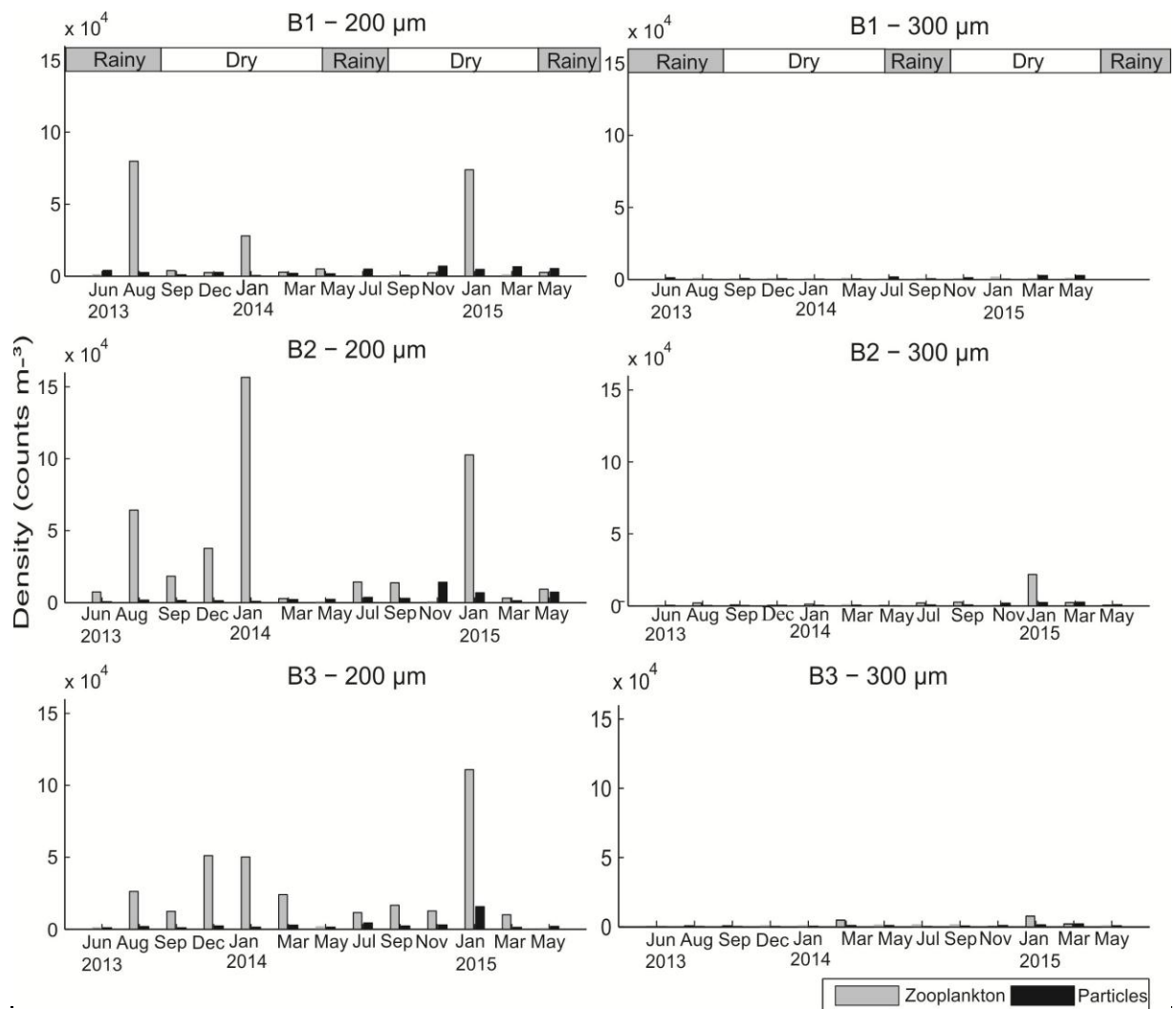
**Figure 6.** Time series of zooplankton and particle densities in the Rio Formoso estuary (Brazil), according to sampling stations (stations E1 to E3) and mesh size (200  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$ ). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.



**Table 2.** Density of zooplankton (ind.m<sup>-3</sup>) and particles (m<sup>-3</sup>) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200 µm and 300 µm mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.

| Area                                               | Formoso River |          |         |          | Tamandaré Bay |          |        |         |
|----------------------------------------------------|---------------|----------|---------|----------|---------------|----------|--------|---------|
| Mesh                                               | 200 µm        |          | 300 µm  |          | 200 µm        |          | 300 µm |         |
| Period                                             | Rainy         | Dry      | Rainy   | Dry      | Rainy         | Dry      | Rainy  | Dry     |
| <b>Parameter</b>                                   |               |          |         |          |               |          |        |         |
| <i>Zooplankton abundance (ind. m<sup>-3</sup>)</i> |               |          |         |          |               |          |        |         |
| Average                                            | 2,012.0       | 9,609.5  | 677.0   | 2,350.2  | 1,284.4       | 3,863.7  | 111.5  | 234.5   |
| Minimum                                            | 1.6           | 303.8    | 45.4    | 165.9    | 35.9          | 69.5     | 4.6    | 8.6     |
| Maximum                                            | 15,234.0      | 42,536.0 | 3,680.1 | 6,726.4  | 7,985.4       | 15,665.0 | 490.3  | 2,182.8 |
| <i>Particle abundance (counts m<sup>-3</sup>)</i>  |               |          |         |          |               |          |        |         |
| Average                                            | 7,143.0       | 20,805.0 | 1,404.5 | 4,343.9  | 290.4         | 389.3    | 97.2   | 69.0    |
| Minimum                                            | 45.8          | 948.0    | 60.9    | 83.0     | 61.6          | 52.6     | 4.9    | 17.5    |
| Maximum                                            | 20,241.0      | 66,052.0 | 6,055.6 | 16,156.0 | 722.3         | 1,572.2  | 273.7  | 232.5   |

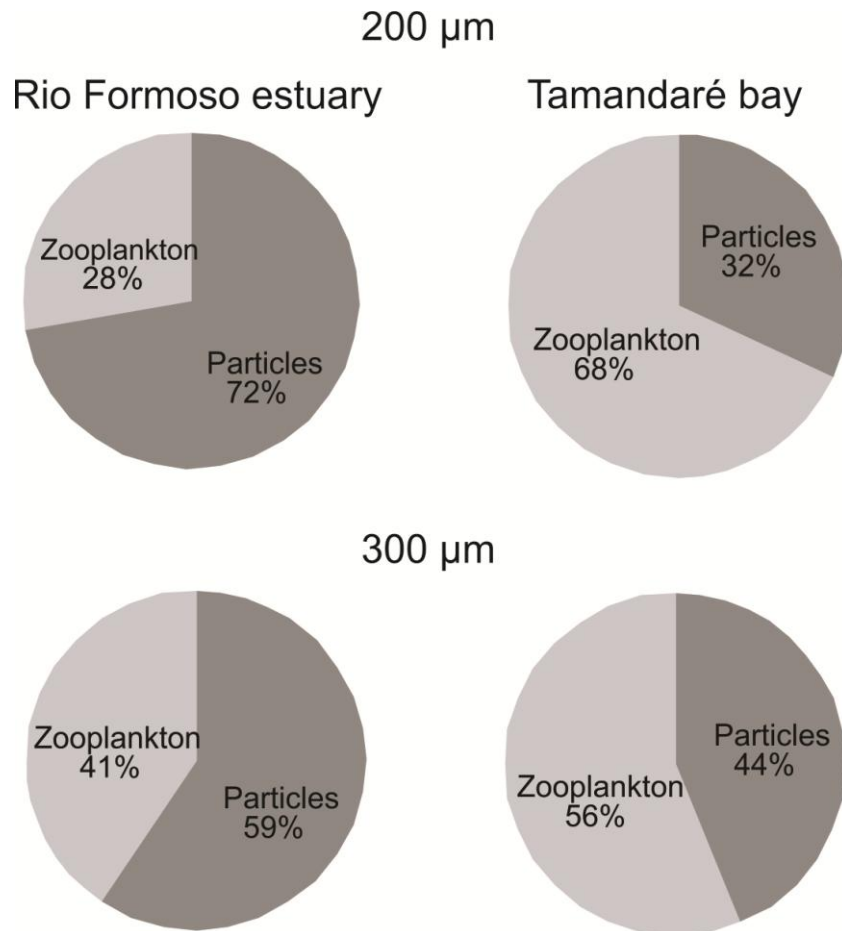
**Figure 7.** Time series of zooplankton and particle densities in Tamandaré Bay (Brazil), according to sampling stations (stations B1 to B3) and mesh size (200- $\mu\text{m}$  and 300- $\mu\text{m}$ ). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.



### ***Particle and Zooplankton Volume***

Particles also showed high values of total volume in Rio Formoso estuary in both meshes, with 42% counts (Tamandaré Bay) to 75% counts (Rio Formoso) to (overall mean: 59% counts) of the total objects detected in the ZooScan. Zooplankton presented a higher relative volume in the 200- $\mu\text{m}$  net in Tamandaré Bay (Fig. 8).

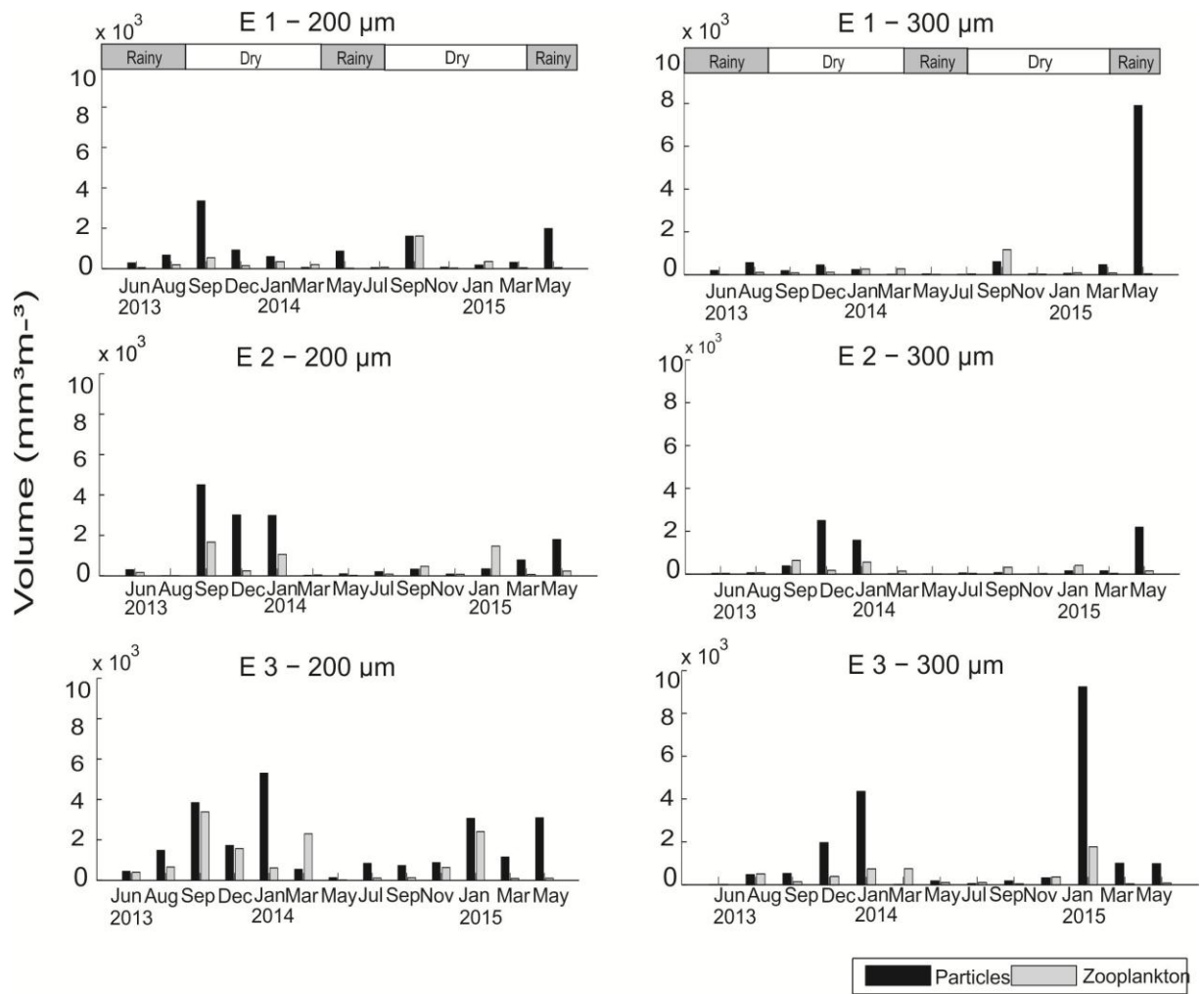
**Figure 8.** Relative contributions (% volume) of zooplankton and particles to the total volume of samples analyzed with the ZooScan equipment, according to sampling area (Rio Formoso estuary and Tamandaré Bay), and mesh size (200- $\mu\text{m}$  and 300- $\mu\text{m}$ ). Fonte: Nathália L. Silva.



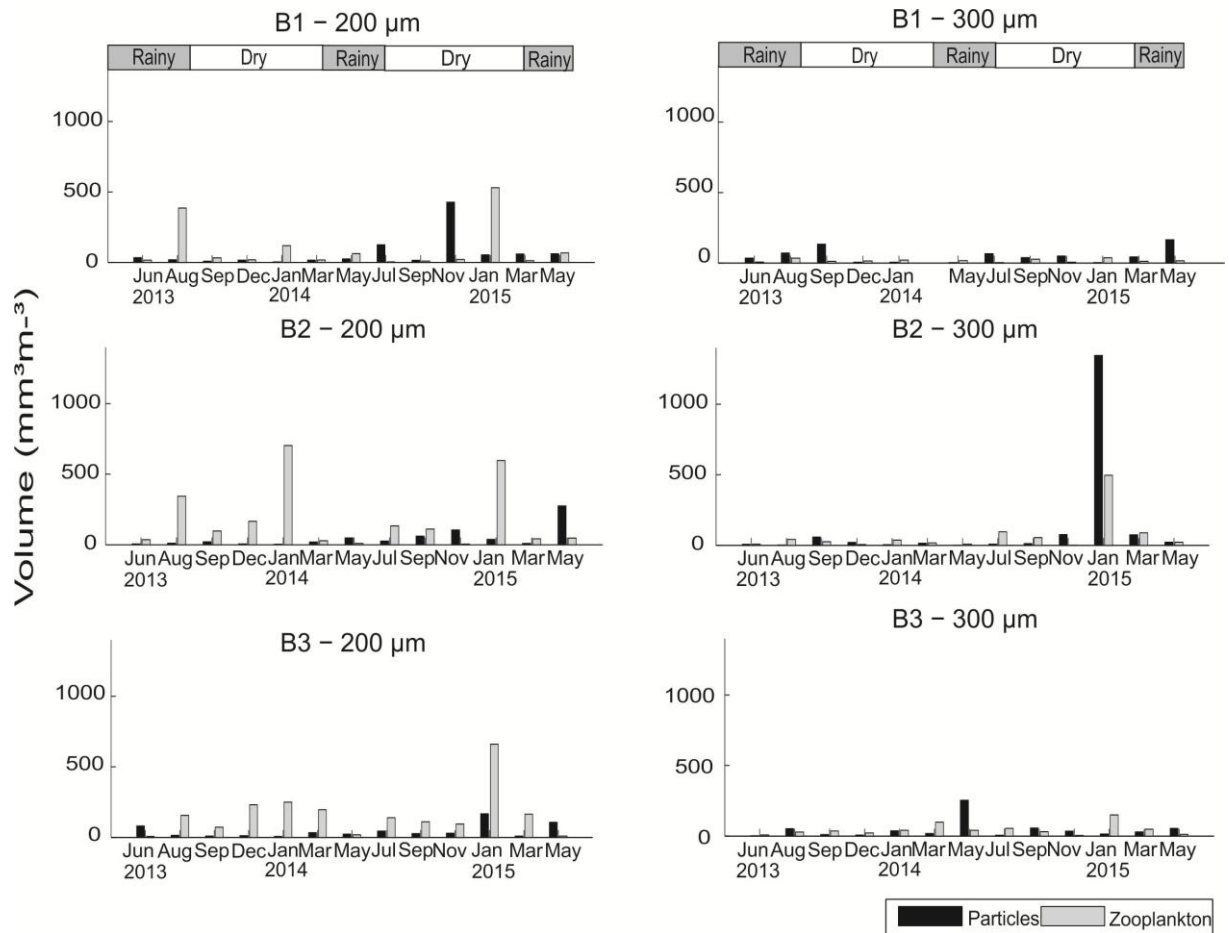
The volume of zooplankton varied from 0.1 to 1,688.7  $\text{mm}^3 \text{m}^{-3}$  (Table 3). Highest values were found in the estuary, particularly in the 200- $\mu\text{m}$ -mesh net samples and during the dry seasons. Significant differences between seasons were found in the estuary, for both the 200- $\mu\text{m}$  ( $p = 0.004$ ) and 300- $\mu\text{m}$  mesh nets ( $p = 0.003$ ) with higher values in the dry season (Fig. 9). However, no significant differences were found in the ratio zooplankton: particles between areas and seasons (Figs. 9 and 10).

The volume of particles also showed a high variability, ranging from 0.1 to 8,799.8  $\text{mm}^3 \text{m}^{-3}$  (Table 3). Significant differences between the meshes were found in the bay, with higher values in the 200- $\mu\text{m}$  ( $p = 0.03$ ) in the dry season (Fig. 10).

**Figure 9.** Time series of zooplankton and particle volumes in the Rio Formoso estuary (Brazil), according to sampling stations (stations E1 to E3) and mesh size (200  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$ ). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Nathália L. Silva.



**Figure 10.** Time series of zooplankton and particle volumes in Tamandaré Bay (Brazil), according to sampling stations (stations B1 to B3) and mesh size (200  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$ ). Bimonthly samples were taken from June 2013 through May 2015. Fonte: Nathália L. Silva.





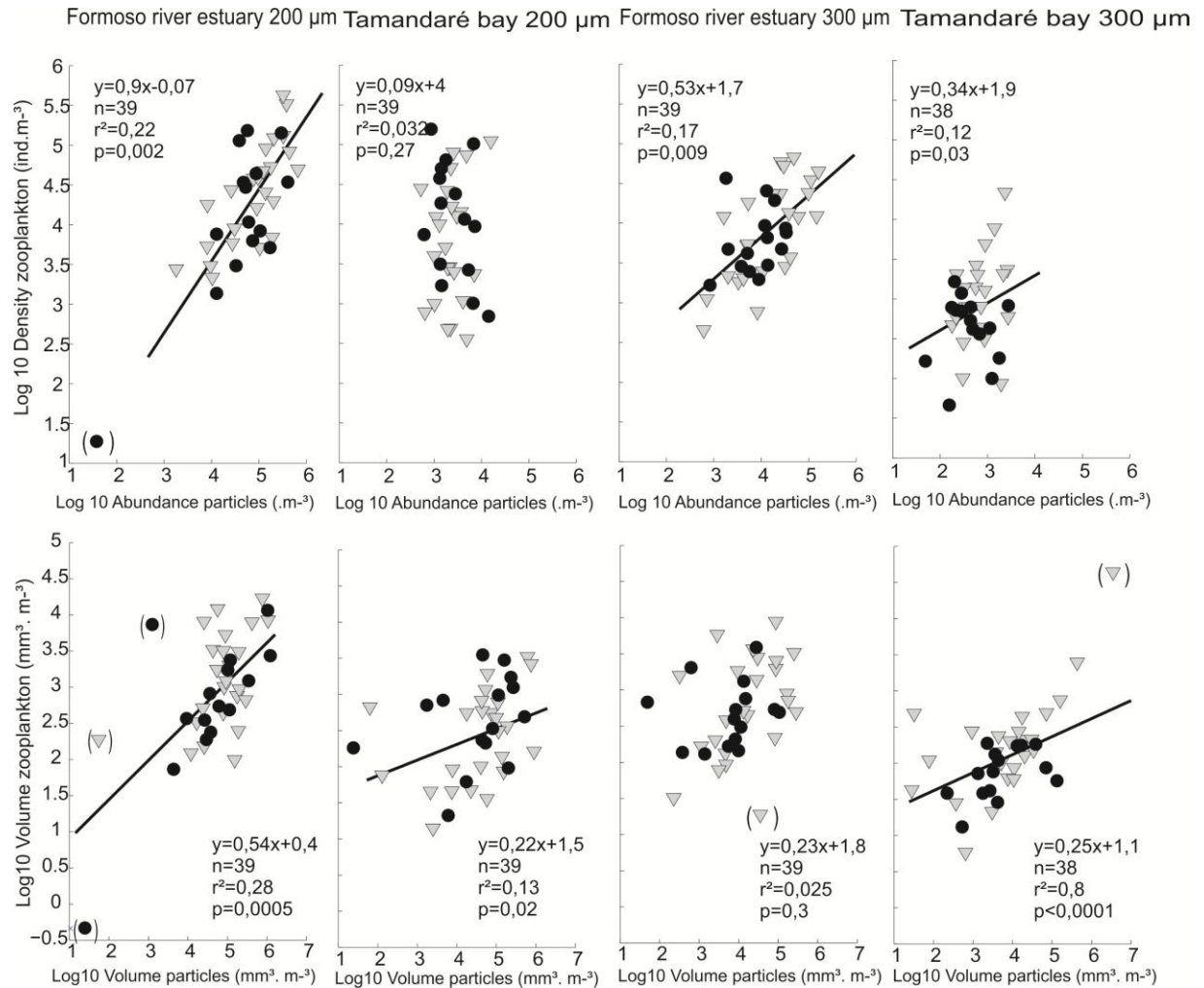
**Table 3.** Total volume of zooplankton ( $\text{mm}^3 \text{ m}^{-3}$ ) and total volume of particles ( $\text{mm}^3 \text{ m}^{-3}$ ) by sampling area, mesh size and season (n = 155 samples). Bimonthly samples were taken with two nets (200- $\mu\text{m}$  and 300- $\mu\text{m}$  mesh size) from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil.

| Area                                 | Formoso River |         |         |         | Tamandaré Bay |       |        |         |
|--------------------------------------|---------------|---------|---------|---------|---------------|-------|--------|---------|
| Mesh                                 | 200 µm        |         | 300 µm  |         | 200 µm        |       | 300 µm |         |
| Period                               | Rainy         | Dry     | Rainy   | Dry     | Rainy         | Dry   | Rainy  | Dry     |
| Parameter                            |               |         |         |         |               |       |        |         |
| <i>Zooplankton volume (mm³. m-³)</i> |               |         |         |         |               |       |        |         |
| Average                              | 116.3         | 464.6   | 60.9    | 201.4   | 44.7          | 105.9 | 16.4   | 28.1    |
| Minimum                              | 0.1           | 15.1    | 1.8     | 13.0    | 1.3           | 2.1   | 1.3    | 0.6     |
| Maximum                              | 1,145.8       | 1,688.7 | 359.2   | 879.6   | 193.0         | 351.4 | 49.4   | 248.4   |
| <i>Particle volume (mm³. m-³)</i>    |               |         |         |         |               |       |        |         |
| Average                              | 354.6         | 932.0   | 519.8   | 853.5   | 21.4          | 18.7  | 18.8   | 87.4    |
| Minimum                              | 1.9           | 34.7    | 2.3     | 3.9     | 2.7           | 1.4   | 0.3    | 1.7     |
| Maximum                              | 1,583.4       | 2,649.7 | 7,644.1 | 8,799.8 | 137.1         | 82.6  | 69.2   | 1,334.7 |

### ***Correlations between zooplankton and particle densities and volumes***

The densities of zooplankton and particles in the Rio Formoso estuary were significantly correlated with each other in both the 200-  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.002$ ) and the 300- $\mu\text{m}$ -mesh nets ( $p = 0.009$ ). In Tamandaré Bay, there was a significant correlation between zooplankton and particle densities only in the 300- $\mu\text{m}$ -mesh net ( $p = 0.03$ ) (Fig. 11). Zooplankton and particle volumes were also correlated in the bay (200- $\mu\text{m}$ -mesh:  $p = 0.02$ ; 300- $\mu\text{m}$ -mesh:  $p < 0.001$ ; Fig 11). In the estuary, zooplankton and particle volumes were also correlated in the 200- $\mu\text{m}$ -mesh net samples ( $p = 0.0005$ ).

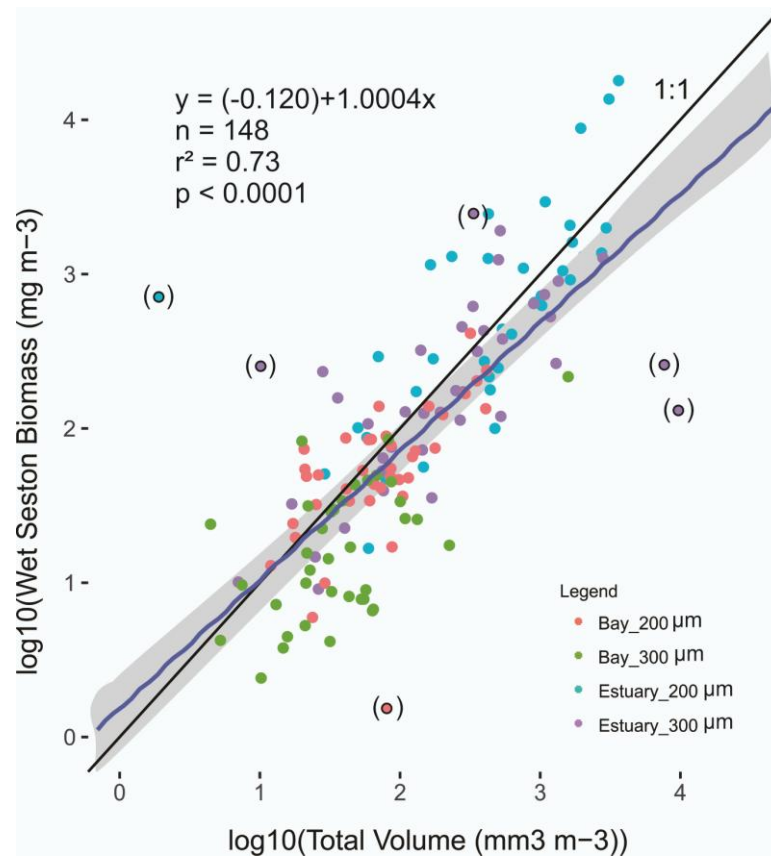
**Figure 11.** Linear correlations between  $\log_{10}(\text{total particles})$  and  $\log_{10}(\text{total zooplankton})$ , in units of density and volume. Black circles: rainy season. Grey triangles: dry season. Samples were taken from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil ( $n = 155$  samples). Outliers are marked with “()”. Fonte: Nathália L. Silva.



### Total volume vs seston biomass

When pooling all samples together, median and average values of total wet seston biomass and total volume were similar in order of magnitude between methods, indicating that results in similar scales may result from both methods (assuming that average density is similar to that of seawater). The highly significant linear relationship between wet biomass and total volume ( Fig. 12) further underlines the existence of a strong relationship between data obtained with both methods.

**Figure 12.** Relationship between  $\log_{10}(\text{soston biomass (mg m}^{-3}\text{)})$  and  $\log_{10}(\text{total volume (mm}^3 \text{ m}^{-3}\text{)})$ . Seston biomass was measured as wet weight, total volume (particles + zooplankton) was obtained thorough image analysis (ZooScan). Samples ( $n = 148$ ) were taken from 2013 to 2015 in the Rio Formoso estuary and in Tamandaré Bay, Brazil. Outliers are marked with “( )”. Fonte: Ralf Schwamborn.



## Discussion

This paper presents a novel approach to study plankton communities in estuarine and marine ecosystems, based on image analysis. Through the separation of the zooplankton from suspended particles, it was possible to quantify the contributions of each of these ecosystem compartments. This approach allows completely new interpretations of the composition of seston in aquatic ecosystems.

### *Seasonal and spatial variability in hydrographic conditions and biomass*

In coastal environments, temperature and salinity are determinant factors for most organisms (JACOBS & GRANT, 1978; ODUM, 2004; ZARAUZ & FERNANDES, 2008). Our results indicate that in both areas, there was a gradual increase in temperature during the dry season, with a higher seasonal variability in salinity in the estuary. Similar results have

been found by other authors in this region (REBOUÇAS 1966, NASCIMENTO-VIEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2009).

Estuaries are often extremely productive habitats (FRENCH 1997, ZARAUZ & FERNANDES, 2008), due to generally high concentrations of nutrients from marine, terrestrial, and anthropogenic sources. Often, these waters have a turbid appearance and a water of brownish color, suggesting that there are large amounts of suspended particles in the water. The low transparencies of waters (1.2 - 3.5 m) observed in the Rio Formoso estuary are consistent with those observed in other turbid estuaries, like the estuarine systems of the Santa Cruz Channel, Brazil (FLORES-MONTES, 1996), San Francisco Bay, California (CLOERN, 1987) and Chesapeake Bay, Virginia (PARK & MARSHALL 2000). In Tamandaré Bay the water transparency, presented larger Secchi depths (1 m during the rainy season and 5.5 m during the dry season). The seasonal variability in transparency in the bay is due to the nutrient-rich river plumes that seasonally affect the waters surrounding the Tamandaré Bay, interchanged by oligotrophic regimes (MOURA & PASSAVANTE, 1993).

The high wet seston biomass observed in the Rio Formoso estuary is expected, confirming the importance of estuaries as nurseries of marine ecosystems (SCHWAMBORN & BONECKER, 1996; MELO JÚNIOR et al., 2007, SCHWAMBORN et al., 2008). The values of wet sestonic biomass presented on Tamandaré Bay also were considered common, reflecting the proximity of the reef system and the adjacent estuary (NASCIMENTO-VIEIRA et al., 2010). Similar results also were described by other author in the others tropical ecosystems (MELO et al., 2002; SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2004; MELO JÚNIOR et al., 2007).

### ***Zooplankton density and seasonal variation***

Zooplankton density showed a marked seasonal variation, with the highest values observed during the dry season. Our results agree with Nascimento-Vieira et al. (2010) who also studied the sestonic biomass and density of zooplankton in Tamandaré Bay suggesting the existence of a favorable period for the mesozooplankton in these reefs ecosystems, between November to February (dry season), when the temperature is relatively higher and the influence of continental drainage is smaller. This author also mentioned the values highest in the impacts due to tourism and a higher influx of organic pollution during dry season. However this behavior is not very common, for example, Pereira et al. (2005) observed the

highest abundance of zooplankton during the rainy season at the northern Coast of Olinda (Pernambuco, Brazil). Costa et al. (2008) studying the tropical estuary of Taperaçu (Northern Brazil) also registered the highest zooplankton abundance during the rainy season with a 120 µm net mesh and a relationship the distribution of zooplankton with the season variability of temperature and salinity.

### ***Net selectivity***

This study used nets with meshes of 200 and 300 micrometers. In tropical environments, zooplankton size is relatively small when compared to temperate and boreal regions. Therefore, the use of smaller mesh opening enabled the accumulation of zooplankton and particles of equal or largest size also easily capture larger phytoplankton and aggregate particles (NAKAJIMA et al., 2010). This observations also confirm the ecological importance of the smaller to higher trophic levels (PITOIS & FOX, 2006).

### ***Zooplankton volume***

Zooplankton volume also showed a clear seasonal variation with higher values during the dry season, following the patterns of biomass and density. This variability was also observed by Matsuno et al. (2012), who quantified the biomass size spectra of zooplankton through volume estimates in the Chukchi Sea during the dry season, these data relating to interannual changes of sea ice extension that enables a water rich in nutrients. When quantified the biovolume zooplankton based on ESD (equivalent spherical diameter), on Okhotsk Sea (Japan), Sato et al. (2015) noted that the lower production values were distributed among the groups that dominated the small size class.

### ***Zooplankton and particles: comparison of methods***

Image analysis allowed the discrimination between zooplankton and particles showing the greater contribution of particles in relation to zooplankton density (individuals/particles m<sup>-3</sup>) in the estuary. These results are consistent with those found in a recent study based on acoustic and optical in situ methods (CHECKLEY et al., 2008) off the Californian Coast, where particle aggregates were also more abundant than zooplankton greater than 100 µm, for near shore areas. On the other hand, zooplankton was dominant in the areas of California with greater oceanic influence.

Schultes & Lopes (2009) quantified the particle volume (zooplankton + particles) with the Laser Optical Particle Counter (LOPC) and the zooplankton biomass with the ZooScan and correlated the estimates provided by these methodologies in the Brazilian Continental Shelf, finding significant correlation between sestonic particles (LOPC) and zooplankton (ZooScan). These correlations were significant even considering disparities in the optimal size sampling range of these devices. The LOPC detects seston as small as 100  $\mu\text{m}$  (HERMAN et al., 2004), whereas 200- $\mu\text{m}$ -mesh plankton nets samples efficiently organisms between 450 to 1400  $\mu\text{m}$  (HOPCROFT et al., 2001). Ohman et al. (2012), who used a Moving Vessel Profiler (MVP) and an Underwater Vision Profiler 5 (UVP5) in association with quantitative bongo samples analyzed with a ZooScan, also found an increase in organic particles related to the high density of mesozooplankton in California Current System. On the other hand, Marcolin et al. (2013) found higher particle concentration in coastal areas when compared to oceanic stations, and that particle volume declines in contrast with increases in mesozooplankton biomass, suggesting a latitudinal gradient in the proportional distribution of living and non-living particles, with a higher detrital input over the Abrolhos Bank than on the southern Brazilian shelf. These authors used both LOPC and ZooScan to estimate the size distribution of seston and zooplankton, respectively. We also found more particles in the estuarine areas in relation to areas that had more influence of oceanic waters and we also found spatial contrasting results in the zooplankton: particle relationship.

### ***Dynamics of zooplankton and particles***

The study indicates the use of seston biomass may not be appropriate even for an approximation of zooplankton biomass, since particles make up a significant portion of the seston (on average, 64% vol. in the estuary and 44% vol. in the bay), This may leading to an overestimation of the biomass of zooplankton, especially in in coastal and estuarine areas and to misinterpretations of spatio-temporal patterns. Similarly, in a recent study in Malaysian coastal coral reefs (in an area that is comparable to Tamandaré Bay), Nakajima et al. (2010) using mesh size 100- $\mu\text{m}$  worked in the coral reef at Tioman Island, Malaysia and found an average contribution of particles of 42 % to the seston, based on the difference between total seston and total zooplankton (particles were not actually or measured).

Our results showed that, with increasing temperature, during the dry period, the density and volume of the particles also increased. Besides we take into account the contribution of organic particles, which through its decomposition and subsequent

rem mineralization participates in the nutrient dynamics in the two areas studied, as they are influenced from adjacent ecosystems (mangroves and coral reefs), the inorganic particles also deserve attention. Studies conducted by Araújo and Costa (2004) in Tamandaré Bay, found high inorganic particle values, probably because this area is very crowded in summer periods reported that the particles collected on the beach were from various types of plastics and that these particles were qualitatively compared to those collected in the coastal reefs. Plastics have several characteristics that allow them to be one of the targets of ongoing monitoring worldwide, such as their increasing production, difficult degradation, easy dispersion, and because it is widely spread. Also in Tamandaré Bay, Nascimento-Vieira (2000) assigns the low diversity during dry season of zooplankton to the impacts due to tourism, mangrove destruction and a higher influx of organic pollution. The input of domestic sewage during the dry seasons (peak vacation season) is several times higher than during the rainy season, which may in part explain the higher densities of organisms and particles. This may be a relevant factor in densely populated coastal and estuarine areas and coral reefs under immense anthropogenic pressure (Santos et al. 2015).

## **Conclusion**

The comparison between automatic measurements of plankton scanned images with the indirect estimates of wet seston biomass revealed linear relationships and that despite the estimative of biomass of zooplankton by wet weight is not the most appropriate method, therefore quantifies zooplankton and particles, provides a viable estimate, however, unclear in the study of plankton. In conclusion, this study shows the importance of the particles in the structure of the biomass of the zooplankton community. Our data are consistent with the hypothesis that the particles influence the structure of ecosystems.

## **Acknowledgements**

The authors thank the funding agency FACEPE for the fellowship granted to the first author. Fieldwork was funded by CNPq (grant no. 471038/2012-1) and by INCT AmbTropic (CNPq/CAPES/FAPESB). Many thanks to all the people who participated in the fieldwork and to Marc Picheral (LOV, France) for assistance with the ZooScan and the ZooProcess

software. Many thanks also to all those who commented on earlier versions of this manuscript.

## References

- ALCARAZ, M., SAIZ, E., CALBET, A., TREPAT, I., & BROGLIO, E. (2003). Estimating zooplankton biomass through image analysis. **Marine Biology**, 143(2), 307-315.
- ARAUJO, H. M. P., NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., NEUMANN-LEITÃO, S., SCHWAMBORN, R., LUCAS, A. P. O., & ALVES, J. P. H. (2008). Zooplankton community dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 68(4), 751-762.
- ARAÚJO, M. C. B. & COSTA M. F. (2004). Análise quali-quantitativa do lixo deixado na baía de Tamandaré - PE - Brasil, por excursionistas. **Gerenciamento costeiro integrado**. Pernambuco – Brasil.
- BLANCHOT, J., CHARPY, L. & BORGNE, R. (1989). Size composition of particulate organic matter in the lagoon of Tikehau atoll (Tuamotu archipelago). **Mar Biol** 102: 329–339
- CAMARGO, J. M. R., ARAÚJO, T. C. M., MAIDA, M. & USHIZIMA, T. M., (2007). Morfologia da plataforma continental interna adjacente ao município de Tamandaré, Sul de Pernambuco- Brasil. **Revista Brasileira de Geofísica** vol.25, pp. 79-89.
- CIALDI, M. & SECCHI, P. A. (1865). Sur la Transparence de la Mer. **Comptes Rendu de l'Académie des Sciences**. 61: 100–104.
- COE, J.M. & ROGERS, D.B. 2000. Marine Debris: sources, impacts and solutions. - **Springer-Verlag**, New York, USA.
- COSTA, K. G., PEREIRA, L. C. C. & COSTA, R. M. (2008). Shot and long-term temporalvariation of the zooplankton in a tropical estuary (Amazon region, Brazil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais** 3(2): 127-141.
- CHECKLEY, D. M., DAVIS, R. E., HERMAN, A. W., JACKSON, G. A., BEANLANDS, B., & REGIER, L. A. (2008). Assessing plankton and other particles in situ with the SOLOPC. **Limnology and Oceanography**, 53(5), 2123.
- CLOERN, J. E. (1987). Turbidity as a control on phytoplankton biomass and productivity in estuaries. - **Continental Shelf Research** 7(11/12): 1367-1381.
- CRIPPS, G., FLYNN, K. J., & LINDEQUE, P. K. (2016). Ocean Acidification Affects the Phyto-Zoo Plankton Trophic Transfer Efficiency. **PloS one**, 11(4), e0151739.
- DAVIS, C. S., GALLAGER, S. M., BERMAN, M. S., HAURY, L. R., & STRICKLER, J. R. (1992). The video plankton recorder (VPR): design and initial results. **Arch. Hydrobiol. Beih**, 36, 67-81.
- ELLIOTT, D. T., & KAUFMANN, R. S. (2007). Spatial and temporal variability of mesozooplankton and tintinnid ciliates in a seasonally hypersaline estuary. **Estuaries and coasts**, 30(3), 418-430.



EMBRAPA. Boletim climatológico da região nordeste. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>.

FERREIRA, B. P. & MAIDA, M. **Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Brasília: MMA, v.1, 120 pp., 2006.

FLORES-MONTES, M. J. Variação nictemeral do fitoplâncton e parâmetros hidrológicos non Canal de Santa Cruz, Itamaracá, PE. Recife, 197f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco.

FRENCH, P. W. 1997. Coastal and estuarine management. - Routledge environmental management series.

GLADSTONE-GALLAGHER, R. V., LOHRER, A. M., LUNDQUIST, C. J., & PILDITCH, C. A. (2016). Effects of Detrital Subsidies on Soft-Sediment Ecosystem Function Are Transient and Source-Dependent. **PloS one**, 11(5), e0154790.

GORSKY, G., OHMAN, M. D., PICHERAL, M., GASPARINI, S., STEMMANN, L., ROMAGNAN, J. B. & PREJGER, F. (2010). Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. **Journal of Plankton Research**, 32(3), 285-303.

GROSJEAN, P., PICHERAL, M., WAREMBOURG, C., & GORSKY, G. (2004). Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. **ICES Journal of Marine Science**, 61(4), 518-525.

HARRIS, R., WIEBE, P., LENZ, J., SKJOLDAL, H. R., & HUNTLEY, M. (Eds.). (2000). **ICES zooplankton methodology manual**. Academic Press.

HERMAN, A. W., BEANLANDS, B., & PHILLIPS, E. F. (2004). The next generation of optical plankton counter: the laser-OPC. **Journal of Plankton Research**, 26(10), 1135-1145.

HOPCROFT, R.R., ROFF, J.C., CHAVEZ, F.P. (2001). Size paradigms in copepod communities: a re-examination. **Hydrobiologia** 453/454: 133-141.

JACOBS, F., & GRANT, G. C. (1978). **Guidelines for zooplankton sampling in quantitative baseline and monitoring programs** (No. 83). for sale by the National Information Service.

LEHETTE, P., & HERNÁNDEZ-LEÓN, S. (2009). Zooplankton biomass estimation from digitized images: a comparison between subtropical and Antarctic organisms. **Limnology Oceanography: Methods**. 7, 304–308

LI, X., CUI, B., YANG, Q., TIAN, H., LAN, Y., WANG, T., & HAN, Z. (2012). Detritus quality controls macrophyte decomposition under different nutrient concentrations in a eutrophic shallow lake, North China. **PloS one**, 7(7), e42042.

LIRA, L.; ZAPATA, M. C. & FONSECA, V. G.. Aspectos da dinâmica do estuário do Rio Formoso, Pernambuco. **Caderno Ômega**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, v. 3, n. 1/2, p. 133-156, 1979.

MARCOLIN, C. R., SCHULTES, S., JACKSON, G. A., & LOPES, R. M. (2013). Plankton and seston size spectra estimated by the LOPC and ZooScan in the Abrolhos Bank ecosystem (SE Atlantic). **Continental Shelf Research**, 70, 74-87.

- MATSUNO, K., YAMAGUCHI, A. & IMAI, I. (2012). Biomass size spectra of mesozooplankton in the Chukchi Sea during the summers of 1991/1992 and 2007/2008: an analysis using optical plankton counter data. - **ICES Journal of Marine Science** 69(7): 1205–1217.
- MELO JÚNIOR, M. D., PARANAGUÁ, M. N., SCHWAMBORN, R., LEITÃO, S. N., & EKAU, W. (2007). Fluxes of zooplankton biomass between a tidal estuary and the sea in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 55(4), 239-249.
- MELO, N. F. A. C., NEUMANN-LEITÃO, S., SILVA, T. A., SCHWAMBORN, R. & GUSMÃO, L. M. O. (2002). Zooplankton from the Maracajaú reefs, Northeastern Brazil. **Tropical Oceanography**, Recife: v.30, n. 2, p. 133-145.
- MOURA, R. T. & PASSAVANTE, J. Z. O. (1993). Taxa de Assimilação do Fitoplâncton da baía de Tamandaré – Rio Formoso – PE. Brasil. - **Boletim Técnico Científico CEPENE**, Rio Formoso, 1 (11): 7-23.
- NAKAJIMA, R., YOSHIDA, T., OTHMAN, B. H. R., & TODA, T. (2010). High detritus/phytoplankton content in net-plankton samples from coral reef water: source of over-estimation in zooplankton biomass by measuring seston weight. **Plankton and Benthos Research**, 5(2), 69-73.
- NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., VIEIRA, H. L. F., & LIMA, T. V. C. (1985). Zooplâncton da região costeira do Estado de Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos** Universidade Federal de Pernambuco, 55-72.
- NASCIMENTO-VIEIRA, D. A. 2000. Macrozooplâncton recifal da baía de Tamandaré, Pernambuco – Brasil. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Oceanografia, Recife. 107 p.
- NASCIMENTO-VIEIRA, D. A., FIGUEIREDO, F., PORTO NETO, F. (2010) Mesozooplâncton de área recifal do Atlântico Sudoeste tropical. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 38, n. 1, p. 47-59.
- ODUM, E. P. (2004). **Fundamentos de Ecologia**. 6ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian.
- OHMAN, M. D., POWELL, J. R., PICHERAL, M., & JENSEN, D. W. (2012). Meso zooplankton and particulate matter responses to a deep-water frontal system in the southern California Current System. **Journal of plankton research**, fbs028.
- OMORI, M. & IKEDA, T. (1984). **Methods in marine zooplankton ecology**. John Willey; Sons, New York, p. 332.
- PALUMBO, A. V. FERGUSON, R. & RUBLEE, P. A. (1984). Size of Suspended Bacterial Cells and Association of Heterotrophic Activity with Size Fractions of Particles in Estuarine and Coastal Waters. *Applied and environmental microbiology*, p. 157-164
- PARK, G. S., & MARSHALL, H. G. (2000). Estuarine relationships between zooplankton community structure and trophic gradients. **Journal of Plankton Research**, 22(1), 121-136.
- PEREIRA, L. C. C., JIMÉNEZ, J. A., KOENING, M. L., PORTO NETO, F. F., MEDEIROS, C. & COSTA, R. M. (2005). Effect of coastline properties and wastewater on plankton composition and distribution in a stressed environment on the north coast of Olinda - PE (Brazil). - *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(6): 1013-1026.

PARSONS, T. R., MAITA, Y., & LAI, C. I. I. (1984). **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Pergamon Press, Oxford, UK, 1, 73.

PINTO-COELHO, R. M., & BEZERRA-NETO, J. F. (2005). Effects of eutrophication on size and biomass of crustacean zooplankton in a tropical reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, 65(2), 325-338.

PITOIS, S. G. & FOX, C. J. 2006. Long-term changes in zooplankton biomass concentration and mean size over the Northwest European shelf inferred from Continuous Plankton Recorder data. - **ICES Journal of Marine Science**, 63: 785-798.

REBOUÇAS, A. C. (1966). Sedimentos da baía de Tamandaré, Pernambuco. **Trabalhos Oceanográficos** da Universidade Federal de Pernambuco, 7(9): 187-206.

SANTOS, G. S., BURGOS, D. C., LIRA, S. M. A. & SCHWAMBORN, R. (2015). The Impact of Trampling on Reef Macroenthos in Northeastern Brazil: How Effective are Current Conservation Strategies? **Environmental Management**. DOI 10.1007/s00267-015-0552-7.

SATO, K., MATSUNO, K., ARIMA, D., ABE, Y. & YAMAGUCHI, A. (2015). Spatial and temporal changes in zooplankton abundance, biovolume, and size spectra in the neighboring waters of Japan: analyses using an optical plankton counter. - **Zoological Studies** 54(1): 1-15.

SCHULTES, S. & LOPES, R. M. 2009. Laser Optical Plankton Counter and Zooscan intercomparison in tropical and subtropical marine ecosystems - **Limnology and Oceanography**. - Methods.

SCHUMANN, R., & RENTSCH, D. (1998). Staining particulate organic matter with DTAF-a fluorescence dye for carbohydrates and protein: a new approach and application of a 2D image analysis system. **Marine Ecology Progress Series**.

SCHWAMBORN, R. & BONECKER, A. C. T. (1996). Seasonal changes in the transport and distribution of meroplankton into a Brazilian estuary with emphasis on the importance of floating mangrove leaves. - **Arquivos de Biologia e Tecnologia** 39(2): 451-462.

SCHWAMBORN, R., EKAU, W., VOSS, M. & SAINT-PAUL, U. (2002). How important are mangroves as a carbon source for decapod crustacean larvae in a tropical estuary? - **Marine Ecology Progress Series** 229: 195-205.

SCHWAMBORN, R., EKAU, W., SILVA, A.P., SCHWAMBORN, S.H.L., SILVA, T.A., NEUMANN-LEITÃO, S. & SAINT-PAUL, U. (2006). Ingestion of large centric diatoms, mangrove detritus, and zooplankton by zoeae of *Aratus pisonii* (Crustacea: Brachyura: Grapsidae). - **Hydrobiologia** 560: 1-13.

SCHWAMBORN, R., MELO JÚNIOR, M., NEUMANN-LEITÃO, S. & PARANAGUÁ, W. E. M. N. (2008). Dynamic patterns of zooplankton transport and migration in Catuama Inlet (Pernambuco, Brazil), with emphasis on the decapod crustacean larvae. **Latin American Journal of Aquatic Research**, 36, 1.

SILVA, A. P., NEUMANN-LEITÃO, S., SCHWAMBORN, R., GUSMÃO, L. M. O., SILVA, T. A. (2004). Mesozooplankton of a impacted bay in North Eastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 47(3): 485-493.

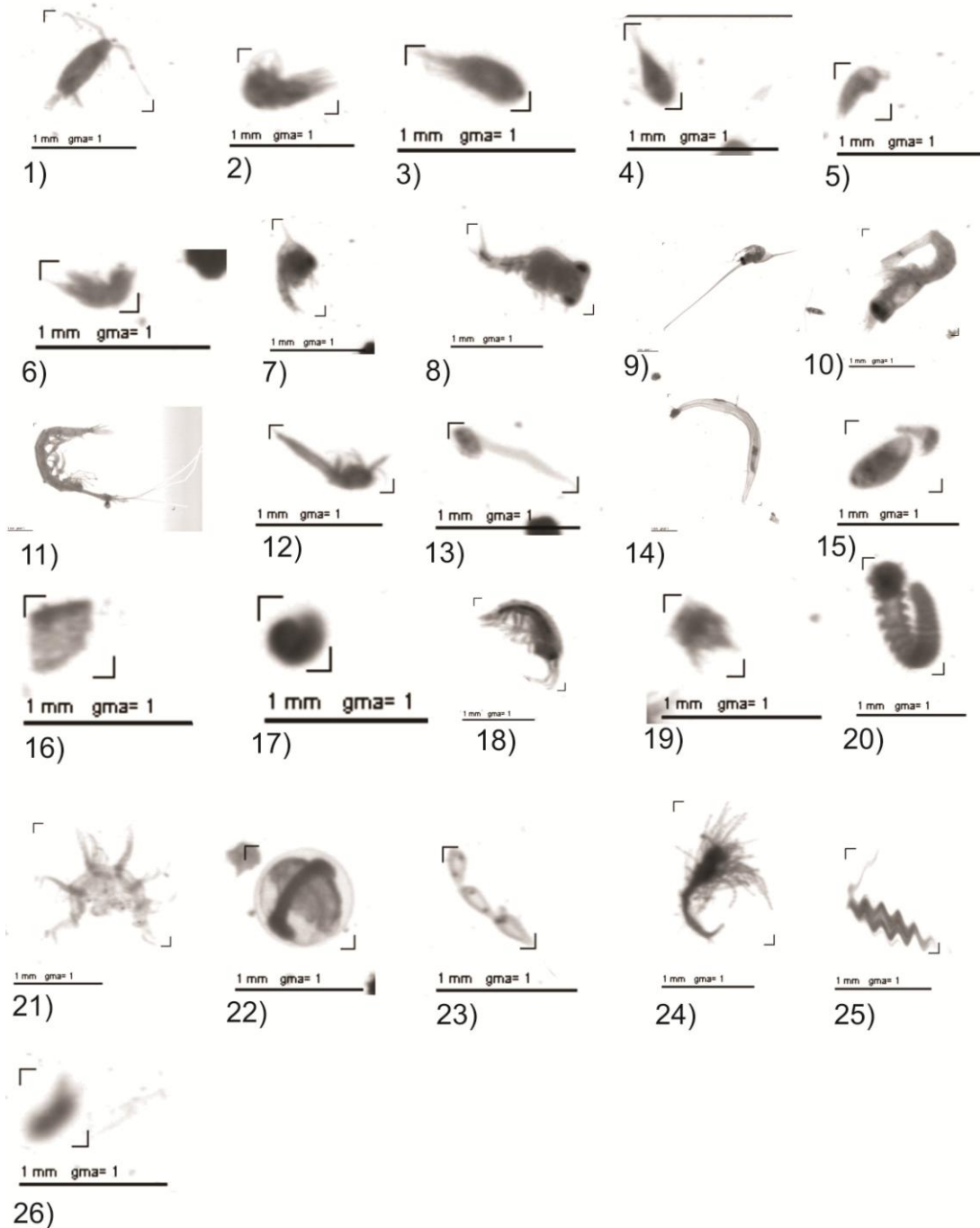
- SILVA, M. H. D., SILVA-CUNHA, M. D. G. G., PASSAVANTE, J. Z. D. O., GREGO, C. K. D. S., & MUNIZ, K. (2009). Estrutura sazonal e espacial do microfitoplâncton no estuário tropical do rio Formoso, PE, Brasil. **Acta botanica**, 23(2), 355-368.
- SILVA, T. A. (2003). Zooplâncton demersal na Área de Proteção Ambiental de Tamandaré (APA dos corais) Pernambuco (Brasil). 89 folhas. **Tese (doutorado)** - Universidade Federal de Pernambuco. CTG.Oceanografia.
- STEMMANN, L. & BOSS, E. (2012). Plankton and Particle Size and Packaging: From determining Optical Properties to Driving the Biological Pump. **Annual Review of Marine Science** 4: 263-290.
- VANDROMME, P., STEMMANN, L., GARCÍA-COMAS, C., BERLINE, L., SUN, X., & GORSKY, G. (2012). Assessing biases in computing size spectra of automatically classified zooplankton from imaging systems: a case study with the ZooScan integrated system. **Methods in Oceanography**, 1, 3-21.
- VEGA-PÉREZ, L. A. (1993). Estudo do zooplâncton da região de Ubatuba, Estado de São Paulo. **Publicação Especial do Instituto Oceanográfico**, 10, 65-84.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. (1996). 3ª edição. Prentice Hall International Editions. 662p.
- ZARAUZ, L. & FERNANDES, X. I. J. (2008). Modelling the influence of abiotic and biotic factors on plankton distribution in the Bay of Biscay, during three consecutive years (2004 – 06). **Journal of Plankton Research** 30(8): 857–872.
- ZIADI, B., DHIB, A., TURKI, S. & ALEYA, L. (2015). Factors driving the seasonal distribution of zooplankton in a eutrophicated Mediterranean Lagoon. - **Marine Pollution Bulletin** 97(1): 224-233.

## Conclusões gerais

- Este estudo foi o primeiro a quantificar as contribuições do mesozooplâncton e das mesopartículas em águas costeiras tropicais através de análises de imagem nas amostras de plâncton obtidas com rede.
- Os dados são consistentes com a hipótese de que as partículas influenciam a estrutura dos ecossistemas.
- Apesar de serem evidenciadas elevadas contribuições de partículas em termos de densidade e volume ao longo dos dois anos de estudo, estas contribuições foram sempre mais acentuadas durante a estação seca.
- Este estudo demonstra a importância das partículas na estrutura da biomassa da comunidade zooplâncton.
- A comparação entre os métodos direto e indireto para a estimativa da biomassa do zooplâncton, revelou relações lineares e que, apesar da estimativa da biomassa do zooplâncton através do método direto não ser o método mais adequado, fornece uma estimativa viável no estudo de plâncton, no entanto, para ambientes costeiros, principalmente os que recebem grande aporte continental, a discrepância entre a real contribuição do zooplâncton é superestimada. Pois, nos cálculos de biomassa sestônica úmida, a contribuição das mesopartículas é extremamente significativa.

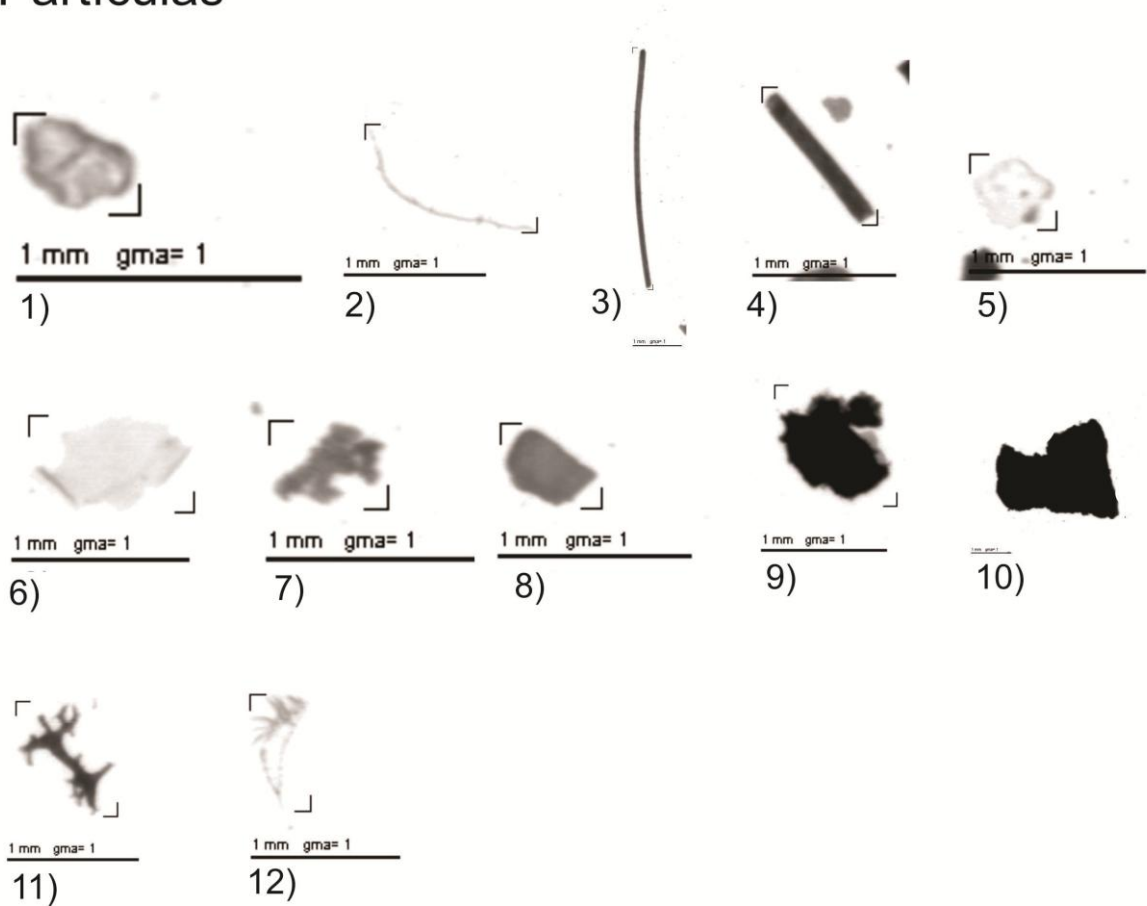
**ANEXO I.** Categorias dos organismos que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier. 1) Calanoida; 2) Temoridae; 3) Oncaea; 4) Cyclopoida; 5) Coryceidae; 6) Harpacticoida; 7) zoea de Brachyura; 8) megalopa de Brachyura; 9) Porcellanidae; 10) outros Decapoda; 11) *Lucifer* sp.; 12) Euphausiacea; 13) Appendicularia; 14) Chaetognatha; 15) Bivalvia; 16) Bryozoa; 17) Gastropoda; 18) Amphipoda; 19) Náuplio de Cirripedia; 20) Polychaeta; 21) Hidrozoário; 22) ovo de Teleostei; 23) Antozoário; 24) Hippolytidae; 25) Trepidado; 26) fora de foco.

## Anexo I Organismos



**Anexo II.** Categorias das partículas que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier. 1) grão de areia; 2) fibra de origem diversa; 3) fibra vegetal; 4) graveto; 5) detrito transparente roliço/esférico; 6) detrito transparente plano; 7) detrito opaco; 8) detrito opaco achatado; 9) detrito escuro; 10) detrito escuro achatado; 11) fragmento de macroalga; 12) exúvia.

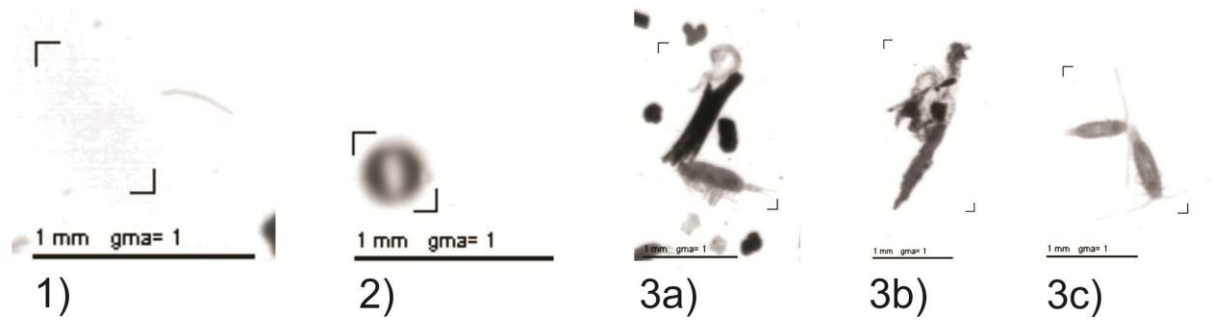
## Anexo II Partículas



**Anexo III.** Categorias de artefatos de escaneio que compuseram a base de treinamento do Plankton Identifier. 1) manchas opacas no vidro de escaneamento do ZooScan; 2) bolha de ar; 3a) Múltiplos: diversas partículas e organismos se tocando; 3b) Múltiplos: diversas partículas de tocando; 3c) Múltiplos: organismos se tocando.

## Anexo III

### Artefatos de escaneio





## Apêndice A

### Manual prático dos procedimentos com o ZooScan

#### O ZooScan

Procedimentos para escanear  
uma amostra de plâncton e  
extrair dados de software  
especializado

Por Catarina Marcolin  
Gleice Santos  
Nathália Lins  
Simone Lira  
Ubatuba-SP  
Agosto de 2014

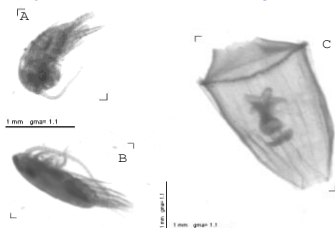
#### O ZooScan



- Escanear alíquotas de amostras de plâncton preservadas
- ZooScan + ZooProcess + Plankton Identifier
- Identificação semiautomática de organismos > 200 µm

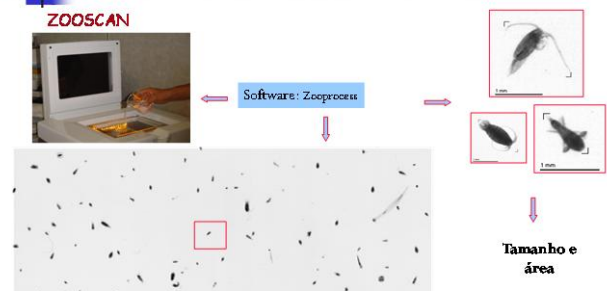
#### Fornece dados de forma rápida

- Distribuição de abundância e tamanhos para diferentes grupos taxonômicos.
- Resolução taxonômica é variável, mas **precisa**.



#### O ZooScan

Triagem digital e obtenção do tamanho/biomassa



#### Iniciando o trabalho no Zooscan: SOFTWARES NECESSÁRIOS



- Java Oracle
- Tanagra
- ZooProcess
- Image J
- Plankton Identifier (PKID)
- Vuescan



Plankton Identifier



Vuescan

#### Iniciando o trabalho no Zooscan: Abrir o ImageJ

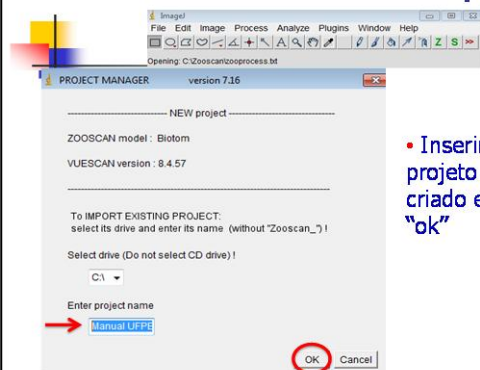


### 1º Passo: Criando um novo projeto



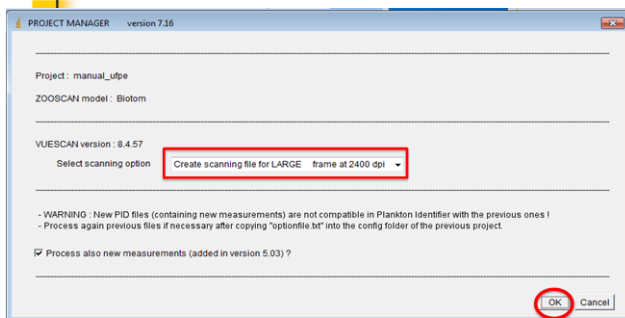
- Selecionar a opção "create new project" e clicar em ok.

### 1º Passo: Criando um novo projeto



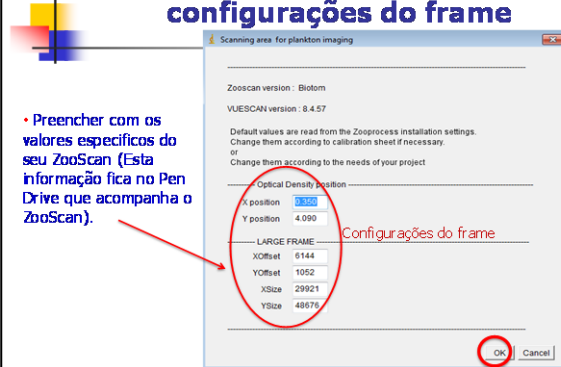
- Inserir nome do projeto a ser criado e clicar "ok"

### 1º Passo: Criando um novo projeto



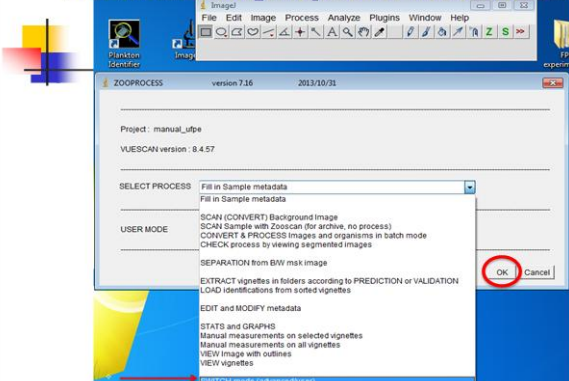
- Escolha o frame e dpi

### 1º Passo: Criando um novo projeto configurações do frame

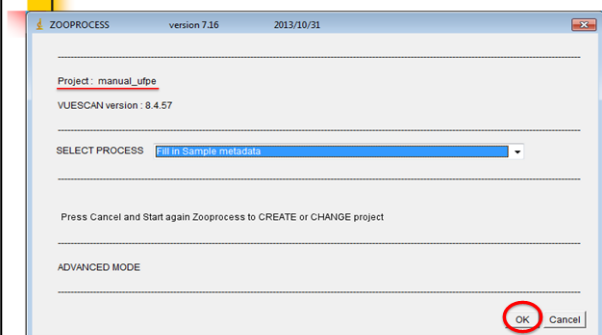


- Preencher com os valores específicos do seu ZooScan (Esta informação fica no Pen Drive que acompanha o ZooScan).

### 2º Passo: Configurações do modo avançado



### 3º Passo: Cadastrar as amostras a serem trabalhadas no projeto que acabou de ser criado



### 3º Passo: Nomear a amostra do projeto

Project : manual\_uupe

ENTER Sample ID, (no extension or space character allowed)

sampleid

Nomeie sua amostra

OK Cancel

### 3º Passo: Inserir dados da planilha de campo

METADATA version 7.13 Please ENTER or CHECK the informations

SAMPLE ID : manual\_uupe  
METADATA from sample "sampleid" displayed below

Ship :  
Scientific program :  
Station ID ("NAUT" if unknown) :  
Sampling date (YYYYMMDD-HHMM) :  
CONVENTION at (0) = Latitude (-12 05388 for 12°05.388 S) Longitude (-135 05325 for 135°05.325 E)  
Latitude (DD MM for North, -DD MM for South) :  
Longitude (DDD MM for West, -DDD MM for East) :  
Bottom Depth (m) :  
CTD reference (Filename) :  
Other reference :  
Number of tow in the same sample :  
Tow type (Oblique = 1, Horizontal = 2, Vertical = 3) :  
Net type (NP2, JB, Omnis...) :  
Net mesh (cod end) µm :  
Net opening surface (m2) :  
Maximum Depth (m) : 2 max :  
Minimum Depth (m) : Zmin :  
Filtered volume (m3) :  
Add sample comment :  
OK Cancel



• **NUNCA** cancele esta tela de metadados. Se preencheu algo errado, você terá como corrigir posteriormente em: Image J → Editar e modificar metadados.



### 4º Passo: Fazendo o background

SCAN PROCEDURE

QUIT VUESCAN before proceeding

OK Cancel

SCAN BACKGROUND CONFIG MENU

Project : manual\_uupe

ZOO SCAN installed model is : Biotom

VUESCAN installed version is : 8.4.57

Number of frames in background : 8 Não altere

OK Cancel

### 4º Passo: Fazendo o background

SCANNING PROCEDURE version 7.06

-----INFORMATION in vuescan\_zooscan\_2400dpi\_frame2\_large.ini-----

Operation performed = background

Actual settings = Process 8 bits image using MANUAL color balance

16 bits RAW image SAVED

Process 8 bits image using MANUAL color balance

Save 16 bits RAW image ?

OK Cancel

PROCEDURE for the large frame

- 1) Switch Zooscan ON (if not done yet)
- 2) Clean Zooscan Cell
- 3) Fill the cell with fresh water (0.6 to 1 cm thick)
- 4) Place transparent large frame in normal position (corner reference)
- 5) Clean transparent frame top side (OD zone)
- 6) Launch VUESCAN
- 7) Start light tempo (press green button on cover)
- 8) Click on PREVIEW button in VUESCAN
- 9) Check your image (No white strip, no dust on the OD ref)
- 10) Click 2 times on SCAN (2 times for 2 scans !)

DO NOT CHANGE ANY SETTING (window size) in VUESCAN !

IMPORTANT NOTE : WAIT more than 30 seconds between scans or after PREVIEW !

PRESS OK just after pressing SCAN (first time) in VUESCAN !

OK Cancel

• Leia e siga as recomendações do check list

• Muito importante esperar no mínimo 30 segundos.

### 5º Passo: Abrir Vuescan



• Selecionar a opção "manual" na aba color → Preview

Vuescan 8.64 (8.4.26)

File Edit Scanner Profile Image Help

Input Crop Filter Color Output Prefs Preview Scan

Color balance: Manual

Neutral red: 1

Neutral green: 1

Neutral blue: 1

Black point (No): 0

White point (No): 0

Curve low: 0.25

Curve high: 0.75

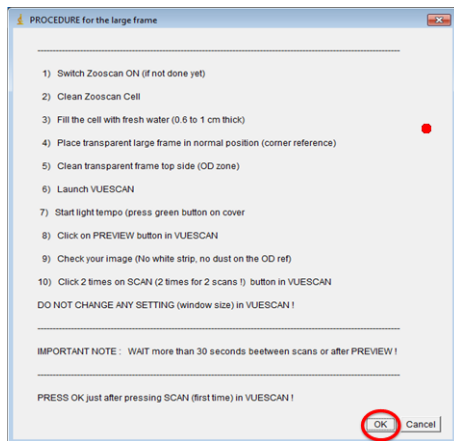
Brightness: 0.9

Brightness red: 1

Brightness green: 1

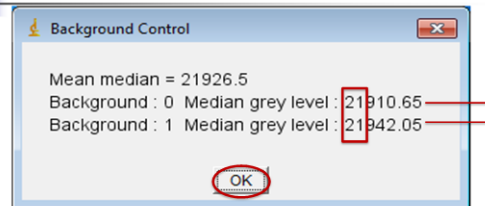
OK Scan Less

Input: Perfection4990 Output: 3600x2700 pixels 300 dpi 256x256 mm



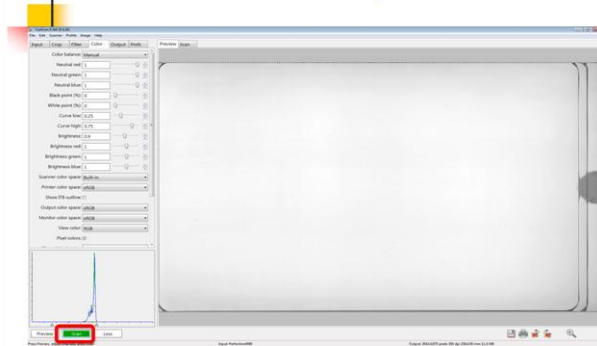
- Clicar em OK e em seguida fechar o Vuescan

Verificar se a média dos níveis de tons de cinza... ver manual

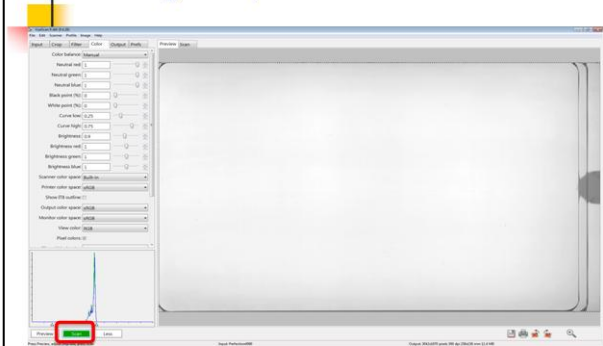


- Cada aparelho de ZooScan possui um valor aceitável para os valores médios dos níveis de cinza. Caso o primeiro e segundo background estejam discrepantes entre si, ou seja, a casa da milhar excedendo 2 milhões, repita todo o processo do background. Em seguida, clique em OK.

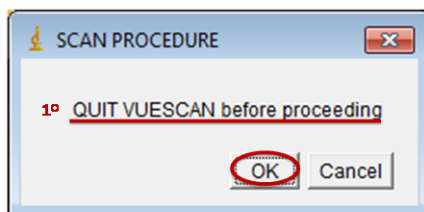
- Finalizado o Preview, clicar em Scan



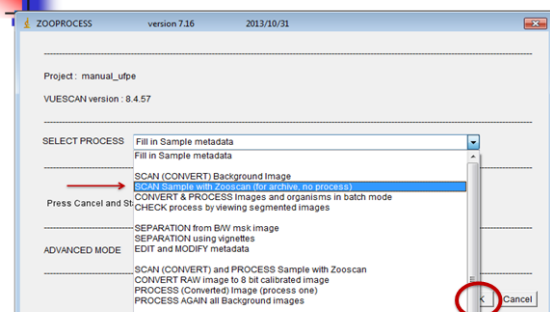
- Após 30 segundos, clicar novamente em Scan



**6º Passo: Início do escaneamento da amostra**

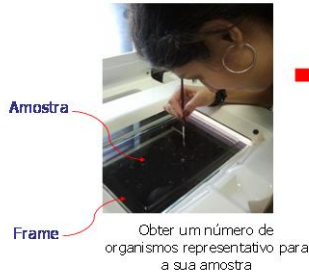


**6º Passo: Início do escaneamento da amostra**



### Antes de escanear: Preparação da amostra

- Remover o formol da amostra
- Utilizar água destilada ou filtrada em temperatura ambiente
- Subamostrar e escanear

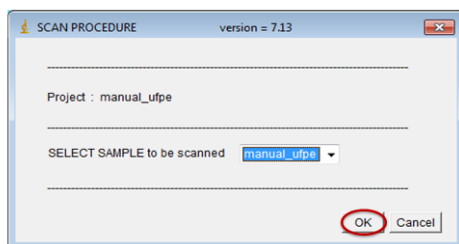


### Cuidados

- Deixar reservada a água (ao menos 24 horas de antecedência) para que esta esteja em temperatura ambiente e assim, evitar a formação de bolhas na célula de escaneamento do ZooScan;
- Não separar os organismos com objetos metálicos para não arranhar o vidro. Sugestão: Use espinho de cacto ou pincel.
- Separe o máximo de organismos possíveis para evitar o contato entre eles. No entanto, não perca mais que 15 minutos nesta etapa;
- Ao retirar a amostra, **NÃO** solte a tampa do equipamento.

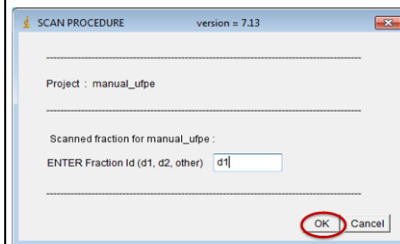
### Continuando o escaneamento...

- Selecionar amostra que foi nomeada

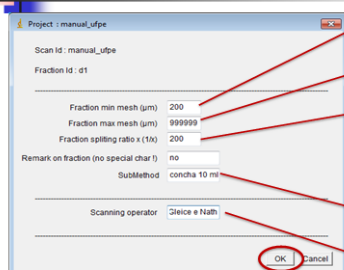


### Escolher fração de diluição

- Caso a amostragem ultrapasse mais de uma subamostragem, classifique conforme o número da subamostragem.



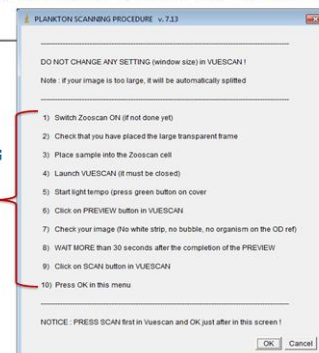
### Dados da subamostragem



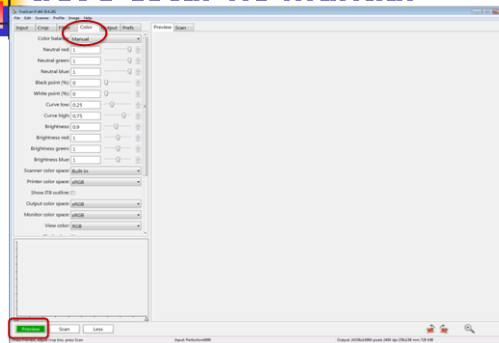
- Fração da malha escaneada
- Fração máxima pode deixar valores altos
- O resultado da fração que você diluiu ou quarteou a amostra (Neste exemplo a amostra foi diluída em 2000 ml)
- Método de subamostragem
- Nome do Operador que escaneou a amostra

### Escaneando amostras...

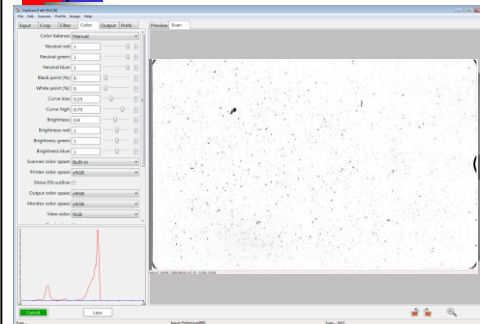
- Leia e siga as recomendações do check list



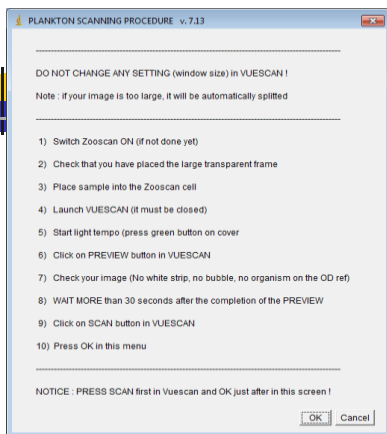
## Checar o balanço de cor que deve estar no manual



## 6º Passo: Escaneando a amostra

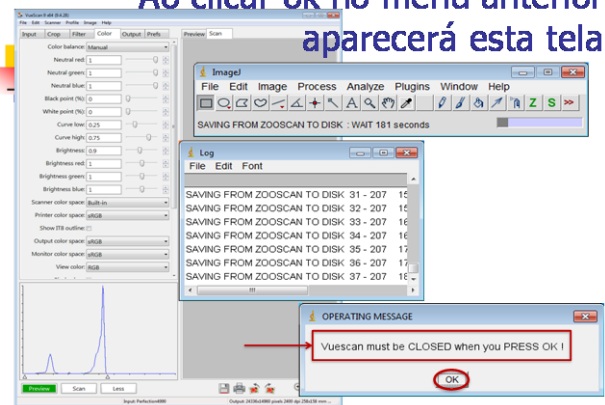


- Nota: Os organismos precisam estar na área do frame e **NUNCA** tocar a área da borda do frame ou flutuar;

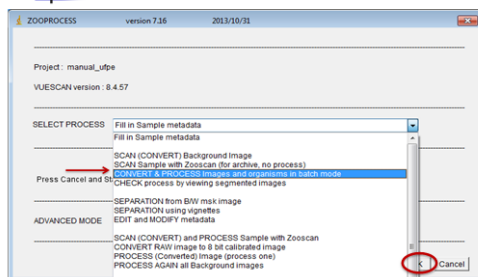


- Retorne ao menu anterior e clique em OK

## Ao clicar ok no menu anterior aparecerá esta tela

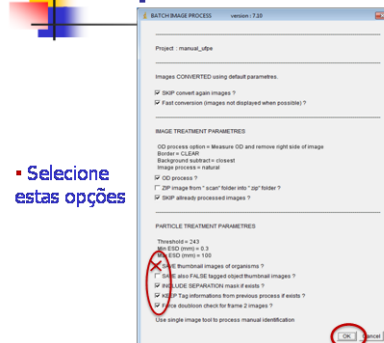


## 7º Passo: Convertendo e processando imagens



- Recomenda-se realizar esta etapa ao final do dia de trabalho. Pois, pode demandar bastante tempo.

## 7º Passo: Convertendo e processando imagens

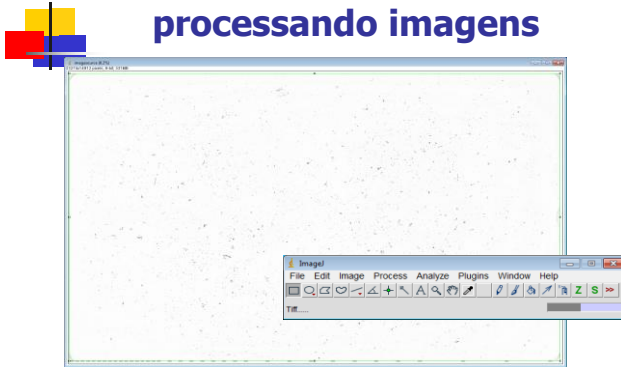


- Selecione estas opções

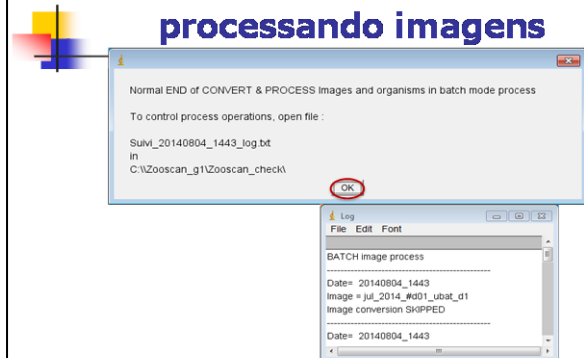
espere...



## 7º Passo: Convertendo e processando imagens



## 7º Passo: Convertendo e processando imagens

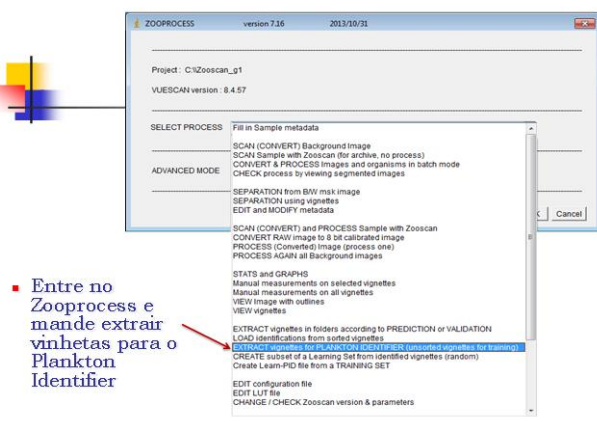
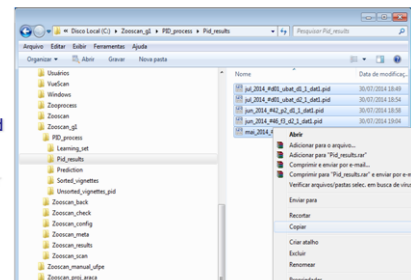


## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Criar pastas e **arrastar** as imagens referentes aos organismos para criar a base de treinamento;
- Gorsky et al. (2010), recomendam **200-300 imagens** em cada categoria do *learning set*;
- **Evitar nomes extensos**. Não use espaços, nem parênteses. Use o nome das categorias de forma **consistente** para evitar duplicidade;
- Colocar **números** na frente dos nomes pode ajudar a organizá-los:
  - 00\_detrito; 01\_calanoida; 01\_cyclopoida; 02\_cnidaria

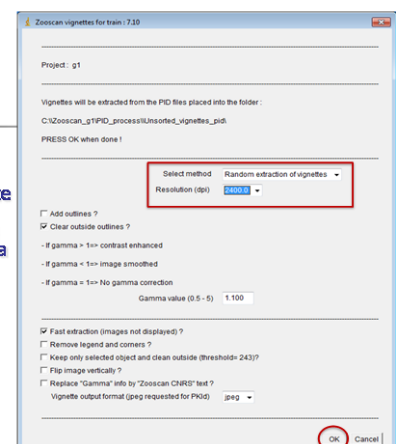
## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Antes de começar a realizar esse passo, copiar os arquivos .pid da pasta PID\_process → PID\_results e cole na pasta Unsorted\_vignettes\_pid
- Escolha as amostras que você quiser utilizar para criar sua base de treinamento. Usar amostras representativas de diferentes situações ecológicas (ex: inverno/verão).



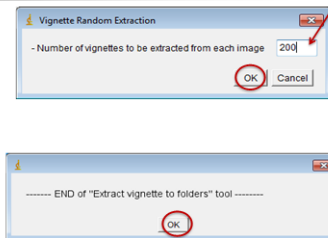
- Entre no Zooproccess e mande extrair vinhetas para o Plankton Identifier

- Irá extrair aleatoriamente vinhetas de todas as amostras cujos arquivos ".pid" estiverem na pasta Unsorted\_vignettes\_pid
- Lembre de alterar a resolução das vinhetas para a mesma na qual você escaneou.



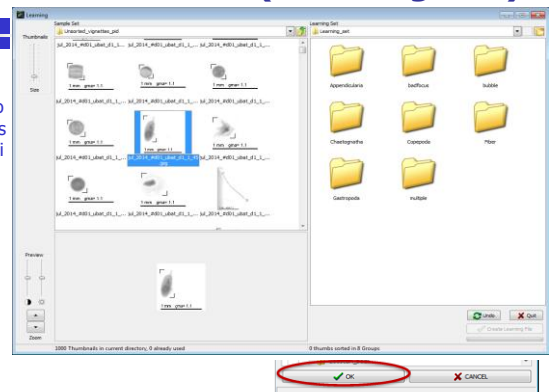
## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Nesta opção você escolhe quantas vinhetas de cada arquivo serão extraídas
- Ao final aparece uma mensagem sinalizando que acabou a extração
- Agora feche o ImageJ e vá para o Plankton Identifier



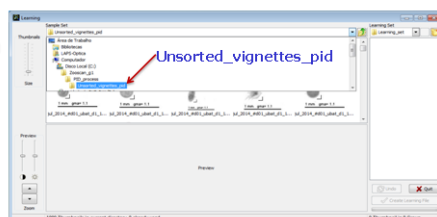
## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Pastas contendo os nomes taxonômicos que foram criados na etapa anterior

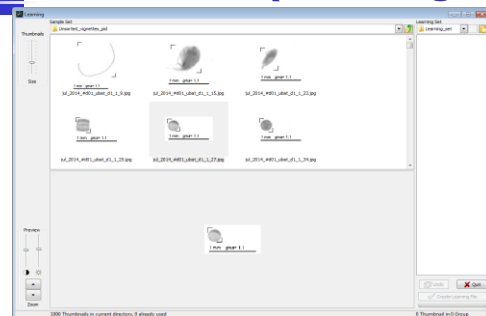


## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Do lado direito sua pasta do Learning set já estará selecionada
- Do lado esquerdo, selecione a pasta onde as vinhetas foram extraídas (Clique no projeto Zooscan\_xxx → Pid\_process → Unsorted\_vignettes\_pid)

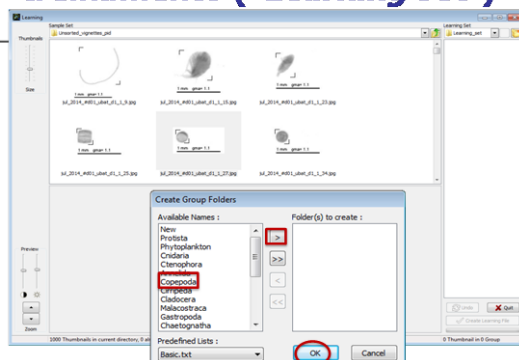


## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")



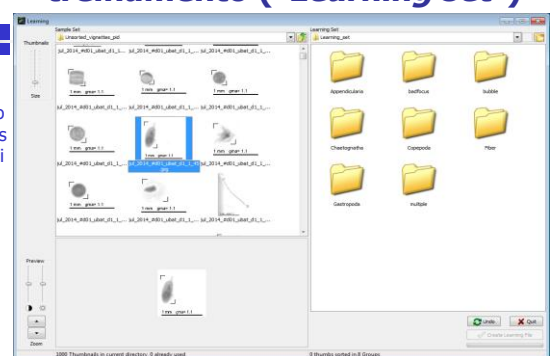
## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

- Seleciona os taxa de interesse, clica na seta, em seguida, OK. Você também pode criar um novo táxon na opção "New"



## 8º Passo: A base de treinamento ("Learning set")

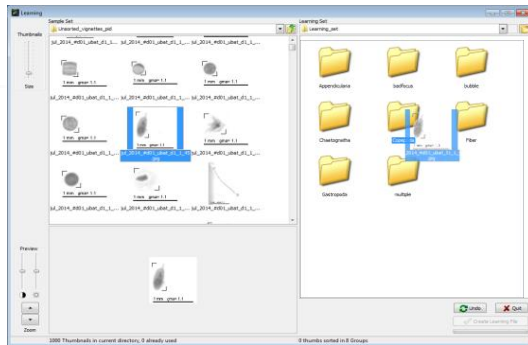
- Pastas contendo os nomes taxonômicos que foram criados na etapa anterior



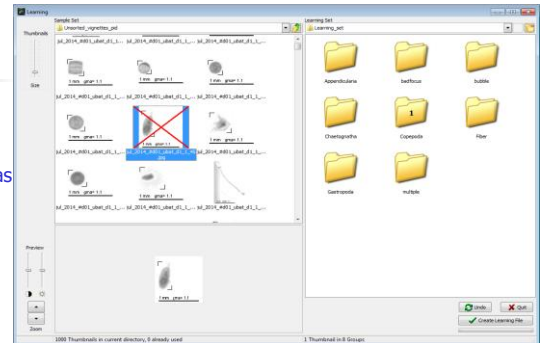




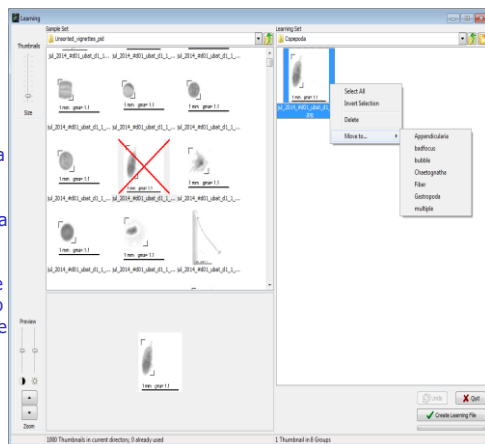
- Seleciona a vinheta e move para a pasta de destino conforme o táxon



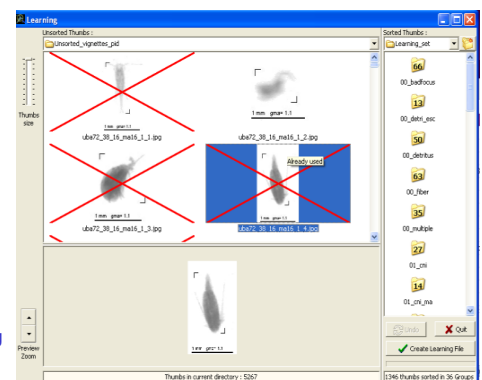
- Após movidas as vinhetas, clique em "Create Learning File"



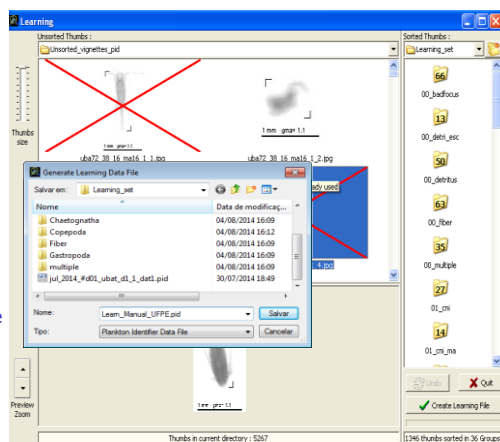
- Caso você tenha movido algum táxon para a pasta errada, abra a pasta e com o botão direito em cima da vinheta e selecione a opção "Move to" e clique na categoria taxonômica correta



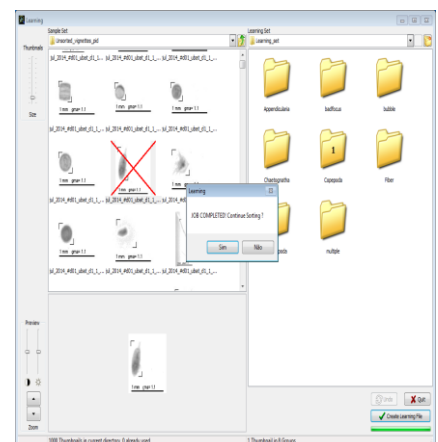
- Note que, as vinhetas que já foram classificadas são automaticamente marcadas com um "X"
- Ao finalizar esta etapa, clique em "Create Learning File"



- Salve sua base de treinamento ("Learning set") renomeando o arquivo. Porém, sempre mantenha o nome **LEARNING**



- Caso você tenha concluído esta etapa e não deseja mais continuar sorteando as vinhetas, clique em "Não"



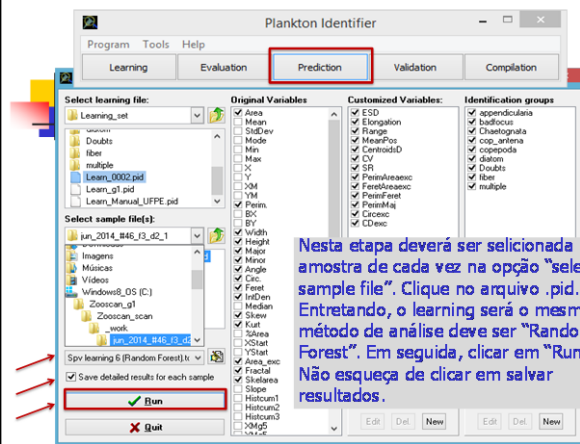


## 10º Passo: No Plankton Identifier → Prediction...

### Fazendo a identificação automática

- Utilizar o método 6 – Random Forest

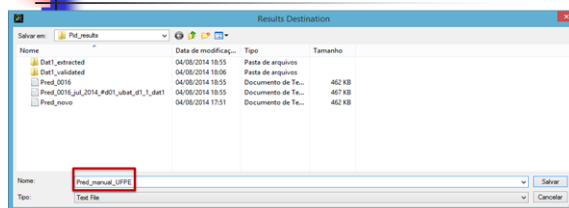
- ✓ Irá fazer a previsão de acordo com a base de treinamento.
- ✓ Escolher o learning set
- ✓ Selecionar uma amostra do seu projeto por vez localizado na pasta work (arquivo pid)
- ✓ Irá salvar na pasta ZooScan\_Results



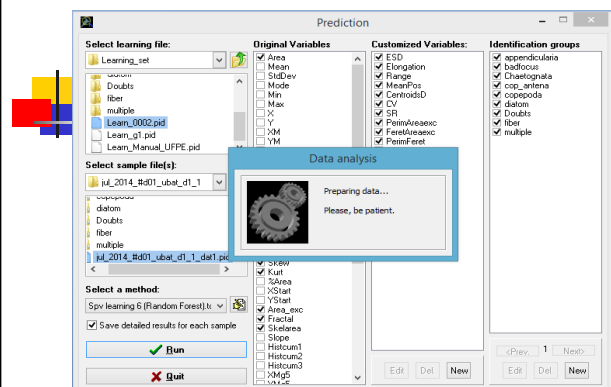
Nesta etapa deverá ser selecionada uma amostra de cada vez na opção "select sample file". Clique no arquivo .pid. Entretanto, o learning será o mesmo. O método de análise deve ser "Random Forest". Em seguida, clicar em "Run". Não esqueça de clicar em salvar resultados.

## 10º Passo: No Plankton Identifier → Prediction...

### Fazendo a identificação automática

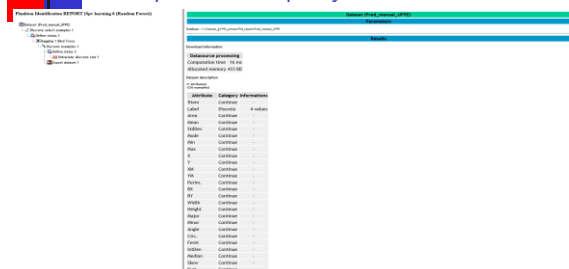


- Salvar o arquivo Pred\_XXX.txt na pasta Pid\_results

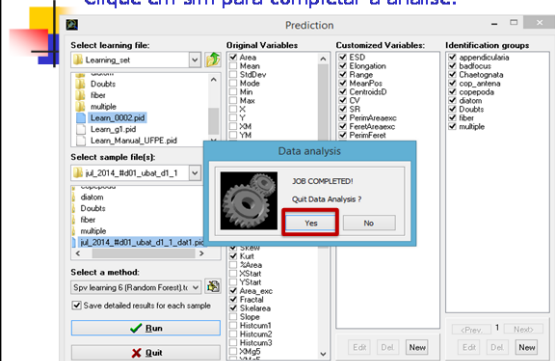


Aguarde com paciência...

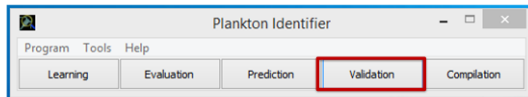
- Esta etapa vai originar uma janela de internet explorer que é a matriz de confusão. Que você pode visualizar e fechar para continuar predição.



- Depois da janela de internet explorer fechada. Clique em sim para completar a análise.

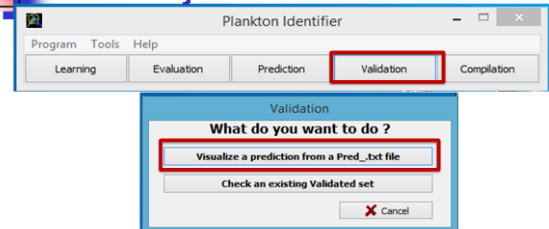


## 11º Passo: No Plankton Identifier → Validação

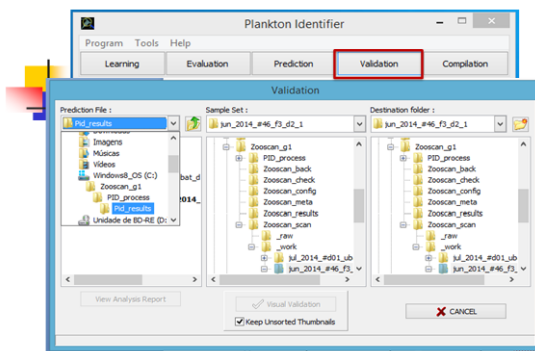


- Fazer a validação manual, "consertando" os erros da classificação automática

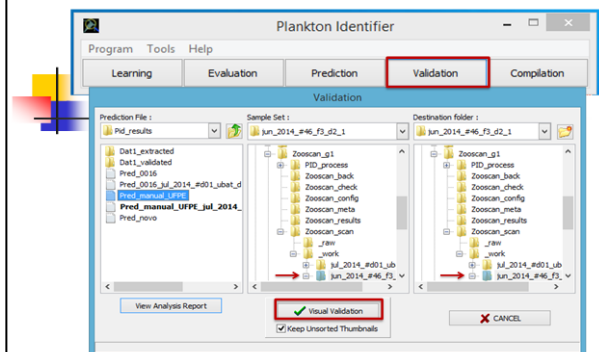
## 11º Passo: No Plankton Identifier → Validação



- Esta é a etapa de verificação da análise automática.
- Clique em Validation e em seguida na opção visualizar predição.

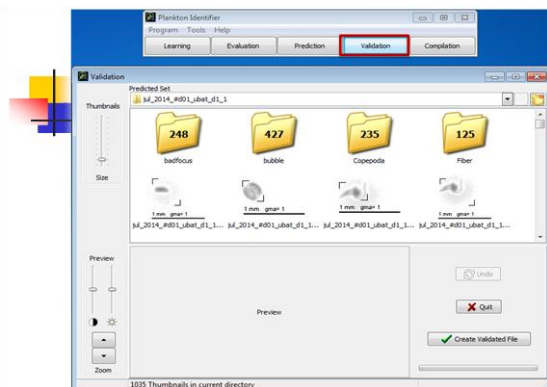


- Nesta etapa selecione o pred\_XXX.txt na pasta prediction que foi salvo na pasta Pid\_results.



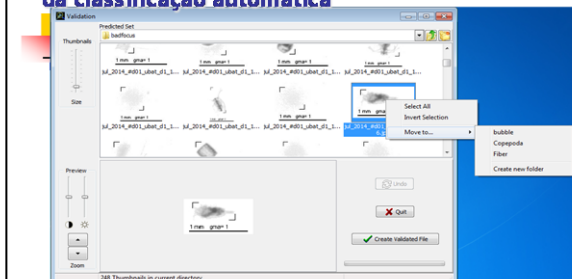
- Selecione o arquivo Pred\_XXX.txt. → Sample Set selecione a amostra a ser validada → Destination folder seleciona a mesma pasta da amostra.

**NOTA:** Etapa é para ser repetida em **TODAS** as amostras



- Abrirá esta janela de Validação

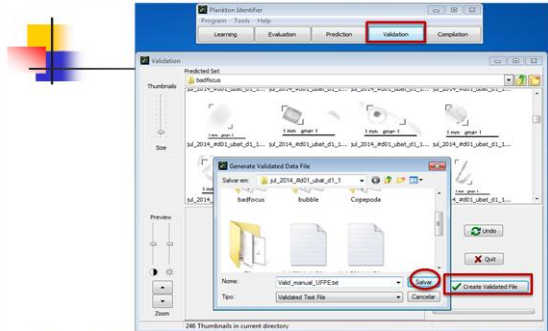
## 11º Passo: Validação → Reclassificando as vinhetas da classificação automática



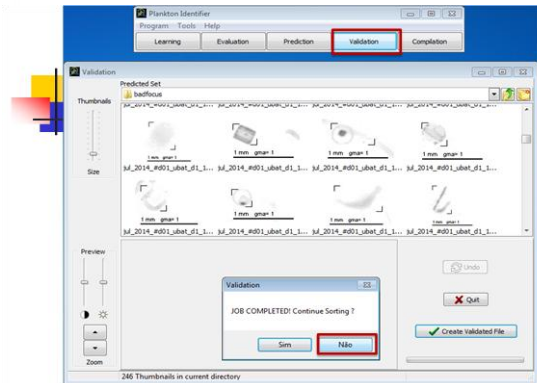
- Entrar em cada janela, como por exemplo, a janela badfocus, e visualizar todas as vinhetas. Caso alguma classificação esteja errada clique em cima da vinheta com o botão direito do mouse e mova para o destino correto.

**NOTA:** Se houver um novo táxon que anteriormente não foi citado, clique em criar nova pasta e renomeie com o novo táxon.

## 11º Passo: Salvando seu arquivo validado ☺!!!



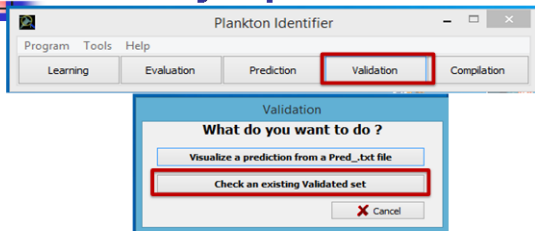
- Depois de relocar os tãxons para os destinos corretos, clique em Create Validated file. E salve sua validação (valid\_XXX.txt)



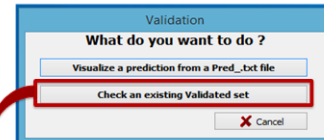
- Clique em não.....



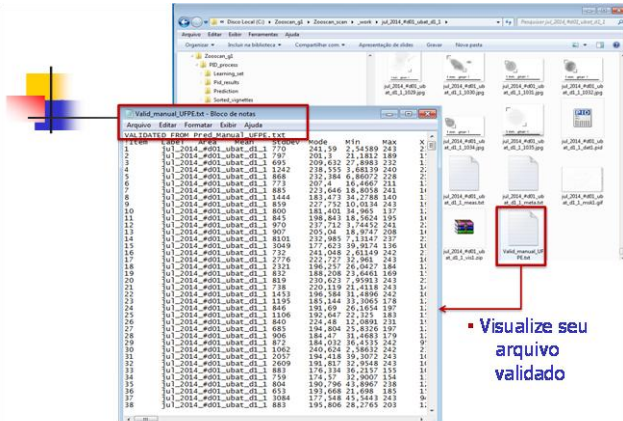
## Vai precisar continuar a validação posteriormente?



## Vai precisar continuar a validação posteriormente?



- E continue normalmente com a sua validação que não havia sido concluída

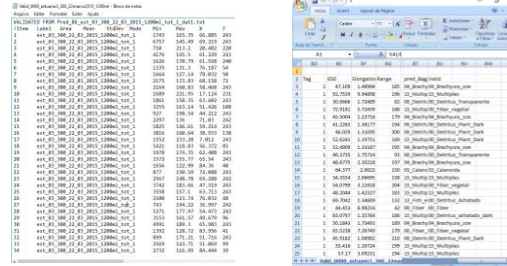


- Visualize seu arquivo validado



## Opções para visualizar um arquivo validado

- Bloco de notas
- Excel



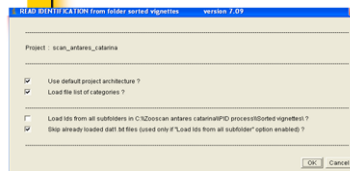


## 12º Passo: Após a validação... → No ImageJ

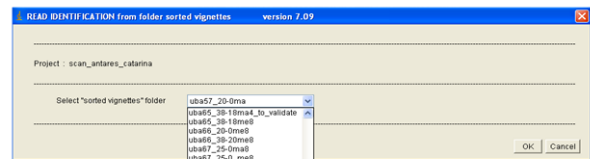
- Clicar em "Load identifications from sorted vignettes"



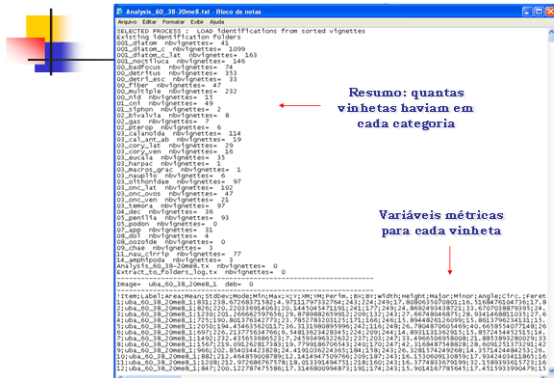
Fornece o erro da análise e gera um arquivo .txt na pasta pid\_results → Dat1\_validated



Finalmente, os arquivos que você quer estão aqui!



## Planilha resultante do erro da análise



## Consultas

(Gorsky et al. 2010 → [http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky\\_2010.pdf](http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky_2010.pdf));

Manual Short Zooproces → [http://www.obs-vlfr.fr/LOV/ZooPart/ZooScan/Download%20Softwares/Zooproces/ZOOSCAN\\_ShortUserManual.pdf](http://www.obs-vlfr.fr/LOV/ZooPart/ZooScan/Download%20Softwares/Zooproces/ZOOSCAN_ShortUserManual.pdf)

Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system

SHORT MANUAL TO WORK WITH THE ZOO SCAN

Please use the following "tools" to learn how to use the ZooScan:

ZooScan Manual (v.6.16) to download in [www.zooscan.com](http://www.zooscan.com)

ZooScan Users Forum: <http://www.zooscan.com/forum>

Gorsky et al. (2010) ZooScan methodological paper: [http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky\\_2010.pdf](http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky_2010.pdf)

Open access link in [www.zooscan.com](http://www.zooscan.com)

[http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky\\_2010.pdf](http://oceanic-obs-vlfr.fr/public/PRIME/Pubs/Gorsky_2010.pdf)

ZOO SCAN WORKING PROTOCOL

Turning on the ZooScan and rinsing the scan tray.

Eliminate marks on the glass and frame and check from time to time if the glass of the ZooScan.com has not moved.

## Recursos para analisar os dados

Planilha de metadados + planilha da validação = Extração e análise dos dados

