

**Desinfeção de ovos do copépode *Acartia
tonsa* (Dana, 1849): viabilidade biológica
e carga bacteriana**

André Gonçalves Mendes

2021

Desinfecção de ovos do copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849): viabilidade
biológica e carga bacteriana

André Gonçalves Mendes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Sérgio
Miguel Leandro e coorientação da Doutora Sónia Cotrim Marques

2021

Título: Desinfecção de ovos do copépode *Acartia tonsa* (Dana, 1849): viabilidade biológica e carga bacteriana.

Copyright © André Gonçalves Mendes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

A aquacultura é um setor em franco crescimento económico, mas que apresenta alguns constrangimentos como a nutrição larvar de algumas espécies nutricionalmente mais exigentes. A superioridade nutricional dos copépodes como alimento vivo pode viabilizar o cultivo destas larvas e *Acartia tonsa* é uma das espécies mais estudadas e com maior potencial. Os ovos de *A. tonsa* podem ser transportados e armazenados durante longos períodos de tempo e funcionar como produto de comercialização e exportação contudo existe a necessidade de assegurar a sua biossegurança.

Neste âmbito, o presente trabalho teve como objetivo testar o potencial de desinfecção de ovos de *A. tonsa* através da utilização de três desinfetantes, azul de metileno, iodopovidona e hipoclorito de sódio, avaliando, no Ensaio 1, a viabilidade biológica dos ovos pós-desinfecção, e, no Ensaio 2, a eficácia microbiológica da desinfecção.

No Ensaio 1, foram avaliadas as taxas de eclosão após um período de incubação de 24 e 48 horas de ovos desinfetados com 9 concentrações de cada desinfetante (azul de metileno: 1, 2, 5, 10, 20, 40 e 100 mg/L; iodopovidona: 2, 5, 10, 20, 40, 80 e 100 mg/L; hipoclorito de sódio: 5, 20, 40, 80, 100, 200, 300 mg/L) durante 6 tempos de exposição (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). O azul de metileno e a iodopovidona mostraram ser desinfetantes menos prejudiciais para a viabilidade dos ovos de *A. tonsa*. O hipoclorito de sódio revelou ser o desinfetante mais nocivo para a viabilidade dos ovos dos três desinfetantes experimentados. A iodopovidona foi o único desinfetante que demonstrou aumentar a viabilidade dos ovos de *A. tonsa*, nomeadamente através da aplicação de 100 mg/L durante 10 minutos de exposição

No Ensaio 2, foram avaliadas as cargas bacterianas de ovos de *A. tonsa* desinfetados com os dois melhores tratamentos de cada desinfetante do Ensaio 1 (azul de metileno: 10 mg/L e 20 mg/L durante 30 minutos; iodopovidona: 20 mg/L durante 30 minutos e 100 mg/L durante 10 minutos; hipoclorito de sódio: 5 mg/L durante 30 minutos e 100 mg/L durante 10 minutos) através da incubação dos ovos pós-desinfecção em dois meios de cultura, *Trypticase Soy Agar* (TSA) e *Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar* (TCBS). A grande maioria das bactérias presentes nos ovos de *A. tonsa* são espécies não pertencentes ao género *Vibrio*. Os tratamentos mais eficazes na diminuição da carga bacteriana genérica e da carga bacteriana de *Vibrio* spp. foram 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos e 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos respetivamente.

Como tratamento de desinfecção dos ovos de *A. tonsa*, é recomendável a aplicação de 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos ou a aplicação de 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos. São necessários trabalhos complementares principalmente sobre a eclosão de ovos desinfetados de *A. tonsa* após diferentes períodos de armazenamento no frio.

Palavras-chave: *Acartia tonsa*, Ovos, Desinfecção, Azul de metileno, Iodopovidona, Hipoclorito de sódio

Abstract

Aquaculture is a sector undergoing rapid economic growth, but it has some constraints such as larval nutrition of some nutritionally more demanding species. The nutritional superiority of copepods as live food can enable larval rearing of these larvae, and *Acartia tonsa* is one of the most studied species with the greatest potential. *A. tonsa* eggs can be transported and stored for long periods and play a role as a commercial and export product, however there is a need to ensure their biosafety.

In this context, the present work aimed to test the disinfection potential of *A. tonsa* eggs using three disinfectants, methylene blue, povidone iodine and sodium hypochlorite, evaluating, in Assay 1, the biological viability of the eggs after disinfection, and, in Assay 2, the microbiological efficacy of the disinfection.

In Assay 1, egg-hatching rates were evaluated after an incubation period of 24 and 48 hours for eggs disinfected with 9 concentrations of each disinfectant (methylene blue: 1, 2, 5, 10, 20, 40 and 100 mg/L; povidone-iodine: 2, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 mg/L; sodium hypochlorite: 5, 20, 40, 80, 100, 200, 300 mg/L) during 6 exposure times (5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes). Methylene blue and povidone-iodine showed to be less harmful disinfectants on the egg viability of *A. tonsa*. Sodium hypochlorite was found to be the most harmful disinfectant on egg viability of the three disinfectants tested. Povidone iodine was the only disinfectant that was shown to increase the viability of *A. tonsa* eggs, specifically in the application of 100 mg/L for 10 minutes.

In Assay 2, bacterial loads of *A. tonsa* eggs disinfected with the two best treatments of each disinfectant in Assay 1 were evaluated (methylene blue: 10 mg/L and 20 mg/L for 30 minutes; povidone-iodine: 20 mg/L for 30 minutes and 100 mg/L for 10 minutes; sodium hypochlorite: 5 mg/L for 30 minutes and 100 mg/L for 10 minutes) by incubating the eggs after disinfection in two growth media, Trypticase Soy Agar (TSA) and Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar (TCBS). Most bacteria present in *A. tonsa* eggs are non-*Vibrio* species. The most effective treatments in reducing the general bacterial load and *Vibrio* bacterial load. were 100 mg/L povidone iodine for 10 minutes and 20 mg/L sodium hypochlorite for 20 minutes, respectively.

As a treatment for disinfecting *A. tonsa* eggs, it is recommended to apply 100 mg/L of povidone iodine for 10 minutes or 20 mg/L of sodium hypochlorite for 20 minutes. Further investigation is needed, especially on egg-hatching of *A. tonsa* disinfected eggs after different periods of cold storage.

Keywords: *Acartia tonsa*, Eggs, Disinfection, Methylene blue, Povidone-iodine, Sodium hypochlorite

Índice

Resumo e Palavras-chave	v
<i>Abstract e Keywords</i>	vii
Índice	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Símbolos, Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	xv
1. Introdução	1
1.1. Importância do alimento vivo em aquacultura	1
1.2. Espécies de alimento vivo	4
1.3. Copépodes e as vantagens da sua utilização	7
1.4. Constrangimentos no cultivo de copépodes em larga escala	9
1.5. Copépodes calanóides – <i>Acartia tonsa</i>	11
1.6. Mais-valia dos ovos de <i>Acartia tonsa</i>	17
1.7. Biossegurança e desinfecção dos ovos de <i>Acartia tonsa</i>	20
2. Materiais e métodos	23
2.1. Estabelecimento e manutenção da cultura parental <i>Acartia tonsa</i>	23
2.2. Recolha dos ovos da cultura de <i>Acartia tonsa</i>	24
2.3. Preparação das diferentes concentrações dos desinfetantes	26
2.4. Protocolo de desinfecção dos ovos de <i>A. tonsa</i>	28
2.5. Ensaio 1: Viabilidade biológica dos ovos de <i>A. tonsa</i> pós-desinfecção	29
2.5.1. Tratamentos e replicados	29
2.5.2. Protocolo experimental	31
2.5.3. Taxa de eclosão	31
2.6. Ensaio 2: Eficácia microbiológica da desinfecção dos ovos de <i>A. tonsa</i>	32
2.6.1. Tratamentos	32
2.6.2. Ensaio 2.1	33
2.6.2.1. Replicados	33
2.6.2.2. Protocolo experimental	34
2.6.3. Ensaio 2.2	34
2.6.3.1. Preparação e plaqueamento dos meios de cultura.....	34
2.6.3.2. Protocolo experimental	35
2.6.3.3. Unidades formadoras de colónias (CFUs).....	36
2.7. Análise estatística	37
3. Resultados	39
3.1. Parâmetros da água da cultura	39

3.2. Número efetivo de ovos incubados	39
3.3. Taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos de controlo	40
3.4. Proporção de ovos eclodidos 24/48 h e a relação com a taxa de eclosão às 48h ..	41
3.5. Taxas de eclosão dos ovos às 48 h do Ensaio 1	43
3.6. Taxas de eclosão dos ovos às 48 h do Ensaio 2.1	54
3.7. CFUs determinadas em meio TSA e TCBS do Ensaio 2.2	56
4. Discussão	59
4.1. Qualidade da água da cultura de <i>A. tonsa</i>	59
4.2. Técnica de desinfeção e de lavagem dos ovos de <i>A. tonsa</i>	59
4.3. Eclosão dos ovos de <i>A. tonsa</i> sem desinfeção	60
4.4. Período de eclosão dos ovos de <i>A. tonsa</i>	61
4.5. Viabilidade biológica dos ovos de <i>A. tonsa</i> pós-desinfeção	63
4.6. Eficácia microbiológica da desinfeção dos ovos de <i>A. tonsa</i>	66
5. Considerações finais e perspetivas futuras	69
6. Referências Bibliográficas	71
7. Anexos	92

Índice de Figuras

Figura 1 - Contribuição da Aquacultura na produção global de pescado. Adaptado de FAO, 2020	2
Figura 2 – Espécimes de <i>Acartia tonsa</i> , na fase adulta (1) (exemplar macho à esquerda, exemplar fêmea à direita) e na fase de náuplio (2). Adaptado de diArk, 2021 e de Alver et al., 2011 respetivamente. Fotomontagem meramente ilustrativa e sem a proporção correta entre as dimensões dos organismos	12
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida do copépode <i>Acartia tonsa</i> . Adaptado de Algae Research Supply, 2021	14
Figura 4 – Ovos de <i>Acartia tonsa</i> , em aglomerado à esquerda e em singular à direita. Fotografado pelo autor, A. G. Mendes, 2020, e adaptado de Salveson, 2013 respetivamente. Relação entre as imagens meramente ilustrativa	17
Figura 5 – Equação utilizada para calcular a taxa de eclosão dos ovos de <i>A. tonsa</i> para os períodos de 24 e 48 horas de incubação	37
Figura 6 – Equação utilizada para calcular as CFUs das amostras de ovos de <i>A. tonsa</i> inoculados em meio TSA e TCBS	42
Figura 7 – Número efetivo de ovos viáveis de <i>A. tonsa</i> incubados por replicado às 0 horas durante o Ensaio 1 ($n = 1296$) e 2.1 ($n = 21$)	45
Figura 8 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h de <i>A. tonsa</i> (barras) e respetivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro) dos tratamentos de controlo (O) do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 54$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 54$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 54$) do Ensaio 1 e também do tratamento de controlo (O) do Ensaio 2.1 ($n = 3$)	46
Figura 9 – Proporções de ovos de <i>A. tonsa</i> eclodidos 24/48 h (%) médias (barras) dos tratamentos de controlo (O), de 5 mg/L e de 100 mg/L do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 54$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 54$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 54$) do Ensaio 1 e também do tratamento de controlo (O) do Ensaio 2.1 ($n = 3$).....	48
Figura 10 – Proporções de ovos de <i>A. tonsa</i> eclodidos 24/48 h (%) médias (barras) dos tratamentos com tempos de exposição de 5, 20 e 30 minutos do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 63$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 63$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 63$) do Ensaio 1	48
Figura 11 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respetivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante azul de metileno (A) e os respetivos tratamentos de controlo (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p > 0,10$) indicadas com um “.”	51

Figura 12 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante iodopovidona (B) e os respectivos tratamentos de controlo (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p < 0,10$) indicadas com um “.” 54

Figura 13 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante hipoclorito de sódio (C) e os respectivos tratamentos de controlo (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p < 0,10$) indicadas com um “.” 57

Figura 14 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre os tratamentos de controlo (0%) e os tratamentos com 5, 20 e 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) após 30 minutos de exposição do Ensaio 1 (barras) ($n = 9$) 59

Figura 15 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre os tratamentos de controlo (0%) e os tratamentos com 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) após 5, 10, 20 e 30 minutos de exposição do Ensaio 1 (barras) ($n = 9$) 59

Figura 16 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro) dos diferentes tratamentos do Ensaio 2.1 ($n = 3$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*” 61

Figura 17 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre o tratamento de controlo (0%) e os restantes tratamentos do Ensaio 2.1 (barras) ($n = 3$) ... 61

Figura 18 – Unidades formadoras de colónias (CFUs) por ovo determinadas em meio TSA (barras claras) e TCBS (barras escuras) para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$) 63

Figura 19 – Unidades formadoras de colónias (CFUs) por ovo determinadas em meio TCBS (barras) para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$) 64

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Potenciais organismos a ser utilizados como alimento vivo em aquacultura. Adaptado de Drillet, 2010	6
Tabela 2 – Diferentes concentrações estabelecidas a serem experimentadas para os três desinfetantes	31
Tabela 3 – Diferentes concentrações das soluções preparadas para os três desinfetantes.....	32
Tabela 4 – Todos os diferentes tratamentos de desinfecção experimentados no Ensaio 1.....	35
Tabela 5 – Tratamentos de desinfecção selecionados e experimentados no Ensaio 2	38
Tabela 6 – Número de tratamentos, replicados e ovos por replicado experimentados no Ensaio 1 e no Ensaio 2.1	39
Tabela 7 – Unidades formadoras de colônias (CFUs) por mL determinadas em meio TSA e TCBS para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$)	62

Página intencionalmente deixada em branco

Lista de Símbolos, Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

et al.	E outros (<i>et alii</i>)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
%	Porcentagem
&	E (“e” comercial)
spp.	Várias espécies do mesmo género (<i>species pluralis</i>)
µm	Micrómetro(s)
HUFA	Ácido gordo altamente insaturado (<i>Highly Unsaturated Fatty Acid</i>)
DHA	Ácido docosahexaenóico (<i>Docosahexaenoic Acid</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenóico (<i>Eicosapentaenoic Acid</i>)
mm	Milímetro(s)
ARA	Ácido araquidónico (<i>Arachidonic Acid</i>)
e.g.	Por exemplo (<i>exempli gratia</i>)
€	Unidade monetária Euro
WoRMS	World Register of Marine Species
°C	Grau(s) Celsius
NI-NVI	Náuplios I a VI
CI-CV	Copepodito I a V
CVI	Copépode adulto
<i>A. tonsa</i>	<i>Acartia tonsa</i>
RAS	Sistema de recirculação de água (<i>Recirculating Aquaculture System</i>)
sp.	Espécie não identificada de um género (<i>species</i>)
L	Litro(s)
UV	Radiação ultravioleta
12L12D	12 horas de luz e 12 horas de escuro (12 h <i>Light</i> : 12 h <i>Darkness</i>)
F/2	Meio de cultivo de Guillard
14L10D	14 horas de luz e 10 horas de escuro (14 h <i>Light</i> : 10 h <i>Darkness</i>)
pH	<i>power of Hydrogen / potential of Hydrogen</i>
DO	Oxigénio Dissolvido (<i>Dissolved oxygen</i>)
mg	Miligramma(s)
mL	Mililitro(s)
i.e.	Isto é (<i>id est</i>)
µL	Microlitro(s)
rpm	Rotações por minuto (<i>revolutions per minute</i>)
N.º	Número
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>

TCBS	<i>Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar</i>
NaCl	Cloreto de sódio
c/	Com
CFU	Unidade formadora de colónias (<i>Colony-Forming Unit</i>)
SD	Desvio-padrão (<i>Standard deviation</i>)
CI	Intervalo de confiança (<i>Confidence Interval</i>)
h	Hora(s)
ANOVA	Análise de variância
<i>p</i>	Valor <i>p</i> (<i>p value</i>)
<i>n</i>	Número de replicados
F1	Geração descendente da geração parental F0
F2	Geração descendente da geração F1

Página intencionalmente deixada em branco

1. Introdução

1.1. Importância do alimento vivo em aquacultura

Desde o final da Segunda Guerra Mundial que a procura de pescado aumentou significativamente (Little et al., 2016). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o consumo de pescado per capita duplicou nos últimos 50 anos (FAO, 2020). Assim, o pescado tornou-se num dos recursos alimentares mais comercializados a nível mundial e com mais interesse da atualidade, representando 17% da proteína animal consumida pela população humana (Ottinger et al., 2015). Contudo, o estado deste recurso tem vindo a deteriorar-se devido à poluição dos oceanos e à sobre-exploração dos *stocks* pesqueiros (Little et al., 2016; FAO, 2020). Grande parte dos *stocks* já se encontram explorados na sua capacidade de carga máxima ou acima desse limite, fazendo dos *stocks* biologicamente sustentáveis uma realidade com um fim à vista (Little et al., 2016; FAO, 2020).

A estagnação nas capturas de pescado selvagem e a crescente necessidade de produtos de pescado impulsionaram e ajudaram a prosperar o setor da aquacultura, um setor que rapidamente conquistou o seu lugar na economia mundial, sendo responsável pelo aumento na oferta de pescado para alimentação humana neste século (Ottinger et al., 2015; FAO, 2020).

A “Aquacultura” define-se como a produção em cativeiro de organismos aquáticos como peixes, moluscos, crustáceos, algas, envolvendo práticas de cultivo que têm como objetivo potenciar o crescimento dos organismos cultivados e maximizar a eficiência na produção destes (FAO, 2015). Contrapõe-se, portanto, às capturas selvagens pela intervenção humana direta no desenvolvimento de uma ou mais fases de vida do organismo, seja na alimentação seja no estabelecimento e manutenção de sistemas onde os cultivos decorrem (FAO, 2015).

A este método de produção estão associados vários benefícios, tal como o aumento do controlo da produção alimentar, o potencial para reduzir a pressão antrópica sobre os recursos marinhos e os oceanos, o incremento significativo da produção de diferentes espécies de pescado, a capacidade para promover repovoamentos naturais (Troell et al., 2014). Porém, pode também ser causa de impactos ambientais negativos como a degradação de ecossistemas aquáticos envolventes às produções, como a transmissão de patologias para o meio natural ou como a introdução e disseminação de espécies não indígenas provenientes das aquaculturas (Troell et al., 2014).

O setor da aquacultura encontra-se em franco desenvolvimento, crescendo mais que qualquer um dos principais setores alimentares, incluindo todos os outros setores de criação animal (FAO, 2020). A produção global de pescado em cativeiro atingiu os 82 milhões de toneladas em 2018, representado assim, 46% do pescado produzido (Figura 1) e 52% do pescado consumido mundialmente (FAO, 2020). O setor verifica-se em constante progresso tecnológico, sendo alvo de um grande investimento por muitos países, caracteriza-se pela inovação nas práticas alimentares, nos sistemas de cultivo e na reprodução de espécies cultivadas, gera mais de 20 milhões de postos de trabalho e encontra-se num próspero crescimento económico, tendo sido avaliado em 250 mil milhões de dólares americanos em 2018, valor superior à avaliação atribuída ao setor pesqueiro (Troell et al., 2014; FAO, 2020).

Assim, a aquacultura possui o potencial para produzir mais e melhor pescado no futuro.

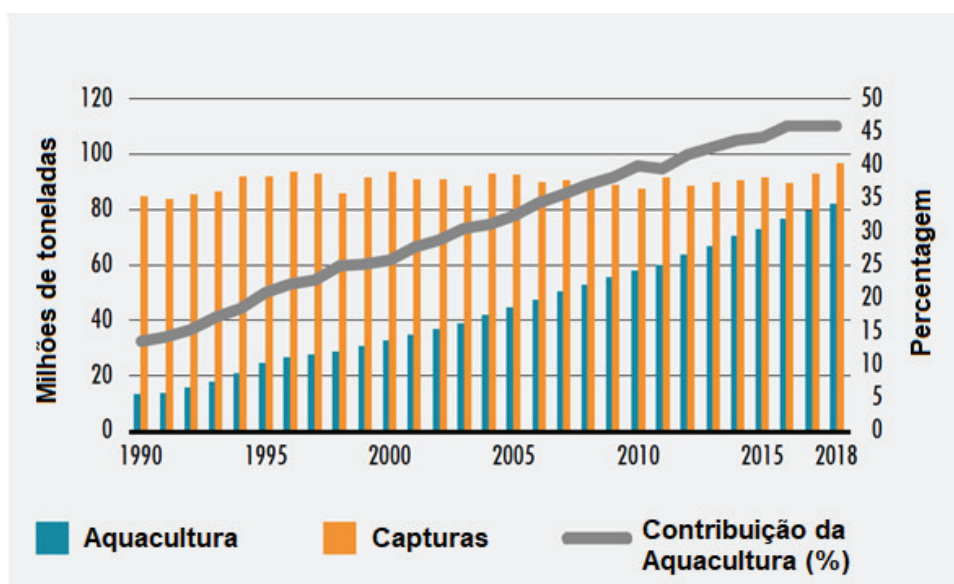


Figura 1 - Contribuição da Aquacultura na produção global de pescado. Adaptado de FAO, 2020.

Espera-se, portanto, que a aquacultura venha a contribuir ainda mais para o setor alimentar com as projeções de crescimento da população mundial assegurando as necessidades alimentares de milhões, com o aumento esperado no consumo de pescado e com a disponibilidade limitada de pescado selvagem (Little et al., 2016; Ottinger et al., 2015).

Até aos anos 70 do século XX a aquacultura dependia quase exclusivamente da captura de pequenos juvenis do meio selvagem para engorda, uma prática insustentável e ultrapassada no final do século, quando muitos dos ciclos de vida começaram a ser fechados alcançando a domesticação completa da maioria das espécies cultivadas, sendo possível reproduzir e desenvolver os animais até à fase adulta em cativeiro (Lavens & Sorgeloos, 1996; Valenti & Moraes-Valenti, 2010). Esta procriação induzida e controlada de adultos reprodutores para obter novas larvas é praticada em instalações designadas de maternidades produzindo, nos dias de hoje, milhões de larvas de peixes, bivalves e crustáceos por todo o mundo (Das et al., 2012; FAO, 2020).

O cultivo de larvas é das etapas mais delicadas em aquacultura, pois as larvas são muito pequenas, extremamente frágeis e ainda fisiologicamente subdesenvolvidas pelo que as maternidades requerem condições e técnicas particulares para a sua manutenção e crescimento, tais como regimes alimentares específicos e um controlo rigoroso de patologias (Lavens & Sorgeloos, 1996; Das et al., 2012). De salientar que o reduzido diâmetro bucal e o desenvolvimento incompleto tanto dos órgãos sensoriais como do sistema digestivo são fatores que limitam a ingestão e, acima de tudo, a digestão de alimento inerte por parte das larvas (Lavens & Sorgeloos, 1996; Rasdi & Qin, 2016).

Por conseguinte, nas maternidades, a alimentação das larvas realiza-se através da administração de outros organismos de menor dimensão, também vivos e produzidos em cativeiro, designados por “alimento vivo” (Conceição et al., 2010; Rasdi & Qin, 2016). O alimento vivo é administrado aquando da transição entre a alimentação endógena e exógena e durante o desenvolvimento inicial do organismo variando de espécie para espécie (Olivotto et al., 2010; Abate et al., 2015).

Estes organismos são seres planctónicos, ocupam níveis tróficos primários e secundários e integram a base de todas as teias alimentares dos ecossistemas aquáticos (Das et al., 2012; Dhont et al., 2013). O zooplâncton, em concreto, apresenta-se como a principal dieta da maioria das larvas de peixe e crustáceos no meio natural sendo, por isso, considerado um recurso valioso no setor da aquacultura, estritamente crucial para o sucesso das maternidades (Das et al., 2012; Abate et al., 2015).

As larvas são predadoras visuais, acostumadas a capturar presas em movimento (Conceição et al., 2010). Como tal, o zooplâncton, ao movimentar-se pela coluna de água dos cultivos larvares, promove a sua deteção e estimula um comportamento predatório por parte das larvas que, após a captura, também o digerem com facilidade devido ao elevado teor em água e aos finos exosqueletos (Conceição et al., 2010; Das et al., 2012; Rasdi & Qin, 2016). Independentemente da fácil captura e da boa digestibilidade, o zooplâncton apresenta um elevado valor nutricional para as larvas contendo nutrientes essenciais para

o seu desenvolvimento, tais como aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas, pigmentos, esteróis, proteínas, lípidos entre outros (Conceição et al., 2010; Das et al., 2012).

A utilização de alimento vivo e, em particular, de zooplâncton para alimentação das larvas nas maternidades é, portanto, essencial e imprescindível consistindo numa dieta apropriada e rica em nutrientes essenciais (Dhont et al., 2013; Rasdi & Qin, 2016).

No entanto, a nutrição larvar tornou-se no maior constrangimento para o cultivo de muitas espécies sobretudo marinhas (Sargent et al., 1999; Rasdi & Qin, 2016; Jayalakshmi & Santhanam, 2019). Uma nutrição inadequada aumenta a taxa de mortalidade larvar e o número de larvas com malformações (Sargent et al., 1999; Rasdi & Qin, 2016). Por isso, a produção de organismos zooplanctónicos mais nutritivos e adequados às necessidades nutricionais das larvas é extremamente relevante para fornecer larvas de qualidade superior ao mercado, com taxas de sobrevivência e de crescimento mais elevadas, contribuindo para um aumento de produtividade e redução de custos na aquacultura (Fleeger, 2005; Das et al., 2012; Abate et al., 2015).

1.2. Espécies de alimento vivo

Atualmente, as espécies de zooplâncton mais usadas como alimento vivo nas maternidades são os rotíferos (*Brachionus* spp.) e a artémia (*Artemia* spp.), principalmente no cultivo larvar de organismos marinhos (Støttrup & McEvoy, 2008; Ferreira, 2009; Conceição et al., 2010; Dhont et al., 2013).

Os rotíferos, de menores dimensões (120-300 µm), são usualmente administrados durante os primeiros dias de alimentação exogénea das larvas, uma vez que muitas espécies apresentam aberturas bucais pequenas (Støttrup & McEvoy, 2008; Ferreira, 2009; Rasdi & Qin, 2016). A artémia, mais concretamente os náuplios e metanáuplios de artémia, apresentam dimensões superiores (450-800 µm) e, embora possam também servir como primeira alimentação para algumas espécies, é mais comum serem administrados mais tarde às larvas, e durante o restante desenvolvimento até estas serem capazes de ingerir e processar dietas inertes (Støttrup & McEvoy, 2008; Ferreira, 2009; Rasdi & Qin, 2016).

A vantagem da artémia prende-se com o facto de poder ser preservada em seco ou em salmoura durante longos períodos sob a forma de cistos recolhidos diretamente da natureza para posterior utilização (Lavens & Sorgeloos, 1996; Ferreira, 2009).

Ambas as espécies, antes de serem administradas às larvas, precisam de ser alimentadas com microalgas e assim enriquecidas nutricionalmente por forma a satisfazer muitas das necessidades nutricionais das larvas, particularmente em ácidos gordos, sendo este enriquecimento fundamental para muitos organismos aquáticos, nomeadamente peixes marinhos (Watanabe et al., 1983, Das et al., 2012; Ferreira, 2009).

As técnicas de cultivo destes organismos zooplanctónicos já se encontram otimizadas, existindo protocolos estabelecidos e relativamente simples para a produção intensiva de rotíferos e para a descapsulação e crescimento da artémia, sendo, por isso, espécies muito comercializadas e de fácil obtenção (Støttrup & McEvoy, 2008; Ferreira, 2009). Deste modo, os cultivos larvares atuais ajustaram-se, na sua maioria, à utilização destes organismos como alimento vivo, contribuindo para o sucesso na produção de larvas mais de 70 espécies de peixe e crustáceos essencialmente marinhas (Das et al., 2012).

Ainda que moderadamente eficazes como alimento vivo para o desenvolvimento larvar, estas espécies apresentam-se como um fator limitante para as maternidades pois, mesmo enriquecidos, apresentam perfis nutricionais incapazes de assegurar o melhor desenvolvimento, potenciar a resistência a patologias e maximizar a sobrevivência de larvas muitas espécies marinhas de interesse (Watanabe et al., 1983; Olivotto et al., 2010; Rasdi & Qin, 2016). Carecem principalmente de ácidos gordos altamente insaturados (HUFAs) essenciais, que as larvas são incapazes de sintetizar, como o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA), mas, por vezes, também de aminoácidos, de minerais e de vitaminas, sendo insuficientes as quantidades destes nutrientes adquiridas através do enriquecimento em microalgas, comprometendo assim o cultivo de espécies com exigências mais específicas (Watanabe et al., 1983; Conceição et al., 2010; Olivotto et al., 2010).

Podem também apresentar um tamanho inadequado para a sua ingestão, mesmo os rotíferos, no caso de algumas espécies marinhas com larvas recém-eclodidas muito pequenas e diâmetros bucais reduzidos (Holt, 2003; Marcus, 2005).

A artémia tem ainda o constrangimento de ser um produto de elevado custo de aquisição que constitui uma relevante fatia das despesas das maternidades, e, para além de dispendiosa, também apresenta preços oscilantes e disponibilidade incerta visto que a quase totalidade dos cistos utilizados globalmente são provenientes de grandes lagoas salinas dos Estados Unidos da América, onde as alterações climáticas podem gerar uma rutura nos stocks e a inflação dos preços (Drillet et al., 2006b; Abate et al., 2015).

Apesar de todas estas desvantagens são, ainda assim, administrados nas maternidades impossibilitando o cultivo de várias espécies marinhas muito procuradas, ornamentais e/ou de elevado valor comercial, cujas larvas não se desenvolvem com administração de rotíferos nem artémia (Morehead et al., 2005; Rasdi & Qin, 2016). Por isso, é de extrema importância a produção de alimento vivo mais adequado e ideal para a nutrição larvar representando este, um dos maiores desafios na indústria da aquacultura (Mahjoub et al., 2013; Santhanam et al., 2019b).

Existem outros tipos de organismos que podem ser utilizados como alimento vivo na aquacultura, todavia nenhuma das alternativas foi intensivamente explorada devido a dificuldades encontradas no crescimento, armazenamento ou no transporte destas presas (Tabela 1).

Tabela 1 – Potenciais organismos a ser utilizados como alimento vivo em aquacultura. Adaptado de Drillet (2010).

Sistemas marinhos e salobros	Sistemas de água doce
<ul style="list-style-type: none"> • Nematoda • Copepoda • Appendicularia • Larvas trocóforas • Larvas de poliqueta 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Daphnia</i> • <i>Moina</i>

Entre os organismos potenciais, os copépodes são os melhores candidatos a alimento vivo alternativo dos rotíferos e da artémia, são reconhecidos como provável solução para cultivar espécies nutricionalmente mais exigentes e apresentam, inclusivamente, provas dadas na otimização de protocolos de cultivos larvares já existentes (Støttrup, 2000; Holt, 2003; Jayalakshmi & Santhanam, 2019). Tendo isso em vista, a utilização de copépodes como alimento vivo poderá resultar num incremento sustentado da produção de espécies marinhas e, conseqüentemente, traduzir-se num progresso considerável para a indústria da aquacultura (Støttrup, 2000; Payne et al., 2001; Støttrup, 2006).

1.3. Copépodes e as vantagens da sua utilização

Os copépodes são também organismos zooplânctônicos, cujo estágio de náuplio pode apresentar dimensões inferiores a 100 µm e os indivíduos adultos variam entre 1 e 5 mm de comprimento (Lavens & Sorgeloos, 1996; Støttrup & McEvoy, 2008). A subclasse Copepoda reúne perto de 12000 espécies e integra o subfilo dos crustáceos, sendo um dos metazoários mais numerosos do planeta tanto em abundância como em riqueza específica e constituindo cerca de 80% da biomassa do mesozooplâncton costeiro. Estes organismos habitam numa grande variedade de massas de água, desde oceânicas a lagunares e estuarinas e representam um elo importante na transferência de nutrientes e energia desde os produtores primários até às larvas de espécies marinhas sustentando inúmeras teias alimentares (Ianora, 2005; Støttrup & McEvoy, 2008; Drillet, 2010; Rasdi & Qin, 2016). As larvas de peixe alimentam-se de náuplios de copépodes e os juvenis consomem copépodes adultos (Kleppel et al., 2005; Das et al., 2012).

Os copépodes têm sido então estudados devido ao papel fundamental que desempenham nos ecossistemas aquáticos, em particular os ovos e os náuplios de copépodes, que são a principal fonte de alimento das larvas de espécies marinhas durante as primeiras semanas de vida estando presentes na maioria dos tratamentos digestivos e chegando muitas vezes a representar 90-100% da sua dieta (Turner, 1984; Chesney, 2005; Olivotto et al., 2010).

Alimentam-se de fitoplâncton rico em HUFAs, importante para o seu metabolismo, crescimento e reprodução, e caracterizam-se pela elevada fecundidade, pelo rápido desenvolvimento e pelo largo espectro de comprimentos que varia entre os diferentes estádios, náuplios, copepoditos e os adultos, e difere também entre as diversas espécies podendo, portanto, ser utilizados como alimento em aquacultura desde os primeiros dias de alimentação exógena até à introdução do alimento inerte (Buskey, 2005; van der Meeren et al., 2008; Santhanam et al., 2019a). Particularmente em cultivos de larvas com desenvolvimento altricial e, em especial, na alimentação de pequenas larvas de espécies tropicais com bocas muito reduzidas, uma vez que os náuplios de copépodes apresentam dimensões suficientemente pequenas (Uye, 2005; Santhanam et al., 2019b).

Assim, o interesse nos copépodes tem vindo a crescer e, apesar de não serem normalmente utilizados nas maternidades, a sua administração tem sido alvo de intensa pesquisa impulsionada pelos bons resultados que apresenta (Støttrup et al., 1998; Payne et al., 2001; Shields et al., 2005; Santhanam et al., 2019a). Inúmeros estudos apontam para a superioridade nutricional dos copépodes, tanto em termos quantitativos como qualitativos, apresentando-se como uma dieta compatível, apropriada e eficaz para as

larvas de organismos marinhos, sobretudo larvas de exigência nutricional mais elevada (Watanabe et al., 1983; van der Meeren et al., 2008; Ajiboye et al., 2011).

Estes organismos possuem um perfil lipídico e de ácidos gordos superior dado que, contêm, e algumas espécies sintetizam, concentrações elevadas de HUFAs essenciais, como o DHA, o EPA e o ácido araquidónico (ARA), mantêm os rácios adequados de DHA/EPA e de EPA/ARA exigidos pelas larvas de peixes marinhos e possuem até 90% do total de ácidos gordos na forma de fosfolípidos, que são mais fáceis de digerir e potenciam a assimilação de outros nutrientes (Watanabe et al., 1983; Støttrup, 2003; van der Meeren et al., 2008; Conceição et al., 2010; Rasdi & Qin, 2016; Santhanam et al., 2019b). Adicionalmente, dispõem de uma maior eficácia na assimilação de outros nutrientes através das microalgas apresentando teores proteicos razoáveis e um bom perfil de aminoácidos, em particular aminoácidos essenciais e sob a forma livre, concentrações consideráveis de pigmentos como a astaxantina e de vitaminas como a vitamina A, C e E e quantidades apreciáveis de minerais, especialmente de iodo (Lavens & Sorgeloos, 1996; Støttrup, 2003; van der Meeren et al., 2008; Conceição et al., 2010).

Portanto, ao contrário dos rotíferos e do artémia, os copépodes não necessitam de ser enriquecidos nem perderão rapidamente o seu valor nutricional devido à lixiviação ou excreção (van der Meeren et al., 2008; Dhont et al., 2013).

Todas estas qualidades dietéticas superiores dos copépodes conferem múltiplos benefícios para a performance das larvas de espécies marinhas, e.g., um aumento da taxa de sobrevivência, um maior crescimento, uma melhor e normal pigmentação, um incremento do peso corporal, um funcionamento ótimo do sistema imunitário e uma maior resistência a doenças e patologias, um aumento da tolerância ao stress e uma melhor morfo- e esqueletogénese, que resulta num menor número de malformações e numa taxa de metamorfose bem-sucedidas mais elevada (Toledo et al., 2005; van der Meeren et al., 2008; Conceição et al., 2010).

Estes efeitos benéficos fomentam a produção de larvas de qualidade superior, com um desenvolvimento mais saudável e normal e encontram-se extensamente descritos tanto quando os copépodes são administrados em exclusivo e como substituto, como quando são administrados em conjunto com rotíferos ou artémia, em dietas combinadas ou apenas como suplemento (Nanton & Castell, 1998; Evjemo et al., 2003; Morehead et al., 2005; Phelps et al., 2005; Toledo et al., 2005; Rajkumar, 2006; Olivotto et al., 2008; Sun et al., 2013; Karlsen et al., 2015).

Para além disso, os copépodes apresentam uma digestibilidade superior pelo facto de sintetizarem um conjunto de enzimas digestivas exógenas que beneficiam e potencializam a digestão da larvas recém-eclodidas (Lavens & Sorgeloos, 1996; Rasdi & Qin, 2016; Jayalakshmi & Santhanam, 2019). Sofrem uma passagem mais lenta e demorada pelo tubo digestivo das larvas, sendo mais facilmente digeridos e contribuindo para uma maior assimilação de nutrientes (Pedersen, 1984; Olivotto et al., 2010; Drillet, 2010).

Outra das vantagens dos copépodes é a sua seletividade preferencial por parte das larvas, inclusive em dietas combinadas ou suplementadas com rotíferos e artémia, nas quais os copépodes tendem não só a ser mais capturados, por serem mais conspícuos e palatáveis, como também desencadeiam um comportamento predatório generalizado funcionando como estímulo visual e químico (Buskey, 2005; Chesney, 2005; Olivotto et al., 2010). A grande diversidade de espécies de copépodes e dos seus estádios (náuplio, copepodito e adulto) mostra-se promissora e parece corresponder à multiplicidade de atributos exigida pela enorme variedade de larvas e respetivas características que condicionam a competência predatória, tais como a dimensão, a acuidade visual e a capacidade natatória (Buskey, 2005; Chesney, 2005).

Os copépodes são ainda um produto ambientalmente sustentável, visto que a sua obtenção e comercialização não depende nem explora recursos naturais, e com um fornecimento estável e consistente ao longo do ano, já que são cultivados sob gestão e influência exclusivamente antrópica, o que não se verifica com a artémia (Drillet et al, 2011c; Abate et al., 2015). Por outro lado, podem também contribuir para um decréscimo da pressão sobre os *stocks* naturais e proteger habitats delicados como os recifes de coral ao viabilizar o cultivo larvar de espécies ornamentais com requisitos mais específicos muito procuradas e altamente valorizadas na aquariofilia (Holt, 2003; Olivotto et al., 2010; Drillet et al, 2011c).

1.4. Constrangimentos no cultivo de copépodes em larga escala

Sendo a superioridade dos copépodes para o desenvolvimento e nutrição de larvas marinhas tão clara e evidente seria expectável que a utilização de copépodes como alimento vivo nas maternidades fosse predominante, o que está longe de coincidir com a realidade. Os copépodes não são comercialmente produzidos, pelo menos em larga escala, nem frequentemente administrados nas maternidades (Støttrup, 2003; Mahjoub et al., 2013; Abate et al., 2015).

A sua produção resume-se a explorações *in situ* e sob regime extensivo ou semi-intensivo realizadas através do transporte de colheitas de *blooms* naturais para tanques exteriores (Drillet et al., 2006b; Drillet, 2010; Franco et al., 2017). Apesar do interesse ser crescente, vários obstáculos que têm inviabilizado a produção intensiva e em larga escala de copépodes.

Um dos principais constrangimentos à produção intensiva e utilização de copépodes nas maternidades é a ausência de protocolos e técnicas de cultivo eficientes (Conceição et al., 2010; Dhont et al., 2013; Rasdi & Qin, 2016). Em cativeiro, os copépodes apresentam uma fraca produtividade, dificuldades em atingir densidades elevadas, requerem muitos cuidados e uma manutenção elaborada e as suas culturas são de complexo maneio (Uye, 2005; Vu et al., 2017; Kaviyarasan & Santhanam, 2019). A escassez de informação e a falta de conhecimentos da indústria e dos aquacultores sobre estes organismos acentuam todos estes desafios (Drillet et al., 2006b; Jepsen et al., 2007; Drillet et al., 2011c). Outro obstáculo a ser superado é a identificação das espécies de copépodes mais compatíveis para o cultivo em larga escala. Atualmente, em laboratório foram já cultivadas com êxito mais de 60 espécies, contudo, entre estas ou outras ainda não cultivadas, existiram algumas mais aptas à produção intensiva (Drillet et al., 2006b; Støttrup, 2006; Kaviyarasan & Santhanam, 2019). Advém, portanto, a necessidade de selecionar espécies ideais para regimes mais intensivos, possivelmente espécies mais tolerantes a grandes variações de temperatura e salinidade e que apresentem curtos intervalos inter-geracionais (Rippingale & Payne, 2005; Støttrup, 2006; Drillet et al., 2008b).

Por último e não menos importante, coloca-se a questão da viabilidade económica e se os cultivos intensivos de copépodes serão lucrativos. Tanto o decréscimo significativo das taxas de mortalidade larvares como a qualidade superior das larvas produzidas são argumentos fortes para o aumento de produtividade e a rentabilidade das maternidades (Drillet et al., 2011c; Abate et al., 2015). Sabe-se ainda que os copépodes são um produto muito valorizado no mercado variando os preços de aquisição entre 30 e 200 € por mil indivíduos adultos e 150 e 350 € por milhão de ovos, dependendo da espécie e do fornecedor (Drillet et al., 2011c; Abate et al., 2015). Como tal, os copépodes apresentam potencial para ser uma alternativa rentável e até mais barata que o alimento vivo convencional embora sejam necessárias avaliações económicas e de custo-benefício sobre a produção intensiva e a utilização de copépodes como alimento vivo antes da sua afirmação comercial e de uma possível competição pelo mercado com os rotíferos e a artémia (Rippingale & Payne 2005; Drillet et al., 2011c).

Logo, de modo a ultrapassar todos estes constrangimentos e corresponder à necessidade da indústria em produzir copépodes em larga escala, é necessário mais investigação e conhecimento científico sobre as características e a biologia deste grupo taxonómico e as suas espécies, como por exemplo identificar os fatores determinantes na regulação das dinâmicas populacionais ou otimizar os parâmetros de cultivo, tal como é fundamental desenvolver métodos e tecnologias que possibilitem a intensificação das culturas de copépodes (Støttrup, 2003; Drillet et al, 2011c; Dhont et al., 2013; Mahjoub et al., 2013).

1.5. Copépodes calanóides – *Acartia tonsa*

No setor da aquacultura, as espécies de copépodes cultivadas com maior sucesso e que apresentam melhores resultados em produções intensivas pertencem às ordens Calanoida, Harpacticoida e Cyclopoida (O'Bryen & Lee, 2005; Støttrup, 2006; Dhont et al., 2013). Das três, a ordem Calanoida é vista como a mais promissora pelos investigadores (Mauchline, 1998; Marcus, 2005; Dhont et al., 2013).

Os copépodes calanóides predominam em meio marinho sendo o grupo de zooplâncton mais abundante e com maior biomassa nos ambientes costeiros e estuarinos, chegando a representar cerca de 90% do zooplâncton e constituindo tanto o primeiro como a maioria do alimento consumido pelas larvas pelágicas destas regiões (Mauchline, 1998; Uye, 2005; Dos Santos et al., 2006). Os calanóides caracterizam-se por todas as fases de desenvolvimento ocorrerem na coluna de água, pelo longo par de anténulas com um comprimento igual ou superior ao corpo sendo, por isso, facilmente identificáveis e fáceis de isolar do meio selvagem, pelo facto de as fêmeas gerarem desovas diárias libertando os ovos na água durante um extenso período fértil, e pela capacidade de muitas das espécies produzirem ovos de dormência (Mauchline, 1998; Marcus, 2005; Dos Santos et al., 2006).

Embora bastante vantajosa por tolerar um largo espectro de condições ambientais, por possuir os náuplios dimensões muito reduzidas e por produzir ovos que podem ser recolhidos e armazenados como os cistos de artémia, a ordem Calanoida também apresenta algumas desvantagens tais como a rápida evasão e resposta antipredatória, uma maior exigência nutritiva necessitando de microalgas ricas em HUFAs essenciais uma vez que carece dos mecanismos metabólicos para os sintetizar, uma maior dificuldade de cultivo por serem mais sensíveis ao maneo e menos tolerantes a águas de qualidade

deteriorada e à presença de espécies contaminantes, e densidades de cultivo menores precisando de volumes de água maiores para evitar efeitos negativos, entre os quais elevadas mortalidades, canibalismo, fecundidade reduzida e diminuição nas taxas de eclosão dos ovos (Mauchline, 1998; Kiørboe et al., 1999; Buskey & Hartline, 2003; Rhodes & Boyd, 2005; Uye, 2005; Støttrup, 2006; Drillet et al, 2011c).

As espécies de calanóides mais estudadas e com maior potencial integram os géneros *Acartia* spp., *Calanus* spp., *Centropages* spp., *Eurytemora* spp. e *Gladioferens* spp. (Lavens & Sorgeloos, 1996; Mauchline, 1998; Marcus, 2005; Conceição et al., 2010; Dhont et al., 2013).

A espécie de copépode calanóide utilizada para a realização deste trabalho foi *Acartia tonsa* (Dana, 1849) (Figura 2), classificada taxonomicamente, segundo WoRMS (2014), como pertencente ao reino Animalia, filo Arthropoda, subfilo Crustacea, superclasse Multicrustacea, classe Hexanauplia, subclasse Copepoda, infraclasse Neocopepoda, superordem Gymnoplea, ordem Calanoida, família Acartiidae, e, por fim, género *Acartia*.

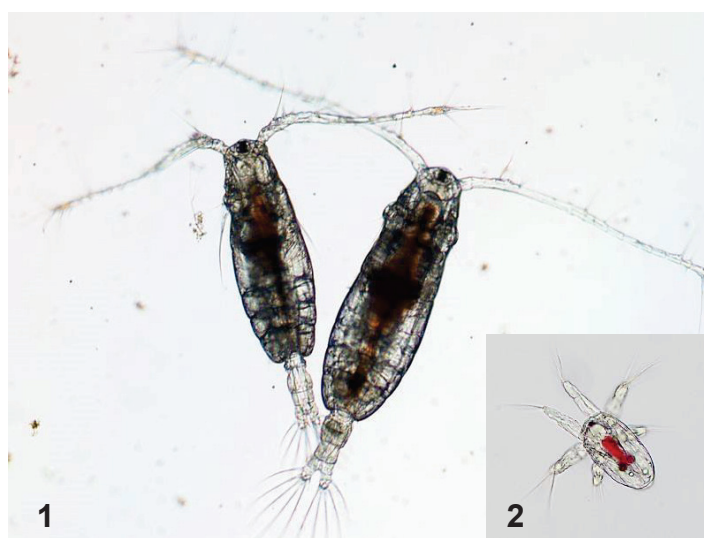


Figura 2 – Espécimes de *Acartia tonsa*, na fase adulta (1) (exemplar macho à esquerda, exemplar fêmea à direita) e na fase de náuplio (2). Adaptado de diArk (2021) e de Alver *et al.* (2011) respetivamente. Fotomontagem meramente ilustrativa e sem a proporção correta entre as dimensões dos organismos.

O pequeno e pelágico crustáceo copépode *A. tonsa* é uma espécie marinha, de águas temperadas e subtropicais embora também ocorra em águas boreais, com uma distribuição geográfica global e cosmopolita sendo o calanóide mais comum na maior parte dos mares e oceanos (Ogle et al., 2005; Leandro et al., 2006; Peck & Holste, 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Vitiello et al., 2016; Hagemann et al., 2016; Jørgensen et al., 2019). Habita zonas neríticas e de pouca profundidade, principalmente em ambientes costeiros e estuarinos dominando assim a maior parte das comunidades zooplanctônicas (Heinle, 1966; Paffenhöfer & Stearns, 1988; Ogle et al., 2005; Leandro et al., 2006; Holmstrup et al., 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Drillet et al., 2008a).

É uma espécie euritérmica e eurlialina que tolera temperaturas entre 1 e 32 °C e salinidades entre 1 e 72 e que apresenta, portanto, uma elevada plasticidade adaptativa a diferentes condições ambientais nomeadamente através de estratégias de dinâmica populacional diferentes (Cervetto et al., 1999; Gaudy et al., 2000; Chinnery & Williams, 2004; Peck & Holste, 2006; Peck et al., 2015). Em águas mais quentes ocorre durante todo o ano, já em águas mais frias exibe flutuações populacionais sazonais ocorrendo apenas durante os meses mais quentes (Heinle, 1966; Ambler, 1985; Kleppel, 1992; Leandro et al., 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Sullivan et al., 2007; Jørgensen et al., 2019).

Acartia tonsa é uma espécie omnívora e oportunista, consumindo preferencialmente fitoplâncton e matéria orgânica em suspensão através de um comportamento filtrador e passivo, embora possa alimentar-se também de ciliados ou dos próprios ovos e náuplios através de um comportamento predatório de captura ativa e emboscada (Allan & Heinle, 1976; Roman, 1984; Stoecker & Sanders, 1985; Gifford & Dagg, 1988; Jonsson & Tiselius, 1990; Saiz & Kiørboe, 1995; Kiørboe et al., 1996; Marcus & Wilcox, 2007; Drillet et al., 2011a; Drillet et al., 2014).

É um organismo que apresenta doze estádios de desenvolvimento, eclode como náuplio I (NI), com cerca de 120 µm de comprimento, de seguida percorre mais cinco estádios naupliares (NII-NVI), posteriormente alcança o estádio de copepodito I (CI), depois realiza mais cinco mudas (CI-CVI) até atingir finalmente a maturidade sexual e a fase de copépode adulto (CVI), com aproximadamente 1,5 mm de comprimento (Figura 2) (Figura 3) (Dos Santos et al., 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Drillet et al., 2008b; Drillet, 2010).

Reproduzem-se apenas sexualmente, os machos adultos copulam as fêmeas utilizando as anténulas e os pleópodes para se agarrarem e depositando o esperma para a fertilização dos ovos que, mais tarde, são libertados individualmente pelas fêmeas, através do poro genital, diretamente na coluna de água e durante um período contínuo de 3 a 4 semanas (Figura 3). Por fim, os ovos afundam devido à flutuabilidade negativa e

acabam por eclodir novamente em náuplios I (Figura 3) (Marcus, 2005; Støttrup, 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Vitiello et al., 2016; Jørgensen et al., 2019).

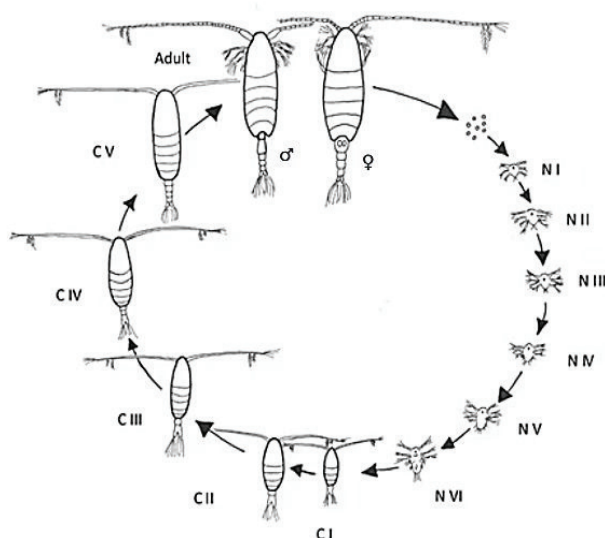


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida do copépode *Acartia tonsa*. Adaptado de Algae Research Supply, 2021.

São animais constituídos por um cefalossoma, um metassoma e um urossoma (Mauchline, 1998; Dos Santos et al., 2006; Marcus & Wilcox, 2007). Apresentam longas anténulas derivadas do rostro que usam como mecano- e quimiorreceptores e para a sua deslocação característica em ziguezague seguida um pequeno deslizamento, em conjunto com pleópodes (Lavens & Sorgeloos, 1996; Barroso et al., 2013; Drillet et al., 2014). Possuem também pares de mandíbulas, maxilas e maxilípedes que utilizam para processar e ingerir o alimento, e ainda um olho naupliar simples fotossensível à intensidade da luz (Lonsdale et al., 1979; Stearns & Forward, 1984; Mauchline, 1998; Ferrari & Dahms, 2007).

Exibem dimorfismo sexual, sendo diferenciados pelo tamanho – fêmeas maiores, pela curvatura e comprimento das anténulas – fêmeas com anténulas mais compridas e menos curvas, pelo número de sómitos do urossoma – fêmeas com quatro e machos com cinco, e pelos pleópodes – fêmeas com pleópodes mais espessos e filamentosos e machos com o 5.º par assimétrico e mais desenvolvido (Figura 2) (Figura 3). Os machos apresentam ainda muito menor longevidade que as fêmeas (Gilbert & Williamson, 1983; Mauchline, 1998; Dos Santos et al., 2006; Marcus & Wilcox, 2007).

Possuem um desenvolvimento rápido, cerca de 12-15 dias até a fase adulta, e praticamente isócrono, com estádios de desenvolvimento de igual duração (Miller et al., 1977; Leandro et al., 2006; Støttrup, 2006). Tanto este desenvolvimento como a eclosão dos ovos, cerca de 24-48 horas, está estritamente ligado à temperatura da água, obtendo

períodos de desenvolvimento e eclosão mais curtos a temperaturas mais elevadas (Leandro et al., 2006; Vitiello et al., 2016; Jørgensen et al., 2019).

De origens indo-pacíficas, invadiu os restantes oceanos do globo ocasionando diferentes populações com características variáveis, conforme a zona geográfica, resultantes de condições climáticas e habitats diferentes (Caudill & Bucklin, 2004; Drillet et al., 2008a; Drillet et al., 2008b; Jørgensen et al., 2019). Exibem assim uma grande variabilidade genética, fenotípica, comportamental, fisiológica e ecológica, sendo já consideradas pelos investigadores como diferentes estirpes de *A. tonsa* (Caudill & Bucklin, 2004; Drillet et al., 2008a; Drillet et al., 2008b; Drillet, 2010; Hansen et al., 2016).

Além disso, em virtude de ser uma espécie com múltiplos cultivos a decorrer em diferentes laboratórios distribuídos pelo globo, estabelecidos com organismos de origens diferentes, mantidos em diferentes condições e com durações e número de gerações diferentes, a espécie em cativeiro sofreu mais diferenciação, provocada por diferentes pressões seletivas e derivas genéticas, divergindo, ainda mais, nas suas características de cultivo para cultivo, apresentando diferenças ao nível do comprimento corporal, dos períodos de desenvolvimento, das taxas de crescimento e mortalidade diárias, da sensibilidade ao manuseamento, do ritmo circadiano, da composição bioquímica, da fecundidade das fêmeas, do tamanho dos ovos, do período de eclosão, da taxa de eclosão e da viabilidade dos ovos após armazenamento no frio (Tiselius et al., 1995; Drillet et al., 2008a; Drillet et al., 2008b; Hansen et al., 2016; Jepsen et al., 2017).

Neste aspeto, os copépodes cultivados na Dinamarca parecem ser os mais promissores, superiores às outras estirpes na maior parte dos aspetos de interesse, existindo ainda a possibilidade de ser otimizada através seleção artificial de características hereditárias mais desejáveis para o cultivo intensivo e utilização como alimento vivo (Drillet et al., 2008a; Drillet et al., 2008b; Hammervold et al., 2015; Hansen et al., 2016).

Acartia tonsa é, portanto, uma espécie já cultivada para experimentação e investigação em laboratório e para administração, em pequena escala, como alimento vivo em cultivos larvares de algumas espécies de peixes e invertebrados marinhos (Munk & Kiørboe, 1985; Støttrup et al., 1986; Schipp et al., 1999; Wilcox et al., 2006; Hansen, 2011; Barroso et al., 2013; Øie et al., 2017; Højgaard et al., 2018). Serve também como espécie bioindicadora para avaliações ambientais e testes ecotoxicológicos e ainda como modelo para estudos ecofisiológicos de vários habitats (Durbin et al., 1983; Kiørboe et al., 1985; Kiørboe & Nielsen, 1994; Saiz & Kiørboe, 1995; Medina et al., 2002; Wollenberger et al., 2003; Medina & Barata, 2004; Bielmyer et al., 2006; Nielsen et al., 2006; Richmond et al.,

2006; Bellas & Thor, 2007; Gorbi et al., 2012; Vitiello et al., 2016; Krause et al., 2017; Bellas & Gil, 2020).

A enorme potencialidade para aquacultura prende-se no facto de ser das espécies de manutenção menos complexa e com um desenvolvimento mais rápido entre os calanóides, de possuir um largo espetro de dimensões adequadas à ingestão pelas larvas, de apresentar uma elevada produtividade de ovos, de ocorrer globalmente permitindo cultivos locais e de possibilitar o armazenamento e transporte dos ovos funcionando como produto de comercialização e exportação para os mercados globais (O'Bryen & Lee, 2005; Holmstrup et al., 2006; Leandro et al., 2006; Hansen et al., 2016; Vitiello et al., 2016; Hagemann et al., 2017).

Por isso, existem já metodologias e técnicas de cultivo para *A. tonsa*, inclusive manuais para a sua produção em cativeiro, ainda que seja necessário otimizar algumas condições de cultivo e definir protocolos específicos para o cultivo intensivo, surgindo propostas alternativas e inovadoras como a automatização dos sistemas e dos processos de cultivo e a produção dos copépodes em sistemas de recirculação de água (RAS) (Zillioux, 1969; Marcus & Wilcox, 2007; Alver et al., 2011; Elliott & Tang, 2011; Drillet et al., 2011c; Abate et al., 2015; Jepsen et al., 2017).

Os cultivos de *A. tonsa* apresentam também algumas dificuldades tais como necessitarem de alimento sempre disponível, por utilizarem rapidamente os nutrientes recém-ingeridos sem desenvolver reservas lipídicas, e de elevada qualidade, microalgas bastante nutritivas ricas em azoto e fósforo, permitirem apenas densidades reduzidas sem efeitos negativos e apresentarem alguma sensibilidade ao manuseamento, ao arejamento, à tensão superficial da água e ao efeito da gravidade (Dagg, 1977; Tester & Turner, 1990; Tiselius, 1992; Jones et al., 2002; Medina & Barata, 2004, O'Bryen & Lee, 2005; Støttrup, 2006; Marcus & Wilcox, 2007; Franco et al., 2017; Jepsen et al., 2017; Vu et al., 2017).

Tendo em vista a mitigação destas desvantagens e a otimização dos cultivos desta espécie têm sido estudadas diversas variáveis de cultivo, bióticas e abióticas, tais como, as dietas, incluindo diferentes espécies de microalgas, alimentação com ciliados ou processados vegetais, a temperatura, a salinidade, o fotoperíodo, a intensidade e comprimento de onda da luz, o oxigénio dissolvido na água, o regime alimentar e a disponibilidade de alimento, a utilização de probióticos e preparados bacterianos, os níveis de amónia e outros produtos de excreção na água e a interação entre muitas delas (Zillioux, 1969; Breteler, 1980; Turk et al., 1982; Houde & Roman, 1987; Stoecker & Egloff, 1987; Berggreen et al., 1988; Støttrup & Jensen, 1990; Besiktepe & Dam, 2002; Broglio et al., 2003; Marcus et al., 2004; Peck & Holste, 2006; Jepsen et al., 2007; Drillet et al., 2011a;

Drillet et al., 2014; Zhang et al., 2015; Jepsen et al., 2015; Franco et al., 2017; Jepsen et al., 2017; Vu et al., 2017).

Apesar do cultivo de *A. tonsa* em larga escala evidenciar ainda algumas limitações e questões por solucionar, a sua comercialização e introdução nas maternidades mostra-se, no presente, uma realidade possível e viável. Abate *et al.* (2015) apresenta um estudo empírico de viabilidade económica baseado numa cultura de *A. tonsa* na Dinamarca e os resultados revelam que a produção comercial e intensiva de *A. tonsa* é economicamente rentável e competitiva relativamente a outras produções existentes de alimento vivo como de rotíferos, especialmente visando os ovos como produto final para a comercialização.

1.6. Mais-valia dos ovos de *Acartia tonsa*

Os ovos da espécie *A. tonsa* são esféricos, com um diâmetro entre 75-85 μm , de coloração azul-escura, cobertos de pequenos espinhos e mais densos que a água salgada, podendo ser recolhidos através de sifonagem do fundo dos cultivos (Figura 4) (Drillet et al., 2006a; Marcus & Wilcox, 2007; Hansen et al., 2010; Hansen et al., 2016; Jørgensen et al., 2019).

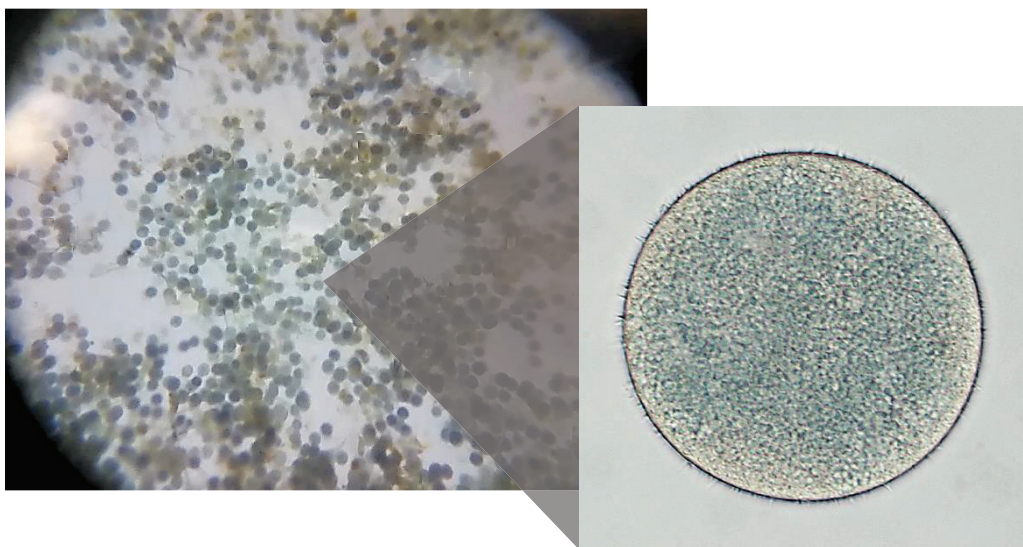


Figura 4 – Ovos de *Acartia tonsa*, em aglomerado à esquerda e em singular à direita. Fotografado pelo autor, A. G. Mendes, 2020, e adaptado de Salvesson, 2013 respetivamente. Relação entre as imagens meramente ilustrativa.

Em cativeiro, cada fêmea apresenta fecundidades entre 25 e 50 ovos/L por dia, durante ciclos reprodutivos de 5-6 dias, dependendo da disponibilidade e da qualidade do alimento, da densidade e do fotoperíodo dos cultivos, podendo as culturas produzir mais de 10 000 ovos/L por dia (Parrish & Wilson, 1978; Støttrup & Jensen, 1990; Jónasdóttir, 1994; Kleppel & Burkart, 1995; Tiselius et al., 1995; Kleppel et al., 1998; Medina & Barata, 2004; Støttrup, 2006; Peck & Holste, 2006; Peck et al., 2008; Zhang et al., 2015; Hagemann et al., 2016; Franco et al., 2017). Já o período de eclosão e a taxa de eclosão dos ovos são influenciados não só pela alimentação e densidade dos progenitores, mas também pela temperatura, salinidade e fotoperíodo tanto do cultivo dos progenitores como da água de incubação dos ovos (Uye & Fleminger, 1976; Ban & Minoda, 1994; Jónasdóttir & Kiørboe, 1996; Støttrup et al., 1999; Broglio et al., 2003; Holste & Peck, 2006; Peck & Holste, 2006; Peck et al., 2008; Hansen et al., 2010; Teixeira et al., 2010; Zhang et al., 2015; Hagemann et al., 2016; Jepsen et al., 2017).

As fêmeas de *A. tonsa*, como de muitos calanóides, têm a capacidade de produzir dois tipos de ovos, os ovos ditos “normais” e os ovos de dormência (Holmstrup et al., 2006; Drillet, 2010).

Os ovos normais são ovos de desenvolvimento imediato após a desova sob condições ambientais favoráveis, em que a embriogênese e a eclosão acontecem no período de 1-2 dias (Figura 4) (Marcus & Wilcox, 2007; Drillet, 2010; Jørgensen et al., 2019).

Os ovos de dormência são ovos que entram num estado de diapausa após a desova, em que a embriogênese se encontra suspensa e a eclosão não acontece durante um período refratário obrigatório de muitos meses a anos independentemente das condições ambientais, comportando-se como ovos normais após esse período (Holmstrup et al., 2006; Drillet et al., 2008a; Drillet, 2010). Estes ovos são caracterizados por um tegumento endurecido e uma atividade metabólica muito reduzida, sendo maioritariamente produzidos como resposta adaptativa a condições ambientais desfavoráveis de longa duração, possivelmente baixas temperaturas, fotoperíodos com menos horas de luz e/ou condições anóxicas, embora também sejam produzidos numa fração muito reduzida durante condições ambientais favoráveis (Leandro et al., 2006; Holmstrup et al., 2006; Peck & Holste, 2006; Ohs et al., 2009; Jørgensen et al., 2019). Um terceiro tipo é proposto por alguns investigadores, ovos de eclosão atrasada, são ovos essencialmente normais e com as mesmas características, em que a eclosão apenas acontece após um período de algumas semanas, sendo este tipo muito pouco expressivo (Drillet, 2010; Hansen & Drillet, 2013; Vitiello et al., 2016).

Apesar de todo o interesse e elevada aplicabilidade dos ovos de dormência na aquacultura, não têm sido possível produzi-los em laboratório e de forma consistente nem interromper artificialmente o seu período refratário, sendo, portanto, de momento irrealista a utilização destes ovos na indústria (Ohs et al., 2009; Hansen et al., 2016). Assim, tem sido experimentada e apontada como solução a utilização dos ovos normais, aproveitando outro processo de adaptação da espécie a condições ambientais adversas, o estado de quiescência (Drillet et al., 2006b; Drillet et al., 2007; Drillet, 2010; Hansen et al., 2016).

O estado de quiescência dos ovos normais é um estado de “repouso” em que os ovos suspendem a sua embriogénese, tal como no estado de diapausa, mas apenas durante o período das condições ambientais desfavoráveis retomando o desenvolvimento e eclodindo quando as condições voltarem a ser favoráveis (Drillet, 2010; Hagemann et al., 2016; Hansen et al., 2016; Jørgensen et al., 2019).

Este estado é uma resposta adaptativa a alterações ambientais mais súbitas e tem sido facilmente replicado e induzido em laboratório através da diminuição abrupta da temperatura (Drillet et al., 2006b; Vitiello et al., 2016; Kaviyarasan & Santhanam, 2019). Os ovos, acabados de recolher, são armazenados no frio a temperaturas de refrigeração (2-4 °C) forçando o estado de quiescência e permanecendo viáveis durante semanas a meses (Støttrup et al., 1999; Drillet et al., 2006b; Holmstrup et al., 2006; Kaviyarasan & Santhanam, 2019). Por exemplo, Drillet *et al.* (2006b) apresenta uma elevada taxa de eclosão (>70%) para ovos de *A. tonsa* armazenados no frio durante 11 meses, sem afetar o *fitness* tanto da geração resultante como das gerações seguintes e mantendo um perfil nutricional relevante para alimentação larvar.

A capacidade dos ovos em permanecer no estado de quiescência e de conservar a sua viabilidade durante longos períodos de armazenamento poderá estar relacionada com o seu diâmetro, a sua ontogénese e o seu metabolismo (Støttrup et al., 1999; Nielsen et al., 2006; Drillet et al., 2007; Hansen et al., 2016). Recentemente têm sido experimentados, em sinergia com a temperatura reduzida, outros fatores como baixas salinidades, condições de hipoxia e anoxia e até tratamentos incluindo crioprotetores e antibióticos tendo como objetivo maximizar os períodos de armazenamento dos ovos sem comprometer as taxas de eclosão (Lutz et al., 1992; Marcus & Lutz, 1994; Holmstrup et al., 2006; Drillet et al., 2007; Højgaard et al., 2008; Ohs et al., 2009; Hansen et al., 2012; Jørgensen et al., 2019).

Esta técnica de armazenamento dos ovos para posterior eclosão é, assim, uma alternativa com grande potencial para as maternidades, afigurando-se como um produto prático e conveniente, análogo aos cistos de artémia (Drillet et al., 2006b; Drillet, 2010; Das et al., 2012; Abate et al., 2015). Possibilita o transporte e o comércio dos ovos para outros locais do globo, para utilizar como alimento vivo ou iniciar novos cultivos, e permite também o armazenamento de ovos em stocks, servindo para uma futura e não imediata alimentação das larvas ou como reserva e garantia dos cultivos decorrentes, no caso de declínio populacional ou contaminação (Drillet et al, 2011c; Abate et al., 2015; Hansen et al., 2016).

Os ovos normais de *A. tonsa* são, portanto, propícios e muito promissores para a aquacultura porque são fáceis e baratos de produzir, porque decorrem de uma normal e diária reprodução, porque estão disponíveis em grandes quantidades, porque são robustos e mais resistentes que os náuplios, porque requerem pouco espaço para armazenamento, e porque eclodem, na sua grande maioria, em náuplios no período de 24-48 horas sem períodos refratários ou condições de incubação particulares (Drillet et al., 2006a; Holmstrup et al., 2006; Jepsen et al., 2015; Hansen et al., 2016; Hagemann et al, 2017). Não obstante, a utilização generalizada de ovos de *A. tonsa* pelo setor da aquacultura enfrenta alguns desafios, entre os quais a necessidade imperativa de garantir a biossegurança destes ovos (Drillet et al, 2011c).

1.7. Biossegurança e desinfeção dos ovos de *Acartia tonsa*

A necessidade de assegurar a biossegurança dos ovos, isto é, o controlo e a prevenção de ocorrência de organismos patogénicos, aplica-se a vários cenários em aquacultura, tais como na utilização de ovos como inóculo de futuros náuplios de *A. tonsa* para alimentação dos cultivos larvares das maternidades, na colheita selvagem com o intuito de começar uma cultura sem contaminações e na recolha de ovos das culturas como medida de biossegurança passiva, ou ativa no caso já estarem contaminadas, seja para reforçar cultivos em declínio seja para recomeçar novas culturas, livres de contaminações e espécies infestantes (Naess & Bergh, 1994; Støttrup & McEvoy, 2003; Toledo et al., 2005; Drillet et al., 2007; Drillet et al, 2011c; Hagemann et al, 2016).

Estas espécies contaminantes, muitas vezes patogénicas, são usualmente microrganismos oportunistas epibióticos, como bactérias, fungos, vírus, cianobactérias ou microalgas que se associam ao tegumento do ovo, todavia ocorrem também contaminações de ciliados, protozoários e outros microrganismos planctónicos que proliferam na água dos cultivos e que se associam aos copépodes e aos ovos, utilizando-

os como hospedeiro intermediário para parasitar os organismos que os consomem (Naess & Bergh, 1994; Lavens & Sorgeloos, 1996; Støttrup, 2003; Phelps et al., 2005; Su et al. 2005; Toledo et al., 2005; Gugliandolo et al., 2008; Drillet et al, 2011c; Hagemann et al, 2016).

Todos estes organismos podem representar fontes ou vetores de patologias para a cadeia alimentar em aquacultura, desde os copépodes, passando pelos peixes e crustáceos até ao ser humano, ou apenas provocar efeitos negativos nos cultivos, seja por competição pelos mesmo espaço e recursos, seja pela alteração das propriedades físico-químicas da água e pela perturbação da microbiota e eventualmente da flora intestinal, que acaba por prejudicar o estado de saúde e capacidade digestiva principalmente das larvas, tornando-as mais suscetíveis a doenças e resultando em malformações e grandes mortalidades (Lavens & Sorgeloos, 1996; O'Bryen & Lee, 2005; Morehead et al., 2005; Su et al. 2005; Peck & Holste, 2006). Estes efeitos nefastos encontram-se amplamente descritos tanto para o alimento vivo convencional, existindo técnicas de descontaminação e produtos especializados, nomeadamente para a artémia sendo os cistos descapsulados e descontaminados com hipoclorito de sódio, como para espécies de copépodes e em particular *A. tonsa*, já tendo sido relatada a presença de patógenos e espécies contaminantes em meio selvagem e de cultivo (Sochard et al., 1979; Lavens & Sorgeloos, 1996; Lo et al., 1996; Douillet, 1998; Morehead et al., 2005; Su et al. 2005; Rawlings et al., 2007; Gugliandolo et al., 2008; Steinfeldt and Nielsen, 2010; Hagemann et al, 2016).

Em cativeiro e mesmo numa esfera mais controlada, sob medidas de esterilização e higiene regular, estes organismos surgem nas culturas derivados muito provavelmente de uma esterilização incompleta da água captada e utilizada, ou da alimentação dos cultivos com microalgas contaminadas e não axénicas, ou possivelmente ainda de material partilhado e não exclusivo para cada cultura (Lavens & Sorgeloos, 1996; Morehead et al., 2005; Conceição et al., 2010).

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo testar o potencial de desinfeção de ovos de *A. tonsa* através da utilização de diferentes desinfetantes, tendo em vista um futuro procedimento de descontaminação como medida profilática. Os desinfetantes avaliados para esse efeito foram o azul de metileno ($C_6H_9I_2NO$), a iodopovidona ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) e o hipoclorito de sódio ($NaClO$), a diferentes concentrações e tempos de exposição, no sentido de avaliar, primeiro a viabilidade biológica dos ovos pós-desinfeção através da taxa de eclosão, e segundo a eficácia microbiológica da desinfeção através da carga bacteriana dos ovos pós-desinfeção. Estes desinfetantes foram selecionados pela sua facilidade de obtenção e acesso, pelo seu reduzido custo de aquisição e pela sua versatilidade, sendo dos mais utilizados em aquacultura.

Página intencionalmente deixada em branco

2. Materiais e métodos

2.1. Estabelecimento e manutenção da cultura parental *Acartia tonsa*

A cultura parental de *A. tonsa* foi estabelecida no centro de investigação CETEMARES – Politécnico de Leiria em Peniche, Portugal, no início do janeiro de 2020, através da incubação de cerca de 150 000 ovos recolhidos no final de dezembro e provenientes das culturas do National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua) da Technical University of Denmark em Kongens Lyngby, Dinamarca.

Estes ovos foram incubados em 3 tanques cilíndricos de 15 L cada, contendo água salgada, filtrada e esterilizada por UV, proveniente de uma captação de água em profundidade. A cultura foi mantida a uma temperatura de 21 ± 1 °C, a uma salinidade de 30 ± 1 e sujeita a um arejamento fraco constante fornecido através de pipetas serológicas, mangueiras flexíveis de borracha e torneiras de fluxo plásticas. O arejamento é procedente de um sistema de bombas de ar atmosférico. A cultura foi também submetida a um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (12L12D).

Os copépodes foram alimentados de 2 em 2 dias com microalgas e em regime *ad libitum*. Contudo, foi tomada sempre atenção para não administrar microalga em excesso, acrescentando apenas a quantidade estritamente necessária para conferir uma tênue coloração à água dos cilindros.

A dieta de microalgas consistiu essencialmente em criptófitas *Rhodomonas* spp. (*Rhodomonas baltica* e *Rhodomonas lens*) embora, semanalmente e como suplemento, também fossem administradas em menores quantidades a diatomácea *Thalassiosira weissflogii* ou o cocolitóforo *Isochrysis* sp. (T-Iso), sensivelmente numa proporção de 3:1. De salientar que, no dia anterior aos trabalhos experimentais, foi tomado o cuidado prévio de alimentar a cultura exclusivamente com *Rhodomonas baltica*.

Todas as microalgas administradas foram cultivadas em balões de 1 L e carboys de 10 L, com arejamento forte e utilizando meio de cultivo F/2 modificado. Estes cultivos de microalgas ocorreram numa sala de temperatura controlada a 20 °C, iluminação com lâmpadas de halogénio e fotoperíodo de 14L10D.

Para uma correta manutenção do cultivo parental, procedeu-se à sifonagem dos tanques e correspondentes trocas parciais de água a cada 3 dias.

O volume do cilindrocónico era sifonado e transferido para três baldes de 5 L, em seguida o tanque era lavado com água doce corrente e novamente preenchido com 2/3 de água nova às condições-padrão, depois era cuidadosamente devolvido ao cilindrocónico o balde com o primeiro volume sifonado e os restantes dois eram triados com o auxílio de vários crivos, de 200 µm, de 125 µm e de 75 µm, com o intuito de remover a matéria orgânica particulada, detritos das microalgas, excrementos e restos mortais dos copépodes, e de separá-la dos diferentes estádios de desenvolvimento dos copépodes, recorrendo à fototaxia positiva, e dos ovos, recorrendo a lavagens sucessivas com um esguicho, devolvendo todos eles, por fim, à cultura. Este processo era repetido e realizado para os três tanques cilindrocónicos.

A salinidade e o arejamento foram verificados diariamente, sendo a salinidade medida através do refratómetro digital Hanna Instruments® HI 96822 e devidamente ajustada no caso de não ser igual a 30, e o funcionamento do arejamento observado e corrigido no caso de não se encontrar numa intensidade fraca.

Por último, foram efetuados registos semanais dos parâmetros da cultura como o pH, o oxigénio dissolvido (DO) (mg/L), a amónia (mg/L), os nitritos (mg/L) e os nitratos (mg/L). O pH e o DO foram medidos através da submersão de uma sonda multiparamétrica YSI® Professional Plus e a amónia, os nitritos e os nitratos obtidos através da realização de testes *kit* da marca API® a amostras da cultura.

2.2. Produção de ovos da cultura de *Acartia tonsa*

Assim que a cultura foi estabelecida com sucesso, ou seja, após atingir uma densidade aproximada de 0,5 copépodes/mL, começaram a ser recolhidas desovas de 2 em 2 dias. Primeiramente para armazenamento numa camara frigorífica a 4 °C, de modo a constituir um *stock* de reserva de ovos como *backup*. Posteriormente para dar início aos ensaios utilizando apenas o número de ovos necessário para o trabalho experimental a realizar sendo o restante número também armazenado no frio, por forma a atualizar o *stock* de reserva armazenando ovos mais recentes, dada a viabilidade dos ovos ser inversamente proporcional à duração do período de refrigeração.

A recolha dos ovos da cultura foi concretizada do seguinte modo: primeiro, eram interrompidos os arejamentos durante 2 minutos, a seguir, após os ovos se depositarem, o fundo dos tanques era minuciosamente sifonado para um balde de 5 L, depois o volume desse balde era submetido a sucessivas crivagens por malhas de 200 μm , de 125 μm e de 75 μm de modo a separar e devolver os copépodes à cultura retendo os ovos, nomeadamente no crivo de 75 μm onde eram extensamente lavados com um esguicho, por último, os ovos eram transpostos para um tubo tipo Falcon™ de 15 mL. De seguida, estes ovos recolhidos eram ou armazenados, ou contabilizados para o trabalho experimental.

Para armazenamento no frio era usado o mesmo tubo da recolha dos ovos, o volume total do tubo era perfeito com a adição de água a 30 de salinidade por forma a residir o mínimo de ar dentro do tubo após ser encerrado com a respetiva tampa, sendo, depois, devidamente identificado, a abertura selada com papel *parafilm* e coberto exteriormente com papel de alumínio antes de ser armazenado na câmara frigorífica a 4 °C.

Para utilização nos trabalhos experimentais eram realizadas cinco sucessivas amostragens de 10 μL ao tubo após este ter sido perfeito até aos 15 mL. Estas amostragens eram pipetadas sequencialmente com recurso a uma micropipeta mecânica P20 para uma placa de Petri com grelha de contagem, cada uma após uma agitação unidirecional do tubo durante 15 segundos seguida de cinco inversões consecutivas do tubo. Em seguida, procedia-se à contagem dos ovos viáveis, i.e., ovos fertilizados, presentes nas cinco amostras à lupa Leica Microsystems © EZ4 E e era estimado, a partir dos ovos contados e do volume amostrado, o número de ovos total existente no tubo da recolha dos ovos. Por fim, após nova homogeneização do tubo, era pipetado com uma micropipeta mecânica P5000 o volume correspondente ao número de ovos necessário para o trabalho experimental para outro tubo e armazenado o tubo da recolha com os ovos sobrantes executando o procedimento de armazenamento acima descrito.

De referir que os ovos viáveis distinguem-se dos não viáveis por apresentarem uma coloração azul visivelmente escura, quase preta apresentado um efeito visual pigmentado, ao invés de uma coloração azul-clara e desvanecida, parecendo vazios de conteúdo. Estes ovos não viáveis degradam-se rapidamente aquando da incubação, sendo possível observar um halo de filamentos, de origem bacteriana ou fúngica, associado ao tegumento, que acaba por depois lhe atribuir uma coloração castanha opaca.

2.3. Preparação das diferentes concentrações dos desinfetantes

Para a realização dos ensaios foram anteriormente preparadas as soluções dos três desinfetantes às diferentes concentrações.

As soluções do desinfetante azul de metileno (desinfetante A) foram obtidas a partir de dissoluções do azul de metileno Merck KGaA © Methylene blue (C.I. 52015) Reag. Ph Eur, encontrado no estado sólido e em pó, em água a 30 de salinidade, previamente microfiltrada por crivos de 0,22 µm e autoclavada em fracos de vidro tipo Schott DURAN® de 1 L, sendo os microgramas de azul de metileno pesados numa balança Sartorius AG © TE124S e diluídos por forma a alcançar as concentrações pretendidas para os trabalhos experimentais. As soluções do desinfetante iodopovidona (desinfetante B) e do desinfetante hipoclorito de sódio (desinfetante C) foram obtidas a partir de diluições das soluções originais, Betadine® solução cutânea PVP-I 100 mg/mL à concentração de 100 000 mg/L e Megaclean © HLX-65 7,5% à concentração de 75000 mg/L respetivamente, sendo acrescentada água a 30 de salinidade também microfiltrada e autoclavada de modo a obter as concentrações desejadas.

Todas as soluções foram preparadas individualmente e à chama, sendo acomodadas em tubos tipo Falcon™ de 50 mL estéreis e individualizados, com o auxílio de micropipetas mecânicas P20, P100 e P1000 e pontas novas. Por último, os tubos foram cobertos exteriormente com papel de alumínio e armazenados no escuro para posterior utilização.

As diferentes concentrações estabelecidas para três desinfetantes a serem experimentadas no decorrer dos ensaios foram as seguintes listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes concentrações estabelecidas a serem experimentadas para os três desinfetantes.

Azul de metileno (A)	Iodopovidona (B)	Hipoclorito de sódio (C)
<ul style="list-style-type: none">• 1 mg/L (A1)	<ul style="list-style-type: none">• 2 mg/L (B2)	<ul style="list-style-type: none">• 5 mg/L (C5)
<ul style="list-style-type: none">• 2 mg/L (A2)	<ul style="list-style-type: none">• 5 mg/L (B5)	<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L (C20)
<ul style="list-style-type: none">• 5 mg/L (A5)	<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L (B10)	<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L (C40)
<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L (A10)	<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L (B20)	<ul style="list-style-type: none">• 80 mg/L (C80)
<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L (A20)	<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L (B40)	<ul style="list-style-type: none">• 100 mg/L (C100)
<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L (A40)	<ul style="list-style-type: none">• 80 mg/L (B80)	<ul style="list-style-type: none">• 200 mg/L (C200)
<ul style="list-style-type: none">• 100 mg/L (A100)	<ul style="list-style-type: none">• 100 mg/L (B100)	<ul style="list-style-type: none">• 300 mg/L (C300)

Estas concentrações foram delineadas com base na seguinte bibliografia:

Azul de metileno (Carvalho, 2004; Chambel et al., 2014; Sharker et al, 2014; Yaesmin et al., 2015; Calado et al., 2017; Mishra et al., 2017; Rahdari et al, 2017; Rahman et al., 2017; Mishra et al., 2018; Park et al, 2019);

Iodopovidona (Chen et al., 1992; Chang et al., 1998; Takahashi et al., 2003; Momoyama & Tanimura, 2004; Pangastuti et al., 2009; Allan & Burnell, 2013; Chalupnicki et al., 2014; He et al., 2014; Kabir et al., 2014; Kanjanasopa et al., 2015; Singh & Singh, 2018);

Hipoclorito de sódio (GomezGil et al., 1994; Mohamed et al., 2000; Tonguthai, 2000; Pati & Belmonte, 2003; Takahashi et al., 2003; Ritar et al, 2006; Tsolaki et al., 2010; Saejung et al., 2014; Calado et al., 2017; Sebire et al., 2018).

De notar que as soluções foram preparadas no dobro das concentrações estabelecidas para que, aquando do procedimento de desinfeção e da mistura dos volumes entre a solução e os ovos, se obtivesse a concentração estabelecida para o efeito de desinfeção dos ensaios. Assim, as concentrações das soluções dos desinfetantes efetivamente preparadas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Diferentes concentrações das soluções preparadas para os três desinfetantes.

Azul de metileno (A)	Iodopovidona (B)	Hipoclorito de sódio (C)
<ul style="list-style-type: none">• 2 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 4 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 4 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 80 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 160 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 40 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 80 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 200 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 80 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 160 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 400 mg/L
<ul style="list-style-type: none">• 200 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 200 mg/L	<ul style="list-style-type: none">• 600 mg/L

2.4. Protocolo de desinfecção dos ovos de *A. tonsa*

Após a recolha e a contagem dos ovos viáveis, era retirado o volume correspondente ao número de ovos necessários para o trabalho experimental para um novo tubo tipo Falcon™ de 50 mL estéril e individualizado, com auxílio de uma micropipeta mecânica P5000, e acrescentada água à salinidade de 30, previamente microfiltrada por crivos de 0,22 µm e autoclavada, por forma a obter a densidade de 400 ovos viáveis/mL. Esta foi a densidade predeterminada para a realização dos ensaios de modo que cada replicado, após a desinfecção, contivesse cerca 200 de ovos viáveis, sendo este o número de ovos padrão utilizado durante todo o trabalho.

Em seguida, era pipetado 1 mL da solução de desinfetante e 1 mL do tubo dos ovos para um tubo tipo Falcon™ de 15 mL estéril e individualizado, com auxílio de uma micropipeta mecânica P1000 e pontas novas, sendo este tubo o local onde decorria a desinfecção. Os 2 mL de volume do tubo eram sujeitos a três ressuspensões com auxílio da micropipeta e a uma homogeneização manual durante 5 segundos.

Decorridos T-4 minutos do tempo de exposição à solução desinfetante estabelecido para o tratamento, era retirado, após nova homogeneização, 1 mL do tubo de desinfecção para um tubo tipo Eppendorf AG © de 1,5 mL com auxílio da P1000, tubo esse que era imediatamente centrifugado a 4000 rpm durante 4 minutos numa centrífuga Eppendorf AG © Centrifuge 5415R.

Após a centrifugação, era removido o sobrenadante, dada a adsorção dos ovos no fundo do tubo de centrifugação como *pellet*, e adicionado 1 mL de água às condições já mencionadas por forma a lavar os ovos do desinfetante, Este processo de lavagem, realizado com recurso à P1000 e pontas novas, era repetido mais duas vezes de modo a efetuar, no total, três lavagens aos ovos.

Todo este procedimento de desinfecção e de lavagem era executado com vários replicados em simultâneo de modo a agilizar o trabalho experimental e apenas depois de terminado o procedimento para todos os diferentes tratamentos é que os ovos eram utilizados para as avaliações a realizar.

2.5. Ensaio 1: Viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* pós-desinfecção

O Ensaio 1 realizou-se no sentido de testar exclusivamente a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* após serem desinfetados com diferentes concentrações dos três desinfetantes e durante tempos de exposição diferentes, avaliando os efeitos na taxa de eclosão dos ovos viáveis após um período de incubação de 24 e 48 horas.

2.5.1. Tratamentos e replicados

Para além de todas as diferentes concentrações dos três desinfetantes foram também experimentados 6 diferentes tempos de exposição (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) para cada concentração de desinfetante. Assim, foram experimentadas todas as combinações possíveis entre concentração de desinfetante e tempo de exposição, perfazendo um número total de 126 tratamentos de desinfecção diferentes (Tabela 4).

Como tratamento de controlo, foi apenas adicionada água a 30 de salinidade, previamente microfiltrada por crivos de 0,22 µm e autoclavada ao invés de uma solução de desinfetante. Ainda assim, foi repetido o mesmo procedimento de desinfecção e de lavagem utilizado para as soluções dos desinfetantes.

Para todos os tratamentos diferentes foram realizados 9 replicados.

Devido ao elevado número de tratamento e replicados a experimentar, o trabalho experimental do Ensaio 1 foi dividido por vários dias, sendo experimentadas todas as concentrações de um desinfetante durante um determinado tempo de exposição no mesmo dia e tempos de exposição diferentes em dias diferentes. Por isso, foram também realizados controlos para cada dia de experiência do Ensaio 1.

Tabela 4 – Todos os diferentes tratamentos de desinfecção experimentados no Ensaio 1.

	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	25 minutos	30 minutos
Azul de metileno (A)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mg/L (A1 5) • 2 mg/L (A2 5) • 5 mg/L (A5 5) • 10 mg/L (A10 5) • 20 mg/L (A20 5) • 40 mg/L (A40 5) • 100 mg/L (A100 5) 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 10 • A2 10 • A5 10 • A10 10 • A20 10 • A40 10 • A100 10 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 15 • A2 15 • A5 15 • A10 15 • A20 15 • A40 15 • A100 15 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 20 • A2 20 • A5 20 • A10 20 • A20 20 • A40 20 • A100 20 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 25 • A2 25 • A5 25 • A10 25 • A20 25 • A40 25 • A100 25 	<ul style="list-style-type: none"> • A1 25 • A2 25 • A5 25 • A10 25 • A20 25 • A40 25 • A100 25
Iodopovidona (B)	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mg/L (B2 5) • 5 mg/L (B5 5) • 10 mg/L (B10 5) • 20 mg/L (B20 5) • 40 mg/L (B40 5) • 80 mg/L (B80 5) • 100 mg/L (B100 5) 	<ul style="list-style-type: none"> • B2 10 • B5 10 • B10 10 • B20 10 • B40 10 • B80 10 • B100 10 	<ul style="list-style-type: none"> • B2 15 • B5 15 • B10 15 • B20 15 • B40 15 • B80 15 • B100 15 	<ul style="list-style-type: none"> • B2 20 • B5 20 • B10 20 • B20 20 • B40 20 • B80 20 • B100 20 	<ul style="list-style-type: none"> • B2 25 • B5 25 • B10 25 • B20 25 • B40 25 • B80 25 • B100 25 	<ul style="list-style-type: none"> • B2 30 • B5 30 • B10 30 • B20 30 • B40 30 • B80 30 • B100 30
Hipoclorito de sódio (C)	<ul style="list-style-type: none"> • 5 mg/L (C5 5) • 20 mg/L (C20 5) • 40 mg/L (C40 5) • 80 mg/L (C80 5) • 100 mg/L (C100 5) • 200 mg/L (C200 5) • 300 mg/L (C300 5) 	<ul style="list-style-type: none"> • C5 10 • C20 10 • C40 10 • C80 10 • C100 10 • C200 10 • C300 10 	<ul style="list-style-type: none"> • C5 15 • C20 15 • C40 15 • C80 15 • C100 15 • C200 15 • C300 15 	<ul style="list-style-type: none"> • C5 20 • C20 20 • C40 20 • C80 20 • C100 20 • C200 20 • C300 20 	<ul style="list-style-type: none"> • C5 25 • C20 25 • C40 25 • C80 25 • C100 25 • C200 25 • C300 25 	<ul style="list-style-type: none"> • C5 30 • C20 30 • C40 30 • C80 30 • C100 30 • C200 30 • C300 30

2.5.2. Protocolo experimental

Após a recolha, a desinfecção conforme o tratamento e a lavagem, o volume do tubo de centrifugação de cada replicado foi transposto para um poço de uma placa multipoços nova com 6 poços com auxílio de uma micropipeta mecânica P1000 e pontas novas. De seguida e por duas vezes, foi adicionado 1 mL de água nova às mesmas condições ao tubo onde se encontravam os ovos e depois transposto novamente para o poço correspondente de modo a garantir que era transferida a totalidade dos ovos contidos no tubo. Depois, a cada poço foram acrescentados também 2 mL de água às mesmas condições com auxílio de uma micropipeta mecânica P5000 e pontas novas, totalizando um volume final de incubação dos ovos de 5 mL por poço. Por último, após finalizar este procedimento para todos os replicados e tratamentos experimentados naquele dia, era contabilizado, à lupa Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 Series, e registado o número de ovos viáveis presente em cada poço. Terminadas as contagens, as placas multipoços eram colocadas a incubar numa sala a 21 °C e com um fotoperíodo de 12L12D, durante um período máximo de 48 horas, sendo este o momento estabelecido como 0 horas experimentais para a eclosão dos ovos.

De notar que, nos dias de ensaio com o mesmo desinfetante, foram reutilizadas, de forma aleatória, as mesmas placas multipoços. Entre o intervalo dos dias de ensaio, estas placas eram meticulosamente lavadas com álcool etílico a 70% e posteriormente com água destilada sendo depois colocadas a secar numa estufa Memmert GmbH + Co.KG © UFE 600 a 55 °C.

2.5.3. Taxa de eclosão

Decorridas 24 e 48 horas de incubação, foram contados à lupa os ovos viáveis restantes e não-eclodidos. Deste modo, foram calculadas as taxas de eclosão para cada replicado após 24 e 48 horas de incubação segundo a seguinte equação:

$$\text{Taxa de Eclosão (\%)} = \frac{(\text{N.º de ovos viáveis inicial} - \text{N.º de ovos viáveis restantes})}{\text{N.º de ovos viáveis inicial}} \times 100$$

Figura 5 – Equação utilizada para calcular a taxa de eclosão dos ovos de *A. tonsa* após 24 e 48 horas de incubação.

2.6. Ensaio 2: Eficácia microbiológica da desinfecção dos ovos de *A. tonsa*

O Ensaio 2 realizou-se no sentido de testar a eficácia microbiológica da desinfecção dos ovos de *A. tonsa* após determinados tratamentos de desinfecção, avaliando a carga bacteriana dos ovos pós-desinfecção (Ensaio 2.2).

Em simultâneo, também foi testada a viabilidade biológica dos ovos para os mesmos tratamentos (Ensaio 2.1).

2.6.1. Tratamentos

Os tratamentos de desinfecção selecionados para estas duas avaliações foram os tratamentos que melhores resultados obtiveram no ensaio anterior (Ensaio 1), isto é, taxas de eclosão mais elevadas priorizando tempos de exposição e concentrações superiores.

Assim, para além do tratamento de controlo, foram selecionados e testados 2 tratamentos de cada desinfetante durante o Ensaio 2 (Tabela 5).

Tabela 5 – Tratamentos de desinfecção selecionados e experimentados no Ensaio 2.

Azul de metileno (A)	Iodopovidona (B)	Hipoclorito de sódio (C)
<ul style="list-style-type: none">• 10 mg/L durante 30 minutos (A10 30)	<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L durante 30 minutos (B20 30)	<ul style="list-style-type: none">• 5 mg/L durante 30 minutos (C5 30)
<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L durante 30 minutos (A20 30)	<ul style="list-style-type: none">• 100 mg/L durante 10 minutos (B100 10)	<ul style="list-style-type: none">• 20 mg/L durante 20 minutos (C20 20)

De salientar que foram preparadas novas soluções para as concentrações dos tratamentos selecionados para os trabalhos experimentais do Ensaio 2.

2.6.2. Ensaio 2.1

2.6.2.1. Replicados

Para o Ensaio 2.1, foram realizados 3 replicados dos tratamentos experimentados, sendo, na Tabela 6, sumariado o número de tratamentos e replicados utilizados para avaliar a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* pós-desinfecção durante o Ensaio 1 e o Ensaio 2.1.

Tabela 6 – Número de tratamentos, replicados e ovos por replicado experimentados no Ensaio 1 e no Ensaio 2.1.

	Ensaio 1	Ensaio 2.1
Tratamentos	127 tratamentos: Controlo, sem desinfecção (O) Todas as combinações possíveis entre concentrações dos três desinfetante e tempos de exposição (Tabela 4)	7 tratamentos: Controlo, sem desinfecção (O) Azul de metileno (A10 30 e A20 30) Iodopovidona (B20 30 e B100 10) Hipoclorito de sódio (C5 30 e C20 20)
Replicados	9 replicados	3 replicados
Ovos por replicado	≈200 ovos viáveis	≈200 ovos viáveis

2.6.2.2. Protocolo experimental

O protocolo experimental utilizado para o Ensaio 2.1 foi exatamente igual ao protocolo experimental do Ensaio 1, tendo sido executado precisamente o mesmo procedimento de transposição, de incubação e de contagem dos ovos viáveis. Assim, a taxa de eclosão de cada replicado também foi calculada segundo a equação da Figura 5.

2.6.3. Ensaio 2.2

No Ensaio 2.2, foram avaliadas as cargas bacterianas dos diferentes tratamentos através da incubação dos ovos, e posterior contagem de colónias bacterianas, em dois meios de cultura: *Trypticase Soy Agar* (TSA) e *Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar* (TCBS), ambos da marca VWR® Chemicals BDH®. O meio TSA é um meio geral e não seletivo, promovendo o crescimento de diversos grupos de bactérias, e o meio TCBS é um meio seletivo para *Vibrio* spp., onde crescem apenas espécies de bactérias pertencentes ao género *Vibrio*.

2.6.3.1. Preparação e plaqueamento dos meios de cultura

Para a realização dos trabalhos experimentais do Ensaio 2 foram anteriormente preparadas placas de Petri, em número suficiente, contendo tanto meio TSA como meio TCBS para a inoculação dos ovos após desinfecção.

Os dois meios de cultura, TSA e TCBS, foram preparados conforme as instruções do fornecedor, tendo sido o meio TSA ainda suplementado com 1,5% de cloreto de sódio (NaCl). Depois, foram esterilizados através de autoclavagem e vertidos, ainda quentes, para as respetivas placas de Petri em condições assépticas no interior de câmara de fluxo laminar Telstar® Bio II Advance Plus. Após serem plaqueados, os meios foram deixados a arrefecer e solidificar dentro da câmara de fluxo laminar, sendo depois fechadas as placas com a tampa correspondente e logo armazenadas na câmara frigorífica a 4 °C até utilização posterior.

2.6.3.2. Protocolo experimental

Após a recolha, a desinfeção e a lavagem dos ovos e em paralelo com o Ensaio 2.1, o volume de 1 tubo de centrifugação por tratamento foi consecutivamente diluído na proporção de 1:10, sendo as diluições realizadas e a concentração original posteriormente inoculadas nas placas dos dois meios de cultura.

A fim de realizar apenas o número necessário de diluições por forma a garantir que, após as inoculações, é possível contar numa das placas entre 30 e 300 colónias bacterianas, número de colónias academicamente convencionado, foi previamente concretizado um teste com uma amostra de 200 ovos sem desinfeção, tendo sido realizadas 6 diluições decimais sucessivas a partir da amostra e depois todas inoculadas, mais a amostra original, em ambos os meios. Por conseguinte, foi determinado que seria preciso realizar 2 diluições decimais (1:10) consecutivas das amostras iniciais para o Ensaio 2.2, ou seja, até à diluição 10^{-2} , inoculando, em meio TSA c/ 1,5% NaCl, a amostra à concentração original e as 2 diluições decimais resultantes (10^{-1} e 10^{-2}), e em meio TCBS, a amostra à concentração original e apenas a 1.^a diluição decimal (10^{-1}). De referir que todas as diluições decimais foram realizadas pipetando 1 volume da amostra, ou da diluição anterior, para 9 volumes de soro com 1,5% de NaCl.

Assim, operando na câmara de fluxo laminar, foram executadas estas 2 diluições das amostras de cada tratamento, sempre após uma homogeneização moderada com recurso ao vórtex e com auxílio de uma micropipeta mecânica P1000 e pontas novas, pipetando 1 mL de amostra para tubos de ensaio autoclavados já preenchidos por 9 mL de soro c/ 1,5% NaCl. Em seguida, procedeu-se à inoculação de 100 µL de cada amostra inicial em duplicado e das respetivas diluições em triplicado para as placas contendo os meios TSA c/ 1,5% NaCl e TCBS, também após homogeneizações com vórtex e com auxílio de uma micropipeta mecânica P100 e pontas novas. Depois seguiu-se o espalhamento do inóculo de forma persistente e uniforme pela placa, com um espalhador novo para cada placa e por último, foram fechadas todas as placas de Petri inoculadas com as tampas correspondentes e seladas com papel *parafilm* pela periferia de ambas metades.

Findo o procedimento anterior, as placas foram transportadas para uma estufa de incubação Memmert GmbH + Co.KG © IPP110 a 22 °C, tendo sido colocadas a incubar, durante um período de 48 horas no caso das placas de meio TSA e durante um período de 24 horas no caso das placas de meio TCBS.

2.6.3.3. Unidades formadoras de colónias (CFUs)

Decorridos os períodos de incubação, foram retiradas as placas da estufa e foi contado, num contador de colónias Stuart® Colony Counter SC6, e registado o número de colónias bacterianas existente em cada placa correspondente à carga bacteriana do inóculo que se desenvolveu durante o respetivo período de incubação.

Assim, foram calculadas as unidades formadoras de colónias (CFUs) para cada amostra conforme a equação representada na Figura 6, selecionando a diluição cujas placas apresentavam entre 30 e 300 colónias e realizada uma média entre as contagens de colónias dessas placas.

$$\text{CFU/mL} = \text{Média do número de colónias} \times \frac{1}{\text{Diluição}} \times \frac{1}{\text{Volume do inóculo (mL)}}$$

Figura 6 – Equação utilizada para calcular as CFUs das amostras de ovos de *A. tonsa* inoculadas em meio TSA e TCBS.

2.7. Análise estatística

Todos os dados foram tratados estatisticamente com recurso ao *software* R v.3.6.1 (The R Project for Statistical Computing, © The R Foundation) e as análises gráficas foram produzidas através do programa Microsoft® Excel® v.16.0 (Microsoft® Office 365 versão 2104). Os resultados, sempre que aplicável, foram apresentados sobre a forma de média \pm desvio-padrão (SD) ou sobre a forma média \pm limites dos intervalos de confiança de 95% (95% CI) sendo o formato apresentado sempre devidamente referenciado.

Os testes estatísticos aplicados aos resultados obtidos variaram conforme a sua natureza, tendo sido realizados: testes t de Student, teste paramétrico, e U de Mann-Whitney, teste não paramétrico, para o tratamento do número efetivo de ovos incubados; teste de Kruskal-Wallis, análise não paramétrica, seguido do teste *a posteriori* de Dunn quando observadas diferenças significativas, e teste t de Student para o tratamento das taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos de controlo; testes Z para duas proporções, teste paramétrico, testes Qui-quadrado para duas proporções com a correção de continuidade de Yates, teste não paramétrico, para o tratamento das proporções de ovos eclodidos 24/48 h; correlação de Spearman, medida não paramétrica, para o tratamento da relação entre a taxa de eclosão e o período de eclosão dos ovos; análises de variância (ANOVAs) com um fator, análise paramétrica, seguidas do teste *a posteriori* de Dunnett, comparações múltiplas com o tratamento de controlo, quando observadas diferenças significativas, e testes de Kruskal-Wallis, análise não paramétrica, seguidos do teste *a posteriori* de Dunn para comparações múltiplas com o tratamento de controlo com o método de Bonferroni para o ajuste dos valores p quando observadas diferenças significativas, para o tratamento das taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos realizados no Ensaio 1 e no Ensaio 2.1.

Todos os pressupostos de normalidade e homocedasticidade das amostras foram verificados quando necessário através do teste de Shapiro–Wilk e do teste de Bartlett respetivamente.

Para todos os testes e análises realizadas o nível de significância utilizado foi sempre de $p < 0,05$.

Página intencionalmente deixada em branco

3. Resultados

3.1 Parâmetros da água da cultura

Os valores registados para os parâmetros da cultura de *A. tonsa* avaliados foram os seguintes: $8,09 \pm 0,07$ de pH (média \pm desvio-padrão (SD)), $5,78 \pm 0,53$ mg/L de oxigénio dissolvido, $0,26 \pm 0,09$ mg/L de amónia, $0,10 \pm 0,07$ mg/L de nitritos e $5,83 \pm 2,64$ mg/L de nitratos.

3.2 Número efetivo de ovos incubados

No total de 1296 replicados realizados durante o Ensaio 1, o número efetivo de ovos viáveis de *A. tonsa* contabilizados e colocados a incubar às 0 horas experimentais por replicado foi de 170 ± 33 ovos (média \pm SD).

O conjunto destes ovos de todos os replicados realizados durante o Ensaio 1, resultantes de todos os procedimentos de desinfeção e lavagem executados, mostra-se significativamente diferente de 200 (Teste U de Mann-Whitney, $U = 92993$; $p < 0,001$), o número de ovos padrão e expectável de encontrar por replicado.

Para o Ensaio 2.1, o número efetivo de ovos viáveis incubados por replicado foi de 174 ± 29 ovos, mostram-se também significativamente diferente de 200 (Teste t de Student, $t = -4,036$; $p < 0,001$). Contudo, não se mostra significativamente diferente dos ovos dos replicados do Ensaio 1 (Teste U de Mann-Whitney, $U = 12752$; $p > 0,05$) (Figura 7).

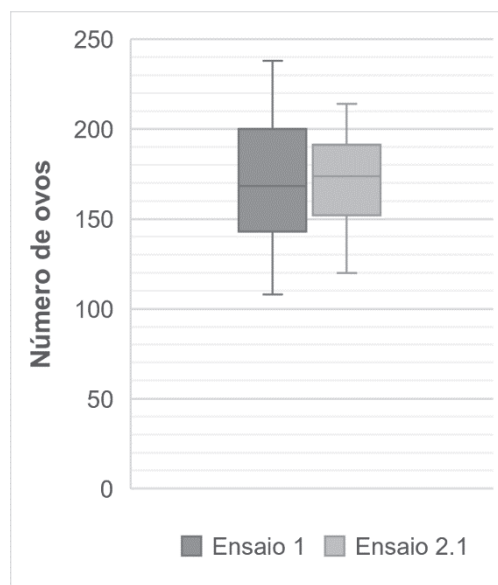


Figura 7 – Número efetivo de ovos viáveis de *A. tonsa* incubados por replicado às 0 horas durante o Ensaio 1 ($n = 1296$) e 2.1 ($n = 21$).

3.3 Taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos de controlo

A taxa média de eclosão dos ovos viáveis de *A. tonsa* às 48 horas (h) de todos os tratamentos de controlo (O) realizados no decorrer do Ensaio 1 foi de 90,93% \pm 4,93% (média \pm SD) e para o Ensaio 2.1 foi de 95,83% \pm 1,47%.

O Ensaio 1 apresenta um elevado desvio-padrão mostrando diferenças significativas entre as taxas de eclosão às 48 h dos controlos (O) realizados para o desinfetante azul de metileno (A) (95,99% \pm 2,15%), para o desinfetante iodopovidona (B) (89,80% \pm 3,48%) e para o desinfetante hipoclorito de sódio (C) (87,00% \pm 3,76%) (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 98,931$; $p < 0,001$) (Figura 8).

No entanto, as taxas de eclosão às 48 h dos controlos do azul de metileno (O (A)) não se mostraram significativamente diferentes das taxas de eclosão às 48 h do controlo do Ensaio 2.1 (O (2.1)) (Teste de t de Student, $t = 0,179$; $p > 0,05$) (Figura 8).

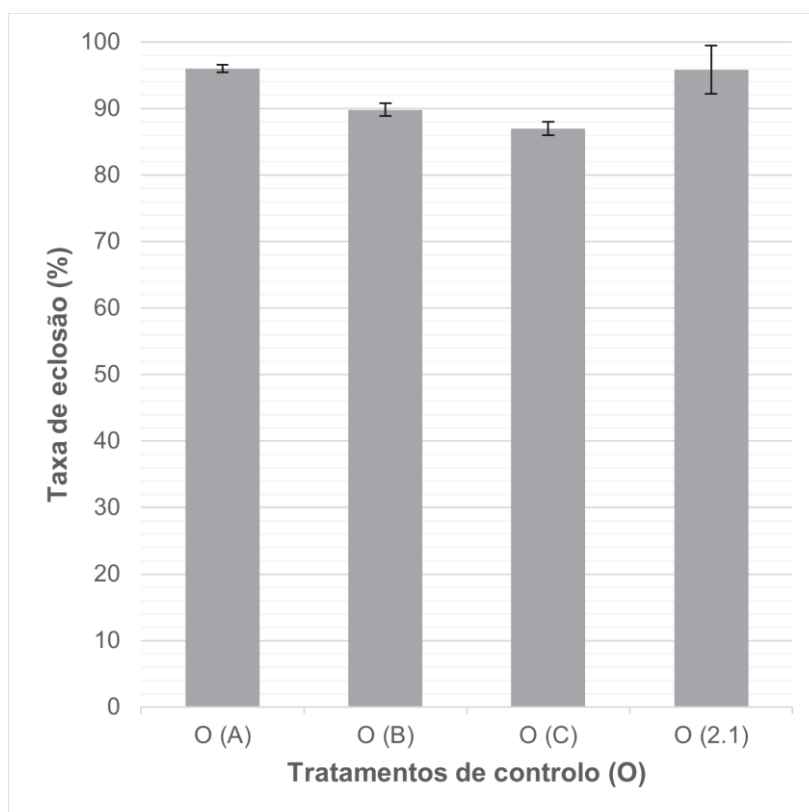


Figura 8 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h de *A. tonsa* (barras) e respetivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro) dos tratamentos de controlo (O) do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 54$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 54$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 54$) do Ensaio 1 e também do tratamento de controlo (O) do Ensaio 2.1 ($n = 3$).

3.4 Proporção de ovos eclodidos 24/48 h e a relação com a taxa de eclosão às 48h

A proporção média de ovos de *A. tonsa* eclodidos 24/48 horas (h) de todos os tratamentos de controlo (O) realizados durante todo o Ensaio 1 foi de 87,67% \pm 7,43% (média \pm SD) e de 96,12% \pm 1,24%. para o Ensaio 2.1.

Uma vez mais o Ensaio 1 apresenta um elevado desvio-padrão evidenciando diferenças apreciáveis entre as proporções de ovos eclodidos 24/48 h dos tratamentos de controlo (O), nomeadamente diferenças significativas entre os controlos do desinfetante azul de metileno (O (A)) (94,70% \pm 3,76%) e os controlos do desinfetante hipoclorito de sódio (O (C)) (81,30% \pm 6,29%) (Teste Qui-quadrado para duas proporções, $\chi^2 = 6,562$; $p = 0,010$) (Figura 9).

As proporções 24/48 h do tratamento de controlo do Ensaio 2.1 (O (2.1) e dos controlos do desinfetante hipoclorito de sódio também se mostraram significativamente diferentes (Teste Qui-quadrado para duas proporções, $\chi^2 = 8,625$; $p = 0,003$) (Figura 9).

Já as proporções 24/48 h dos restantes tratamentos de controlo não se mostraram significativamente diferentes entre si (Testes Z para duas proporções e Testes Qui-quadrado para duas proporções; $p > 0,05$) (Figura 9).

Para além disso, as proporções de ovos eclodidos 24/48 h do conjunto de todos tratamentos de desinfeção realizado para cada desinfetante não se mostrou significativamente diferente dos respetivos controlos, nem as proporções 24/48 h dos diferentes tempos de exposição experimentados de cada desinfetante entre si, nem mesmo a proporção 24/48 h de nenhum tratamento em particular, de todas as combinações testadas de concentração de desinfetante e tempo de exposição, evidenciou diferenças significativas relativamente ao controlo correspondente (Testes Z para duas proporções e Testes Qui-quadrado para duas proporções; $p > 0,05$) (Figura 9) (Figura 10).

De salientar que, embora não sendo estatisticamente significativo, os tratamentos de desinfecção com concentrações mais elevadas de hipoclorito de sódio apresentaram uma ligeira tendência para proporções 24/48 h superiores comparativamente com concentrações mais baixas e os controlos (Figura 9), e os tratamentos de desinfecção com tempos de exposição ao hipoclorito de sódio mais elevados exibiram uma pequena tendência para proporções 24/48 h inferiores em comparação com tempos de exposição mais reduzidos (Figura 10).

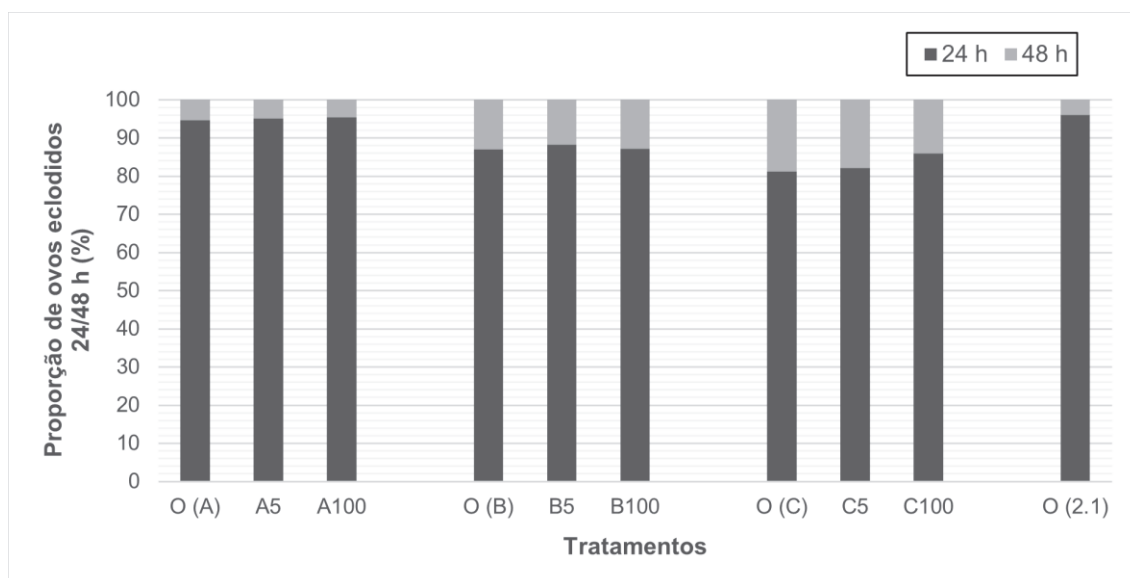


Figura 9 – Proporções de ovos de *A. tonsa* eclodidos 24/48 h (%) médias (barras) dos tratamentos de controlo (O), de 5 mg/L e de 100 mg/L do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 54$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 54$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 54$) do Ensaio 1 e também do tratamento de controlo (O) do Ensaio 2.1 ($n = 3$).

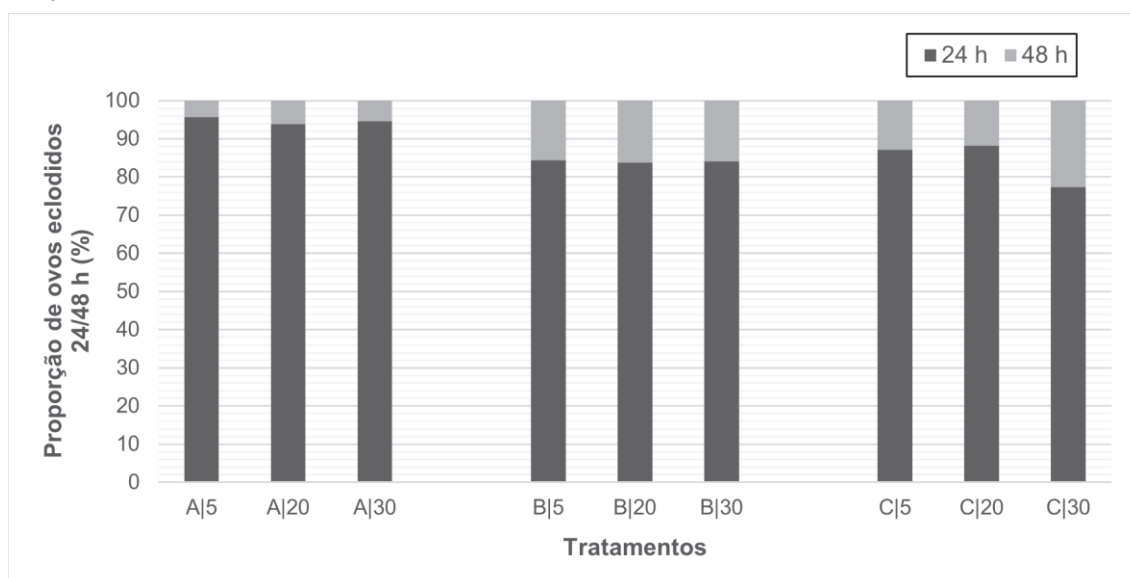


Figura 10 – Proporções de ovos de *A. tonsa* eclodidos 24/48 h (%) médias (barras) dos tratamentos com tempos de exposição de 5, 20 e 30 minutos do desinfetante azul de metileno (A) ($n = 63$), do desinfetante iodopovidona (B) ($n = 63$) e do desinfetante hipoclorito de sódio (C) ($n = 63$) do Ensaio 1.

Quanto à relação entre a taxa de eclosão às 48 h e a proporção de ovos eclodidos 24/48 h, as duas variáveis mostram-se significativa e positivamente correlacionadas entre si (Correlação de Spearman, $\rho = 0,749$; $p < 0,001$).

Esta forte correlação positiva ($\rho = 0,749$) entre a taxa de eclosão às 48 h e a proporção 24/48 h quer dizer que ovos com taxas de eclosão às 48 h mais elevadas tendem a apresentar proporções 24/48 h mais elevadas e vice-versa. Já ovos com taxas de eclosão às 48 h mais baixas tendem a apresentar proporções 24/48 h menores e vice-versa também.

3.5 Taxas de eclosão dos ovos às 48 h do Ensaio 1

Todas as taxas médias de eclosão dos ovos viáveis às 48 horas (h) e os respectivos limites dos intervalos de confiança de 95% da totalidade dos tratamentos experimentados, dos três desinfetantes, azul de metileno, iodopovidona e hipoclorito de sódio, com as concentrações e os tempos de exposição diferentes, no decorrer do Ensaio 1 (Tabela 4) encontram-se indicadas no Anexo 1.

Começando pelos resultados dos diferentes tratamentos testados do desinfetante azul de metileno (A) e os tratamentos de controlo correspondentes (O) encontram-se representados graficamente na Figura 11 sob a forma de taxas de eclosão médias às 48 h e respectivos intervalos de confiança de 95%.

As diferentes concentrações de azul de metileno a que os ovos foram submetidos (1, 2, 5, 10, 20, 40 e 100 mg/L) não mostraram influenciar significativamente as taxas de eclosão dos ovos às 48 h após 5 minutos de exposição (Análise de variância (ANOVA), $F = 1,136$; $p > 0,05$) (Figura 11).

Já para os 10 minutos (ANOVA, $F = 2,862$; $p = 0,012$), os 15 minutos (ANOVA, $F = 5,555$; $p < 0,001$), os 20 minutos (ANOVA, $F = 23,35$; $p < 0,001$), os 25 minutos (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 38,859$; $p < 0,001$) e 30 minutos (ANOVA, $F = 59,97$; $p < 0,001$) de tempo de exposição às diferentes concentrações de azul de metileno experimentadas os ovos evidenciaram diferenças significativas entre as suas taxas de eclosão às 48 h e as taxas dos tratamentos de controlo (Figura 11).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com concentrações de 1, 2, 5, 10 e 20 mg/L de azul de metileno não se mostraram significativamente diferentes das taxas dos controlos em nenhum dos tempos de exposição (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) embora a concentração 20 mg/L após 30 minutos de exposição apresente taxas de eclosão dos ovos às 48h quase significativamente inferiores às taxas do controlo (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,068$) (Figura 11).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com a concentração 40 mg/L de azul de metileno não se apresentaram significativamente diferentes das taxas dos controlos após 5, 10, 15, 20 minutos de exposição, contudo já apresentaram diferenças significativas e taxas de eclosão às 48h inferiores relativamente aos tratamentos de controlo para 25 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,021$) e 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$) (Figura 11).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com a concentração 100 mg/L de azul de metileno apenas não evidenciariam diferenças significativas em relação às taxas dos controlos para 5 minutos de exposição. Após 10 minutos (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,002$), 15 minutos (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$), 20 minutos (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$), 25 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p < 0,001$) e 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$) as taxas de eclosão às 48 h já se mostraram significativamente inferiores às taxas do controlo (Figura 11).

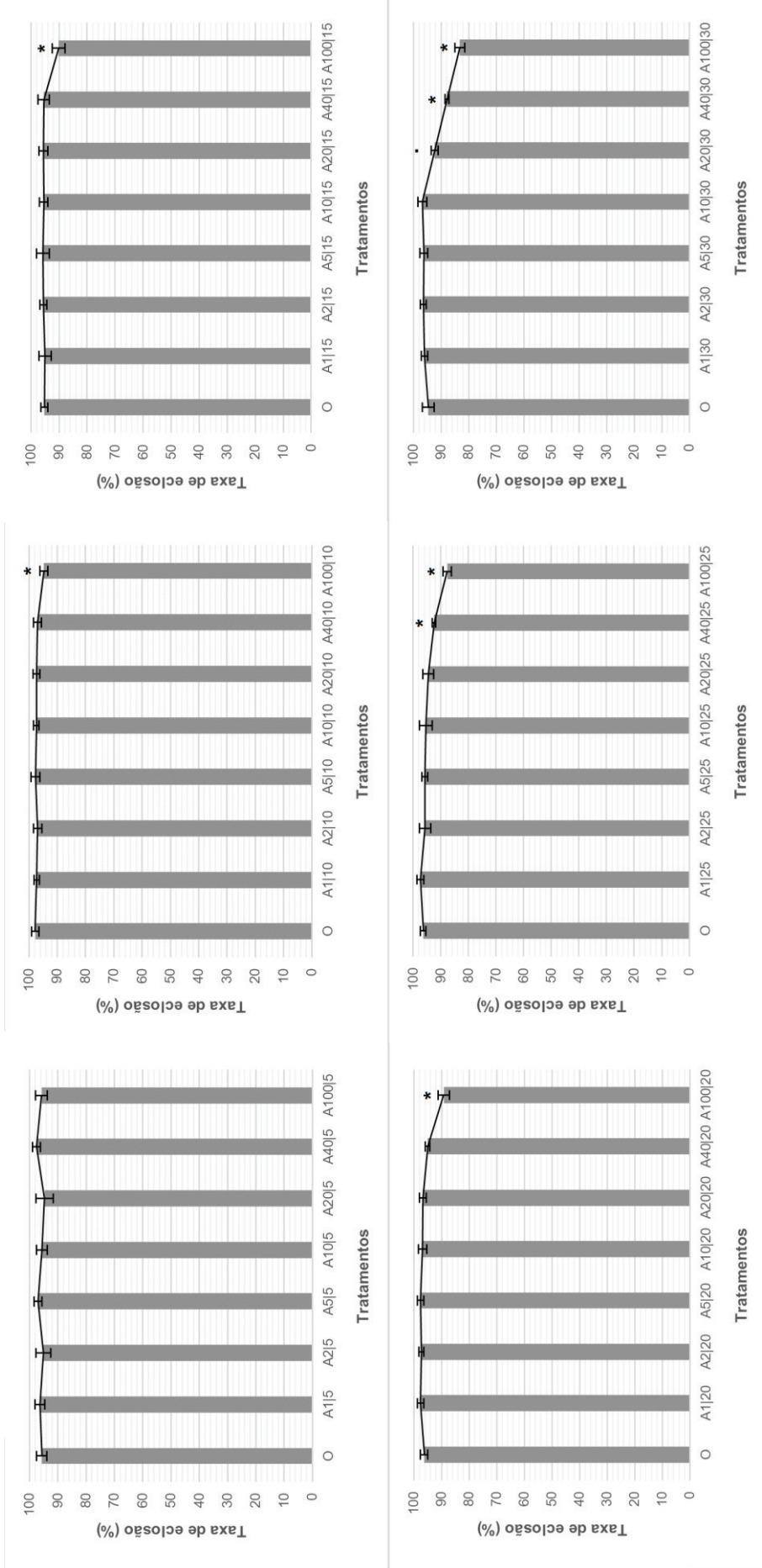


Figura 11 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante azul de metileno (A) e os respectivos tratamentos de controlo (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p < 0,10$) indicadas com um “.”.

Passando aos resultados dos diferentes tratamentos experimentados do desinfetante iodopovidona (B) e os respectivos tratamentos de controlo (O) encontram-se reproduzidos graficamente na Figura 12 no formato de taxas de eclosão médias às 48 h e respetivos intervalos de confiança de 95%.

As diferentes concentrações de iodopovidona com que os ovos foram desinfetados (2, 5, 10, 20, 40, 80 e 100 mg/L) não mostraram influenciar significativamente as taxas de eclosão dos ovos às 48 h após 5 minutos de exposição (Análise de variância (ANOVA), $F = 1,791$; $p > 0,05$) (Figura 12).

Já após 10 minutos de exposição, as diferentes concentrações exibiram diferenças significativas entre as suas taxas de eclosão às 48 h e as taxas de eclosão do controlo (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 20,173$; $p = 0,005$) porém estas diferenças significativas voltaram a não se verificar após 15 minutos (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 12,504$; $p > 0,05$) e 20 minutos (ANOVA, $F = 1,585$; $p > 0,05$) de exposição dos ovos às diferentes concentrações de iodopovidona (Figura 12).

Para restantes os tempos de exposição, 25 minutos (ANOVA, $F = 7,162$; $p < 0,001$) e 30 minutos (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 34,906$; $p < 0,001$), as diferentes concentrações de iodopovidona testadas apresentaram diferenças significativas entre as suas taxas de eclosão às 48 h e as taxas de eclosão dos ovos dos tratamentos de controlo (Figura 12).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos de iodopovidona com as concentrações 2, 5, 10, 20 e 40 mg/L não se mostraram significativamente diferentes das taxas dos controlos após nenhum dos tempos de exposição (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) apesar de a concentração 40 mg/L após 30 minutos de exposição revelar taxas de eclosão quase significativamente inferiores às taxas do controlo (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,074$) (Figura 12).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com a concentração 80 mg/L de iodopovidona apenas se demonstraram significativamente inferiores às taxas de eclosão dos controlos após 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,006$), todavia para os 25 minutos de exposição já exibia diferenças quase significativas e taxas às 48 h inferiores em comparação ao tratamento de controlo (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,057$). Já após apenas 10 minutos de exposição revela também diferenças quase significativas, mas com taxas de eclosão dos ovos desta vez superiores às taxas do controlo Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,093$) (Figura 12).

As taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos com concentrações de 100 mg/L de iodopovidona apenas não se mostraram significativamente diferentes relativamente às taxas dos controlos para os tempos de exposição de 5, 15, e 20 minutos. Após 10 minutos de exposição as taxas de eclosão apresentaram-se significativamente superiores comparativamente com o controlo (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,023$) e após 25 minutos e 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunnett e Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p < 0,001$) as taxas de eclosão às 48 h já se demonstraram significativamente inferiores às taxas às 48h do controlo (Figura 12).

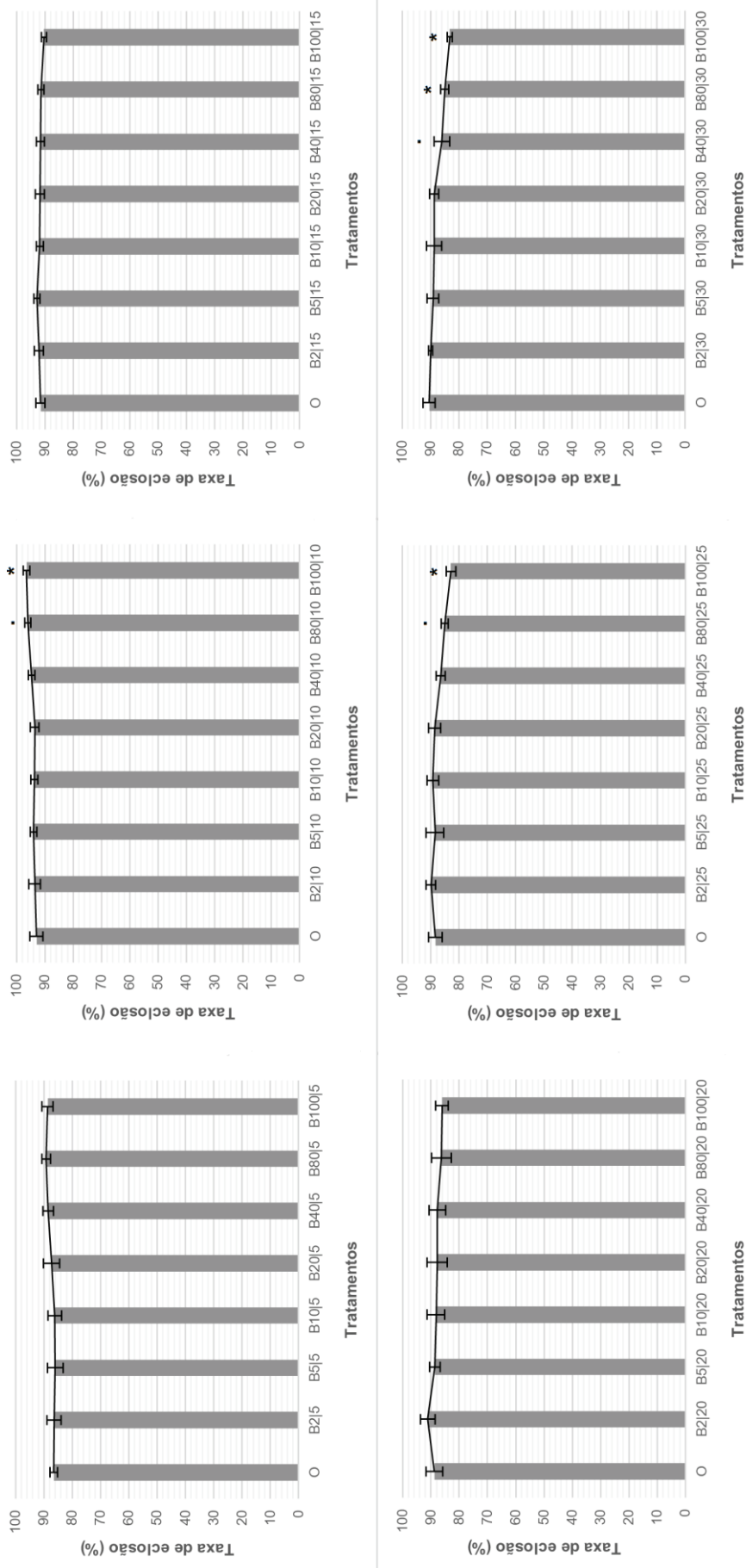


Figura 12 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante iodopovidona (B) e os respectivos tratamentos de controle (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controle (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p < 0,10$) indicadas com um “. ”.

Por último, os resultados dos diferentes tratamentos realizados com o desinfetante hipoclorito de sódio (C) e os respetivos tratamentos de controlo (O) apresentam-se graficamente retratados na Figura 13 sob a forma de taxas de eclosão médias às 48 h e respetivos intervalos de confiança de 95%.

Todos os tempos de exposição experimentados a que os ovos foram expostos com hipoclorito de sódio (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) evidenciaram diferenças significativas entre as taxas de eclosão dos ovos às 48 h das diferentes concentrações e as taxas de eclosão dos tratamentos de controlo (5 minutos: (Análise de variância (ANOVA), $F = 4,28$; $p < 0,001$); 10 minutos: (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 36,056$; $p < 0,001$); 15 minutos: (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 41,92$; $p < 0,001$); 20 minutos: (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 46,101$; $p < 0,001$); 25 minutos: (Teste de Kruskal-Wallis, $H = 45,797$; $p < 0,001$) e 30 minutos (ANOVA, $F = 8,78$; $p < 0,001$)) (Figura 13).

Apenas as taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos de hipoclorito de sódio com a concentração de 5 mg/L não se apresentaram significativamente diferentes das taxas dos controlos para nenhum dos tempos de exposição (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) (Figura 13).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com a concentração 20 mg/L de hipoclorito de sódio apenas se revelaram significativamente inferiores às taxas dos tratamentos de controlo após 25 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,048$) e 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,004$) (Figura 13).

Já as taxas de eclosão às 48 h de hipoclorito de sódio com a concentração de 40 mg/L exibiram diferenças significativas e taxas inferiores às taxas dos controlos para o tempo de exposição de 20 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,024$), 25 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,012$) e 30 minutos (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,002$) (Figura 13).

As taxas de eclosão às 48 h dos tratamentos com a concentração 80 mg/L de hipoclorito de sódio mostraram-se significativamente inferiores às taxas de eclosão dos controlos após 15 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,018$), 20 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,004$), 25 minutos (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,002$) e 30 minutos de exposição (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$). Ainda para os 10 minutos de exposição relevava já diferenças quase significativas e taxas inferiores em relação às taxas de eclosão dos ovos do controlo (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,055$) (Figura 13).

As taxas de eclosão dos ovos às 48 h dos tratamentos com concentrações de 100, 200 e 300 mg/L de hipoclorito de sódio evidenciaram-se significativamente inferiores comparativamente com as taxas dos tratamentos de controlo para todos os tempos de exposição, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (5 minutos: (100 mg/L: (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,025$); 200 mg/L: (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,002$); 300 mg/L: (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p < 0,001$)); 10 minutos: (100 mg/L: (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,007$); 200 e 300 mg/L: (Testes *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p < 0,001$)); 15 minutos: (100 mg/L: (Teste *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p = 0,002$); 200 e 300 mg/L: (Testes *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p < 0,001$)); 20, 25 e 30 minutos: (100, 200 e 300 mg/L: (Testes *a posteriori* de Dunnett e Testes *a posteriori* de Dunn *c/* controlo; $p < 0,001$))) (Figura 13).

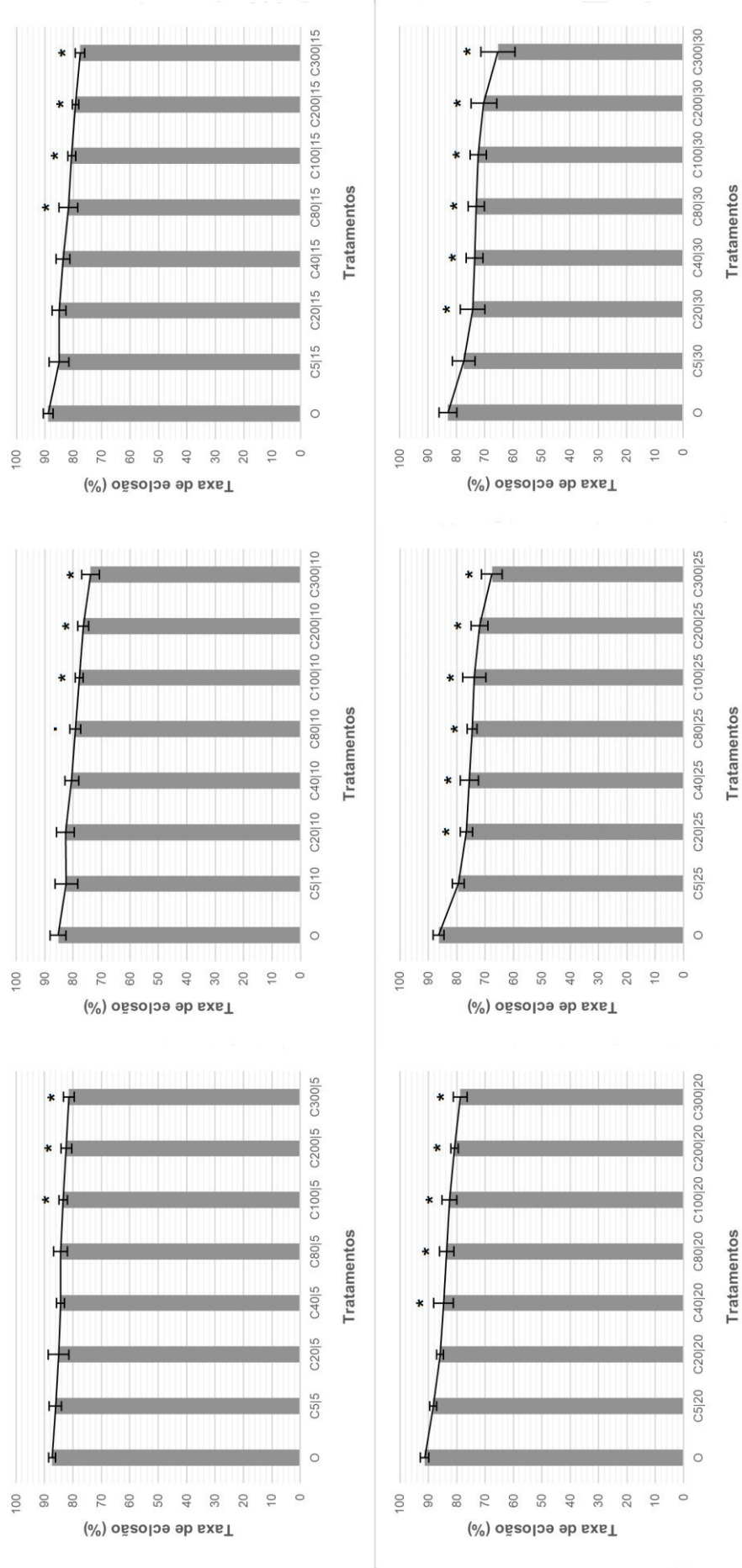


Figura 13 – Quadro das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respectivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro), com as sete concentrações diferentes do desinfetante hipoclorito de sódio (C) e os respetivos tratamentos de controlo (O), e os seis tempos de exposição diferentes (por ordem crescente, 5 minutos de exposição no canto superior esquerdo e 30 minutos de exposição no canto inferior direito) do Ensaio 1 ($n = 9$). Linhas de união das barras pelas médias dos tratamentos meramente ilustrativas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”. Diferenças quase significativas ($0,05 > p < 0,10$) indicadas com um “. ”.

Analisando as diferenças entre as taxas de eclosão médias às 48h dos tratamentos com 5, 20 e 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) após 30 minutos de exposição e as taxas às 48 h dos respectivos tratamentos de controlo (O), verifica-se que, apenas os tratamentos com hipoclorito de sódio registaram uma taxa de eclosão apreciavelmente inferior relativamente aos controlos para todas as concentrações, ultrapassando os -5% de eclosão logo na exposição de 5 mg/L durante 30 minutos (-5,58%), e os -10% de eclosão dos ovos quando expostos a 100 mg/L durante 30 minutos (-10,68%) (Figura 14).

Já para os desinfetantes azul de metileno e iodopovidona apenas após a exposição de 100 mg/L durante 30 minutos é que os ovos revelaram diferenças consideráveis e negativas na sua eclosão, superiores a -10% no caso do azul de metileno, sendo até o tratamento com uma diferença mais inferior em relação ao controlo das concentrações comparadas entre os três desinfetantes (-11,45%), e entre os -5% e os -10% de eclosão para o caso da iodopovidona (-7,28%) (Figura 14).

A diferença menor em comparação ao tratamento de controlo e positiva neste caso, apresentando uma taxa de eclosão média às 48 h superior à obtida para os ovos do controlo, foi registada para a concentração 5 mg/L de azul de metileno durante 30 minutos de exposição (+1,61%) (Figura 14).

Considerando desta vez as diferenças entre as taxas de eclosão médias às 48h dos tratamentos apenas com 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) mas após 5, 10, 20 e 30 minutos de exposição e as taxas às 48h dos respectivos tratamentos de controlo (O), é possível verificar uma vez mais que apenas os tratamentos com hipoclorito de sódio registaram taxas às 48h consideravelmente inferiores relativamente aos controlos para todos os tempos de exposição, superando os -5% de eclosão não após 5 mas após 10 minutos de exposição a 100 mg/L (-7,43%), e os -10% de eclosão dos ovos quando expostos apenas durante 30 minutos a 100 mg/L (-10,68%) (Figura 15).

Para o desinfetante azul de metileno apenas durante 20 minutos de exposição a 100 mg/L é que as diferenças negativas entre as taxas excederam os -5% (-7,08%) e após 30 minutos de exposição a 100 mg/L ultrapassaram já os -10%, sendo novamente a diferença mais inferior dos tratamentos comparados (-11,45%) (Figura 15).

Para o desinfetante iodopovidona os tempos de exposição 5 e 10 minutos a 100 mg/L apresentaram as menores diferenças e positivas também, tendo sido registadas taxas médias às 48 h superior às dos tratamentos de controlo (+2,19% e +3,52% respetivamente). Já para os tempos de exposição 20 e 30 minutos a 100 mg/L verificaram-se diferenças negativas entre as taxas que, no caso dos 30 minutos de exposição, superaram os -5% (-7,28%) (Figura 15).

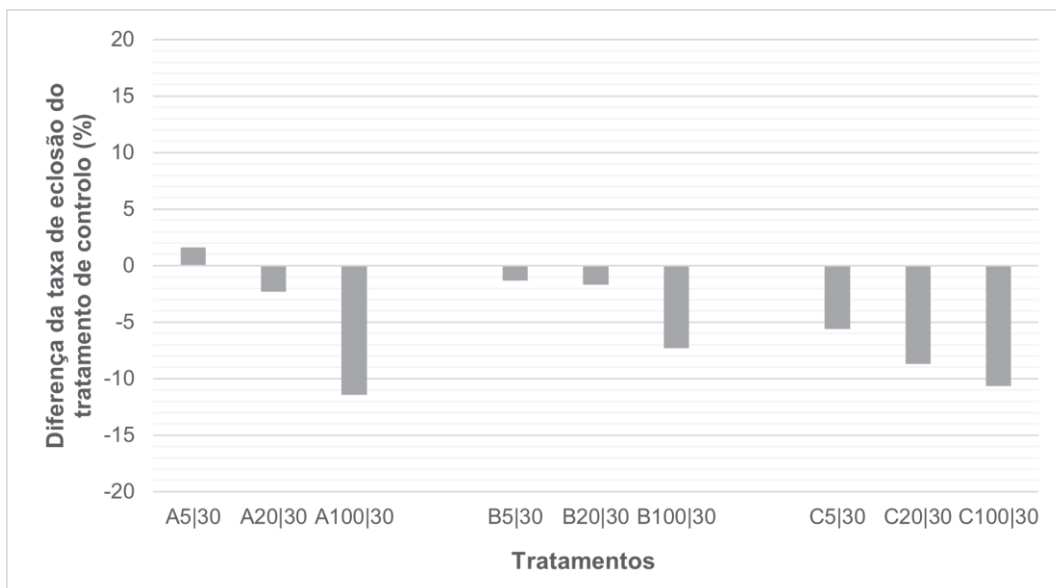


Figura 14 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre os tratamentos de controlo (0%) e os tratamentos com 5, 20 e 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) após 30 minutos de exposição do Ensaio 1 (barras) ($n = 9$).

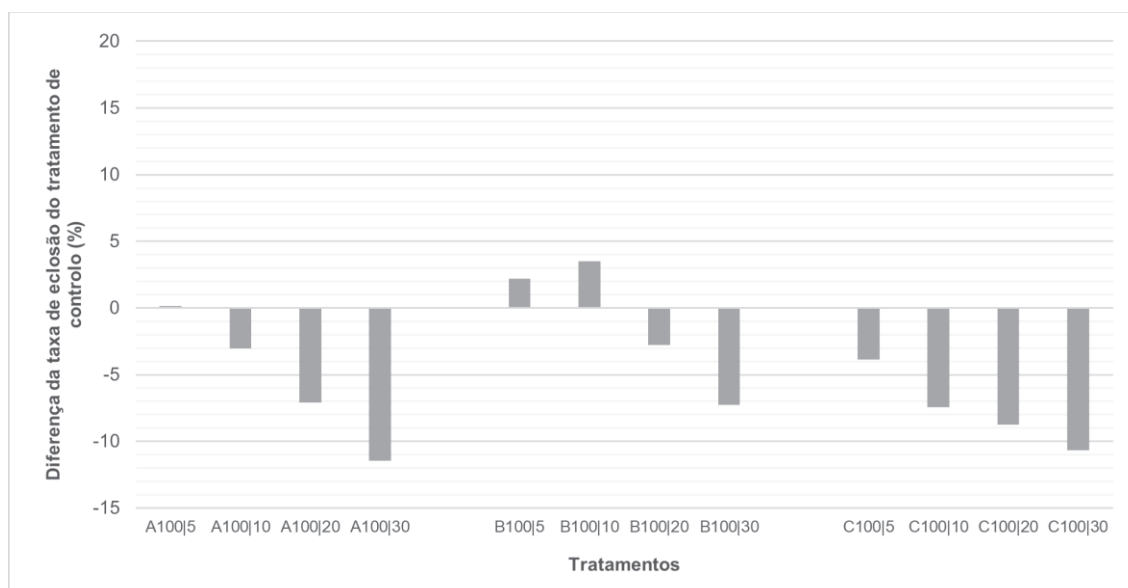


Figura 15 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre os tratamentos de controlo (0%) e os tratamentos com 100 mg/L dos três desinfetantes (azul de metileno (A), iodopovidona (B) e hipoclorito de sódio (C)) após 5, 10, 20 e 30 minutos de exposição do Ensaio 1 (barras) ($n = 9$).

3.6 Taxas de eclosão dos ovos às 48 h do Ensaio 2.1

Todas as taxas médias de eclosão dos ovos viáveis às 48 horas (h) e os respectivos intervalos de confiança de 95% dos tratamentos de desinfecção selecionados e realizados no Ensaio 2.1 (A10|30; A20|30; B20|30; B100|10; C5|30; C20|20 (Tabela 5)) encontram-se apresentadas no Anexo 2 e representadas graficamente na Figura 16.

As taxas de eclosão dos ovos às 48 h resultantes dos tratamentos designados para o Ensaio 2.1 mostraram-se significativamente diferentes das taxas de eclosão do tratamento de controlo (O) (Análise de variância (ANOVA), $F = 11,56$; $p < 0,001$), nomeadamente taxas às 48 h superiores para o tratamento de desinfecção de 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos de exposição (B100|10) (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,020$) e taxas inferiores para o tratamentos com 5 mg/L de hipoclorito de sódio durante 30 minutos (C5|30) (Teste *a posteriori* de Dunnett; $p = 0,010$) (Figura 16).

Quanto às as diferenças entre as taxas de eclosão médias às 48h dos tratamentos selecionados e experimentados no Ensaio 2.1 e as taxas de eclosão do controlo apenas os mesmos dois tratamentos acima referidos apresentaram diferenças destacáveis, acima ou abaixo dos 2%, registando o tratamento com 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos uma diferença de eclosão de +2,65% e o tratamento de desinfecção de 5 mg/L de hipoclorito de sódio durante 30 minutos de exposição uma diferença entre taxas médias de -2,91% (Figura 17).

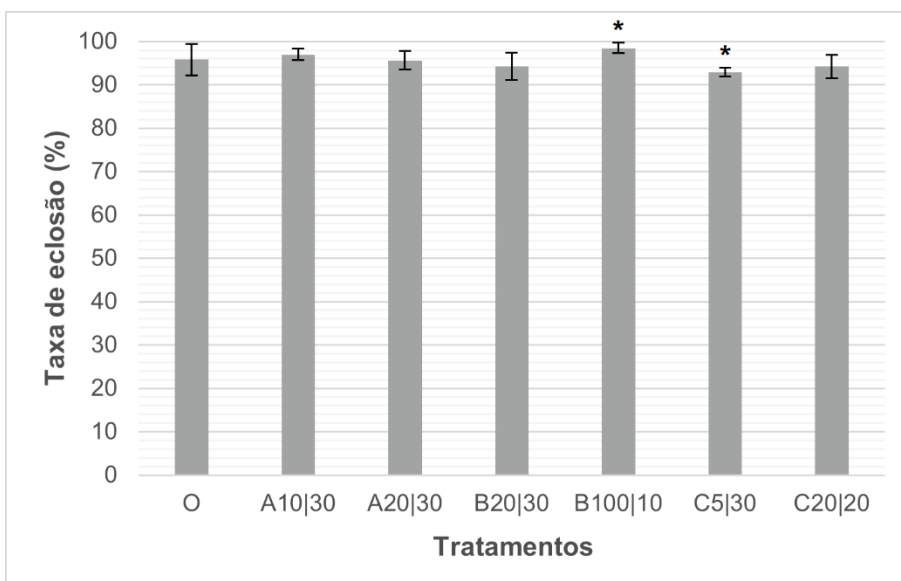


Figura 16 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h (barras) e respetivos intervalos de confiança de 95% (barras de erro) dos diferentes tratamentos do Ensaio 2.1 ($n = 3$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) resultantes das análises estatísticas e das posteriores comparações múltiplas com o tratamento de controlo (O) indicadas com um “*”.

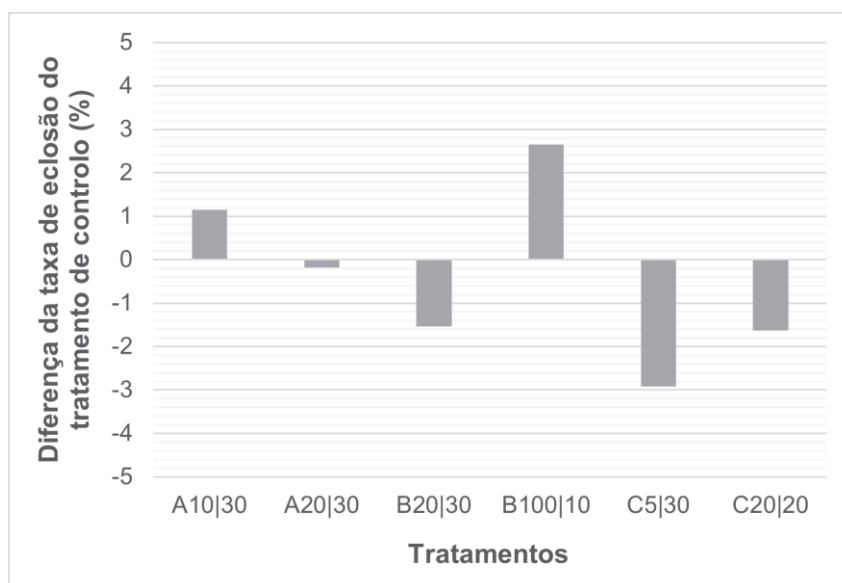


Figura 17 – Diferenças das taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 48 h entre o tratamento de controlo (0%) e os restantes tratamentos do Ensaio 2.1 (barras) ($n = 3$).

3.7 CFUs determinadas em meio TSA e TCBS do Ensaio 2.2

Todas as unidades formadoras de colónias (CFUs) por mililitro (mL) determinadas em meio TSA e TCBS para os tratamentos de desinfecção selecionados e testados no decorrer do Ensaio 2.2 (A10|30; A20|30; B20|30; B100|10; C5|30; C20|20 (Tabela 5)) encontram-se indicadas no Tabela 7.

Tabela 7 – Unidades formadoras de colónias (CFUs) por mL determinadas em meio TSA e TCBS para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$).

Tratamento	Concentração (mg/L)	Tempo de exposição	CFUs/mL em meio TSA	CFUs/mL em meio TCBS
Controlo (O)	0		$1,28 \times 10^4$	$5,85 \times 10^2$
Azul de metileno (A)	10	30 min	$8,80 \times 10^3$	$5,60 \times 10^2$
Azul de metileno (A)	20	30 min	$9,03 \times 10^3$	$5,20 \times 10^2$
Iodopovidona (B)	20	30 min	$1,14 \times 10^4$	$6,00 \times 10^2$
Iodopovidona (B)	100	10 min	$5,30 \times 10^3$	$3,30 \times 10^2$
Hipoclorito de sódio (C)	5	30 min	$1,20 \times 10^4$	$5,33 \times 10^2$
Hipoclorito de sódio (C)	20	20 min	$3,00 \times 10^3$	$4,60 \times 10^2$

Estas unidades formadoras de colónias (CFUs) determinadas em meio TSA e TCBS para os mesmos tratamentos realizados no Ensaio 2.2 encontram-se também reproduzidas graficamente, por ovo e não por mL, na Figura 18 para ambos os meios, e na Figura 19, em pormenor, apenas para o meio TCBS.

Relativamente às unidades formadoras de colónias (CFUs) determinadas em meio TSA, a totalidade dos tratamentos de desinfecção experimentados revelaram uma diminuição e menores CFUs que o tratamento de controlo (O) (Tabela 7) (Figura 18) mas o tratamento com 20 mg/L de iodopovidona durante 30 minutos (B20|30) e o tratamento de 5 mg/L de hipoclorito de sódio durante 30 minutos (C5|30) apresentaram diferenças muito pequenas e inferiores a -10 CFUs por ovo em comparação com o controlo (Figura 18).

Os dois tratamentos com azul de metileno, 10 e 20 mg/L durante 30 minutos (A10|30 e A20|30), registaram diferenças entre os -10 e os -20 CFUs por ovo comparativamente ao tratamento de controlo e os tratamentos 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos (B100|10) e 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos (C20|20) mostraram diferenças substanciais e superiores a -20 CFUs por ovo em relação ao controlo, nomeada e respetivamente de -37 e -49 CFUs por ovo (Figura 18).

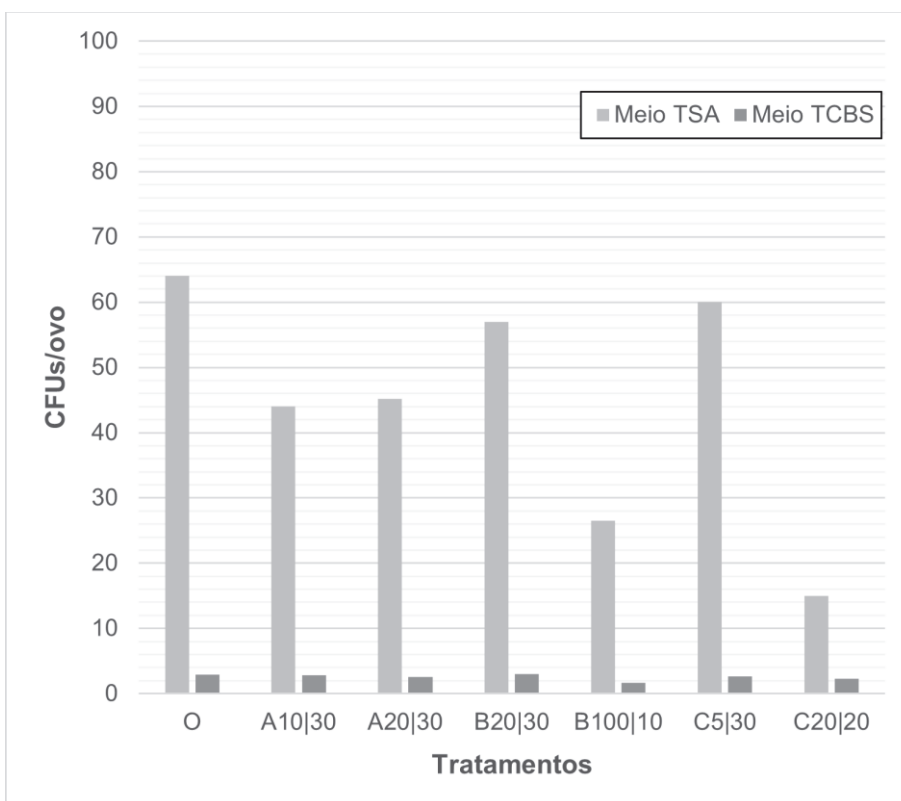


Figura 18 – Unidades formadoras de colónias (CFUs) por ovo determinadas em meio TSA (barras claras) e TCBS (barras escuras) para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$).

Quanto às unidades formadoras de colónias (CFUs) determinadas em meio TCBS, os tratamentos de desinfecção testados demonstraram CFUs muito idênticas ao tratamento de controlo (O) (Tabela 7) (Figura 18), de destacar apenas o tratamento com 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos (C20|20) com uma diferença de -0,63 CFUs por ovo relativamente ao controlo e o tratamento com 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos (B100|10) com uma diferença de -1,28 CFUs em comparação com o controlo (Figura 19).

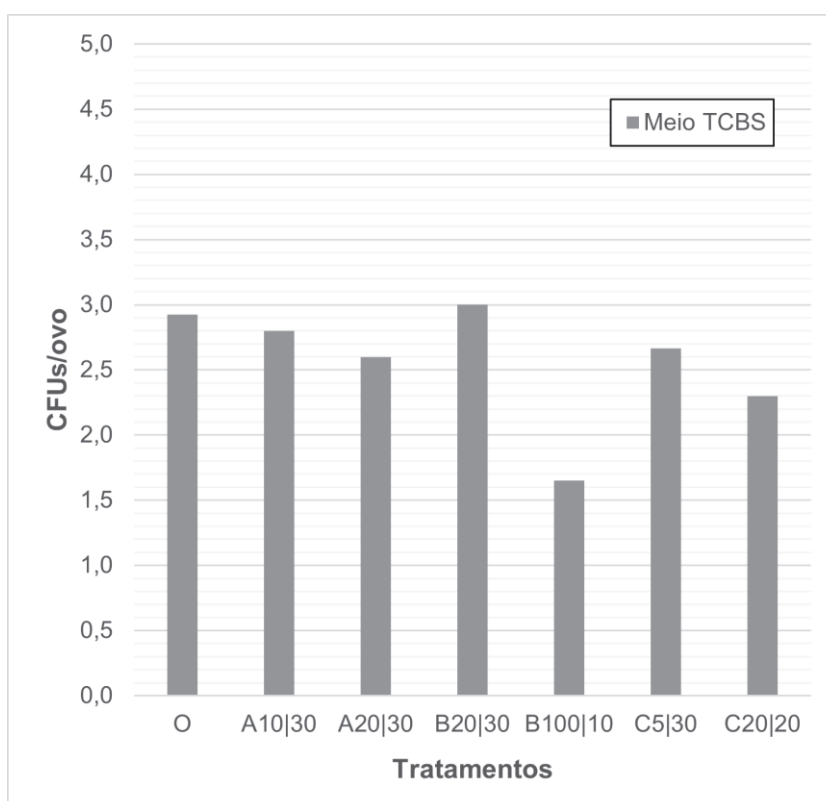


Figura 19– Unidades formadoras de colónias (CFUs) por ovo determinadas em meio TCBS (barras) para os tratamentos realizados no Ensaio 2.2 ($n = 1$).

4. Discussão

4.1 Qualidade da água da cultura de *A. tonsa*

Os valores obtidos de todos os parâmetros avaliados, pH, DO, amónia, nitritos e nitratos, relativos à qualidade da água da cultura, são semelhantes a valores obtidos noutras culturas de *A. tonsa* (Drillet et al., 2008b; Pham, 2014; Franco et al., 2017; Jepsen et al., 2017) e encontram-se dentro dos valores recomendados e adequados para o normal desenvolvimento e reprodução desta espécie em cativeiro (Marcus et al., 2004; Jepsen et al., 2015; Jørgensen et al., 2019).

4.2 Técnica de desinfeção e de lavagem dos ovos de *A. tonsa*

O protocolo concretizado de desinfeção e lavagem dos ovos e a técnica desenvolvida e executada para esse efeito revelaram-se resultados pouco consistentes e ligeiramente ineficazes em conservar o número de ovos inicialmente submetido à desinfeção e pretendido para as avaliações realizadas neste trabalho, número padrão este de 200 ovos.

Tanto o Ensaio 1 como o Ensaio 2.1, realizado meses depois e após muitos dias experimentais do Ensaio 1, apresentaram um número de ovos médio por replicado final de cerca de 170 ovos, o que relativamente aos 200 ovos do número padrão e estimado para cada replicado representa uma perda média de 15% em todo o processo desde o início da desinfeção nos tubos tipo Falcon™ de 15 mL, passando pelos tubos tipo Eppendorf AG® de 1,5 mL e as sucessivas centrifugações incluindo remoção de sobrenadantes e adição de água microfiltrada e autoclavada, até à transposição final dos ovos para os poços de incubação das placas multipoços.

Esta perda média de 15% dos ovos iniciais pode dever-se a vários fatores como a adsorção às paredes dos tubos e das pontas das pipetas e resistência na transposição de tubo para tubo por parte de alguns ovos, como velocidade de rotação (4000 rpm) ou duração (4 minutos) de centrifugação insuficientes para aglomerar todos os ovos em suspensão no *pellet*, ou ainda a homogeneização manual algo ineficaz não permitindo uma concentração uniforme e uma suspensão homogénea dos ovos no interior dos tubos.

Em todo o caso, a ser aplicada na indústria e em ordens de grandeza dos milhares ou até dos milhões de ovos, esta técnica necessita de otimização e aperfeiçoamentos nos processos pois perdas médias de 15% a nível empresarial são extremamente inconvenientes e penosas em termos lucrativos.

4.3 Eclosão dos ovos de *A. tonsa* sem desinfeção

As taxas de eclosão de ovos viáveis de *A. tonsa* às 48 horas (h) obtidas para os tratamentos de controlo do Ensaio 1 e do Ensaio 2.1 apresentaram-se, no cômputo geral, acima dos 90% e, em alguns casos, até acima dos 95%.

Estas taxas de eclosão de ovos viáveis às 48 h bastante elevadas e relativamente próximas da eclosão total dos ovos avaliados para os controlos já foi registada em outros estudos para esta espécie, nomeadamente organismos da estirpe dinamarquesa, como é o caso (Drillet et al., 2008a; Drillet et al., 2011b; Hagemann et al., 2016; Hansen et al., 2016; Jørgensen et al., 2019), sendo por isso, numa cultura saudável e produtiva, uma espécie não só caracterizada, em condições favoráveis, por taxas de eclosão de ovos viáveis muito apreciáveis e satisfatórias (Marcus & Lutz, 1994; Burkart & Kleppel, 1998; Peck et al., 2008; Ohs et al., 2009; Zhang et al., 2015) mas também por elevadas percentagens de ovos viáveis entre o número total de ovos produzidos (A. G. Mendes, observação pessoal; Burkart & Kleppel, 1998; Jepsen et al., 2007; Drillet et al., 2011b).

Todavia, as taxas de eclosão às 48 h dos controlos realizados para os desinfetantes iodopovidona e hipoclorito de sódio exibiram taxas de eclosão significativamente inferiores em relação aos controlos do azul de metileno e do Ensaio 2.1 (Figura 8).

O decréscimo no sucesso de eclosão dos ovos pode suceder devido a diversos motivos como alterações nas condições de cultivo e nos parâmetros físico-químicos da água da cultura e de incubação dos ovos, ao nível da temperatura, do fotoperíodo, da salinidade, do oxigénio dissolvido, do pH ou dos compostos azotados, como variações na disponibilidade e na qualidade do alimento fornecido à cultura, como flutuações na dinâmica populacional da cultura em termos de densidades, de estádios de desenvolvimento e de senescência dos organismos, como ainda pela introdução de espécies ou químicos contaminantes para o cultivo (Uye & Fleminger, 1976; Sullivan & Ritacco, 1985; Lutz et al., 1992; Marcus & Lutz, 1994; Jónasdóttir & Kjørboe, 1996; Castro-Longoria 2003; Nielsen et al., 2006; Peck & Holste, 2006; Hansen et al., 2010; Hagemann et al., 2016; Zhang et al., 2015; Franco et al., 2017; Jepsen et al., 2017).

Neste caso, pelo facto de não se terem verificado alterações nas condições de cultivo e incubação, na disponibilidade e quantidade de alimento e por não se terem observado, à lupa, espécies contaminantes, crê-se que as razões para que as taxas às 48 h dos controlos da iodopovidona e do hipoclorito de sódio se terem revelado significativamente menores foram o deterioramento da qualidade da microalga administrada *Rhodomonas baltica* (A. G. Mendes, observação pessoal), podendo ter fornecido níveis nutricionais subótimos, em particular níveis lipídicos (Kleppel et al., 2005; Franco et al., 2017), ou podendo ainda ter introduzido microrganismos ou compostos adversos e menos favoráveis à eclosão dos ovos (Poulet et al., 1994; Marcus et al., 2004; Hagemann et al., 2016), e/ou devido à maior densidade e longevidade de indivíduos adultos, já relacionada e associada a menores taxas de eclosão (Marcus & Wilcox, 2007; Franco et al., 2017), tendo os ensaios para estes desinfetantes ocorrido posteriormente, pela seguinte ordem: azul de metileno; iodopovidona; hipoclorito de sódio, e com uma densidade da população adulta superior (A. G. Mendes, observação pessoal).

4.4 Período de eclosão dos ovos de *A. tonsa*

As proporções de ovos eclodidos 24/48 horas (h) registadas para todos os tratamentos de controlo realizados durante o Ensaio 1 e o Ensaio 2.1 mostraram-se, na sua grande maioria, superiores a 85%, chegando as proporções mais elevadas a superar os 95%.

Estas proporções 24/48 h substancialmente elevadas e, em alguns casos, perto de alcançar a eclosão da totalidade dos ovos eclodidos em apenas 24 h também já havia sido descrita em outros trabalhos para este organismo e uma vez mais em particular para ovos “dinamarqueses” (Drillet et al., 2008b; Jepsen et al., 2015; Zhang et al., 2015; Hagemann et al., 2016), mas mais genericamente quando os ovos são colocados a incubar a temperaturas altas e superiores a 20 °C, que aceleram o processo da embriogénese nos ovos e, portanto, favorecem períodos menores até a eclosão dos ovos (McLaren et al., 1969; Vitiello et al., 2016).

Novamente, os tratamentos de controlo para os desinfetantes iodopovidona e hipoclorito de sódio exibiram resultados menos promissores quando comparadas com os controlos do azul de metileno e o controlo do Ensaio 2.1, inclusive as proporções 24/48 h dos controlos do hipoclorito de sódio chegaram mesmo a revelar-se significativamente inferiores em comparação com às proporções dos controlos do azul de metileno e Ensaio 2.1 (Figura 9).

Para além disso, as taxas de eclosão às 48 h e as proporções de ovos eclodidos 24/48 h demonstraram ser duas variáveis significativamente correlacionadas apresentando uma forte correlação positiva entre si.

Posto isto, é possível afirmar, como já referido na introdução, que estas duas variáveis mostram ser influenciadas maioritariamente pelos mesmos fatores, como indica o coeficiente de correlação obtido de 0,749. Por isso, é provável que os motivos aparentemente responsáveis pelo decréscimo nas taxas às 48 h dos controlos da iodopovidona e hipoclorito de sódio, o deterioramento da qualidade da microalga administrada e a maior densidade e longevidade de indivíduos adultos, sejam também os reesponsáveis pela diminuição nas proporções 24/48 h dos tratamentos de controlo dos mesmos desinfetantes.

Analisando as proporções de ovos eclodidos 24/48h registadas para os tratamentos de desinfeção, nenhuma destas proporções se mostrou significativamente diferente nem dos respetivos controlos nem entre si, seja comparando as concentrações ou os tempos de exposição em conjunto, seja comparando cada um dos tratamentos em particular (Figura 9) (Figura 10). Pati & Belmonte (2003), após a desinfeção de cistos de artémia e de rotíferos com um composto idêntico à iodopovidona, concluiu também que o tempo de exposição ao desinfetante não influencia a velocidade de eclosão.

Assim, apresentando todos os tratamentos de desinfeção uma tendência geral para proporções 24/48 h muito semelhantes aquelas obtidas para os respetivos controlos, pode-se concluir que os fatores preponderantes para a duração do período de eclosão dos ovos são, de facto, fatores intrínsecos já enumerados da qualidade dos ovos ao invés de quaisquer tratamentos de desinfeção posteriores.

Exceção disso, apresentando alguma influência ainda que relativa, é o caso da desinfeção com hipoclorito de sódio, tendo sido obtidas proporções 24/48 h superiores em tratamentos com concentrações mais elevadas (Figura 9) e proporções 24/48 h inferiores em tratamentos com tempos de exposição mais elevados (Figura 10), sendo que esta última observação já havia sido constatada por Pati & Belmonte (2003) na desinfeção de cistos de artémia e de rotíferos durante tempos de exposição superiores.

Como tal, o hipoclorito de sódio parece ser o único dos três desinfetantes com capacidade para influenciar e acelerar o processo de eclosão dos ovos através da utilização de tratamentos de desinfeção com concentrações de hipoclorito de sódio mais elevadas (Figura 9).

4.5 Viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* pós-desinfecção

Começando por analisar os resultados do Ensaio 1 e as taxas de eclosão às 48 h dos ovos desinfetados com azul de metileno (Figura 11), é possível verificar que este desinfetante apresenta uma influência reduzida sobre a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*, salvo quando aplicado nas concentrações mais elevadas que mostraram diminuir apreciavelmente a viabilidade dos ovos, na concentração de 100 mg/L durante quase todos os tempos de exposição, superiores a 5 minutos, e na concentração de 40 mg/L durante tempos de exposição mais prolongados, superiores a 20 minutos.

Em Hanks (1976), a aplicação de 100 mg/L de azul de metileno também já tinha sido registada como adversa e, no caso, como dose letal de 50 e 100% (LC₅₀ e LC₁₀₀) de um outro crustáceo, *Penaeus californiensis*, após 60 minutos de exposição.

Tratamentos de desinfecção com concentrações relativamente mais baixas de azul de metileno, 1, 2, 5, 10 e 20 mg/L, não mostraram praticamente efeitos negativos para a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* até aos 30 minutos de exposição experimentados.

A utilização de concentrações também mais baixas de azul de metileno, mas durante tempos de exposição muito mais prolongados, superiores a 24 horas, foram apontadas como prejudiciais e letais para outras espécies de crustáceos (Johnson, 1974; Abrahams & Brown, 1977; Müller, 1982; Calado et al., 2017).

Quanto às taxas de eclosão às 48 h dos ovos desinfetados com iodopovidona (Figura 12), verifica-se que este desinfetante mostra uma influência muito diminuta sobre a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*, tendo como exceções os tratamentos com concentrações mais elevadas, de 100 e 80 mg/L, durante tempos de exposição mais prolongados, superiores a 20 minutos, que revelaram reduzir consideravelmente a viabilidade dos ovos e o tratamento com a concentração mais elevada, 100 mg/L, mas com um tempo de exposição de 10 minutos, que, pelo contrário, demonstrou aumentar moderadamente a viabilidade dos ovos.

A exposição de iodopovidona durante tempos de exposição mais prolongados já haviam sido relatadas como nefastas e com mortalidades associadas para outras espécies de crustáceos mesmo quando aplicada em concentrações mais baixas, como 5 mg/L (Guo & Liao, 1994; Rojjananavin, 1996; Pati & Belmonte, 2003; Momoyama & Tanimura, 2004; Melendre et al., 2006; Liu et al., 2011).

Já Pietrak & Opitz (2004) tinha verificado também efeitos positivos e vantajosos na aplicação de iodopovidona em concentrações elevadas, 500 mg/L, durante tempos de exposição mais curtos para uma outra espécie de copépode, *Lepeophtheirus salmonis*.

A aplicação de iodopovidona em qualquer das concentrações testadas durante tempos de exposição relativamente mais curtos, inferiores a 25 minutos, não apresentaram efeitos negativos para a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*.

É possível observar também esta ausência de efeitos negativos durante tempos de exposição igualmente curtos para outro calanóide, *A. clausi*, para outra espécie de copépode, *L. salmonis*, e para outros crustáceos, mesmo quando expostos a concentrações de iodopovidona superiores a 100 mg/L (Chen et al., 1992; Naess & Bergh, 1994; Maeda et al., 1998; Mushiake et al., 1999; Mohamed et al., 2000; Takahashi et al., 2003; Momoyama & Tanimura, 2004; Pietrak & Opitz, 2004; He et al., 2014; Kabir et al., 2014; Sebire et al., 2018).

Em relação às taxas de eclosão às 48 h dos ovos após desinfecção com hipoclorito de sódio (Figura 13), é possível constatar que este desinfetante revela uma influência substancial sobre a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*, exibindo efeitos negativos na maioria das concentrações testadas exceto na concentração mais baixa, 5 mg/L, principalmente quando aplicadas durante tempos de exposição mais prolongados, superiores a 15 minutos.

Efeitos negativos e letalidades derivadas da exposição de hipoclorito de sódio em concentrações relativamente mais elevadas, superiores a 10 mg/L, já tinham sido descritas para *A. tonsa*, para outros copépodes calanóides e para outras espécies de copépodes e de crustáceos, mesmo durante tempos de exposição menos prolongados (Gentile, 1976; Capuzzo, 1979; Dempster et al., 1988; Takahashi et al., 2003; Pietrak & Opitz, 2004; Lin et al., 2009; Tsolaki et al., 2010; Kerrison et al., 2016; Sebire et al., 2018; Daw et al., 2021).

Apenas a aplicação de hipoclorito de sódio numa concentração muito baixa, 5 mg/L, parece não diminuir a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*.

Concentrações também mais baixas de hipoclorito de sódio, inferiores a 10 mg/L, mas quando aplicadas durante tempos mais prolongados já demonstraram provocar efeitos adversos e mortalidades em *A. tonsa*, noutra calanóide, *Eurytemora affinis*, e noutras espécies de copépodes e de crustáceos (Behrens & Larsson, 1976; Bradley, 1977; Capuzzo et al., 1977; Davis & Coughlan, 1978; Brown et al., 1994; GomezGil et al., 1994; Manning et al., 1996; Bamber & Seaby, 2004).

Analisando agora comparativamente as taxas de eclosão médias às 48h dos ovos desinfetados com 5, 20 e 100 mg/L de cada um dos três desinfetantes durante um tempo de exposição de 30 minutos (Figura 14), é possível observar que todos os desinfetantes reduzem amplamente a viabilidade dos ovos quando aplicados na concentração de 100 mg/L, no entanto, quando aplicados nas concentrações de 20 e 5 mg/L, apenas o hipoclorito de sódio evidencia diminuições apreciáveis da viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*.

Comparando já as taxas de eclosão médias às 48h dos ovos desinfetados apenas com 100 mg/L dos três desinfetantes mas durante 5, 10, 20 e 30 minutos de exposição (Figura 15), constata-se que o hipoclorito de sódio diminui consideravelmente a viabilidade dos ovos durante quase todos os tempos de exposição, 10, 20 e 30 minutos, que o azul de metileno diminui consideravelmente a viabilidade durante tempos de exposição mais prolongados, de 20 e 30 minutos, e que a iodopovidona apenas diminui consideravelmente a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* após 30 minutos de exposição, não exibindo efeitos negativos durante tempos de exposição de 5, 10 e 20 minutos e revelando inclusive aumentos da viabilidade dos ovos durante tempos de exposição mais curtos, de 5 e 10 minutos.

Realizando uma análise comparativa global dos três desinfetantes experimentados através dos resultados do Ensaio 1, é possível afirmar que a iodopovidona e o azul de metileno aparentam ser desinfetantes menos nocivos e mais favoráveis para utilizar na desinfecção de ovos de *A. tonsa* e que, pelo contrário, o hipoclorito de sódio parece ser o desinfetante mais nefasto e desfavorável dos três desinfetantes experimentados

De realçar que a iodopovidona foi o único desinfetante que demonstrou aumentar efetivamente a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*, nomeadamente através da aplicação de 100 mg/L durante 10 minutos de exposição, revelando ser o tratamento de desinfecção mais promissor no que a viabilidade dos ovos diz respeito.

Outros desinfetantes, designadamente o glutaraldeído e o formaldeído, também obtiveram resultados satisfatórios na desinfecção de ovos de *A. tonsa* e outros calanóides, *A. tsuensis* e *E. affinis*, durante um tempo de exposição mais curto, 3 minutos de exposição, o glutaraldeído numa concentração mais elevada, 250 mg/L, e o formaldeído em concentrações mais baixas, entre 5 e 20 mg/L (Naess & Bergh, 1994; Toledo et al., 2005).

Para a iodopovidona, é recomendável a utilização de concentrações até 20 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 30 minutos ou de concentrações até 100 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 20 minutos.

Para o azul de metileno, recomenda-se a utilização de concentrações até 10 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 30 minutos ou concentrações até 40 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 20 minutos.

Para o hipoclorito de sódio, é recomendável a utilização da concentração de 5 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 30 minutos ou concentrações até 40 mg/L durante um tempo de exposição máximo de 15 minutos.

Analisando, por último, os resultados do Ensaio 2.1 e as taxas de eclosão às 48 h dos ovos desinfetados com os 6 tratamentos selecionados (Figura 16) (Figura 17), apenas a aplicação de 5 mg/L de hipoclorito de sódio durante 30 minutos de exposição mostrou reduzir de modo considerável a viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa*.

Contrariamente, o tratamento que obteve resultados mais positivos e o único a aumentar de forma relevante a viabilidade dos ovos foi o de 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos de exposição, confirmando, uma vez mais, ser o tratamento mais vantajoso quanto à viabilidade biológica dos ovos de *A. tonsa* de entre todos os tratamentos de desinfecção experimentados neste trabalho.

4.6 Eficácia microbiológica da desinfecção dos ovos de *A. tonsa*

Ao analisar os resultados do Ensaio 2.2 e as unidades formadoras de colónias (CFUs) determinadas em meio TSA e TCBS para os 6 tratamentos selecionados (Figura 18), é possível verificar, em primeiro lugar, que a grande maioria das bactérias presentes nos ovos de *A. tonsa* são espécies não pertencentes ao género *Vibrio*, bactérias pertencentes a este género também ocorrem, mas num número substancialmente inferior.

O género *Vibrio* já havia sido documentado em *A. tonsa*, tanto em meio selvagem como em cativeiro, noutros calanóides e noutras espécies de copépodes, mas com uma representatividade muito superior (Kaneko & Colwell, 1975; Sochard et al., 1979; Huq et al., 1983; Carli et al., 1993; Dumontet et al., 1996; Montanari et al., 1999; Maugeri et al., 2004; Maugeri et al., 2006; Gugliandolo et al., 2008; Zidour et al., 2017).

Muitas espécies de *Vibrio* são responsáveis por patologias e doenças epidémicas graves em crustáceos, como necrose hepatopancreática aguda, em peixes, como diversas vibrioses, e até seres humanos, como gastroenterites e cólera, sendo portanto bactérias preocupantes e de elevado risco sanitário para a indústria da aquacultura e para a saúde pública (Anderson & Conroy, 1970; Blake et al., 1979; Blake et al., 1980; Colwell & Grimes, 1984; Tison & Kelly, 1984; McLaughlin et al., 2005; Pridgeon & Klesius, 2012; Haenen et al., 2014; Farmer III et al., 2015; Novriadi, 2016; Chandrakala & Priya, 2017; Haenen, 2017; OIE, 2019; Arunkumar et al., 2020).

Como tal, verifica-se que é possível produzir ovos de *A. tonsa* relativamente mais biosseguros apresentando uma perigosidade patogénica reduzida para os cultivos que se alimentam e poderão vir a alimentar desta espécie.

Avaliando as CFUs determinadas em meio TSA para os 6 tratamentos selecionados (Figura 18), constata-se que a maior parte dos tratamentos de desinfecção diminuíram de modo considerável a carga bacteriana genérica dos ovos, sendo os tratamentos com 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos de exposição e com 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos de exposição os mais eficazes e aqueles que apresentaram reduções bacterianas mais expressivas.

Tratamentos de desinfecção com concentrações semelhantes de hipoclorito de sódio e de iodopovidona já tinham revelado moderada atividade antibacteriana embora concentrações mais elevadas, superiores a 20 e a 100 mg/L respetivamente, apresentem maior eficácia na redução da carga bacteriana genérica (GomezGil et al., 1994; Naess & Bergh, 1994; Salvesen & Vadstein, 1995; Brown et al., 1997; Mohamed et al., 2000; Wagner et al., 2008; Pangastuti et al., 2009; Mainous et al., 2010; Saejung et al., 2014; Huysman et al., 2018).

Por outro lado, ao avaliar as CFUs determinadas em meio TCBS para os 6 tratamentos selecionados (Figura 19), é possível observar que a maioria dos tratamentos de desinfecção se mostra ineficaz a reduzir a carga bacteriana de *Vibrio* spp. à exceção dos tratamentos com 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos de exposição e com 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos de exposição, sendo este último o tratamento o mais eficaz e que apresentou um decréscimo mais significativo do número de bactérias do género *Vibrio*.

A exposição de hipoclorito de sódio e de iodopovidona em concentrações similares, e mesmo em concentrações mais baixas, já haviam demonstrado uma elevada eficácia bactericida contra *Vibrio* spp. (Sako et al., 1988; GomezGil et al., 1994; McCarthy & Miller, 1994; Muroga et al., 1994; Rojjananavin, 1996; Castro-Rosas & Escartin, 1999; Tendencia, 2001; Pangastuti et al., 2009).

Atendendo ao perigo que representam as bactérias do género *Vibrio*, é possível considerar a desinfecção com 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos de exposição o tratamento mais eficaz em eliminar bactérias possivelmente patogénicas e em assegurar a biossegurança dos ovos de *A. tonsa*.

Todavia, também já foram detetadas, em menor número, outras bactérias patogénicas não pertencentes ao género *Vibrio* tanto para organismos marinhos como para a espécie humana em *A. tonsa*, noutros copépodes calanóides e noutras espécies de copépodes, tais como, *Aeromonas* spp., *Arcobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp. e *Staphylococcus* spp. (Sochard et al., 1979; Dumontet et al., 1996; Maugeri et al., 2006; Gugliandolo et al., 2008; Zidour et al., 2017).

Logo, a desinfecção com 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos de exposição também poderá apresentar uma eficácia bastante interessante na eliminação de outras bactérias com patologias associadas dos ovos de *A. tonsa*.

De referir que, apesar de não ter sido avaliado como uma variável para a avaliar de eficácia microbiológica da desinfecção, verificou-se um crescimento de colónias de fungos em simultâneo durante o período de incubação das placas, ocorrendo em quase todos os tratamentos, inclusive no tratamento de controlo, exceto nas placas contendo os ovos desinfetados com 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos podendo isto significar que o hipoclorito de sódio possui um efeito fungicida superior em relação ao azul de metileno e à iodopovidona.

5. Considerações finais e perspectivas futuras

Em primeiro lugar, é preciso afirmar que, perante as diminutas cargas bacterianas genérica e específica de *Vibrio* spp. apresentada pelos ovos de *A. tonsa* sem desinfecção, é questionável a necessidade de um procedimento de desinfecção de ovos. Ao invés, poderá ser mais aconselhável garantir uma correta manutenção da cultura de *A. tonsa*, realizando trocas de água, sifonagens e limpezas dos tanques com bastante frequência e utilizando apenas água totalmente esterilizada, material exclusivo e descontaminado e microalgas axénicas por forma, não só a assegurar culturas com uma carga bacteriana reduzida e livres de bactérias potencialmente patogénicas, mas também a promover uma produtividade de ovos máxima só alcançada através da administração de alimento de qualidade superior e de uma dinâmica populacional estável.

No entanto, é provável que, num regime de produção intensiva e em larga escala de *A. tonsa* ou num outro contexto regional ou circunstancial, venha a ser necessário desinfetar os ovos, até para serem comercializados com a garantia de ser um produto biosseguro.

Porém, no cenário de desinfecção dos ovos com uma solução aquosa, é fundamental encontrar uma técnica de desinfecção alternativa à realizada durante o trabalho de modo a não ocorrerem perdas apreciáveis de ovos, por exemplo através da utilização de um crivo de uso exclusivo para a desinfecção, de 75 µm ou de malhagem mais fina, submergindo o crivo com ovos na solução de desinfetante durante o tempo de exposição pretendido e podendo ser depois lavados através de imersões em água esterilizada e com auxílio de um esguicho.

Como tratamento de desinfecção dos ovos de *A. tonsa*, tendo em conta, tanto a viabilidade biológica pós-desinfecção, como a eficácia microbiológica da desinfecção avaliadas no trabalho realizado, é recomendável a aplicação de 100 mg/L de iodopovidona durante 10 minutos ou a aplicação de 20 mg/L de hipoclorito de sódio durante 20 minutos. Poderão ainda existir concentrações e tempos de exposição não testados para estes desinfetantes, pelo menos quanto à eficácia microbiológica, com maior potencial de desinfecção de ovos de *A. tonsa*, nomeadamente concentrações superiores a 100 mg/L de iodopovidona durante tempos de exposição curtos e concentrações superiores a 20 mg/L de hipoclorito de sódio também durante tempos de exposição mais curtos. De notar ainda que os resultados da eficácia microbiológica necessitam de ser reproduzidos com um número maior de replicados de forma a oferecer a solidez estatística e a tirar conclusões mais consistentes.

Não obstante, seria sensato experimentar outros desinfetantes, o glutaraldeído e o formaldeído por exemplo, e outros métodos de desinfecção ainda, como por exemplo ozono ou UV, podendo estes revelar-se mais vantajosos, não só ao nível da eficácia microbiológica da desinfecção, como também ao nível da viabilidade biológica pós-desinfecção dos ovos de *A. tonsa*.

Para além das variáveis avaliadas neste trabalho, é necessário testar muitas outras antes de estabelecer um determinado tratamento como viável e promissor na indústria da aquacultura, tais como a sobrevivência e desenvolvimento de náuplios até adultos, as taxas de crescimento e mortalidade diárias; a capacidade reprodutiva e fecundidade dos adultos, as taxas de eclosão e o período de eclosão dos ovos e a *performance* das gerações seguintes, os perfis bioquímicos da F1 e da F2, entre outras. Uma das variáveis mais relevantes é a eclosão de ovos desinfetados de *A. tonsa* após diferentes períodos de armazenamento no frio, sendo este armazenamento o principal motivo de interesse para o setor da aquacultura.

6. Referências Bibliográficas

- Abate, T. G., Nielsen, R., Nielsen, M., Drillet, G., Jepsen, P. M., & Hansen, B. W. (2015). Economic feasibility of copepod production for commercial use: Result from a prototype production facility. *Aquaculture*, 436, 72–79.
- Abrahams, D., & Brown, W. D. (1977). Evaluation of fungicides for *Haliphthoros milfordensis* and their toxicity to juvenile European lobsters. *Aquaculture*, 12(1), 31-40.
- Ajiboye, O. O., Yakubu, A. F., Adams, T. E., Olaji, E. D., & Nwogu, N. A. (2011). A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(2), 225-246.
- Algae Research Supply. (2021). *COPEPODS: LIFE CYCLE*. Consultado em 11 março 2021. Disponível em <https://www.algaeresearchsupply.com/pages/copepods-life-cycle/>.
- Allan, J. D., & Heinle, D. R. (1976). *Grazing in juvenile stages of some estuarine calanoid copepods.[Acartia tonsa, A. clausi, Eurytemora affinis]*. Maryland Univ., College Park (USA). Dept. of Zoology; Lawrence Univ., Appleton, Wis.(USA). Dept. of Zoology; Maryland Univ., Solomons (USA). Chesapeake Biological Lab..
- Allan, G., & Burnell, G. (2013). *Advances in aquaculture hatchery technology*. Elsevier.
- Alver, M. O., Storøy, W., Bardal, T., Overrein, I., Onsøyen, M. K., Tennøy, T., & Øie, G. (2011). Automatic measurement of *Acartia tonsa* nauplii density, and estimation of stage distribution. *Aquaculture*, 313(1-4), 100-106.
- Ambler, J. W. (1985). Seasonal factors affecting egg production and viability of eggs of *Acartia tonsa* Dana from East Lagoon, Galveston, Texas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 20(6), 743-760.
- Anderson, J. I. W., & Conroy, D. A. (1970). Vibrio disease in marine fishes. In *A symposium on diseases of fishes and shellfishes* (pp. 266-272). Am. Fish. Soc Washington, DC.
- Arun Kumar, M., Lewis Oscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* spp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*, 94, 213-223.
- Bamber, R. N., & Seaby, R. M. (2004). The effects of power station entrainment passage on three species of marine planktonic crustacean, *Acartia tonsa* (Copepoda), *Crangon crangon* (Decapoda) and *Homarus gammarus* (Decapoda). *Marine environmental research*, 57(4), 281-294.
- Ban, S., & Minoda, T. (1994). Induction of diapause egg production in *Eurytemora affinis* by their own metabolites. In *Ecology and Morphology of Copepods* (pp. 185-189).

Springer, Dordrecht.

- Barroso, M. V., De Carvalho, C. V. A., Antoniassi, R., & Cerqueira, V. R. (2013). Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture*, 388, 153-158.
- Behrens, D.W., & Larsson, B.C. (1976). Effects of intermittent chlorination on selected invertebrate species indigenous to Diablo Cove. *Report No. 7846*. 7-76.
- Bellas, J., & Thor, P. (2007). Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 16(6), 465-474.
- Bellas, J., & Gil, I. (2020). Polyethylene microplastics increase the toxicity of chlorpyrifos to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Pollution*, 260, 114059.
- Berggreen, U., Hansen, B., & Kiørboe, T. (1988). Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production. *Marine biology*, 99(3), 341-352.
- Besiktepe, S., & Dam, H. G. (2002). Coupling of ingestion and defecation as a function of diet in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 229, 151-164.
- Bielmyer, G. K., Grosell, M., & Brix, K. V. (2006). Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. *Environmental science & technology*, 40(6), 2063-2068.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G., & Heublein, P. C. (1979). Disease caused by a marine vibrio: clinical characteristics and epidemiology. *New England Journal of Medicine*, 300(1), 1-5.
- Blake, P. A., Weaver, R. E., & Hollis, D. G. (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 341-367.
- Bradley, B. P. (1977). *Comparison of residual biotoxicity of chlorine and bromine chloride to copepods*. Technical report (No. PB-286113). Maryland Univ., College Park (USA). Water Resources Research Center.
- Breteler, W. K. (1980). Continuous breeding of marine pelagic copepods in the presence of heterotrophic dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2, 229-233.
- Broglio, E., Jónasdóttir, S. H., Calbet, A., Jakobsen, H. H., & Saiz, E. (2003). Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. *Aquatic Microbial Ecology*, 31(3), 267-278.
- Brown, L. L., Cox, W. T., & Levine, R. P. (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(3), 213-218.
- Brown, M. D., Walker, D. O., Hendrikz, J. K., Cabral, C. P., Araujo, D. B., Ribeiro, Z. M., &

- Kay, B. H. (1994). Chlorine tolerance of *Mesocyclops* (Cyclopoida: Cyclopidae) copepods and three container-breeding species of mosquitoes. *Environmental Entomology*, 23(5), 1245-1249.
- Burkart, C. A., & Kleppel, G. S. (1998). A new incubation system for the measurement of copepod egg production and egg hatching success in the field. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 221(1), 89-97.
- Buskey, E. J., & Hartline, D. K. (2003). High-speed video analysis of the escape responses of the copepod *Acartia tonsa* to shadows. *The Biological Bulletin*, 204(1), 28-37.
- Buskey, E. J. (2005). Behavioral characteristics of copepods that affect their suitability as food for larval fishes. *Copepods in Aquaculture*, 91-105.
- Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M. P., & Holt, J. (2017). *Marine ornamental species aquaculture*. Wiley Blackwell.
- Capuzzo, J. M., Goldman, J. C., Davidson, J. A., & Lawrence, S. A. (1977). Chlorinated cooling waters in the marine environment: development of effluent guidelines. *Marine Pollution Bulletin*, 8(7), 161-163.
- Capuzzo, J. M. (1979). The effect of temperature on the toxicity of chlorinated cooling waters to marine animals—A preliminary review. *Marine Pollution Bulletin*, 10(2), 45-47.
- Carvalho, N. (2004, Fevereiro 16). *onde comprar azul de metileno?*. Aquariofilia.Net. Consultado em 20 novembro 2019. Disponível em <https://www.aquariofilia.net/forum/topic/4371-onde-comprar-azul-de-metileno/>.
- Castro-Longoria, E. (2003). Egg production and hatching success of four *Acartia* species under different temperature and salinity regimes. *Journal of Crustacean Biology*, 23(2), 289-299.
- Castro-Rosas, J., & Escartin, E. F. (1999). Incidence and germicide sensitivity of *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae* O1 in alfalfa sprouts. *Journal of food safety*, 19(2), 137-146.
- Caudill, C. C., & Bucklin, A. (2004). Molecular phylogeography and evolutionary history of the estuarine copepod, *Acartia tonsa*, on the Northwest Atlantic coast. *Hydrobiologia*, 511(1), 91-102.
- Cervetto, G., Gaudy, R., & Pagano, M. (1999). Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 239(1), 33-45.
- Chalupnicki, M., Dittman, D., Starliper, C. E., & Iwanowicz, D. D. (2015). Efficacy of iodine for disinfection of lake sturgeon eggs from the St. Lawrence River, New York. *North American Journal of Aquaculture*, 77(1), 82-89.

- Chambel, J., Costa, R., Gomes, M., Mendes, S., Baptista, T., & Pedrosa, R. (2014). Hydrogen peroxide, iodine solution and methylene solution highly enhance the hatching rate of freshwater ornamental fish species. *Aquaculture international*, 22(6), 1743-1751.
- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in shrimp aquaculture a review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2), 27-33.
- Chang, P. S., Chen, L. J., & Wang, Y. C. (1998). The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. *Aquaculture*, 166(1-2), 1-17.
- Chen, S. N., Chang, P. S., & Kou, G. H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Hawaii. The Oceanic Institute*, 177-184.
- Chesney, E. J. (2005). Copepods as live prey: a review of factors that influence the feeding success of marine fish larvae. *Copepods in aquaculture*, 133-150.
- Chinnery, F. E., & Williams, J. A. (2004). The influence of temperature and salinity on *Acartia* (Copepoda: Calanoida) nauplii survival. *Marine Biology*, 145(4), 733-738.
- Colwell, R. R., & Grimes, D. J. (1984). *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 37(1), 265-287.
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613–640.
- Dagg, M. (1977). Some effects of patchy food environments on copepods. *Limnology and Oceanography*, 22(1), 99-107.
- Das, P., Mandal, S. C., Bhagabati, S. K., Akhtar, M. S., & Singh, S. K. (2012). Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in aquaculture*, 5(4), 69-86.
- Davis, M. H., & Coughlan, J. (1978). Response of entrained plankton to low-level chlorination at a coastal power station. *Water chlorination: environmental impact and health effects*, 2.
- Daw, A. L., Sarkisian, B. L., Blaylock, R. B., & Saillant, E. A. (2021). Removal of Free-Living Ciliates from Stock Cultures of Two Calanoid Copepods with Sodium Hypochlorite. *North American Journal of Aquaculture*, 83(4), 381-389.
- Dempster, R. P., Morales, P., & Glennon, F. X. (1988). Use of sodium chlorite to combat anchorworm infestations of fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 50(1), 51-55.
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (pp. 157-202). Woodhead Publishing

Limited.

- diArk. (2021). *Acartia tonsa*. Consultado em 30 março 2021. Disponível em https://www.diark.org/diark/species_list/Acartia_tonsa/.
- Dos Santos, A., Quintela, F., Dias Inês, M., De Sousa, L. F. (2006). Guia técnico de curso de formação: Taxonomia Ecologia e de Zooplâncton Marinho. Métodos e Técnicas de amostragem, contagem e identificação. *BioMar PT, Instituto Português do Mar e da Atmosfera*.
- Douillet, P. (1998). Disinfection of rotifer cysts leading to bacteria-free populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 224(2), 183-192.
- Drillet, G., Jørgensen, N. O., Sørensen, T. F., Ramløv, H., & Hansen, B. W. (2006a). Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquaculture Research*, 37(8), 756-772.
- Drillet, G., Iversen, M. H., Sørensen, T. F., Ramløv, H., Lund, T., & Hansen, B. W. (2006b). Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring. *Aquaculture*, 254(1-4), 714-729.
- Drillet, G., Lindley, L. C., Michels, A., Wilcox, J., & Marcus, N. H. (2007). Improving cold storage of subitaneous eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana from the Gulf of Mexico (Florida–USA). *Aquaculture Research*, 38(5), 457-466.
- Drillet, G., Goetze, E., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., & Hansen, B. W. (2008a). Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures, I: strain origin, genetic differentiation and egg survivorship. *Aquaculture*, 280(1-4), 109-116.
- Drillet, G., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Jørgensen, N. O., & Hansen, B. W. (2008b). Strain-specific vital rates in four *Acartia tonsa* cultures II: life history traits and biochemical contents of eggs and adults. *Aquaculture*, 279(1-4), 47-54.
- Drillet, G. (2010). Copepods and their resting eggs, a potential source of nauplii for aquaculture. *Department of Environment, Social and Spatial Changes and DTU-Aqua. Roskilde University and Technical University of Denmark, Roskilde and Charlottenlund, Denmark*, 170.
- Drillet, G., Rabarimanantsoa, T., Frouël, S., Lamson, J. S., Christensen, A. M., Kim-Tiam, S., & Hansen, B. W. (2011a). Do inactivated microbial preparations improve life history traits of the copepod *Acartia tonsa*?. *Marine biotechnology*, 13(5), 831-836.
- Drillet, G., Hansen, B. W., & Kiørboe, T. (2011b). Resting egg production induced by food limitation in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2064-2070.
- Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A. K., & Hansen, B. W. (2011c). Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315(3-4), 155-166.

- Drillet, G., Maguet, R., Mahjoub, M. S., Roullier, F., & Fielding, M. J. (2014). Egg cannibalism in *Acartia tonsa*: effects of stocking density, algal concentration, and egg availability. *Aquaculture international*, 22(4), 1295-1306.
- Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S. B., Grottoli, R., Pasquale, V., & Vanucci, S. (1996). Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 19(3), 245-254.
- Durbin, E. G., Durbin, A. G., S-mayda, T. J., & Verity, P. G. (1983). Food limitation of production by adult *Acartia tonsa* in Narragansett Bay, Rhode Island 1. *Limnology and Oceanography*, 28(6), 1199-1213.
- Elliott, D. T., & Tang, K. W. (2011). Influence of carcass abundance on estimates of mortality and assessment of population dynamics in *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 427, 1-12.
- Evjemo, J. O., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (2003). Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 227(1-4), 191-210.
- FAO. (2015). World Programme for the Census of Agriculture 2020. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 195, Issue 5).
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Sustainability in action. Rome.
- Farmer III, J. J., Michael Janda, J., Brenner, F. W., Cameron, D. N., & Birkhead, K. M. (2015). *Vibrio*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-79.
- Ferrari, F. D., & Dahms, H. U. (2007). *Post-embryonic development of the Copepoda* (Vol. 8). Brill.
- Ferreira, P. M. P. (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. *Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P. IPIMAR*, 235.
- Fleeger, J. W. (2005). The potential to mass-culture harpacticoid copepods for use as food for larval fish. *Copepods in aquaculture*, 11-24.
- Franco, S. C., Augustin, C. B., Geffen, A. J., & Dinis, M. T. (2017). Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture*, 468, 569-578.
- Gaudy, R., Cervetto, G., & Pagano, M. (2000). Comparison of the metabolism of *Acartia clausi* and *A. tonsa*: influence of temperature and salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247(1), 51-65.
- Gentile, J. H. (1976). *Power plants, chlorine, and estuaries*. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory.

- Gifford, D. J., & Dagg, M. J. (1988). Feeding of the estuarine copepod *Acartia tonsa* Dana: carnivory vs. herbivory in natural microplankton assemblages. *Bulletin of Marine Science*, 43(3), 458-468.
- Gilbert, J. J., & Williamson, C. E. (1983). Sexual dimorphism in zooplankton (Copepoda, Cladocera, and Rotifera). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14(1), 1-33.
- GomezGil-RS, B., Abreu-Grobois, F. A., Romero-Jarero, J., & De Los Herrera-Vega, M. (1994). Chemical disinfection of *Artemia* nauplii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(4), 579-583.
- Gorbi, G., Invidia, M., Savorelli, F., Faraponova, O., Giacco, E., Cigar, M., Buttino, I., Leoni, T., Prato, E., Lacchetti, I., & Sei, S. (2012). Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 2023-2028.
- Guo, J.J., Liao, I.C. (1994). Toxicity of povidone iodine to fertilized eggs and nauplii of *Penaeus monodon* and algae. *Council of Agriculture (COA) Fish. Ser. 47, Fish Dis. Res. 15*, 37-45.
- Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V., & Maugeri, T. L. (2008). Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), 600-606.
- Haenen, O. L. M., Fouz Rodríguez, B., Amaro González, C., Isern, M. M., Mikkelsen, H., Zrnčić, S., Travers, M. A., Renault, T., Wardle, R., Hellström, A., & Dalsgaard, I. (2014). Vibriosis in aquaculture. 16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2014, vol. 34, num. 4, p. 138-147.
- Haenen, O. (2017, April). Major bacterial diseases affecting aquaculture. *In Aquatic AMR Workshop, Mangalore, India* (Vol. 1, pp. 10-11).
- Hagemann, A., Øie, G., Evjemo, J. O., & Olsen, Y. (2016). Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* Dana eggs. *Aquaculture international*, 24(1), 57-68.
- Hagemann, A., Vorren, S. H., Attramadal, Y., Evjemo, J. O., & Olsen, Y. (2017). Effects of different wavelengths and intensities of visible light on the hatching success of *Acartia tonsa* Dana eggs. *Aquaculture international*, 25(2), 531-541.
- Hammervold, S. H., Glud, R. N., Evjemo, J. O., Hagemann, A., & Hansen, B. W. (2015). A new large egg type from the marine live feed calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana)—Perspectives for selective breeding of designer feed for hatcheries. *Aquaculture*, 436, 114-120.
- Hanks, K. S. (1976). Toxicity of some chemical therapeutics to the commercial shrimp, *Penaeus californiensis*. *Aquaculture*, 7(3), 293-294.

- Hansen, B. W., Drillet, G., Kozmér, A., Madsen, K. V., Pedersen, M. F., & Sørensen, T. F. (2010). Temperature effects on copepod egg hatching: does acclimatization matter?. *Journal of Plankton Research*, 32(3), 305-315.
- Hansen, M. H. (2011). *Effects of feeding with copepod nauplii (Acartia tonsa) compared to rotifers (Brachionus ibericus, Cayman) on quality parameters in Atlantic cod (Gadus morhua) larvae* (Master's thesis, Institutt for biologi).
- Hansen, B. W., Drillet, G., Pedersen, M. F., Sjøgreen, K. P., & Vismann, B. (2012). Do *Acartia tonsa* (Dana) eggs regulate their volume and osmolality as salinity changes?. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(5), 613-623.
- Hansen, B. W., & Drillet, G. (2013). Comparative oxygen consumption rates of subitaneous and delayed hatching eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 442, 66-69.
- Hansen, B. W., Buttino, I., Cunha, M. E., & Drillet, G. (2016). Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* spp. isolated in different geographical areas. *Aquaculture*, 457, 131-139.
- Heinle, D. R. (1966). Production of a calanoid copepod, *Acartia tonsa*, in the Patuxent River estuary. *Chesapeake Science*, 7(2), 59-74.
- Højgaard, J. K., Jepsen, P. M., & Hansen, B. W. (2008). Salinity-induced quiescence in eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana): a simple method for egg storage. *Aquaculture Research*, 39(8), 828-836.
- Højgaard, J. K., Rayner, T. A., Jensen, C. K., Overton, J. L., & Hansen, B. W. (2018). Exploring the potential of providing and feeding pikeperch larvae (*Sander lucioperca* L.) with euryhaline copepod nauplii: A zoo technical trial. *Journal of Applied Aquaculture*, 30(4), 312-324.
- Holmstrup, M., Overgaard, J., Sørensen, T. F., Drillet, G., Hansen, B. W., Ramløv, H., & Engell-Sørensen, K. (2006). Influence of storage conditions on viability of quiescent copepod eggs (*Acartia tonsa* Dana): effects of temperature, salinity and anoxia. *Aquaculture Research*, 37(6), 625-631.
- Holste, L., & Peck, M. A. (2006). The effects of temperature and salinity on egg production and hatching success of Baltic *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida): a laboratory investigation. *Marine Biology*, 148(5), 1061-1070.
- Houde, S. E. L., & Roman, M. R. (1987). Effects of food quality on the functional ingestion response of the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 69-77.
- He, J., Wu, X., Li, J., Huang, Q., Huang, Z., & Cheng, Y. (2014). Comparison of the culture performance and profitability of wild-caught and captive pond-reared Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles reared in grow-out ponds: Implications for seed selection and genetic selection programs. *Aquaculture*, 434, 48-56.

- Holt, G. J. (2003). Research on culturing the early life stages of marine ornamental fish. *Marine ornamental species—Collection, culture & conservation*, 251-254.
- Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R., & Colwell, R. R. (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and environmental microbiology*, 45(1), 275-283.
- Huysman, N., Bergmann, D., Nero, P., Larson, J., Sabrowski, V., & Barnes, M. E. (2018). Increasing iodine concentrations during landlocked fall Chinook salmon egg disinfection decrease bacterial numbers with no impact on egg survival. *North American Journal of Aquaculture*, 80(4), 363-368.
- Ianora, A. (2005). Birth control effects of diatoms on copepod reproduction: Implications for aquaculture studies. *Copepods in aquaculture*, 31-48.
- Jayalakshmi, T., & Santhanam, P. (2019). A Method of Estimation of Enzymatic Activity of Copepods. In *Basic and Applied Zooplankton Biology* (pp. 247-256). Springer, Singapore.
- Jepsen, P. M., Andersen, N., Holm, T., Jørgensen, A. T., Højgaard, J. K., & Hansen, B. W. (2007). Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquaculture Research*, 38(7), 764-772.
- Jepsen, P. M., Andersen, C. V., Schjelde, J., & Hansen, B. W. (2015). Tolerance of un-ionized ammonia in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Aquaculture Research*, 46(2), 420-431.
- Jepsen, P. M., Bjørbæk, N. S., Rayner, T. A., Vu, M. T., & Hansen, B. W. (2017). Recommended feeding regime and light climate in live feed cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Aquaculture international*, 25(2), 635-654.
- Johnson, S. K. (1974). Toxicity of several management chemicals to penaeid shrimp. *Fish disease diagnostic Laboratory reports*.
- Jónasdóttir, S. H. (1994). Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. *Marine Biology*, 121(1), 67-81.
- Jónasdóttir, S. H., & Kiørboe, T. (1996). Copepod recruitment and food composition: do diatoms affect hatching success?. *Marine Biology*, 125(4), 743-750.
- Jones, R. H., Flynn, K. J., & Anderson, T. R. (2002). Effect of food quality on carbon and nitrogen growth efficiency in the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 235, 147-156.
- Jonsson, P. R., & Tiselius, P. (1990). Feeding behaviour, prey detection and capture efficiency of the copepod *Acartia tonsa* feeding on planktonic ciliates. *Marine Ecology Progress Series*, 35-44.
- Jørgensen, T. S., Jepsen, P. M., Petersen, H. C. B., Friis, D. S., & Hansen, B. W. (2019).

- Eggs of the copepod *Acartia tonsa* Dana require hypoxic conditions to tolerate prolonged embryonic development arrest. *BMC ecology*, 19(1), 1-9.
- Kabir, M. A., Iqbal, M. M., Uddin, J., Bapary, M. A. J., & Uddin, M. S. (2014). Effects of washing treatment on hatching and survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) seeds in bangladesh.
- Kaneko, T., & Colwell, R. R. (1975). Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Applied microbiology*, 29(2), 269-274.
- Kanjanasopa, D., Pongtippatee, P., Vanichviriyakit, R., Wongtripop, S., Pradeep, P. J., & Withyachumnarnkul, B. (2015). An evidence on trans-ovarian transmission of Monodon baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 443, 5-10.
- Karlsen Ø, van der Meeren T, Rønnestad I, Mangor-Jensen A, Galloway TF, Kjørsvik E, Hamre K. (2015). Copepods enhance nutritional status, growth and development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae — can we identify the underlying factors?. *PeerJ*, 3, e902.
- Kaviyarasan, M., & Santhanam, P. (2019). A Technique on the Culture and Preservation of Marine Copepod Eggs. In *Basic and Applied Zooplankton Biology* (pp. 197-208). Springer, Singapore.
- Kerrison, P. D., Le, H. N., & Hughes, A. D. (2016). Hatchery decontamination of *Sargassum muticum* juveniles and adults using a combination of sodium hypochlorite and potassium iodide. *Journal of applied phycology*, 28(2), 1169-1180.
- Kjørboe, T., Møhlenberg, F., & Hamburger, K. (1985). Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26(1-2), 85-97.
- Kjørboe, T., & Nielsen, T. G. (1994). Regulation of zooplankton biomass and production in a temperate, coastal ecosystem. 1. *Copepods. Limnology and Oceanography*, 39(3), 493-507.
- Kjørboe, T., Saiz, E., & Viitasalo, M. (1996). Prey switching behaviour in the planktonic copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 143, 65-75.
- Kjørboe, T., Saiz, E., & Visser, A. (1999). Hydrodynamic signal perception in the copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology Progress Series*, 179, 97-111.
- Kleppel, G. S. (1992). Environmental regulation of feeding and egg production by *Acartia tonsa* off southern California. *Marine Biology*, 112(1), 57-65.
- Kleppel, G. S., & Burkart, C. A. (1995). Egg production and the nutritional environment of *Acartia tonsa*: the role of food quality in copepod nutrition. *ICES Journal of Marine Science*, 52(3-4), 297-304.
- Kleppel, G. S., Burkart, C. A., & Houchin, L. (1998). Nutrition and the regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography*,

- 43(5), 1000-1007.
- Kleppel, G. S., Hazzard, S. E., & Burkart, C. A. (2005). Maximizing the nutritional values of copepods in aquaculture: managed versus balanced nutrition. *Copepods in aquaculture*, 352.
- Krause, K. E., Dinh, K. V., & Nielsen, T. G. (2017). Increased tolerance to oil exposure by the cosmopolitan marine copepod *Acartia tonsa*. *Science of the Total Environment*, 607, 87-94.
- Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).
- Leandro, S. M., Tiselius, P., & Queiroga, H. (2006). Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Marine Biology*, 150(1), 121-129.
- Little, D. C., Newton, R. W., & Beveridge, M. C. M. (2016). Aquaculture: A rapidly growing and significant source of sustainable food? Status, transitions and potential. *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(3), 274–286.
- Lin, T., Chen, W., & Wang, L. (2009, June). Experimental Study on Inactivation of Copepod with Current Available Oxidants. In *2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1-4). IEEE.
- Liu, Q., Jiang, Y., Cong, W., Wang, M., Li, C., Feng, Z., Li, J., & Wang, J. (2011). Acute toxicity of povidone-iodine to megalopa and first stage juveniles in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science (Dalian)*, 30(9), 563-567.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Chen, C. H., Hsu, H. C., Chiu, Y. L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H., & Kou, G. H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of aquatic organisms*, 27(3), 215-225.
- Lonsdale, D. J., Heinle, D. R., & Siegfried, C. (1979). Carnivorous feeding behavior of the adult calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 36(3), 235-248.
- Lutz, R. V., Marcus, N. H., & Chanton, J. P. (1992). Effects of low oxygen concentrations on the hatching and viability of eggs of marine calanoid copepods. *Marine Biology*, 114(2), 241-247.
- Maeda, M., Kasornchandra, J., Itami, T., Suzuki, N., Hennig, O., Kondo, M., Albaladejo, J. D., & Takahashi, Y. (1998). Effect of various treatments on white spot syndrome virus (WSSV) from *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand). *Fish Pathology*, 33(4), 381-387.
- Mahjoub, M. S., Schmoker, C., & Drillet, G. (2013). Live feeds in larval fish rearing:

- production, use, and future. *Larval Fish Aquaculture*, 32-51.
- Mainous, M. E., Smith, S. A., & Kuhn, D. D. (2010). Effect of common aquaculture chemicals against *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Journal of aquatic animal health*, 22(4), 224-228.
- Manning, T. M., Wilson, S. P., & Chapman, J. C. (1996). Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 56(6), 971-976.
- Marcus, N. H., & Lutz, R. V. (1994). Effects of anoxia on the viability of subitaneous eggs of planktonic copepods. *Marine Biology*, 121(1), 83-87.
- Marcus, N. H., Richmond, C., Sedlacek, C., Miller, G. A., & Oppert, C. (2004). Impact of hypoxia on the survival, egg production and population dynamics of *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 301(2), 111-128.
- Marcus, N. H. (2005). Calanoid copepods, resting eggs, and aquaculture. *Copepods in aquaculture*, 3-9.
- Marcus, N. H., & Wilcox, J. A. (2007). Guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa*.
- Mauchline, J. (1998). *Advances in Marine Biology 33: The biology of calanoid copepods*. Academic Press.
- Maugeri, T. L., Carbone, M., Fera, M. T., Irrera, G. P., & Gugliandolo, C. (2004). Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *Journal of applied microbiology*, 97(2), 354-361.
- Maugeri, T. L., Carbone, M., Fera, M. T., & Gugliandolo, C. (2006). Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. *Research in microbiology*, 157(2), 194-200.
- McCarthy, S. A., & Miller, A. L. (1994). Effect of three biocides on Latin American and Gulf Coast strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1. *Journal of food protection*, 57(10), 865-869.
- McLaren, I. A., Corkett, C. J., & Zillioux, E. J. (1969). Temperature adaptations of copepod eggs from the arctic to the tropics. *The Biological Bulletin*, 137(3), 486-493.
- McLaughlin, J. B., DePaola, A., Bopp, C. A., Martinek, K. A., Napolilli, N. P., Allison, C. G., Murray, S. L., Thompson, E. C., Bird, M. M., & Middaugh, J. P. (2005). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1463-1470.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T., & Baird, D. J. (2002). Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(1), 17-22.
- Medina, M., & Barata, C. (2004). Static-renewal culture of *Acartia tonsa* (Copepoda:

- Calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture*, 229(1-4), 203-213.
- Melendre, P. M., Celada, J. D., Carral, J. M., Sáez-Royuela, M., & Aguilera, A. (2006). Effectiveness of antifungal treatments during artificial incubation of the signal crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus* Dana. Astacidae). *Aquaculture*, 257(1-4), 257-265.
- Mishra, S.S., Das, R., Das, B.K., Choudhary, P., Rathod, R., Giri, B.S., Debbarma, J., Sahoo, S. N., Barua, A., Sahu, A., Patil, P.K. and Swain, P. (2017). Status of aqua-medicines, drugs and chemicals use in India: A Survey Report. *Journal of Aquaculture & Fisheries*, 1, 004.
- Miller, C. B., Johnson, J. K., & Heinle, D. R. (1977). Growth rules in the marine copepod genus *Acartia*. *Limnology and Oceanography*, 22(2), 326-335.
- Mohamed, S., Nagaraj, G., Chua, F. H. C., & Wang, Y. G. (2000). The use of chemicals in aquaculture in Malaysia and Singapore. In *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines* (pp. 127-140). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Momoyama, K., & Tanimura, T. (2004). Prevention of vertical transmission of PAV in juvenile production of the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by disinfection of spawned eggs with povidone-iodine. *Bulletin of Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center (Japan)*.
- Montanari, M. P., Pruzzo, C., Pane, L., & Colwell, R. R. (1999). Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiology Ecology*, 29(3), 241-247.
- Morehead, D. T., Battaglione, S. C., Metillo, E. B., Bransden, M. P., & Dunstan, G. A. (2005). Copepods as a live feed for striped trumpeter *Latris lineata* larvae. *Copepods in aquaculture*, 195-208.
- Müller, H. G. (1982). Sensitivity of *Daphnia Magna* Straus Against Eight Chemotherapeutic Agents and Two Dyes. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 28(1), 1-2.
- Munk, P., & Kiørboe, T. (1985). Feeding behaviour and swimming activity of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to density of copepod nauplii. Marine ecology progress series. *Oldendorf*, 24(1), 15-21.
- Muroga, K., Sszuik, K., Ishimaru, K., & Nogami, K. (1994). Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 50-54.
- Mushiake, K., Shimizu, K., Satoh, J., Mori, K. I., Arimoto, M., Ohsumi, S. I., & Imaizumi, K. (1999). Control of penaeid acute viremia (PAV) in *Penaeus japonicus*: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from receptaculum

- seminis of spawned broodstock. *Fish Pathology*, 34(4), 203-207.
- Naess, T., & Bergh, Ø. (1994). Calanoid copepod resting eggs can be surface-disinfected. *Aquacultural engineering*, 13(1), 1-9.
- Nanton, D. A., & Castell, J. D. (1998). The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163(3-4), 251-261.
- Nielsen, P., Mortensen, J., Vismann, B., & Hansen, B. W. (2006). Physiological tolerance of marine calanoid copepod eggs to sulphide. *Marine Ecology Progress Series*, 328, 171-182.
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1).
- O'Bryen, P. J., & Lee, C. S. (2005). Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing workshop discussion summary. *Copepods in aquaculture*, 245-253.
- Ogle, J. T., Lemus, J. T., Nicholson, L. C., Barnes, D. N., & Lotz, J. M. (2005). Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of red snapper *Lutjanus campechanus*. In *Copepods in aquaculture* (pp. 225-244). Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA.
- Ohs, C. L., Rhyne, A. L., & Stenn, E. (2009). Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. *Aquaculture*, 287(1-2), 114-119.
- OIE, World Organisation for Animal Health. (2019). *ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE*. Consultado em 02 novembro 2021. Disponível em https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_ahpnd.pdf
- Øie, G., Galloway, T., Sørøy, M., Holmvaag Hansen, M., Norheim, I. A., Halseth, C. K., Almli, M., Berg, M., Gagnat, M., Wold, P.-A., Attramadal, K., Hagemann, A., Evjemo, J., & Kjørsvik, E. (2017). Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 23(1), 3-17.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A. M., Vitiello, V., Maradonna, F., & Carnevali, O. (2008). The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, 274(2-4), 347-352.
- Olivotto, I., Tokle, N. E., Nozzi, V., Cossignani, L., & Carnevali, O. (2010). Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. *Aquaculture*, 308(3-4), 124-131.
- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2015). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review. *Ocean and Coastal Management*, 119(2016), 244-266.

- Paffenhöfer, G. A., & Stearns, D. E. (1988). Why is *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) restricted to nearshore environments?. *Marine Ecology Progress Series*, 33-38.
- Pangastuti, A., Suwanto, A., Lestari, Y., & Suhartono, M. T. (2009). Effect of povidone iodine treatment on bacterial community associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Marine Research in Indonesia*, 34(2), 71-80.
- Park, I. S., Baek, S. W., & Moon, K. H. (2019). The sterilization effect of methylene blue, formalin, and iodine on egg and adult stage of marine medaka, *Oryzias dancena*. *Development & Reproduction*, 23(3), 199.
- Parrish, K. K., & Wilson, D. F. (1978). Fecundity studies on *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) in standardized culture. *Marine Biology*, 46(1), 65-81.
- Pati, A. C., & Belmonte, G. (2003). Disinfection efficacy on cyst viability of *Artemia franciscana* (Crustacea), *Hexarthra fennica* (Rotifera) and *Fabrea salina* (Ciliophora). *Marine biology*, 142(5), 895-904.
- Payne, M. F., Ripplingale, R. J., & Cleary, J. J. (2001). Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture*, 194(1-2), 137-150.
- Peck, M. A., & Holste, L. (2006). Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): optimizing intensive cultures. *Aquaculture*, 255(1-4), 341-350.
- Peck, M. A., Ewest, B., Holste, L., Kanstinger, P., & Martin, M. (2008). Impacts of light regime on egg harvests and 48-h egg hatching success of *Acartia tonsa* (Copepoda: Calanoida) within intensive culture. *Aquaculture*, 275(1-4), 102-107.
- Peck, N., Peters, J., Diekmann, R., Laakmann, S., & Renz, J. (2015). Interactive effects of temperature and salinity on population dynamics of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Plankton Research*, 37(1), 197-210.
- Pedersen, B. H. (1984). The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupea harengus* L.) preying on wild plankton. *Dana*, 3(2), 1-30.
- Pham, T. D. (2014). *Particle characterization and influence on the nauplii and egg production of calanoid copepod (Acartia tonsa Dana) in water treatment systems with and without membrane filtration* (Master's thesis, Institut for biologi).
- Phelps, R. P., Sumiarsa, G. S., Lipman, E. E., Lan, H. P., Moss, K. K., & Davis, A. D. (2005). Intensive and extensive production techniques to provide copepod nauplii for feeding larval red snapper *Lutjanus campechanus*. *Copepods in aquaculture*, 151-168.
- Pietrak, M., & Opitz, H. M. (2004). An evaluation of three potential methods for preventing the spread of larval *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). *Aquaculture Research*, 35(8), 759-763.

- Poulet, S. A., Ianora, A., Miralto, A., & Meijer, L. (1994). Do diatoms arrest embryonic development in copepods?. *Marine Ecology Progress Series*, 79-86.
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *Anim. Sci. Rev*, 7, 1-16.
- Rahdari, A., Falahatkar, B., Mohammadi, P. H., & Darvishi, S. (2017). Comparison of the Efficiency of Iodine Solution, Methylene Blue and Potassium Permanganate for Disinfection of Stellate Sturgeon *Acipenser stellatus* (Pallas, 1771) Eggs. *Journal of animal physiology and development (quarterly journal of biological sciences)*, 10(1 (36)), 33-39.
- Rahman, M. A., Rahman, M. H., Yeasmin, S. M., Asif, A. A., & Mridha, D. (2017). Identification of causative agent for fungal infection and effect of disinfectants on hatching and survival rate of Bata (*Labeo. Bata*) larvae. *Adv. Plants Agric. Res*, 7, 00264.
- Rajkumar, M. (2006). Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): Compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 261(2), 649-658.
- Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2016). Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: A review. *Aquaculture Research*, 47(1), 1–20.
- Rawlings, T. K., Ruiz, G. M., & Colwell, R. R. (2007). Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the Copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(24), 7926-7933.
- Rhodes, A., & Boyd, L. (2005). Formulated feeds for harpacticoid copepods: implications for population growth and fatty acid composition. *Copepods in Aquaculture*, 61-73.
- Richmond, C., Marcus, N. H., Sedlacek, C., Miller, G. A., & Oppert, C. (2006). Hypoxia and seasonal temperature: Short-term effects and long-term implications for *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328(2), 177-196.
- Rippingale, R. J., & Payne, M. F. (2005). Suitability of the copepod *Gladioferens imparipes* for intensive cultivation for aquaculture. *Copepods in Aquaculture*, 107.
- Ritar, A. J., Smith, G. G., & Thomas, C. W. (2006). Ozonation of seawater improves the survival of larval southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, in culture from egg to juvenile. *Aquaculture*, 261(3), 1014-1025.
- Rojjananavin, R. (1996). Degradation of povidone-iodine and its toxicity to *Vibrio* spp. and black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) larvae.
- Roman, M. R. (1984). Utilization of detritus by the copepod, *Acartia tonsa* 1. *Limnology and Oceanography*, 29(5), 949-959.
- Saejung, C., Hatai, K., & Sanoamuang, L. (2014). The *in-vitro* antibacterial effects of organic salts, chemical disinfectants and antibiotics against pathogens of black

- disease in fairy shrimp of Thailand. *Journal of fish diseases*, 37(1), 33-41.
- Saiz, E., & Kiørboe, T. (1995). Predatory and suspension feeding of the copepod *Acartia tonsa* in turbulent environments. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 147-158.
- Sako, H., Ishida, N., Maeno, Y., & Sorimachi, M. (1988). Bactericidal activities of five disinfectants on *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Fish Pathology*, 23(4), 219-229.
- Salvesen, I., & Vadstein, O. (1995). Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquaculture International*, 3(3), 155-171.
- Salveson, E. (2013). *Effects of copepod density and water exchange on the egg production of Acartia tonsa Dana (Copepoda: Calanoida) feeding on Rhodomonas baltica* (Master's thesis, Institutt for biologi).
- Santhanam, P., Jeyaraj, N., Jothiraj, K., Ananth, S., Kumar, S. D., & Pachiappan, P. (2019a). Assessing the Efficacy of Marine Copepods as an Alternative First Feed for Larval Production of Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. In *Basic and Applied Zooplankton Biology* (pp. 293-303). Springer, Singapore.
- Santhanam, P., Jeyaraj, N., Jothiraj, K., Ananth, S., Kumar, S. D., & Pachiappan, P. (2019b). Evaluation of the Suitability of Marine Copepods as an Alternative Live Feed in High-Health Fish Larval Production. In *Basic and Applied Zooplankton Biology* (pp. 277-292). Springer, Singapore.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1-4), 217-229.
- Schipp, G. R., Bosmans, J. M., & Marshall, A. J. (1999). A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp. *Aquaculture*, 174(1-2), 81-88.
- Sebire, M., Rimmer, G., Hicks, R., Parker, S. J., & Stebbing, P. D. (2018). A preliminary investigation into biosecurity treatments to manage the invasive killer shrimp (*Dikerogammarus villosus*). *Management of Biological Invasions*, 9(2), 101.
- Sharker, M. R., Sumi, K. R., Alam, M. J., Ferdous, M. M. R. Z., Ali, M. M., & Chaklader, M. R. (2014). Drugs and chemicals used in aquaculture activities for fish health management in the coastal region of Bangladesh. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(4), 49.
- Shields, R. J., Kotani, T., Molnar, A., Marion, K., Kobashigawa, J., & Tang, L. (2005). Intensive cultivation of a subtropical paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae. *Copepods in Aquaculture*, 209-223.
- Singh, M., & Singh, P. (2018). Drugs and chemicals applied in aquaculture industry: A review of commercial availability, recommended dosage and mode of application. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(6), 903-907.

- Sochard, M. R., Wilson, D. F., Austin, B., & Colwell, R. R. (1979). Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 750-759.
- Stearns, D. E., & Forward, R. B. (1984). Photosensitivity of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Marine Biology*, 82(1), 85-89.
- Steenfeldt, S. J., & Nielsen, J. W. (2010). Use of flubendazole as a therapeutic agent against rotifers (*Brachionus plicatilis*) in intensive cultures of the harpacticoid copepod *Tisbe holothuriae*. *Aquaculture Research*, 41(7), 1089-1094.
- Stoecker, D. K., & Sanders, N. K. (1985). Differential grazing by *Acartia tonsa* on a dinoflagellate and a tintinnid. *Journal of Plankton Research*, 7(1), 85-100.
- Stoecker, D. K., & Egloff, D. A. (1987). Predation by *Acartia tonsa* Dana on planktonic ciliates and rotifers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 110(1), 53-68.
- Støttrup, J. G., Richardson, K., Kirkegaard, E., & Pihl, N. J. (1986). The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, 52(2), 87-96.
- Støttrup, J. G., & Jensen, J. (1990). Influence of algal diet on feeding and egg-production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141(2-3), 87-105.
- Støttrup, J. G., Shields, R., Gillespie, M., Gara, M. B., Sargent, J. R., Bell, J. G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., Sutherland, R., Naess, T., Jensen, A.M., Naas, K., van der Meeren, T., Harboe, T., Sanchez, F.J., Sorgeloos, P., Dhert, P., & Fitzgerald, R. (1998). The production and use of copepods in larval rearing of halibut, turbot and cod. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, (4), 41-45.
- Støttrup, J. G., Bell, J. G., & Sargent, J. R. (1999). The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture*, 176(3-4), 257-269.
- Støttrup, J. G. (2000). The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*, 31(8-9), 703-711.
- Støttrup, J. G. (2003). Production and nutritional value of copepods. *Live feeds in marine aquaculture*, 145-205.
- Støttrup, J. G. (2006). A review on the status and progress in rearing copepods for marine larviculture. Advantages and disadvantages. Among Calanoid, Harpacticoid and Cyclopoid copepods. *Avances en nutrición acuicola*.
- Støttrup, J., & McEvoy, L. (2008). *Live feeds in marine aquaculture*. John Wiley & Sons.
- Sullivan, B. K., & Ritacco, P. J. (1985). Ammonia toxicity to larval copepods in eutrophic marine ecosystems: a comparison of results from bioassays and enclosed

- experimental ecosystems. *Aquatic toxicology*, 7(3), 205-217.
- Sullivan, B. K., Costello, J. H., & Van Keuren, D. (2007). Seasonality of the copepods *Acartia hudsonica* and *Acartia tonsa* in Narragansett Bay, RI, USA during a period of climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(1-2), 259-267.
- Su, H. M., Cheng, S. H., Chen, T. I., & Su, M. S. (2005). Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. *Copepods in aquaculture*, 183-194.
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Huang, K. P., Ye, J. D., & Zhang, C. X. (2013). Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Aquaculture*, 392, 44-50.
- Takahashi, Y., Fukuda, K., Kondo, M., Chongthaleong, A., Nishi, K., Nishimura, M., Ogata, K., Shinya, I., Takise, K., Fujishima, Y., & Matsumura, M. (2003). Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asian Aquaculture Magazine*, 75, 25-27.
- Teixeira, P. F., Kaminski, S. M., Avila, T. R., Cardozo, A. P., Bersano, J. G., & Bianchini, A. (2010). Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82, 333-339.
- Tendencia, E. A. (2001). Effect of iodine disinfection on the bacterial flora and hatching rate of grouper, *Epinephelus coioides* eggs at the cleavage and eyed stages. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 21(4), 160-163.
- Tester, P. A., & Turner, J. T. (1990). How long does it take copepods to make eggs?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141(2-3), 169-182.
- Tiselius, P. (1992). Behavior of *Acartia tonsa* in patchy food environments. *Limnology and Oceanography*, 37(8), 1640-1651.
- Tiselius, P., Hansen, B., Jonsson, P., Kiørboe, T., Nielsen, T. G., Piontkovski, S., & Saiz, E. (1995). Can we use laboratory-reared copepods for experiments? A comparison of feeding behaviour and reproduction between a field and a laboratory population of *Acartia tonsa*. *ICES Journal of Marine Science*, 52(3-4), 369-376.
- Tison, D. L., & Kelly, M. T. (1984). *Vibrio* species of medical importance. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2(4), 263-276.
- Toledo, J. D., M. S. Golez, and A. Ohno. (2005). Studies of the use of copepods in the semi-intensive seed production of grouper *Epinephelus coioides*. *Copepod in Aquaculture*, 169-182.
- Tonguthai, K. (2000). The use of chemicals in aquaculture in Thailand. In *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines* (pp. 207-220). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.

- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., Arrow, K. J., Barrett, S., Crépin, A. S., Ehrlich, P. R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S. A., Nyborg, K., Österblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B. H., Xepapadeas, T., & De Zeeuw, A. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), 13257–13263.
- Tsolaki, E., Pitta, P., & Diamadopoulou, E. (2010). Electrochemical disinfection of simulated ballast water using *Artemia salina* as indicator. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 305-312.
- Turk, P. E., Krejci, M. E., & Yang, W. T. (1982). A laboratory method for the culture of *Acartia tonsa* (Crustacea: Copepoda) using rice bran. *Journal of aquaculture and aquatic sciences*, 3(2), 25-27.
- Turner, J. T. (1984). The feeding ecology of some zooplankters that are important prey items of larval fish. *NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) Technical Report NMFS 7:1–28*, Beaufort, North Carolina, USA.
- Uye, S. I., & Fleminger, A. (1976). Effects of various environmental factors on egg development of several species of *Acartia* in southern California. *Marine Biology*, 38(3), 253-262.
- Uye, S. I. (2005). A Brief Review of Mass Culture Copepods Used for Fish Food in Japanese Mariculture and A Proposed Plan to Use High Biomass Natural Populations of Brackish-Water Copepods. *Copepods in aquaculture*, 75-90.
- Valenti, W. C., & Moraes-Valenti, P. (2010). Production chain of aquaculture. *World Aquaculture*, 41(4), 54–56.
- van der Meeren, T., Olsen, R. E., Hamre, K., & Fyhn, H. J. (2008). Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274(2-4), 375-397.
- Vitiello, V., Zhou, C., Scuderi, A., Pellegrini, D., & Buttino, I. (2016). Cold storage of *Acartia tonsa* eggs: a practical use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology*, 25(5), 1033-1039.
- Vu, M. T., Hansen, B. W., & Kiørboe, T. (2017). The constraints of high density production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *Journal of Plankton Research*, 39(6), 1028-1039.
- Wagner, E. J., Arndt, R. E., Billman, E. J., Forest, A., & Cavender, W. (2008). Comparison of the efficacy of iodine, formalin, salt, and hydrogen peroxide for control of external bacteria on rainbow trout eggs. *North American Journal of Aquaculture*, 70(2), 118-127.
- Watanabe, T., Kitajima, C., & Fujita, S. (1983). Nutritional values of live organisms used in

- Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34(1-2), 115-143.
- Wilcox, J. A., Tracy, P. L., & Marcus, N. H. (2006). Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(1), 113-120.
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Kusk, K. O., & Bengtsson, B. E. (2003). Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Science of the Total Environment*, 305(1-3), 53-64.
- WoRMS, World Register of Marine Species. (2014). *Acartia (Acanthacartia) tonsa* Dana, 1849. Consultado em 06 abril 2021. Disponível em <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=345943>
- Yeasmin, S. M., Rahman, M. A., Hossain, M. M. M., Rahman, M. H., & Al Asif, A. (2015). Identification of causative agent for fungal infection and effect of disinfectants on hatching and survival rate of common carp (*C. carpio*) larvae. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 1(3), 578-588.
- Zhang, J., Ianora, A., Wu, C., Pellegrini, D., Esposito, F., & Buttino, I. (2015). How to increase productivity of the copepod *Acartia tonsa* (Dana): effects of population density and food concentration. *Aquaculture research*, 46(12), 2982-2990.
- Zidour, M., Chevalier, M., Belguesmia, Y., Cudennec, B., Grard, T., Drider, D., Souissi, S., & Flahaut, C. (2017). Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and other pathogenic strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 1919.
- Zillioux, E. J. (1969). A continuous recirculating culture system for planktonic copepods. *Marine Biology*, 4(3), 215-218.

7. Anexos

Anexo 1 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 24 h e 48 h \pm limites dos intervalos de confiança de 95% de todos os tratamentos realizados no Ensaio 1 ($n = 9$).

Desinfetante	Concentração (mg/L)	Tempo de exposição																																						
		5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos		25 minutos		30 minutos																												
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h																											
Azul de metileno (A)	0	91,71 \pm 3,76	95,67 \pm 1,84	96,73 \pm 1,12	97,80 \pm 1,35	89,69 \pm 3,53	95,23 \pm 1,19	89,48 \pm 2,67	96,26 \pm 1,32	91,25 \pm 1,47	96,33 \pm 1,00	86,63 \pm 2,11	94,63 \pm 2,17	0	91,71 \pm 3,76	95,67 \pm 1,84	96,73 \pm 1,12	97,80 \pm 1,35	89,69 \pm 3,53	95,23 \pm 1,19	89,48 \pm 2,67	96,26 \pm 1,32	91,25 \pm 1,47	96,33 \pm 1,00	86,63 \pm 2,11	94,63 \pm 2,17														
	1	91,34 \pm 1,94	96,33 \pm 1,73	95,74 \pm 1,25	97,26 \pm 0,95	88,29 \pm 3,32	94,95 \pm 2,21	89,68 \pm 1,70	97,55 \pm 1,20	90,56 \pm 2,34	97,42 \pm 1,23	91,29 \pm 2,17	95,90 \pm 1,22	1	91,34 \pm 1,94	96,33 \pm 1,73	95,74 \pm 1,25	97,26 \pm 0,95	88,29 \pm 3,32	94,95 \pm 2,21	89,68 \pm 1,70	97,55 \pm 1,20	90,56 \pm 2,34	97,42 \pm 1,23	91,29 \pm 2,17	95,90 \pm 1,22	2	91,77 \pm 4,00	95,15 \pm 2,58	95,45 \pm 1,45	96,90 \pm 1,42	88,60 \pm 2,86	95,54 \pm 1,19	93,06 \pm 1,80	97,21 \pm 0,89	95,68 \pm 2,01	91,40 \pm 2,88	96,36 \pm 1,06		
	2	91,77 \pm 4,00	95,15 \pm 2,58	95,45 \pm 1,45	96,90 \pm 1,42	88,60 \pm 2,86	95,54 \pm 1,19	93,06 \pm 1,80	97,21 \pm 0,89	95,68 \pm 2,01	91,40 \pm 2,88	96,36 \pm 1,06	5	94,44 \pm 2,03	97,07 \pm 1,40	95,60 \pm 1,88	94,70 \pm 3,07	97,54 \pm 1,35	90,39 \pm 2,08	95,70 \pm 2,28	95,44 \pm 1,51	90,84 \pm 2,21	87,62 \pm 2,77	95,76 \pm 1,12	91,70 \pm 2,32	92,66 \pm 2,75	96,67 \pm 1,63	10	91,79 \pm 4,33	95,60 \pm 1,88	95,83 \pm 0,76	97,34 \pm 0,97	90,71 \pm 2,39	95,44 \pm 1,51	90,84 \pm 2,21	87,62 \pm 2,77	95,76 \pm 1,12	91,70 \pm 2,32	92,66 \pm 2,75	96,67 \pm 1,63
	5	94,44 \pm 2,03	97,07 \pm 1,40	95,60 \pm 1,88	94,70 \pm 3,07	97,54 \pm 1,35	90,39 \pm 2,08	95,70 \pm 2,28	95,44 \pm 1,51	90,84 \pm 2,21	87,62 \pm 2,77	95,76 \pm 1,12	10	90,48 \pm 4,49	94,70 \pm 3,07	95,60 \pm 1,88	94,70 \pm 3,07	97,54 \pm 1,35	90,71 \pm 2,39	95,61 \pm 1,62	95,61 \pm 1,62	90,42 \pm 3,36	87,17 \pm 2,31	94,50 \pm 1,95	92,45 \pm 2,31	96,36 \pm 1,87	92,32 \pm 1,23	40	92,87 \pm 3,49	97,54 \pm 1,35	94,33 \pm 2,42	96,98 \pm 1,45	88,56 \pm 3,49	95,44 \pm 2,00	90,70 \pm 2,00	95,02 \pm 0,86	85,48 \pm 1,29	92,45 \pm 2,31	83,14 \pm 0,94	87,82 \pm 0,77
	40	92,87 \pm 3,49	97,54 \pm 1,35	94,33 \pm 2,42	96,98 \pm 1,45	88,56 \pm 3,49	95,44 \pm 2,00	90,70 \pm 2,00	95,02 \pm 0,86	85,48 \pm 1,29	92,45 \pm 2,31	83,14 \pm 0,94	100	90,44 \pm 2,57	95,80 \pm 2,06	93,36 \pm 1,32	94,76 \pm 1,41	88,34 \pm 2,35	90,13 \pm 2,31	89,18 \pm 2,09	88,83 \pm 2,95	83,66 \pm 2,29	83,14 \pm 2,14	87,69 \pm 1,49	77,14 \pm 1,68	83,17 \pm 1,77	0	70,86 \pm 3,17	86,51 \pm 1,33	85,11 \pm 4,70	93,00 \pm 2,37	82,10 \pm 2,87	91,55 \pm 1,58	75,71 \pm 5,44	88,83 \pm 2,95	76,50 \pm 3,13	88,44 \pm 2,43	79,24 \pm 4,61	90,50 \pm 2,16	
	0	70,86 \pm 3,17	86,51 \pm 1,33	85,11 \pm 4,70	93,00 \pm 2,37	82,10 \pm 2,87	91,55 \pm 1,58	75,71 \pm 5,44	88,83 \pm 2,95	76,50 \pm 3,13	88,44 \pm 2,43	79,24 \pm 4,61	2	71,87 \pm 5,41	86,45 \pm 2,51	86,78 \pm 4,18	93,62 \pm 2,00	82,01 \pm 3,86	92,20 \pm 1,58	91,12 \pm 2,55	80,41 \pm 1,24	89,98 \pm 1,74	76,39 \pm 1,62	89,95 \pm 0,69	5	71,50 \pm 5,39	86,00 \pm 2,74	88,08 \pm 2,09	94,04 \pm 1,15	83,96 \pm 1,56	92,89 \pm 1,04	76,41 \pm 3,56	88,64 \pm 1,89	78,85 \pm 2,65	88,53 \pm 3,11	77,67 \pm 3,82	89,18 \pm 2,08			
	5	71,50 \pm 5,39	86,00 \pm 2,74	88,08 \pm 2,09	94,04 \pm 1,15	83,96 \pm 1,56	92,89 \pm 1,04	76,41 \pm 3,56	88,64 \pm 1,89	78,85 \pm 2,65	88,53 \pm 3,11	77,67 \pm 3,82	10	71,62 \pm 4,69	86,14 \pm 2,36	88,11 \pm 2,97	93,78 \pm 1,27	81,86 \pm 2,63	91,85 \pm 1,25	88,16 \pm 3,10	79,90 \pm 2,20	89,28 \pm 2,01	74,10 \pm 4,82	88,73 \pm 2,67	20	73,58 \pm 5,46	87,29 \pm 2,83	87,37 \pm 3,04	93,61 \pm 1,52	83,02 \pm 3,27	91,74 \pm 1,63	74,87 \pm 6,96	87,78 \pm 3,63	78,07 \pm 2,27	88,69 \pm 2,16	73,68 \pm 2,39	88,81 \pm 1,59			
	20	73,58 \pm 5,46	87,29 \pm 2,83	87,37 \pm 3,04	93,61 \pm 1,52	83,02 \pm 3,27	91,74 \pm 1,63	74,87 \pm 6,96	87,78 \pm 3,63	78,07 \pm 2,27	88,69 \pm 2,16	73,68 \pm 2,39	40	75,86 \pm 3,27	88,47 \pm 1,85	88,90 \pm 1,65	94,76 \pm 1,19	81,69 \pm 2,87	91,58 \pm 1,45	87,71 \pm 3,01	86,50 \pm 1,60	70,55 \pm 5,06	86,06 \pm 2,78	80	77,91 \pm 2,37	89,24 \pm 1,55	89,95 \pm 1,60	96,02 \pm 1,09	82,61 \pm 1,79	91,37 \pm 1,10	72,26 \pm 6,42	86,26 \pm 3,53	74,32 \pm 2,45	85,10 \pm 1,18	70,93 \pm 1,00	84,96 \pm 1,39				
	80	77,91 \pm 2,37	89,24 \pm 1,55	89,95 \pm 1,60	96,02 \pm 1,09	82,61 \pm 1,79	91,37 \pm 1,10	72,26 \pm 6,42	86,26 \pm 3,53	74,32 \pm 2,45	85,10 \pm 1,18	70,93 \pm 1,00	100	75,52 \pm 4,02	88,70 \pm 1,94	89,34 \pm 2,32	96,52 \pm 1,20	81,37 \pm 2,76	90,37 \pm 0,96	86,07 \pm 2,19	72,55 \pm 4,66	82,92 \pm 1,71	71,05 \pm 2,35	83,22 \pm 0,83	0	71,37 \pm 2,61	87,32 \pm 1,24	87,32 \pm 1,24	85,24 \pm 2,75	72,61 \pm 3,88	88,83 \pm 1,68	79,69 \pm 3,06	91,29 \pm 1,49	86,35 \pm 1,93	60,83 \pm 6,79	82,97 \pm 3,13				
	0	71,37 \pm 2,61	87,32 \pm 1,24	87,32 \pm 1,24	85,24 \pm 2,75	72,61 \pm 3,88	88,83 \pm 1,68	79,69 \pm 3,06	91,29 \pm 1,49	86,35 \pm 1,93	60,83 \pm 6,79	82,97 \pm 3,13	5	71,86 \pm 4,26	86,16 \pm 2,21	89,20 \pm 1,70	82,41 \pm 4,00	73,12 \pm 6,43	85,00 \pm 3,55	88,36 \pm 1,25	62,65 \pm 3,37	79,46 \pm 2,14	57,21 \pm 7,56	77,39 \pm 3,99	20	74,97 \pm 5,69	85,07 \pm 3,57	69,54 \pm 3,87	82,71 \pm 3,10	71,28 \pm 4,47	85,00 \pm 2,39	75,75 \pm 2,03	85,91 \pm 1,28	63,77 \pm 6,08	76,63 \pm 2,14	53,70 \pm 4,15	74,28 \pm 4,30			
5	71,86 \pm 4,26	86,16 \pm 2,21	89,20 \pm 1,70	82,41 \pm 4,00	73,12 \pm 6,43	85,00 \pm 3,55	88,36 \pm 1,25	62,65 \pm 3,37	79,46 \pm 2,14	57,21 \pm 7,56	77,39 \pm 3,99	40	75,83 \pm 1,99	84,41 \pm 1,37	88,06 \pm 5,29	80,51 \pm 2,41	72,98 \pm 5,25	83,62 \pm 2,46	84,60 \pm 3,47	61,73 \pm 4,72	75,62 \pm 3,21	58,36 \pm 3,33	73,58 \pm 2,95	80	72,88 \pm 3,64	84,35 \pm 2,44	66,93 \pm 4,08	79,21 \pm 1,92	69,25 \pm 5,62	81,68 \pm 3,34	75,14 \pm 2,52	83,54 \pm 2,46	58,30 \pm 3,27	74,59 \pm 1,72	59,90 \pm 3,42	72,96 \pm 2,91				
20	74,97 \pm 5,69	85,07 \pm 3,57	69,54 \pm 3,87	82,71 \pm 3,10	71,28 \pm 4,47	85,00 \pm 2,39	75,75 \pm 2,03	85,91 \pm 1,28	63,77 \pm 6,08	76,63 \pm 2,14	53,70 \pm 4,15	40	75,83 \pm 1,99	84,41 \pm 1,37	88,06 \pm 5,29	80,51 \pm 2,41	72,98 \pm 5,25	83,62 \pm 2,46	84,60 \pm 3,47	61,73 \pm 4,72	75,62 \pm 3,21	58,36 \pm 3,33	73,58 \pm 2,95	80	72,88 \pm 3,64	84,35 \pm 2,44	66,93 \pm 4,08	79,21 \pm 1,92	69,25 \pm 5,62	81,68 \pm 3,34	75,14 \pm 2,52	83,54 \pm 2,46	58,30 \pm 3,27	74,59 \pm 1,72	59,90 \pm 3,42	72,96 \pm 2,91				
80	72,88 \pm 3,64	84,35 \pm 2,44	66,93 \pm 4,08	79,21 \pm 1,92	69,25 \pm 5,62	81,68 \pm 3,34	75,14 \pm 2,52	83,54 \pm 2,46	58,30 \pm 3,27	74,59 \pm 1,72	59,90 \pm 3,42	100	74,12 \pm 1,66	83,44 \pm 1,54	68,31 \pm 2,32	77,82 \pm 1,42	69,19 \pm 2,45	80,55 \pm 1,38	73,86 \pm 2,88	82,55 \pm 2,61	58,53 \pm 5,28	73,84 \pm 4,09	61,57 \pm 4,24	72,29 \pm 2,93	200	71,28 \pm 4,35	82,38 \pm 1,91	62,83 \pm 4,91	76,44 \pm 1,96	67,76 \pm 3,05	79,19 \pm 1,14	69,43 \pm 1,75	80,71 \pm 1,35	50,20 \pm 2,80	72,01 \pm 2,93	57,49 \pm 4,40	70,36 \pm 4,52			
200	71,28 \pm 4,35	82,38 \pm 1,91	62,83 \pm 4,91	76,44 \pm 1,96	67,76 \pm 3,05	79,19 \pm 1,14	69,43 \pm 1,75	80,71 \pm 1,35	50,20 \pm 2,80	72,01 \pm 2,93	57,49 \pm 4,40	300	71,56 \pm 2,25	81,43 \pm 1,93	64,64 \pm 2,73	73,88 \pm 3,08	65,67 \pm 1,80	77,58 \pm 1,64	68,59 \pm 4,17	78,72 \pm 2,48	49,44 \pm 4,57	67,59 \pm 3,61	44,94 \pm 7,85	65,36 \pm 6,03																
300	71,56 \pm 2,25	81,43 \pm 1,93	64,64 \pm 2,73	73,88 \pm 3,08	65,67 \pm 1,80	77,58 \pm 1,64	68,59 \pm 4,17	78,72 \pm 2,48	49,44 \pm 4,57	67,59 \pm 3,61	44,94 \pm 7,85																													

Anexo 2 – Taxas de eclosão (%) médias dos ovos às 24 h e 48 h \pm limites dos intervalos de confiança de 95% dos tratamentos realizados no Ensaio 2.1 ($n = 3$).

Tratamento	Concentração (mg/L)	Tempo de exposição	Taxa de eclosão (%) às 24 h	Taxa de eclosão (%) às 48 h
Controlo (O)	0		92,10 \pm 3,55	95,83 \pm 3,65
Azul de metileno (A)	10	30 min	93,59 \pm 7,51	96,97 \pm 1,36
Azul de metileno (A)	20	30 min	91,07 \pm 6,52	95,65 \pm 2,10
Iodopovidona (B)	20	30 min	87,57 \pm 4,62	94,29 \pm 3,13
Iodopovidona (B)	100	10 min	94,52 \pm 6,31	98,47 \pm 1,20
Hipoclorito de sódio (C)	5	30 min	88,30 \pm 1,74	92,91 \pm 0,98
Hipoclorito de sódio (C)	20	20 min	89,77 \pm 8,14	94,20 \pm 2,71