



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ITACORUBI PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E PLANTAS

Cesar Augusto Stramosk

**Ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas em amostras de água de lastro de navios mercantes no porto de Itajaí-SC**

Florianópolis  
2020

Cesar Augusto Stramosk

**Ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas em amostras de água de lastro de navios mercantes no porto de Itajaí-SC**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.  
Orientador: Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stramosk, Cesar Augusto

Ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas em amostras de água de lastro de navios mercantes no porto de Itajaí-SC : Ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas em amostras de água de lastro de navios mercantes no porto de Itajaí-SC / Cesar Augusto Stramosk ; orientador, Leonardo Rubi Rörig, 2020.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Água de Lastro. 3. Diatomáceas. 4. Viabilidade Celular. 5. Fitoplâncton. I. Rörig, Leonardo Rubi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. III. Título.

Cesar Augusto Stramosk

**Ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas em amostras de água de lastro de navios mercantes no porto de Itajaí-SC**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Bonomi Barufi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Leila Hayashi, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Charrid Resgalla Junior

Universidade do Vale do Itajaí

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

---

Prof. Mayara Krasinski Caddah, Dra.

Coordenador do Programa

---

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020.

Aos que sabem que merecem.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a paciência de meu orientador Leonardo Rubi Rörig. Ao Prof. Márcio da Silva Tamanaha responsável pelo Laboratório de Algas Nocivas – UNIVALI pelo auxílio na identificação dos organismos. Ao colega Altevir Caron Jr. pela coleta de todas as amostras analisadas neste projeto e introdução a este campo de pesquisa tão interessante. À Superintendência do Porto de Itajaí por permitir a coleta e utilização das amostras de água de lastro de navios mercantes que fizeram uso de seus terminais portuários. A UNIVALI por ceder estrutura e tempo de pessoas ao longo do desenvolvimento deste projeto. Ao Prof. Dr. Marcus Adonai Castro da Silva, pelos encorajadores “não vai deixar jubilar ...” Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Thiago pelas brincadeiras e incentivos ao estilo do Prof. Marcus. E a todos que de alguma forma contribuíram com minha experiência durante estes 3 anos e em consequência a existência desta dissertação.

## RESUMO

A água de lastro de navios mercantes, tem sido cada vez mais reconhecida como principal vetor de transporte e consequente transferência de espécies exóticas entre diversas partes do mundo. As espécies fitoplanctônicas estão entre os mais comuns componentes biológicos destas águas. Assim a identificação e verificação de sua viabilidade se fazem importantes. Neste sentido, no presente trabalho, dois métodos ópticos, a microscopia invertida e a de epifluorescência, e o cultivo de amostras foram utilizados para identificar as espécies em águas de lastro de navios em aportados em Itajaí e Navegantes, na foz do rio Itajaí-açu em Santa Catarina - Brasil. Foram realizadas 38 amostragens entre os anos de 2012 e 2013 em diferentes embarcações que se utilizaram dos dois principais terminais portuários instalados. Nestas amostras foram identificados 92 táxons divididos entre os filos Charophyta (1 táxon), Cyanobacteria (2 táxons), Dinophyta (25 táxons), Heterokontophyta (63 táxons) e Protozoa *incertae sedis* (1 táxon). Destes, a metade (46 táxons), mostraram-se viáveis em cultivo. Foi identificada 1 espécie exótica (*Chaetoceros castracanei*) e 3 táxons potencialmente tóxicos (*Dinophysis acuminata*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* e *Karenia* spp.). Os resultados ainda indicaram a predominância da Classe Bacillariophyceae (diatomáceas) entre os organismos identificados e viáveis. Todos estes dados alertam a necessidade de um maior cuidado quanto a potencial introdução de espécies exóticas no ambiente estudado.

**Palavras-chave:** Água de Lastro. Fitoplâncton. Diatomáceas. Viabilidade Celular.

## ABSTRACT

The ballast water of merchant ships, has been increasingly recognized as the main vector of transport and the consequent transfer of alien species among different parts of the world. Phytoplankton species are the most common biological components of these waters. Thus the identification and verification of its viability are important tools of monitoring bioinvasion. In the present work two optical methods, the inverted microscopy and epifluorescence microscopy, and cultivation of samples were used to identify species in ballast water of ships docked at the Ports of Itajaí and Navegantes, in the mouth of the Itajai-Açu River, Santa Catarina, Brazil. A total of 38 samples were collected between the years 2012 and 2013 from different boats that used the two main port terminals installed. In these samples 92 taxa were identified belonging to the phyla Charophyta (1 taxon), Cyanobacteria (2 taxa), Dinophyta (25 taxa), Heterokontophyta (63 taxa) and Protozoa *incertae sedis* (1 taxon). Half of these (46 taxa) were viable in culture. One alien species (*Chaetoceros castracanei*) and 3 potentially toxic taxa (*Dinophysis acuminata*, *Pseudo-nitzschia delicatissima* and *Karenia* spp.) were among the identified. The results also indicated the predominance of class Bacillariophyceae (diatoms) both in identified and viable organisms. The data indicate the need for more attention to the potential introduction of exotic species in the studied environment.

**Keywords:** Ballast Water. Phytoplankton. Diatoms. Cell Viability.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas e intensidade de jornadas ao redor do mundo. ....	15
Figura 2 - Esquema do lastreamento de uma embarcação quando esta é carregada e descarregada nos portos de origem e destino. ....	16
Figura 3 - Visualização da geografia da região de Itajaí e Navegantes - SC. ....	22
Figura 4 - Localização dos terminais portuários dos municípios de Itajaí e Navegantes em Santa Catarina. ....	26
Figura 5 - Acesso ao tanque de água de lastro. A) Retirada de elipse para entrada ao ambiente anterior ao tanque. B) Retirada de elipse para acesso ao tanque de lastro. C) Detalhe do equipamento na água sendo preparado para amostragem. ....	27
Figura 6 - Detalhe do cultivo em microplacas com suas diferentes concentrações e composições. ....	29
Figura 7 - Proveniência e frequência das águas de lastro analisadas. ....	33
Figura 8 - Análise de ACP do número de espécies viáveis cultivadas (Cultivo) e identificadas por epifluorescência (Epifluorescência), número de espécies identificadas nas amostras fixadas (Fixadas), pH, Salinidade, número de dias de tanque da água de lastro e valores de clorofila-a extraída das amostras analisadas. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de salinidades, pH e clorofila-a extraída o número de táxons identificados nas amostras cultivadas, fixadas e observadas em microscopia de epifluorescência e dados de dias de retenção e origem das 38 amostras de água de lastro coletadas nos Terminais Portuários de Itajaí e Navegantes – SC. ....	36
Tabela 2 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras fixadas de água de lastro, sua frequência em número de amostras e em porcentagem.....	42
Tabela 3 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras cultivadas de água de lastro, sua frequência em número de amostras e sua frequência em porcentagem. ....	43
Tabela 4 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras analisadas com microscopia de epifluorescência, sua frequência em número de amostras e sua frequência em porcentagem.....	44
Tabela 5 - Espécies fitoplanctônicas identificadas, sua ocorrência, hábitos, potencial toxico e frequência em que foi registrada em relação as 38 amostras analisadas de acordo com o método empregado. *Aut=Autotrófico, Epic=Epicontinental, Mar=Marinho, Het=Heterotrófico, Ner=Nerítico, Est=Estuarino, Oc=Oceânico, Bent=Bêntico, Ticop=Ticopelágico, Limn=Limnico, Temp=Temperado, Trop=Tropical, Term=Termófila, Cosm=Cosmopolita e Eurit=Euritêmica. ....	48

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas  
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IMO International Maritime Organization  
MEPC Marine Environment Protection Committee  
MMA Ministério do Meio Ambiente do Brasil  
ONU Organização das Nações Unidas  
UFC Unidade Formadora de Colônias  
NAG Non – Agglutinable  
UNIVALI Universidade do Vale do Itajaí  
ANVISA Agência nacional de Vigilância Sanitária  
GPM Galões por Minuto  
ACP Análises de Componentes Principais

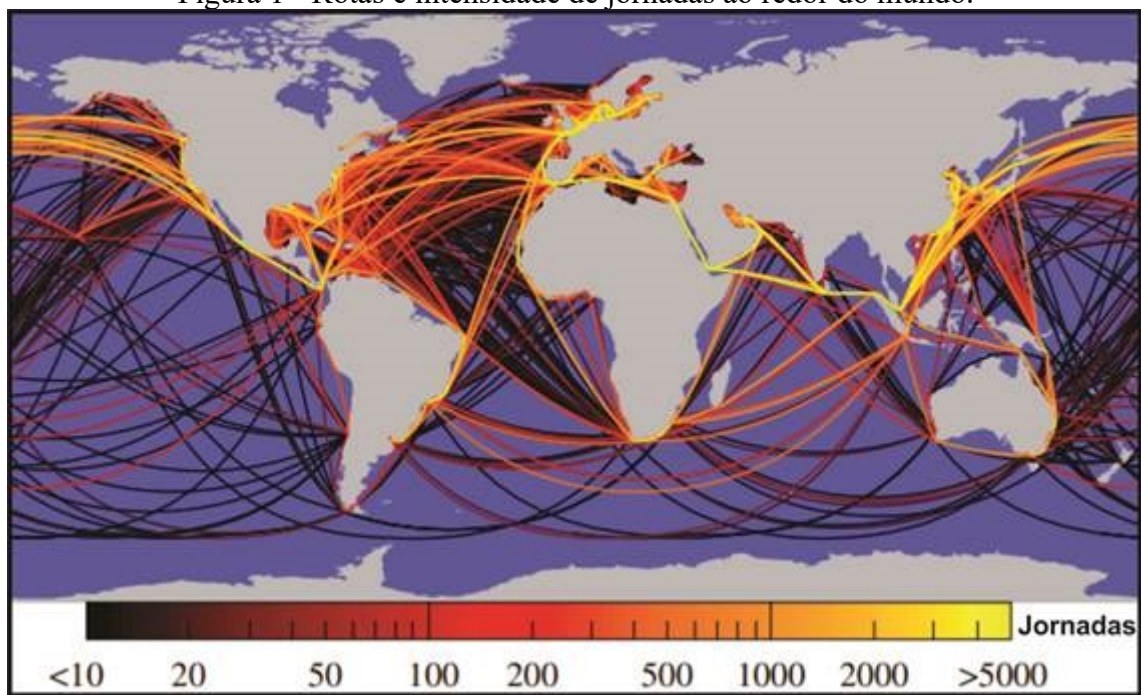
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos .....	17
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>18</b>
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1.1	Áreas de estudo .....	25
2.1.2	Amostragens.....	27
2.1.3	Cultivo.....	28
2.1.4	Determinação qualitativa e quantitativa do fitoplâncton de amostras fixadas e de amostras cultivadas. ....	30
2.1.5	Determinação de salinidade, clorofila-a e pH. ....	30
2.1.6	Determinação da viabilidade de células fitoplanctônicas, através da análise de epifluorescência.....	30
2.1.7	Análise estatística.....	31
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
2.2.1	Origem das amostras.....	31
2.2.2	Dados Químicos e biológicos das amostras .....	33
2.2.3	Táxons identificados nos métodos propostos .....	41
2.2.4	Registros no Brasil, Santa Catarina e características ecológicas dos táxons identificados .....	45
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A habilidade de realizar viagens, transportar “commodities” e compartilhar informações com eficiência é uma demanda imprescindível na economia moderna globalizada. Entre os diferentes meios de transporte, o marítimo continua sendo um dos mais eficientes para longas distâncias e grandes quantidades de bens (Rodrigues et al., 2006). Devido a estas características, o crescimento do comércio internacional através das vias marítimas vem se intensificando continuamente desde 1970 (Breen & Metaxaz, 2008; Jokela & Ricciardi, 2008) e hoje já corresponde a mais de 90% da comercialização de bens no mundo (Figura 1).

Figura 1 - Rotas e intensidade de jornadas ao redor do mundo.



Fonte: Kaluza et al., 2010.

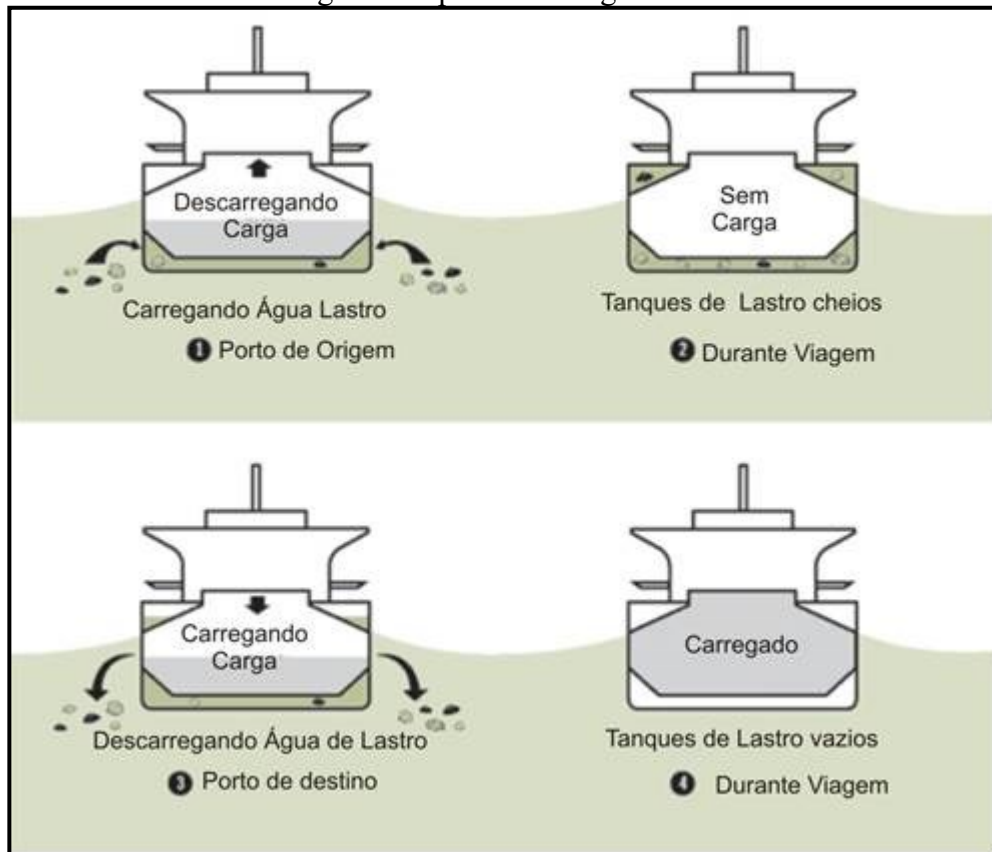
Devido a este comércio, as barreiras físicas e químicas naturais que historicamente permitiram a evolução independente dos ecossistemas se mostram cada vez menos relevantes, o que potencialmente, em um caso extremo, pode levar a homogeneização da biota terrestre (Eno, 1996).

Isto se deve principalmente ao método comum a maior parte desta frota que utiliza-se de água para o seu balanceamento. Este método utilizado pela frota de navios comerciais é reconhecido como lastreamento da embarcação, que trata-se do procedimento usual para o

balanceamento da estrutura metálica das embarcações, sendo por isso indispensável. Esta água uma vez utilizada para esta finalidade, acaba recebendo a determinação de “água de lastro”.

Este balanceamento proporciona à embarcação manobrabilidade e estabilidade e normalmente é realizada com águas das baías ou estuários do porto de origem que são posteriormente despejadas nos portos de destino (Figura 2). Estes procedimentos tornam a água de lastro o principal vetor no transporte de protistas aquáticos e propágulos de plantas e animais (Mccarthy & Crowder, 2000; Edwards et al., 2001; Werschkun et al., 2012). Algumas estimativas indicam que mais de 12 bilhões de toneladas de água de lastro são transportadas ao redor do mundo por ano (IMO/MEPC, 1998).

Figura 2 - Esquema do lastreamento de uma embarcação quando esta é carregada e descarregada nos portos de origem e destino.



Fonte: IMO, 2007.

A biota encontrada nestas águas, quando introduzida em um novo ambiente, constitui-se de organismos exóticos e pode ter consequências ambientais, econômicas e de saúde pública (Klein et al., 2010). Estimativas indicam que diariamente mais de 7.000 espécies circulam a nível mundial (Carlton, 2001).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas transportadas e liberadas através de águas de lastro por navios mercantes que se utilizam dos terminais portuários do rio Itajaí-açú.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a ocorrência e viabilidade de espécies fitoplanctônicas existentes em amostras de águas de lastro, através do cultivo *in vivo* em meio específico com diferentes teores de salinidade e composição de sílica.

- Testar metodologias com a utilização da microscopia invertida e de epifluorescência, no intuito de definir qual metodologia possui uma resposta rápida e coerente quanto a viabilidade de espécies fitoplanctônicas nas águas de lastro analisadas.

## 2 DESENVOLVIMENTO

O transporte de água de lastro ao redor do globo, intensifica o risco da introdução de organismos estranhos ao ambiente de destino das embarcações. Este processo definido por bioinvasão, mediado pelas águas de lastro, é complexo e constituído de diversos passos (Carlton, 1996). Primeiro os organismos devem sobreviver às condições extremas a que são expostos durante o transporte e subsequente deslastreamento. Na adaptação ao novo ambiente, estes organismos precisam estar em número suficiente para reproduzir-se, devem apresentar um alto nível de competitividade a possíveis parâmetros antagônicos e sua reprodução deve ser suficiente para compensar a mortalidade que pode ocorrer durante sua dispersão no ambiente de destino (Barlow, 2006). Uma característica destas águas e que aumenta seu potencial como vetor de introdução de organismos, de acordo com diferentes autores, é de que a água de lastro transporta todo tipo de organismos: bactérias (Willians. et al., 1988), protistas (Galil, 1997; Genovesi, 2004), protozoários (Hamer. 2000), algas, zooplâncton, invertebrados bentônicos e peixes entre os portos de origem e destino (Carlton, 1993; Mccarthy et al., 2000).

Estas espécies uma vez estabelecidas, podem gerar uma série de problemas ecológicos como alterações na cadeia trófica, competição com espécies nativas por espaço, introdução de substâncias tóxicas ou até mesmo doenças (Klein et al., 2010; Klein at al., 2009; Daszak et al., 2000; Barry et al., 2008). Podem ainda trazer prejuízos para instalações marítimas, turismo, pescaria comercial e artesanal, qualidade de águas e transporte marítimo (Pam, 2013).

Com o intuito de melhor definir a classificação das diferentes espécies exóticas, estas foram categorizadas da seguinte maneira (MMA, 2009):

- Espécie exótica contida, seria referente a espécies detectadas apenas em ambientes artificiais controlados, isolados total ou parcialmente do ambiente natural (aquário comercial, cultivo para fins científicos, tanque de água de lastro de navios, etc.);

- Espécie exótica detectada em ambiente natural, refere-se a presença de espécies no ambiente natural porém sem aumento posterior de sua abundância e/ou de sua dispersão consequentemente não sendo atestado impacto causado pela sua presença;

- Espécie exótica estabelecida, seria a espécie introduzida e detectada de forma recorrente, com ciclo de vida completo na natureza e indícios de aumento populacional ao longo do tempo em uma região restrita ou ampla, porém ainda sem apresentar impactos ecológicos ou socioeconômicos aparentes;



- Espécie exótica invasora, refere-se a espécie estabelecida que apresenta abundância ou dispersão geográfica que interferem na capacidade de sobrevivência de outras espécies em uma ampla região geográfica ou mesmo em uma área específica (Elliott, 2003), ou quando a espécie estabelecida causa impactos mensuráveis em atividades sócioeconômicas ou na saúde humana. Especificamente as espécies exóticas invasoras podem ser responsáveis por realizar pelo menos uma das seguintes ações (MMA, 2009):

- Deslocar espécies nativas via competição por espaço, luz ou alimento;
- Ser predadora de espécies nativas e reduzir sua densidade ou biomassa;
- Parasitar ou causar doença em espécies localmente importantes (como espécies cultivadas ou com alto significado ecológico e valor de conservação);
- Produzir toxinas que se acumulam na cadeia alimentar, envenenar outros organismos, ou causar risco direto à saúde humana (por exemplo, pela disseminação de patógenos ou por acumulação de ficotoxinas em moluscos e peixes utilizados na alimentação humana);
- Causar significativas perdas econômicas decorrentes de modificações na infraestrutura (por volumosa incrustação em tomadas de água, circuitos de refrigeração, molhes, embarcadouros, marinas, bóias, cascos de embarcações e outras superfícies entre marés ou submersas, entre outras situações).

Casos como a introdução do mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*) nos EUA, organismo que sozinho causa um impacto econômico de mais de 500 milhões de dólares por ano (Ruiz et al., 2001), estrelas marinhas do Pacífico Norte (*Asterias amurensis*) na Austrália, a macroalga (*Undaria pinnatifida*) no Mediterrâneo e o molusco *Limnoperna fortunei* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) em algumas bacias hidrográficas da região sul da América do Sul, são alguns dos exemplos de espécies exóticas invasoras, que causaram significativos impactos econômicos e ambientais ao longo dos últimos anos (Bax et al., 2003; Brugnoli et al., 2006; 2007).

Outro exemplo que é observado com preocupação é o aumento da frequência, intensidade e distribuição geográfica de dinoflagelados capazes de produzir a ficotoxinas que causam síndromes como a do envenenamento paralisante e do envenenamento diarreico, entre outras (Hallegraeff, 1998).

Entretanto, os potenciais riscos gerados pela liberação destas águas em diferentes ecossistemas, só foram reconhecidos realmente no fim da década de 1980 (Hallegraeff & Bolch, 1992). A intensificação dos estudos sobre esta temática, ocorreu a partir do início da década de 1990 (Davidson, 2012) onde ficou reconhecido internacionalmente os potenciais riscos

pertinentes a atividade comercial marítima e a partir deste momento, diversas organizações de administração e fiscalização portuária iniciaram esforços para a contenção desta ameaça.

Com isto o comitê de proteção ao meio ambiente (MEPC) da Organização Marítima Internacional (IMO) e as Nações Unidas (ONU) vêm, desde 1993, estipulando dispositivos legais que levem a implementação de um plano de controle e gerenciamento das águas de lastro.

Em 1997 a IMO através da criação da resolução A868 definiu diretrizes para o controle e gerenciamento destas águas, visando principalmente à diminuição da transferência de organismos exóticos. Em fevereiro de 2004 na Conferência Internacional dos Direitos do Mar, foi definida uma nova convenção intitulada como Convenção Internacional de Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios. Esta convenção definiu padrões internacionais para o monitoramento e manejo de água de lastro (IMO, 2004, Gollasch et al., 2007, David & Gollasch, 2008). Na seção “D” desta convenção definem-se os padrões para o gerenciamento de Águas de Lastro, no que concerne a viabilidade dos organismos. Na regulamentação “D2”, parágrafo 1º fica definido (IMO, 2004):

“Navios com o gerenciamento das águas de lastro de acordo com esta convenção deverão deslastrear menos de 10 organismos viáveis por metro cúbico maiores ou iguais a 50 micrometros ou maiores e iguais a 10 micrometros.”

O Brasil se tornou país signatário desta convenção, mas ficou dependente da promulgação por parte dos poderes legislativos nacionais, coisa que não ocorreu até hoje e que não permite que esta convenção tenha poder de lei. Atualmente o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária são as entidades que desenvolvem atividades referentes a esta problemática no Brasil. Suas atividades são ainda deficitárias e poucos estudos foram desenvolvidos no sentido de se reconhecer a real ameaça destes procedimentos (Proença & Fernandes 2004; Proença & Mueller 2000; Caron Jr. et al., 2005; Gerhardinger et al., 2005 e Souza & Silva, 2003).

Os quase 8.000 km de linha costeira e os mais de 80 terminais portuários que a cada ano recebem um número maior de embarcações agravam ainda mais este cenário (Takahashi et al., 2007). O monitoramento destes riscos no Brasil atualmente vem sendo realizado por diversos ministérios incluindo o do Meio Ambiente, Transporte, Turismo e Marinha do Brasil. De uma maneira geral estes diferentes ministérios tem as seguintes funções:

- O Ministério do Meio Ambiente tem a obrigação de monitorar os processos que integram as águas costeiras e águas oceânicas nas áreas de biodiversidade e impacto dos organismos marinhos introduzidos pelas águas de lastro;

- O Ministério da Saúde é responsável pela inspeção sanitária das embarcações e controle preliminar das condições de saúde na embarcação. Considerando que muitas vezes o lastreamento é realizado com águas do estuário do porto de origem, estas podem conter uma série de organismos patogênicos, tornando-se desta forma um potencial problema de saúde pública (Ministério da Saúde do Brasil, 2002);

- O Ministério dos Transportes tem por função básica coordenar e controlar a frota que se utiliza dos terminais portuários do Brasil;

- O Ministério da Defesa, através da Marinha do Brasil, teria o papel do policiamento das atividades desta frota comercial que se utiliza dos terminais portuários do Brasil.

Um estudo exploratório realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (subordinada ao Ministério da Saúde), confirmou a ocorrência de agentes patogênicos em águas de lastro liberadas em portos brasileiros. Neste estudo foram encontrados em mais de 70% das amostras de 103 a 106 unidades formadoras de colônias por litro (UFC/L), sendo registrados nestas amostras *Vibrio cholerae* (31%), coliformes fecais (13%), *Escherichia coli* (5%), enterococos fecais (22%), *Clostridium perfringens* (15%), vírus bacterianos (29%), *V. cholerae* O1 (7%), *V. cholerae* NAG (23%) além de espécies planctônicas (21%) (Ministério da Saúde do Brasil, 2002).

Com o intuito de controlar esta atividade, em 2005 a Marinha do Brasil liberou a Norma da Autoridade Marítima para o Gerenciamento da Água de Lastro de Navios – NORMAM 20, que regularizava e definia alguns deveres dos navios que se utilizam de terminais portuários brasileiros. Porém, apesar do envolvimento dos mais diversos ministérios, pouca coisa realmente vinha e vem sendo realizada no Brasil, quanto ao controle e regulamentação das atividades de lastreamento e deslastreamento desenvolvidas nos terminais portuários em seu território. A Organização Marítima Internacional (IMO) afirma que mais de 62% dos navios que declaram realizar a única medida prática exigida atualmente para controle da qualidade de águas de lastro (troca das águas estuarinas por águas oceânicas), provavelmente não o faz, uma vez que as águas contidas em seus tanques possuem salinidade inferior a 34. Corroborando esta afirmação, Martins *et al.* em 1991 e 1993 apresentaram informações sobre a ocorrência de *V. cholerae* na América Latina e estimaram que mais de 1,2 milhões de casos diagnosticados resultaram em cerca de 12.000 mortes. No Brasil um surto com 467 casos confirmados no estado do Paraná, ocorreu justamente na região do terminal portuário de Paranaguá (Ministério da Saúde do Brasil, 2002).

Neste cenário, este projeto teve como foco de estudo o estuário do Rio Itajaí-Açu e as atividades portuárias desenvolvidas neste. Utilizou-se também de um histórico de estudos desenvolvidos neste âmbito desde 2005 (Caron Jr., 2005), incluindo estudos sobre a viabilidade de organismos presentes nestas águas, além da identificação dos mesmos.

A região da foz do Rio Itajaí é um dos maiores pólos de atração econômica de Santa Catarina: localiza-se em uma das regiões com a melhor logística da América Latina; é uma das regiões no Brasil com forte dinamismo econômico; possui o maior porto pesqueiro do Brasil e é considerado um novo pólo da indústria naval inclusive em nível internacional. Sob o ponto de vista geográfico, a região está localizada em uma das áreas mais estratégicas do território catarinense, pois oferece ligação fluvial com o interior do Estado, e pelo Oceano Atlântico com todos os demais portos do Brasil, como demonstrado na Figura 3. Além disso, situa-se próximo de centros importantes como, Curitiba (212 km) e Porto Alegre (564 km).

Figura 3 - Visualização da geografia da região de Itajaí e Navegantes - SC.



Fonte: Google Earth.

Sob o aspecto logístico, esta região se encontra no eixo rodoviário mais importante do sul do Brasil, a BR-101, e possui ligação via aérea para todos os aeroportos do Brasil e do mundo, através do município vizinho de Navegantes. Tem no município de Itajaí a sede da região metropolitana da Foz do Rio Itajaí-Açu, segundo a Lei Complementar Estadual de Santa Catarina nº 495/2010. O núcleo metropolitano é composto pelos municípios de Itajaí, Balneário Camboriú, Camboriú, Navegantes e Penha.

A economia na região se desenvolveu através de 3 ciclos econômicos importantes: o Ciclo da Madeira, o Ciclo da Pesca e o Ciclo da Modernização Portuária, sempre primeiramente no município de Itajaí mas também sempre sendo acompanhado pelo município de Navegantes. Segundo o Atlas Socioambiental de Itajaí, o ciclo da madeira teve seu início na década de 50, transformando o porto de Itajaí no maior exportador de madeira da América do Sul. Com isso, houve um grande crescimento populacional e uma elevação na quantidade de estabelecimentos madeireiros e mão de obra específica. O declínio desse ciclo, nas décadas seguintes, se deu devido a alguns fatores como a criação de leis ambientais para conter o desmatamento e a concorrência com outros portos.

Já o ciclo da pesca teve seu auge nas décadas seguintes, com o declínio da madeira e da economia portuária de Itajaí. Com a grande produção de pescados, empresas de grande porte se estabeleceram na cidade garantindo o abastecimento local e o aumento nas exportações brasileiras. Apesar da falta de investimentos, políticas ambientais e defesos divergentes, o porto de Itajaí continua sendo o maior porto pesqueiro do Brasil, que nas décadas de 1980 e 1990 foi estruturado devido à modernização ocorrida nos portos brasileiros.

Foi nesse período que ocorreram a expansão e a construção de terminais especializados, consolidando o ciclo da modernização portuária.

Com tudo isso, a região se insere no contexto estadual e nacional como uma das mais promissoras no contexto socioeconômico, tendo sua economia diversificada nos mais diversos setores, com destaque para o setor de comércio e prestação de serviços. Atualmente a construção civil está sendo responsável pela modernização e verticalização do centro e dos bairros das cidades; o turismo é responsável por atrair milhares de visitantes em todas as épocas do ano, sendo o terminal transatlântico uma referência internacional.

Estes fatores, aliados ao aquecimento da economia, a nível nacional e municipal, as oportunidades crescentes de trabalho e um Índice de Desenvolvimento Humano considerado elevado (0,825), geraram uma elevação na densidade demográfica da região nos últimos 50 anos (IBGE 2010).

Dentro deste contexto, de aquecimento da economia e conseqüente movimentação de cargas, atualmente são dois os principais terminais portuários que desenvolvem atividades na região, na margem de Itajaí o Porto municipal de Itajaí e seus operadores particulares e, na margem de Navegantes, a Portonave. O terminal portuário de Itajaí teve início de suas atividades para movimentação de cargas por volta do ano de 1935 (Porto de Itajaí, 2011), já o terminal portuário de Navegantes iniciou suas atividades apenas no ano de 2007 (Portonave,

2013). Atualmente o Porto de Itajaí é considerado o segundo maior em número de movimentação de *containers* no país, tem forte vocação a pesca sendo estas atividades responsáveis por mais de 50% da arrecadação dos municípios de Itajaí e Navegantes. Juntos entre dezembro de 2011 e novembro de 2012 movimentaram cerca de 4 milhões de toneladas e tiveram 857 atracções em seus terminais. O terminal na margem de Itajaí em 2013 movimentou mais de 3,4 milhões de toneladas, valor muito abaixo do recorde do ano de 2006, que passou de 4,8 milhões de toneladas de carga movimentada. Apenas neste ano, mais de 310 navios utilizaram-se destes terminais segundo o Histórico de Movimentação Porto de Itajaí (Porto de Itajaí, 2013). Estima-se (sobre o número de navios atracados), que apenas no terminal Portuário de Itajaí mais de vinte e quatro mil m<sup>3</sup> de água de lastro tenham sido despejados no ano de 2010 sem qualquer controle ou tratamento.

Dentre todas as espécies exóticas que potencialmente poderiam ser introduzidas neste ambiente, foi dada especial atenção neste projeto, a comunidade fitoplanctônica. Historicamente os organismos fitoplanctônicos, não têm sido contemplados nos estudos sobre a introdução de espécies exóticas em todo mundo. Deve-se isso principalmente pela convicção da distribuição cosmopolita destes organismos (Finlay, 2002), mas estudos indicam que isto não seria verdade (Casteleyn et al., 2008; Kaczmarek et al., 2009; Kooistra et al., 2008; Medlin, 2007), uma vez que estes possuem sim uma distribuição específica ou até muitas vezes possuem linhagens potencialmente mais tóxicas que as de ocorrência na área de estudo.

Outro fator que influenciaria esta questão seria a descrença na viabilidade destes organismos ao fim de cruzeiros que normalmente duram vários dias, expõem os organismos a condições extremas e os priva totalmente a incidência de luz. Contrariando todas estas condições adversas, vários estudos demonstraram a existência de organismos que resistem ao fim de cruzeiros transoceânicos e são viáveis (Kipp et al., 2010; Klein et al., 2010; Gollasch et al., 2000; Klein et al., 2009).

Atualmente na região, por iniciativa da UNIVALI em convênio com o Porto de Itajaí, para atender requerimento por parte do órgão ambiental competente são realizadas coletas para identificação de espécies fitoplanctônicas e zooplanctônicas, onde as amostras são coletadas e imediatamente fixadas para identificação e quantificação. Além disto, é estimado o volume de despejos de água de lastro e é calculado o risco de cada embarcação de acordo com o porto de procedência e sua similaridade com a região de Itajaí, onde portos de maior similaridade apresentam menor risco sendo o contrário também verdadeiro. Logo no intuito de aprimorar este monitoramento o projeto proposto teve por finalidade não só identificar e quantificar os

organismos, mas sim averiguar que espécies fitoplanctônicas alcançam esta área com viabilidade para se estabelecer nos diferentes ambientes da região.

## 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1.1 Áreas de estudo

A área de estudo corresponde ao estuário do Rio Itajaí-açu onde se desenvolvem a atividade portuária pelo Porto Público de Itajaí e demais terminais portuários instalados nas margens direita e esquerda da Foz do Rio Itajaí-açu. Todas estas instalações constituem o complexo portuário de Itajaí e são hoje a principal opção para os exportadores e importadores que operam em Santa Catarina e um dos principais complexos do Brasil. A Autoridade Portuária é delegada ao município de Itajaí pelo convênio nº 08/1997 firmado entre município e União, e é exercida pela Superintendência do Porto de Itajaí, autarquia municipal criada em junho de 2000 para assegurar as condições operacionais e garantir a infraestrutura terrestre e aquaviária para os terminais que compõem o complexo.

Neste estudo foram amostrados navios mercantes que se utilizaram dos dois principais terminais instalados no estuário do Rio Itajaí-açu, o APM Terminals Itajaí, que localiza-se na margem da cidade de Itajaí e o Portonave que localiza-se na margem do município de Navegantes.

Esta área oferece diferentes habitats com as mais variadas condições físico/químicas e espaciais. Considerando estes diversos habitats é de se supor também uma maior facilidade para a instalação e propagação das mais diversas espécies invasoras. A região como um todo, devido a importâncias das atividades de pesca, aquicultura e até mesmo turismo, poderiam sofrer graves consequências em um eventual estabelecimento de alguma espécie exótica.

Figura 4 - Localização dos terminais portuários dos municípios de Itajaí e Navegantes em Santa Catarina.



Fonte: Google, 2016.

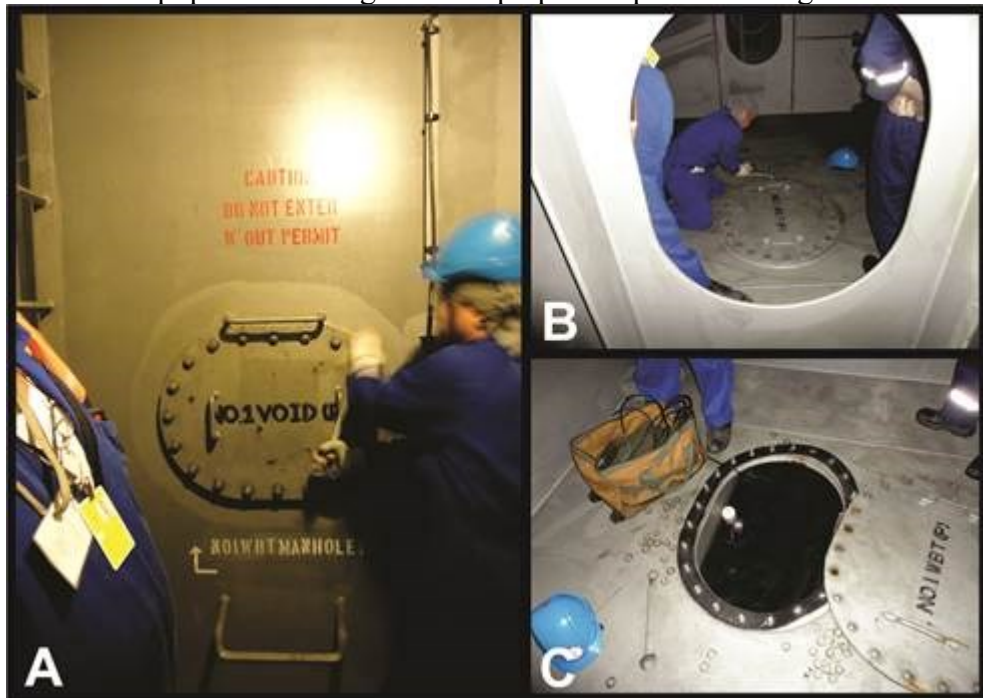


### 2.1.2 Amostragens

O monitoramento de água de lastro no Porto de Itajaí ocorre desde 2005, sendo que apenas a partir de 2007 foi implantado o programa de análise e monitoramento de água de lastro no porto. Devido a todos os empecilhos legais junto a Polícia Federal, Anvisa e Autoridade Portuária o acesso aos navios sempre deve atender a uma série de autorizações prévias. Neste sentido grande parte das amostragens foram realizadas pelo responsável por todo o programa de monitoramento já instituído anteriormente ao início deste projeto.

As amostragens ocorrem diretamente nos tanques de lastro dos navios mercantes e tem como princípio a facilidade de acesso, a determinação do comandante do navio e o nível de água dentro dos tanques. Devido ao difícil acesso, o princípio de que não altere a rotina de carga e descarga e a necessidade de acompanhamento de pessoal responsável pela embarcação muitas vezes a coleta é vista como um empecilho, o que muitas vezes leva a não realização das mesmas. A figura abaixo ilustra uma das coletas realizadas e a mão de obra necessária para realizá-la.

Figura 5 - Acesso ao tanque de água de lastro. A) Retirada de elipse para entrada ao ambiente anterior ao tanque. B) Retirada de elipse para acesso ao tanque de lastro. C) Detalhe do equipamento na água sendo preparado para amostragem.



Com a elipse do tanque de lastro aberta era inserida uma bomba submersa da marca RULE ® modelo 500GPM acoplada a um cabo elétrico anti-chamas de 15m conectado a uma

bateria automotiva de 12v e 45A. Para a coleta da amostra de fitoplâncton era acoplada à boca de saída da bomba submersa uma garrafa filtradora (garrafa plástica com rede de malha de 40 $\mu$ m) e a bomba era acionada por 7min perfazendo um volume estimado de 210 litros, após isso a garrafa filtradora era lavada com pisseta (contendo água do próprio tanque amostrado) sobre um funil que levava o concentrado para um frasco de amostragem. Este processo era repetido 2 vezes. Em uma das ocasiões a amostra era recuperada e acondicionada em um frasco de 200ml contendo formol a 4% para preservação da amostra e na segunda oportunidade para um frasco sem fixador para inoculação e tentativa de cultivo.

No período deste projeto foram realizadas amostragens em 11 tanques de lastro de navios que se utilizaram do terminal da APM em Itajaí e 27 tanques de lastro de navios que se utilizaram do terminal Portonave em Navegantes totalizando 38 amostras de água de lastro no período de setembro de 2011 a dezembro de 2012.

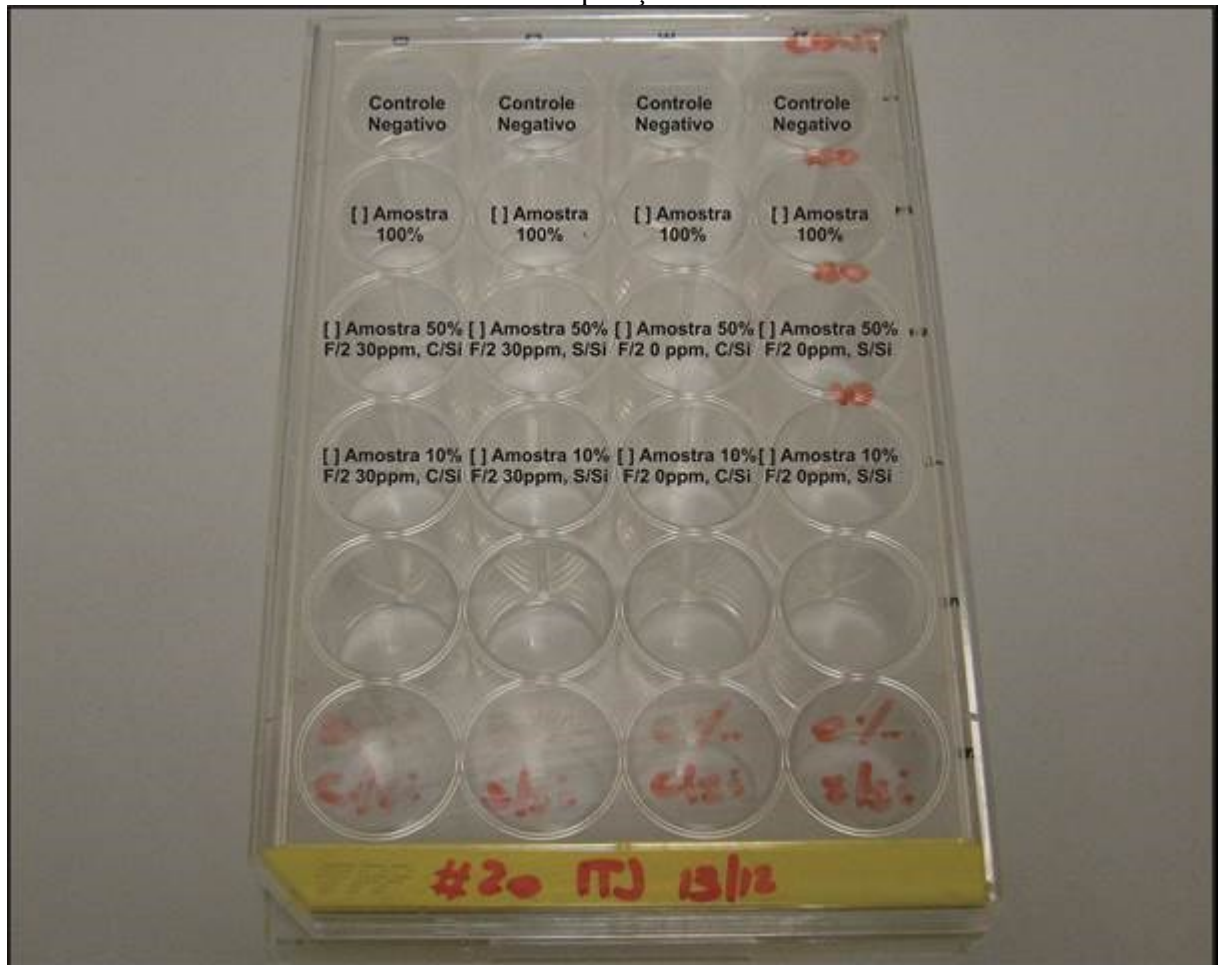
### **2.1.3 Cultivo**

Após coleta e dentro de 8 horas as amostras eram levadas ao laboratório e cultivadas a temperatura e período de luz controlados. Utilizou-se do meio de cultivo F/2 (Guillard, 1975). Foram preparados meios F/2 com água do mar filtrada e com salinidade ajustada a 30 e com água destilada, ambos nas versões com adição de sílica e sem adição de sílica.

Os cultivos foram realizados de duas formas:

- Cultivos em erlenmeyers com volume final de 100 ml, com concentração de amostra de 1:20 e a 30 de salinidade, em meio F/2 com adição de sílica;
- Cultivos em microplacas de 24 poços com volume final de 2 ml por poço nas formulações e concentrações de meio e amostra respectivamente de acordo com a figura 6.

Figura 6 - Detalhe do cultivo em microplacas com suas diferentes concentrações e composições.



O controle negativo tratava-se do meio com sua salinidade específica e formulação com adição ou não de sílica, mas sem a inoculação da amostra *in vivo*.

O cultivo com a concentração de amostra a 100%, tratava-se apenas da amostra *in vivo* cultivada sem qualquer adição de meio. Já as concentrações de amostras de 50% e 10% apresentaram versões do meio F/2 a salinidade 30 e 0 com adição de sílica ou não. Neste caso o cultivo sem adição de sílica, foi uma tentativa de favorecer o desenvolvimento de espécies que não demandassem deste nutriente.

Desta forma ao final de 7 dias de cultivo em ambiente com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas no escuro, a uma temperatura de  $19^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , os cultivos em erlenmeyer foram fixados em frascos de 100 ml e os cultivos das microplacas analisadas em microscopia invertida e posteriormente conservadas em tubos de ensaio com tampa. Ambos foram fixados com formol a 4% e posteriormente analisados no caso das amostras cultivadas em erlenmeyer.

#### **2.1.4 Determinação qualitativa e quantitativa do fitoplâncton de amostras fixadas e de amostras cultivadas.**

A determinação qualitativa e quantitativa do fitoplâncton foi realizada com as amostras fixadas retiradas dos tanques de lastro. Utilizou-se o método de Utermöhl (1958), com câmaras de sedimentação de 10 ml e microscópio invertido com contraste de fase, nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes. As amostras cultivadas em microplacas tiveram seus organismos identificados e quantificados diretamente nas placas utilizando-se do microscópio invertido, sendo posteriormente foram fixadas.

#### **2.1.5 Determinação de salinidade, clorofila-a e pH.**

As variáveis físico químicas da água (salinidade e pH) foram medidas em laboratório, utilizando-se de uma sonda multiparâmetro Horiba U10, em decorrência da dificuldade em acessar os tanques de lastro. Desta forma, tomar medições de outros parâmetros físico/químicos (temperatura e oxigênio dissolvido) não representariam a realidade do momento de coleta e por isso não foram realizados.

Para a análise de clorofila-a foi utilizado o método fluorimétrico de acordo com Strickland & Parsons (1972). Foram filtrados volumes definidos de amostra (entre 5 e 100 ml, dependendo da quantidade de material em suspensão), em filtros GF/F de 25 mm de diâmetro, ao abrigo da luz. Estes foram então dobrados e estocados a -18°C em envelopes de papel alumínio. A extração dos pigmentos foi feita em 10ml de acetona a 90%, por 24h no congelador. A fluorescência das amostras foi lida em fluorímetro Turner TD-700. A calibração do aparelho é feita usando-se amostras extraídas de cultivos saudáveis da diatomácea *Skeletonema costatum*, cuja concentração absoluta de clorofila-a é previamente determinada por espectrofotometria (espectrofotômetro de emissão) de acordo com Strickland & Parsons (1972). Os valores finais foram expressos em  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

#### **2.1.6 Determinação da viabilidade de células fitoplanctônicas, através da análise de epifluorescência.**

A determinação da viabilidade das células fitoplanctônicas, através da observação da integridade de seus cloroplastos foi adaptada de acordo com Klein *et al.* (2010). Devido a

particularidades no método de amostragem, onde no caso do trabalho de Klein *et al.* (2010), eram amostras integrais posteriormente filtradas e no caso deste projeto eram amostras já eram filtradas no momento da amostragem, algumas alterações foram realizadas no método proposto.

A coleta foi realizada de acordo com a descrição do item 3.2. Após a recuperação do material filtrado este era conservado *in vivo*, resfriado e encaminhado ao laboratório. No laboratório uma alíquota de 100 ml era centrifugada, retirava-se o sobrenadante, recuperava-se o *pellet* que era ressuspendido em 20 ml de água do mar filtrada. Esta amostra uma vez recuperada era fixada e posteriormente confeccionavam-se lâminas de microscopia cobertas com lamínulas sendo a enumeração realizada através de contagem direta por microscopia de autofluorescência (MACISAAC & STOCKNER, 1993). O conjunto óptico, nesse caso, compreendeu em filtro de excitação de 510-550 nm, filtro barreira de 590 nm e divisor de feixe de 570 nm em microscópio de epifluorescência Olympus BX40. A autofluorescência natural dos cloroplastos nas células foi considerada um indicativo de que as células estavam vivas no momento em que as amostras foram fixadas. Foram analisadas e enumeradas aleatoriamente um mínimo de 30 células em cada lâmina.

### **2.1.7 Análise estatística**

Para facilitar a compreensão das relações entre os diferentes dados descritos, foi realizada a técnica multivariada exploratória de Análises de Componentes Principais (ACP). As matrizes de dados submetidos à ACP, tiveram seus valores das variáveis logaritmizados para normalização das amplitudes de variação.

## **2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.2.1 Origem das amostras**

Uma das poucas obrigações, em se tratando do controle da água de lastro dos navios mercantes que acessam os diferentes terminais portuários localizados na foz do rio Itajaí-açu, é a entrega de formulários que tem como principais informações:

- Estimativa de Lastreamento ou Deslastreamento realizado no porto de destino (no caso o Porto de Itajaí);
- Declaração da realização da troca oceânica;

- Informações quanto a origem desta água de lastro (normalmente uma coordenada geográfica), data de coleta e dados gerais sobre o navio.

Dentre as 38 amostras de água de lastro coletadas e analisadas no período de setembro de 2011 a dezembro de 2012, ficou claro que, de acordo com informações declaradas em seus respectivos formulários, a distribuição da origem destas águas de lastro variou pouco. Foi declarado que das 38 amostras 22 sofreram troca oceânica e desta forma se desfizeram das águas do porto de origem.

Os demais formulários indicaram uma distribuição principal na costa da América do Sul, com quatro amostragens acumuladas na foz do Rio da Prata, mais especificamente com três navios declarando como origem da água de lastro o terminal portuário da cidade de Buenos Aires e um declarando o terminal da cidade de Montevideo como origem. Deve-se dar atenção aos navios provenientes destes terminais uma vez que de acordo com Brugnoli et al. (2006, 2007) existem 12 organismos aquáticos exóticos já introduzidos nas águas da foz do Rio da Prata onde entre estes organismos destacam-se três espécies de moluscos (*Limnoperma fortunei*, *Rapana venosa* e o *Corbicula fluminea*), que são reconhecidas como espécies exóticas invasoras (Muniz et al. 2005, Rodriguez 2007, Brugnoli et al. 2006, 2007). Além disso, as costas uruguaia e argentina têm sido palco de diversas florações de microalgas nocivas como a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, a diatomácea *Pseudo-nitzschia multiseries* e os dinoflagelados *Gymnodinium catenatum*, *Dinophysis* spp. e *Alexandrium tamarense* (Méndez, 2006). Destas, a última espécie, que é produtora de toxinas paralizantes, ainda não foi citada para a costa catarinense, apesar de ter sido detectada no Paraná (Proença & Fernandes 2004), o que significa que a água de lastro oriunda daquelas regiões constitui um risco de introdução desta espécie na costa catarinense, o que teria graves consequências na maricultura regional.

Os demais formulários declararam como pontos de origens terminais distribuídos ao longo da costa do Brasil. Da mesma maneira, alguns terminais portuários brasileiros também já possuem registros de espécies exóticas invasoras, como a Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul que como o Rio da Prata anteriormente citado também possui registro do molusco *Limnoperma fortunei* (Brugnoli et al. 2006, 2007) e da espécie também já considerada exótica invasora *Alexandrium tamarense*, já citado acima.

Fora destas áreas, foram declaradas apenas duas origens de água de lastro, sendo uma no terminal portuário de Algeciras na Espanha e outra em Singapura (Figura 7).

Como a maior parte das regiões de origem é localizada muito próximo ou até mesmo na mesma biorregião, a expectativa de se encontrar espécies exóticas nas amostras analisadas era pequena.

De qualquer forma, devido aos poucos estudos e programas de monitoramento em toda a região e a identificação, neste estudo, da presença de espécies ainda não registradas, fica clara a necessidade do monitoramento destas águas de lastro. Esta condição se repete em todo o mundo e muito deve-se a falta de um padrão ou medidas adotadas a nível mundial (David et al., 2007) Desta forma, deve ser dada muita atenção, aos portos de origem que possuem registros de espécies exóticas e estão a poucos dias de viagem do porto de destino, no caso o Porto de Itajaí.

Figura 7 - Proveniência e frequência das águas de lastro analisadas.



Fonte: ArqGis (2016)

### 2.2.2 Dados Químicos e biológicos das amostras

Os dados de dias de tanque e origem da água de lastro, que foram obtidos dos formulários entregues pelos responsáveis dos navios, mostraram que estes variaram entre 1 e 193 dias (Tabela 1). Fica claro a grande variação entre as amostras quanto aos seus respectivos dias de retenção, apresentando um valor médio de 25 dias (CV= 156%). De qualquer forma ficou clara a relação entre dias de retenção da água de lastro e número de espécies viáveis nos métodos das amostras cultivadas e analisadas por epifluorescência. A ACP (Figura 8), mostrou

uma relação inversamente proporcional entre os dias de tanque e o número de espécies viáveis, tanto no cultivo como na análise de epifluorescência. Estudos anteriores (Carlton, 1985; Williams et al., 1988), confirmam este padrão onde a abundância e a diversidade de espécies fitoplanctônicas, diminuem com o tempo de retenção da água de lastro nos tanques, ficando estabelecida uma relação inversamente proporcional. Já para as espécies identificadas nas amostras fixadas, esta relação não ficou muito clara. Os dados de origem ou localização da troca, que identificam principalmente se esta água de lastro sofreu troca oceânica são bastante questionáveis uma vez que valores de salinidade não são condizentes com o esperado. Estes dados são coerentes com afirmação anterior (item 1), onde a IMO declara que 62% das declarações cedidas por responsáveis de navios quanto a confirmação da troca oceânica são inverídicas. Estas informações são normalmente contestadas devido a verificação da salinidade destas amostras que apresenta valores inferiores aos comumente encontrados em águas oceânicas. Segundo Stowe (1995), a maior parte das águas oceânicas tem salinidades que variam entre 34 e 36 e virtualmente toda a variação significativa neste parâmetro deve-se a processos físicos (congelamento, precipitação ou evaporação). Um exemplo disto, é que normalmente águas costeiras apresentam uma menor salinidade devido principalmente ao aporte de água doce dos continentes.

Neste sentido a salinidade pouco variou e apresentou valores máximos e mínimos de 36,3 e 28,8 respectivamente (Tabela 1). Os menores valores de salinidade quase sempre são de amostras onde não foram declaradas a troca oceânica. Lembrando que a troca oceânica é considerada satisfatória quando mais de 97% do volume do tanque é realmente trocado com água marinha oceânica. De qualquer maneira cinco das amostras (#3, #9, #26, #34, #35) apresentaram valores de salinidade variando entre 28,8 e 33,6 e foram declaradas como oceânicas (Tabela 1). Estes dados corroboram os receios da IMO das declarações inverídicas nos formulários de controle de trocas oceânicas.

Já o pH variou entre 8,32 e 6,5 (Tabela 1) e da mesma forma não apresentou um padrão de distribuição em relação a declaração de origem da água de lastro.

A concentração de clorofila-a, como citado anteriormente, assume o papel de indicador das espécies fitoplanctônicas viáveis e apresentou máxima e mínima de 0,0516 e 0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente (Tabela 1). Os valores de clorofila-a de acordo com a análise de componentes principais (Figura 8), foram proporcionais ao número de espécies viáveis cultivadas e identificadas por epifluorescência. Ainda se mostrou inversamente proporcional a salinidades



das amostras, indicando um padrão esperado de que águas oceânicas normalmente de maior salinidade possuem uma menor abundância e diversidade de espécies fitoplanctônicas e consequentemente menores valores de clorofila-a. Da mesma maneira, também foi observado um comportamento inversamente proporcional entre valores de clorofila-a e dias de tanque da água de lastro. Estudos, corroboram este dado, como o observado em Klein *et al.* (2010), onde todos os valores de clorofila-a partir do sexto dia de monitoramento dos tanques de lastro, durante uma jornada entre o Oceano Pacífico e o Canadá, apresentaram valores inferiores a 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O mesmo estudo indica que o decréscimo nos níveis de clorofila-a, ocorreu rapidamente após o lastreamento dos navios como consequência da total falta de luz e decréscimo na concentração de alguns nutrientes essenciais como nitrato e fosfato. Ainda de acordo com Gollash *et al.* (2000), as características do ambiente do tanque de lastro podem não ser os únicos fatores responsáveis pelo decréscimo acentuado na abundância dos organismos, e consequente decréscimo nos valores de clorofila-a logo após o lastreamento do navio. Provavelmente, eventuais danos causados durante o processo de bombeamento de água, tiveram papel importante no decréscimo de abundância destas espécies.

Tabela 1 - Dados de salinidades, pH e clorofila-a extraída o número de táxons identificados nas amostras cultivadas, fixadas e observadas em microscopia de epifluorescência e dados de dias de retenção e origem das 38 amostras de água de lastro coletadas nos Terminais Portuários de Itajaí e Navegantes – SC.

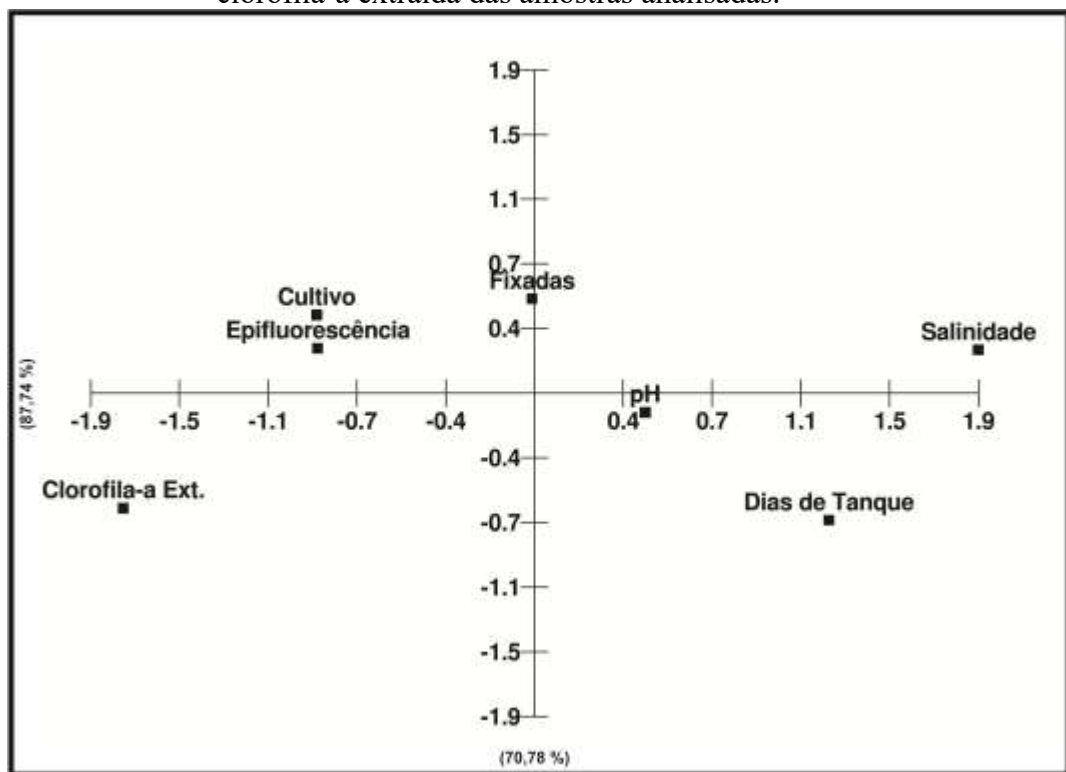
Amostra	Dias de Tanque	Localização da Troca	Salinidade (ppm)	pH	Clorofila-a Ext. (µg/l)	Táxons Viáveis (Cultivo)	Táxons Identificadas	Táxons Viáveis (Epifluor.)
1	8	Oceânica	35,5	7,4	0,0113	2	10	3
2	13	Singapura	35,7	7,9	0,007	1	-	-
3	13	Oceânica	29,3	8,1	0,0118	2	1	-
4	14	Oceânica	35,4	8,05	0,0250	8	7	2
5	25	Ponta do Ebu/Espirito Santo	31,8	7,8	0,0477	20	13	9
6	1	Paranaguá/Paraná	34,4	7,87	0,0007	-	10	4
7	17	Oceânica	35,5	8,1	0,0013	-	12	3
8	14	Algeciras/Espanha	35,1	8,2	0,0290	12	15	5
9	28	Oceânica	33,6	8,3	0,0070	1	10	3
10	29	Oceânica	34,2	7,34	0,0063	-	6	2
11	20	Oceânica	35,3	8,15	0,0153	5	5	1
12	67	Oceânica	34,2	6,70	0,0007	-	7	3
13	-	Oceânica	35,2	6,87	0	-	4	-
14	2	Oceânica	35,6	6,90	0,0107	12	23	8
15	-	-	35,1	6,96	0,0003	-	7	-
16	-	-	32,8	6,50	0,0150	8	27	11
17	-	-	31,7	6,89	0,0123	3	28	8
18	49	Montevideo	29,3	7,09	0,0003	-	2	-
19	5	Oceânica	34,2	7,6	0,0011	-	3	-
20	14	Oceânica	36,3	7,6	0,0218	1	3	1
21	6	Suape/Pernambuco	36,3	8,2	0,0281	3	4	1
22	18	Mista	34,9	8,32	0,0015	-	3	-
23	11	Oceânica	35,9	8,12	0,0008	-	2	-

Continuação Tabela 1.

Amostra	Dias de Tanque	Localização da Troca	Salinidade (ppm)	pH	Fluorescência Ext. (µg/l)	Táxons	
						Viáveis (Cultivo)	Táxons Identificadas Viáveis (Epifluor.)
24	23	Oceânica	34	7,87	0,0017	1	-
25	3	Santos/ São Paulo	29,2	7,65	0,0322	7	20
26	140	Oceânica	28,8	8,22	0,0003	-	1
27	9	Oceânica	35,5	7,98	0,0144	2	6
28	11	Oceânica	35,6	8,02	0,0003	-	2
29	6	Buenos Aires	29,5	6,95	0,0247	4	7
30	12	Oceânica	35,5	7,36	0,0003	-	-
31	42	Oceânica	36,4	7,93	0,0010	-	1
32	2	Buenos Aires/Oceânica	31,2	7,78	0,0448	13	12
33	12	Salvador/Oceânica	35,2	8,18	0,0245	9	28
34	12	Oceânica	30,9	7,7	0,0215	8	20
35	193	Oceânica	31,5	8,1	0,0003	-	18
36	13	Oceânica	35,1	7,43	0,012	12	13
37	4	Paranaguá/Paraná	28,7	7,17	0,0517	7	18
38	8	Buenos Aires/Oceânica	33,7	8,18	0,02	3	4

Outra possibilidade a ser considerada é a existência de metabolismos heterotrófico e mixotrófico em algumas espécies fitoplanctônicas. No caso de mixotróficos, pode haver inativação fisiológica da clorofila-a com sobrevivência das células, o que impõe uma restrição ao uso da concentração de clorofila-a como indicador seguro de viabilidade de células em águas de lastro. Sabe-se que algumas espécies de dinoflagelados potencialmente tóxicos (*Dinophysis* spp.) apresentam metabolismo mixotrófico ou heterotrófico (Jeong *et al.*, 2010), logo há um risco considerável no uso da clorofila-a como único indicador de viabilidade. Além do metabolismo mixotrófico, o encistamento também pode gerar falsos negativos de viabilidade quando avaliados pela concentração de clorofila-a.

Figura 8 - Análise de ACP do número de espécies viáveis cultivadas (Cultivo) e identificadas por epifluorescência (Epifluorescência), número de especies identificadas nas amostras fixadas (Fixadas), pH, Salinidade, numero de dias de tanque da água de lastro e valores de clorofila-a extraída das amostras analisadas.



Já as variáveis utilizadas para indicar a viabilidade das espécies fitoplanctônicas (concentração de Clorofila-a, quantidade de espécies que cresceram em cultivo e quantidade de células íntegras vistas por microscopia de epifluorescência) se mostraram claramente relacionadas positivamente (FIGURA 8). Ficou claro que a análise microscópica das amostras fixadas foi a que mais vezes identificou um maior número de espécies por amostra (Tabela 1).

Em apenas seis das amostras (#2, #3, #4, #5, #24 e #32) o número de espécies identificadas na amostra cultivada foi maior. Destas seis amostras, cinco apresentam a diferença de apenas uma espécie identificada. De qualquer forma o fato apresentado nestas seis amostras não era esperado, uma vez que nem sempre poder-se-ia garantir a integridade da célula através da observação por microscópio óptico e por isso um maior número de espécies nas amostras fixadas seria mais coerente que o inverso. Deste modo, o maior número de espécies cultivadas em relação às identificadas, indica que pode ter ocorrido uma subestimação na identificação destas amostras fixadas. Uma possível explicação, seria a baixa densidade de células viáveis nas amostras, que uma vez sujeitas ao cultivo e conseqüente aumento em sua abundância tiveram sua identificação facilitada. Por outro lado, os resultados bastante positivos relacionados ao crescimento de espécies nos cultivos de água de lastro evidenciam o risco a que são submetidas as regiões receptoras de águas de lastro, pois mesmo com toda a adversidade a que foram impostas, houve crescimento e viabilidade.

Não houve diferença entre os diferentes meios de cultura utilizados no cultivo das espécies viáveis. Os meios com sílica, sem sílica e com diferentes salinidades apresentaram todos sem exceção as mesmas espécies viáveis, variando apenas suas respectivas abundâncias. Exemplo disto foi a predominância de espécies estuarinas nos meios de menor salinidade e vice versa.

Ainda de acordo com a tabela 1, das 38 amostras *in vivo* cultivadas, 15 delas não apresentaram espécies viáveis. Observando o local de origem e dias de retenção em tanque destas 15 amostras, percebe-se um cenário onde ou as amostras tinham origem oceânica, confirmadas ou não pela salinidade superior a 34, ou amostras de origem costeira que possuíam, no mínimo, 49 dias de retenção em tanque. A única amostra que não apresentou espécies viáveis, declarou a origem da água de lastro como costeira e com tempo de retenção 1 dia, foi a amostra #6. Resumidamente, fica claro que, mesmo com esses resultados positivos de viabilidade, o longo tempo de retenção destas águas em tanques e a troca oceânica são meios eficientes para redução da transferência de organismos vivos.

Pode-se observar ainda que a amostra que apresentou um maior número de espécies cultiváveis foi a amostra #5. Esta amostra teve como origem declarada, a Ponta do Ebu no estado do Espírito Santo e tinha como tempo de retenção das águas de lastro 25 dias. Este número elevado de espécies viáveis ao fim de 25 dias, não condiz com estudos realizados durante jornadas de número parecido de dias. Estes estudos indicam que ao fim destas jornadas, poucas espécies sobrevivem às condições adversas proporcionadas pelo ambiente dos tanques

de lastro (Gollash et al. 2000, Klein et al. 2010). Gollash *et al.* (2000), verificaram que durante uma jornada de 23 dias, a taxa de sobrevivência de espécies fitoplanctônicas foi de apenas 0,2% do número inicial de espécies viáveis. Desta forma, mais uma vez, coloca-se em dúvida os dados declarados nos formulários entregues as autoridades portuárias, pois após 25 dias foram identificadas 20 espécies viáveis na amostra cultivada, o que poderia indicar um menor número de dias de retenção desta amostra de água de lastro no tanque.

Já as espécies viáveis identificadas através do método de epifluorescência, apesar de apresentar relação com o número de espécies cultivadas (Tabela 1), foi a que menos apresentou um padrão em relação aos demais métodos. Apresentou valores, em sua maioria, subestimados de espécies viáveis quando comparado ao número de espécies viáveis identificadas no cultivo e na análise das amostras fixadas. A inconstância do método em relação ao número de espécies cultivadas, poderia ser explicada pelo estudo de Augusti et al. (2006). O estudo indica que mesmo a célula apresentando integridade de suas membranas, esta já pode estar sofrendo com alterações em sua capacidade de manutenção da homeostase interna, o que conseqüentemente aumentaria sua permeabilidade celular e por definição este quadro configuraria a inviabilidade celular. Desta forma, uma célula que aparentemente apresentava suas membranas íntegras quando analisadas através da microscopia de epifluorescência, quando cultivadas, mostrar-se-iam inviáveis. Outra possibilidade é que a autofluorescência de clorofila-a pode ocorrer mesmo em células recentemente mortas, dependendo das condições da amostra para a sua manutenção (Macisaac & Stockner, 1993). Baixas temperaturas e ausência de luz tendem a aumentar o tempo de manutenção dessa autofluorescência. Assim, células com autofluorescência de Clorofila-a no momento da análise não necessariamente estavam vivas e íntegras no momento da coleta. Vários outros métodos utilizando fluorescência têm se mostrado mais específicos e eficientes, destacando-se o caso de fluorocromos associados a ácidos nucleicos. Um exemplo é o SYTOX Green (Molecular Probes), que tem uma emissão de fluorescência em verde, contrastando com o vermelho da clorofilal. O SYTOX Green stain apresenta alta afinidade com ácidos nucleicos e não atravessa membranas de células, mas pode facilmente penetrar em células com membranas plasmáticas comprometidas (Lebaron et al., 1998). Apesar de ter sido criada para uso em análise de viabilidade de células bacterianas essa técnica tem sido utilizada de forma crescente para avaliação da viabilidade de células microalgais, especialmente em associação com citometria de fluxo (Veldhuis et al., 2001; Schulze et al., 2011).

Existem também métodos eficientes e seguros para avaliação da viabilidade ou vitalidade celular, independentes de cultivo, que não envolvem fluorocromos. É o caso do Ensaio de Digestão Celular (CDA), que requer a incubação de amostras frescas a 35°C por 45 min para a digestão enzimática de células mortas com tripsina e DNase I (LLABRÉS, M. & AGUSTÍ, 2008).

A padronização desses tipos de análises para amostras de água de lastro seria altamente recomendável, porém, na situação atual dos portos brasileiros ainda é uma realidade difícil. Nesse caso, como visto no presente trabalho, a análise de autofluorescência de clorofila-a talvez seja, apesar da eficiência questionável, um método rápido, factível e com boa margem de segurança para o monitoramento.

### 2.2.3 Táxons identificados nos métodos propostos

Os táxons identificados nas amostras fixadas, nas amostras cultivadas e nas amostras analisadas através da microscopia de epifluorescência pertenceram aos grupos Charophyta (1 táxon), Cyanobacteria (2 táxons), Dinophyta (25 táxons), Heterokontophyta (63 táxons) e Protozoa *incertae sedis* (1 táxon) totalizando 92 táxons. Percebe-se que a maioria dos táxons identificados (69%), pertence ao filo *Heterokontophyta*, em especial a Classe Bacillariophyceae (diatomáceas). Essa predominância, em termos de riqueza é relatada por muitos trabalhos (Sassi, 1991; Brandini, 1995; Melo Magalhães *et al*, 1996; Eskinazi-Leça *et al.*, 2000; Cunha, 2004).

Na análise das 38 amostras fixadas, a comunidade fitoplanctônica identificada foi constituída principalmente por *Coscinodiscus* spp., *Skeletonema* spp., *Cylindrotheca closterium*, *Thalassionema nitzchioides* e pela família Naviculaceae (Tabela 2). Na tabela 2 são apresentados ainda mais cinco táxons de maior frequência, todos pertencendo a Classe Bacillariophyceae.

Tabela 2 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras fixadas de água de lastro, sua frequência em número de amostras e em porcentagem.

<b>Táxons</b>	<b>Frequência (n° amostras)</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Coscinodiscus sp.</i>	30	78,9
<i>Skeletonema sp.</i>	19	50,0
<i>Cylindrotheca closterium</i>	14	36,8
<i>Naviculaceae</i>	14	36,8
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	14	36,8
<i>Chaetoceros sp.</i>	12	31,6
<i>Dictyocha fibula</i>	12	31,6
<i>Pseudo-nitzschia</i>	11	28,9
<i>Leptocylindrus minimus</i>	10	26,3
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	9	23,7

Uma vez cultivadas, as amostras *in vivo* apresentaram como táxons viáveis identificados organismos dos filos Cyanobacteria (1 táxon), Dinophyta (9 táxons) e Heterokontophyta (36 táxons), totalizando 46 táxons, exatamente a metade do número de táxons identificados nas amostras fixadas. A classe Bacillariophyceae, corresponde a mais de 78% dos táxons viáveis em cultivo, demonstrando com isso capacidade elevada em sobreviver às condições adversas apresentadas pelo ambiente dos tanques de água de lastro.

Os táxons mais comuns nas amostras fixadas também apresentaram-se frequentemente viáveis e reproduziram-se sob cultivo, (*Coscinodiscus spp.*, *Skeletonema spp.*, *Cylindrotheca closterium*, *Thalassionema nitzschioides* e família *Naviculaceae*, (Tabela 3). O gênero *Coscinodiscus* apresentou-se viável ao cultivo, em aproximadamente 42% das amostras de água de lastro analisadas. Quanto aos demais táxons que completam os dez mais viáveis, deve-se dar atenção a espécie *Actinopterychus senarius* que apesar de ter sido registrado em apenas duas amostras fixadas, nas amostras cultivadas esta espécie foi identificada em 5 oportunidades. Esta diferença pode estar relacionada aos estágios de esporos de resistência (Ishii *et al.*, 2009), que poderiam passar despercebidos ou desconsiderados como viáveis na análise de microscopia a que foram submetidas as amostras fixadas e que posteriormente em condições ótimas de cultivo voltam a se reproduzir e são facilmente observados.

Dos dez táxons que apresentaram maior frequência em sua viabilidade ao cultivo, todos são organismos autotróficos marinhos, com distribuição predominantemente nerítica e ocorrência em ambientes estuarinos. Não são consideradas tóxicas, uma vez que não possuem registros de produção de ficotoxinas, apesar de Bates & Strain (2006), considerarem algumas espécies do gênero *Chaetoceros* perigosos, devido a registros de mortalidade de peixes por meio da irritação de brânquias na costa oeste do Canadá. Se valendo do mesmo princípio o



gênero *Skeletonema* e a espécie *Asterionellopsis glacialis* também são consideradas perigosas (Zvyagintsev et al. 2010).

Da mesma forma, contrariando a afirmação acima, estudos indicam que as espécies *Skeletonema* spp. e *Asterionellopsis glacialis* também têm sido registradas como espécies benéficas e importantes troficamente do que como potencialmente nocivas (Romer & McLachlan, 1986; Vieira, 1985).

Mas devido a ocorrência já registrada destes táxons no ambiente adjacente a foz do rio Itajaí-açú, o maior risco fica sendo a inoculação pelo deslastre de águas de lastro de um grande número de células viáveis de algum destes táxons, que poderiam, dependendo de diversas condições favoráveis, levar a uma floração e seus consequentes riscos.

Tabela 3 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras cultivadas de água de lastro, sua frequência em número de amostras e sua frequência em porcentagem.

<b>Táxons</b>	<b>Frequência (n° amostras)</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Coscinodiscus</i> sp.	16	42,1
<i>Skeletonema</i> sp.	10	26,3
<i>Cylindrotheca closterium</i>	8	21,1
<i>Naviculaceae</i>	7	18,4
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	7	18,4
<i>Actinoptychus senarius</i>	5	13,2
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	5	13,2
<i>Chaetoceros</i> sp.	4	10,5
<i>Ditylum brightwellii</i>	4	10,5
<i>Thalassiosira rotula</i>	3	7,9

Já para o terceiro e último método (microscopia de epifluorescência), utilizado para testar a viabilidade de organismos fitoplantônicos nas 38 amostras de água de lastro estudadas, os táxons foram identificados e distribuídos entre os grupos Cyanobacteria (2 táxons), Dinophyta (4 táxons) e Heterokontophyta (24 táxons), totalizando 30 táxons, ou cerca de 32% do número de táxons identificados nas amostras fixadas.

Novamente a classe Bacillariophyceae, mostra-se a mais relevante e corresponde a 80% dos táxons identificados nesta metodologia. A tabela 4, apresenta os 10 táxons que foram identificados com maior frequência através da metodologia de microscopia de epifluorescência. Como nas metodologias anteriores *Coscinodiscus* spp. foi o que apresentou maior viabilidade celular, seguido por *Skeletonema* spp., *Thalassionema nitzschioides* e *Cylindrotheca closterium* (Tabela 4). Ficou evidente, desta forma, que os três métodos foram consistentes no sentido de evidenciar as espécies predominantes nas amostras analisadas.

Tabela 4 - Os 10 principais táxons identificados nas amostras analisadas com microscopia de epifluorescência, sua frequência em número de amostras e sua frequência em porcentagem.

<b>Táxons</b>	<b>Frequência (n° amostras)</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Coscinodiscus sp.</i>	19	50
<i>Skeletonema sp.</i>	14	36,8
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	9	23,6
<i>Cylindrotheca closterium</i>	6	15,8
<i>Dictyocha fibula</i>	5	10,5
<i>Thalassionema frauenfeldii</i>	4	13,2
<i>Pseudo-nitzschia</i>	3	7,9
<i>Odontella mobiliensis</i>	3	7,9
<i>Chaetoceros sp.</i>	3	7,9
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	3	7,9

Este padrão de predomínio de táxons da classe Bacillariophyceae nos três diferentes métodos propostos, além de dar consistência a este estudo, confirma observações anteriores (Ruiz *et al.* 1999, Klein 2010, Olenin *et al.* 2000, Morozova *et al.* 2011) e de maneira menos específica, Forbes & Hallegraeff (1998) que descreveram que a viabilidade de células deste filo é comum em águas de lastro de navios comerciais e que várias espécies podem sobreviver a longos períodos de pouca luz ou escuridão total (Lewis *et al.* 1999).

Ainda neste sentido, um estudo de Klein *et al.* (2010), demonstra que um inóculo da espécie *Nanofrustulum shiloi* (pertencente a classe Bacillariophyceae) mantida em cultivo por um período de seis semanas em total escuridão, sofreu um decréscimo de cerca de 80% em seu número de células viáveis, mas em compensação os demais 20% apresentaram fluorescência e nenhum sinal de formação de esporos. Já Forbes & Hallegraeff (2002), também obtiveram sucesso em cultivar mais de 31 espécies de diatomáceas, provenientes de amostras de água de lastro com 20 dias de retenção em tanques de lastro.

Logo, a ocorrência e predominância de diferentes gêneros de diatomáceas sugere que estes táxons podem utilizar diferentes vias para saciar seus requerimentos metabólicos, independentemente da luz. Sob total escuridão ou baixas concentrações de nutrientes, a heterotrofia/mixotrofia tem sido comumente reportada para alguns tipos de microalgas incluindo espécimes de diatomáceas, particularmente espécies bênticas (Bavestrello *et al.* 2000, Garcia *et al.* 2005, Radchenko *et al.* 2004). Bowler *et al.* (2008) acredita ainda na retenção ou na transferência horizontal de genes entre flagelados heterotróficos, bactérias e espécimes pertencentes a classe acima citada. Outros fatores que favoreceriam a sobrevivência destes organismos em condições de pouca luz ou total escuridão, seriam a produção de enzimas responsáveis para acúmulo de energia, a absorção de formas de carbono reduzidas e o uso de múltiplas formas de nitrogênio (Armbrust *et al.* 2004; Weber *et al.* 2009).

Um exemplo confirmado disto, seria a estratégia desenvolvida pela espécie *Phaeodactylum tricornutum* de assimilar carbono orgânico, diminuindo assim a demanda por luz (Garcia *et al.*, 2005). Logo em um ambiente onde existe abundância de carbono orgânico devido a morte celular e consequente decomposição, a sobrevivência por vias heterotróficas aparece como uma alternativa consistente (Klein *et al.* 2010).

Considerando todos os resultados acima citados e a complexidade dos mecanismos desenvolvidos pelos diferentes organismos no intuito de se desenvolver nas mais adversas situações, percebe-se que a variação entre os três métodos é observada principalmente na frequência de ocorrência dos táxons nas 38 amostras analisadas. Como nas análises que se utilizam de microscopia (óptica e de epifluorescência), observase apenas a integridade das membranas celulares, mas, apesar da aparente integridade das mesmas a célula pode não encontrar-se viável. Isto é corroborado quando compara-se as Tabelas 2 e 4 com a Tabela 3. Nesta comparação percebe-se que o cultivo das 38 amostras foi o que apresentou a menor frequência de ocorrência de táxons viáveis, em relação aos demais métodos.

De qualquer maneira a necessidade de uma resposta rápida não permite que utilize-se de um método que demande de 7 dias de incubação. Neste sentido os métodos de microscopia podem ser realizados de forma muito mais eficiente uma vez que é possível inclusive analisar as amostras diretamente das malhas das redes de filtração. Uma vez que considere-se os dois métodos de microscopia, deve-se escolher o método que apresente a maior segurança, no caso o método que apresentou maior frequência na identificação dos táxons. Este seria o método de microscopia óptica convencional.

#### **2.2.4 Registros no Brasil, Santa Catarina e características ecológicas dos táxons identificados**

Resgatando-se as características ecológicas dos 92 táxons identificados, o habitat predominante foi o pelágico (88%), sendo os bênticos correspondendo a apenas 12% do total identificado. Os táxons neríticos predominaram amplamente sobre os oceânicos. Foi identificado apenas um organismo de ambiente límnic (*Aulacoseira granulata*) sendo os demais de ambientes estuarinos e exclusivamente marinhos com 11% e 88% respectivamente (Tabela 5). O predomínio de organismos neríticos, a presença de organismos de ambientes estuarinos e de espécies de ambiente límnic, indica a proveniência das águas tomadas como

lastro em ambientes costeiros ou até mesmo casos onde ocorreu a troca oceânica mas esta foi incompleta.

Em estudos ainda não publicados nesta mesma área e com as mesmas amostras, mas agora com a identificação de organismos zooplanctônicos, ficou claro que nas amostras com declaração em seus respectivos formulários de origem oceânica ou que sofreram troca oceânica mais de 90% eram costeiras ou mistas (devido a composição dos táxons) e portanto, não confirmam as declarações dadas nos formulários sobre água de lastro.

Nenhuma das hipóteses anteriores atenderia a demanda da convenção da IMO da qual o Brasil é signatário e as obrigações listadas pela NORMAN 20 da Marinha do Brasil. Tudo isso torna questionáveis as informações repassadas através dos formulários cedidos pelos responsáveis dos navios. Estas situações são recorrentes internacionalmente e são corroboradas por estudo desenvolvido por Morozavo *et al.* (2011), que obtiveram o mesmo padrão para o porto de Vladivostok – Rússia.

Dando continuidade à análise dos registros de ocorrência dos táxons, fica evidente que entre os identificados nas 38 amostras analisadas, o único que não possui registro no Brasil e Santa Catarina (SC), foi a espécie *Chaetoceros castracanei*. Esta espécie de acordo com a UNESCO (2003), possui distribuição comum nas águas geladas da região antártica. De qualquer maneira esta espécie não apresentou-se viável quando cultivada em qualquer das 3 amostras em que foi identificada nas amostras fixadas (Tabela 5).

Ainda neste sentido foram identificados apenas 18 táxons que possuem registro de ocorrência no Brasil, mas não em SC. Este padrão pode ser explicado devido a maior parte das amostras ter como procedência a costa do Brasil ou regiões próximas a esta, o que propicia o registro de espécies já identificadas na área do estudo.

Entre os 18 táxons que não possuem registro em SC e mostraram-se viáveis ao cultivo encontram-se as espécies: *Aulacoseira granulata*, *Dactyliosolen phuketensis*, *Lithodesmium undulatum*, *Lioloma pacificum*, *Navicula distans*, *Pleurosigma acutum* e *Thalassiosira rotula*.

Deve-se dar atenção à espécie *Thalassiosira rotula*, pois esta é uma das 10 espécies que apresentaram maior frequência de viabilidade em cultivo (Tabela 5) e também a espécie *Aulacoseira granulata* que caracteriza-se por ser uma espécie límnic, estuarina, que sofreu o transporte em águas com salinidades superiores a 30, durante mais de 10 dias e mesmo assim encontrava-se viável ao cultivo. O mesmo gênero (*Aulacoseira*) em condições análogas também apresentou-se viável nas amostras de águas de lastro analisadas por Klein (2010).

Outras três espécies que possuem registro de ocorrência nas costas brasileiras e catarinenses, também chamam a atenção devido ao seu potencial em produzir toxinas. As espécies *Dinophysis acuminata* e *Pseudo-nitzschia delicatissima* e o gênero *Karenia* sp. São potencialmente responsáveis em produzir as toxinas diarreica, amnésica e paralisante respectivamente (UNESCO, 2011).

As espécies *Dinophysis acuminata* e *Pseudo-nitzschia delicatissima* possuem o agravante de terem registro de viáveis em cultivo, o que demonstra sem dúvidas o potencial de introdução de organismos que mesmo nativos possuem potencial em sintetizar toxinas e eventualmente assumir um papel de propágulo para um evento de floração de microalgas.

Tabela 5 - Espécies fitoplanctônicas identificadas, sua ocorrência, hábitos, potencial toxico e frequência em que foi registrada em relação as 38 amostras analisadas de acordo com o método empregado. \*Aut=Autotrófico, Epic=Epicontinental, Mar=Marinho, Het=Heterotrófico, Ner= Nerítico, Est=Estuarino, Oc=Oceânico, Bent=Bêntico, Ticop=Ticopelágico, Limn=Limnico, Temp=Temperado, Trop=Tropical, Term=Termófila, Cosm=Cosmopolita e Eurit=Euritérmica.

Táxons	Registros		Hábitos*	Potencial tóxico	Frequência Viabilidade		
	BR	SC			Cultivo	Identificada	Epifluorescência
<i>Charophyta</i>							
<i>Staurastrum</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Epic	Não	-	2	-
<i>Cyanobacteria</i>							
<i>Johannesbaptistia</i> G.De Toni	Sim	Não	Aut, Mar e Epic	Não	-	3	2
<i>Trichodesmium erythraeum</i> Ehrenberg	Sim	Sim	Aut , Mari	Não	1	1	-
<i>Dinophyta</i>							
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparède & Lachmann	Sim	Sim	Aut , Mar, Ner, Temp	<b>Sim</b>	1	3	-
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner e Oc, Trop	Não	1	5	-
<i>Gonyaulax</i> sp.	Sim	Sim	Aut , Marinha	Não	-	3	-
<i>Gyrodinium spirale</i> (Bergh) Kofoid & Swezy	Sim	Sim	Het, Marinha	Não	-	2	-
<i>Karenia</i> sp.	Sim	Sim	Het, Marinha	<b>Sim</b>	-	1	-
<i>Neoceratium</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Marinha	Não	-	6	-
<i>Neoceratium breve</i> (Ostenfeld & Schmidt) F.Gómez, D.Moreira & P.López-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc, Term	Não	2	8	3
<i>Neoceratium candelabrum</i> (Ehrenberg) F.Gómez, D.Moreira & P.López-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner e Oc, Term, Trop	Não	-	1	-
<i>Neoceratium karstenii</i> (Pavill.) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Não	Aut, Mar, Trop	Não	-	1	-
<i>Neoceratium furca</i> (Ehrenberg) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner e Oc, Trop	Não	1	6	1
<i>Neoceratium fusus</i> (Ehrenberg) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc, Cosm, Eurit	Não	1	5	-
<i>Neoceratium hircus</i> (Schröder) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	-	2	-
<i>Neoceratium horridum</i> (Gran) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner, Temp	Não	1	1	-
<i>Neoceratium trichoceros</i> (Ehrenberg) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc, Trop	Não	-	1	-
<i>Neoceratium tripos</i> (O.F.Müller) F.Gomez, D.Moreira & P.Lopez-Garcia	Sim	Sim	Aut, Ner e Oc, Trop a Temp	Não	-	2	-
<i>Prorocentrum</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar, Est	Não	2	3	2

<i>Prorocentrum compressum</i> (Bailey) Abé ex Dodge	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner e Oc	Não	-	1	-
Continuação da Tabela 5.							
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	1	1	-
<i>Prorocentrum obtusum</i> Ostenfeld	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Prorocentrum sigmoides</i> Böhm	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	-	3	-
<i>Protoperidinium</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	2	8	3
<i>Protoperidinium excentricum</i> (Paulsen) Balech	Sim	Sim	Het, Mar, Temp, Ner e Oc	Não	-	1	-
<i>Protoperidinium pentagonum</i> (Gran) Balech	Sim	Sim	Het, Mar, Ner e Oc	Não	-	2	-
<i>Oxytoxum crassum</i> J. Schiller	Sim	<b>Não</b>	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Torodinium teredo</i> (Pouchet) Kofoid & Swezy	Sim	<b>Não</b>	Aut, Mar	Não	-	2	-
<i>Heterokontophyta</i>							
<i>Actinoptychus senarius</i> Ehrenberg	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner, Bênt	Não	5	2	1
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (Castracane) Round	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	5	9	3
<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen	Sim	<b>Não</b>	Aut, Límn, Est	Não	1	2	-
<i>Bacteriastrum</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	1	1	-
<i>Bellerochea horologicalis</i> Stosch	Sim	<b>Não</b>	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Chaetoceros lorenzianus</i> Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	2	1	-
<i>Chaetoceros peruvianus</i> Brightwell	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner e Oc	Não	-	1	-
<i>Chaetoceros castracanei</i> Karsten	<b>Não</b>	<b>Não</b>	Aut, Mar	Não	-	3	-
<i>Chaetoceros compressus</i> Lauder	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner, Oc	Não	1	-	-
<i>Chaetoceros laevis</i> G.Leuduger-Fortmorel	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	-	2	-
<i>Chaetoceros</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	2	12	3
<i>Chaetoceros subtilis</i> var. <i>abnormis</i>	Sim	Sim	Aut, Mar, Est, Ner	Não	-	2	-
<i>Climacodium frauenfeldianum</i> Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	1	3	1
<i>Coscinodiscus</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	16	30	19
<i>Coscinodiscus wailesii</i> Gran & Angst	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	1	2	-
<i>Cyclotella</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar ou Epic	Não	2	1	-

<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C.Lewin	Sim	Sim	Aut, Mar, Est, Ner a Oc, Bênt	Não	8	14	6
Continuação da Tabela 5.							
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i> (Bergon) Hasle	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	1	2	-
<i>Dactyliosolen phuketensis</i> (B.G.Sundström) G.R.Hasle	Sim	Não	Aut, Mar	Não	2	2	-
<i>Dictyocha fibula</i> Ehrenberg	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	2	12	5
<i>Ditylum brightwellii</i> (T.West) Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	4	4	1
<i>Diploneis</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar ou Epic, Bênt	Não	-	2	-
<i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	Sim	Não	Aut, Mar, Est, Bênt	Não	-	1	-
<i>Eucampia cornuta</i> (Cleve) Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner a Oc	Não	-	1	-
<i>Eucampia zodiacus</i> Ehrenberg	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	-	2	-
<i>Fragilariopsis</i> sp.	Sim	Não	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Guinardia striata</i> (Stolterfoth) Hasle	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner a Oc	Não	-	1	-
<i>Haslea wawriake</i> (Husedt) Simonsen	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	1	1	-
<i>Hemiaulus sinensis</i> Greville	sim	Sim	Aut, Mar, Ner a Oc	Não	1	1	-
<i>Hemiaulus membranaceus</i> Cleve	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc	Não	-	4	1
<i>Hemiaulus hauckii</i> Grunow ex Van Heurck	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc	Não	-	4	2
<i>Hemidiscus cuneiformis</i> Wallich	Sim	Não	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Lauderia</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner a Oc	Não	-	1	-
<i>Leptocylindrus danicus</i> Cleve	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	-	4	-
<i>Leptocylindrus minimus</i> Gran	Sim	Não	Aut, Mar, Ner	Não	-	10	2
<i>Lithodesmium undulatum</i> Ehrenberg	Sim	Não	Aut, Mar, Ner	Não	1	1	-
<i>Melosira</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar ou Epic	Não	-	1	-
<i>Lioloma pacificum</i> (Cupp) Hasle	Sim	Não	Aut, Mar	Não	1	3	1
<i>Melosira moniliformis</i> (O.F.Müller) C.Agardh	Sim	Sim	Aut, Est, Mar, Ner, Bênt	Não	-	2	-
<i>Meuniera membranacea</i> (Cleve) P.C.Silva	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	1	1	-
<i>Navicula distans</i> (W.Smith) Ralfs	Sim	Não	Aut, Mar, Bênt	Não	1	-	-
<i>Noctiluca</i> sp.	Sim	Sim	Het, Mar	Não	1	3	1
<i>Nitzschia</i> sp.	Sim	Sim	Aut, Mar ou Epic	Não	2	2	



<i>Odontella mobiliensis</i> (Bailey) Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner a Oc	Não	3	6	3
Continuação da Tabela 5.							
<i>Odontella sinensis</i> (Greville) Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc	Não	2	6	2
<i>Paralia sulcata</i> (Ehrenberg) Cleve	Sim	Sim	Aut, Mar a Est, Bênt, Ner	Não	2	7	-
<i>Pleurosigma acutum</i> Norman ex Ralfs	Sim	<b>Não</b>	Aut, Mar	Não	-	1	-
<i>Pleurosigma normanii</i> Ralfs	Sim	Sim	Aut, Mar, Bênt, Ner	Não	1	-	-
<i>Pleurosigma</i> sp.	Sim	Sim	Mar ou Est, Bênt ou Ticop	Não	-	1	-
<i>Proboscia alata</i> (Brightwell) Sündstrom	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc a Ner	Não	-	1	-
<i>Pseudo-nitzschia</i> H. Peragallo in H. Peragallo & M. Peragallo	Sim	Sim	Aut, Mar, Bênt, Ner	Não	3	11	3
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (Cleve) Heiden	Sim	Sim	Aut, Mar	<b>Sim</b>	1	4	1
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (Cleve) H.Peragallo	Sim	Sim	Aut, Mar	Não	-	2	-
<i>Pseudosolenia calvar-avis</i> (Schultze) B.G.Sundström	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc	Não	-	1	-
<i>Rhizosolenia imbricata</i> Brightwell	Sim	Sim	Aut, Mar, Ner	Não	1	4	1
<i>Rhizosolenia pungens</i> Cleve-Euler	Sim	Sim	Aut, Mar ou Est, Ner	Não	-	2	-
<i>Rhizosolenia robusta</i> G.Norman ex Ralfs	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc	Não	-	1	-
<i>Rhizosolenia setigera</i> Brightwell	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc a Ner	Não	-	4	2
<i>Skeletonema</i> sp.	Sim	Sim	Mar a Est, Ner	Não	10	19	14
<i>Thalassionema frauenfeldii</i> Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc a Ner	Não	2	7	4
<i>Thalassionema nitzschioides</i> Grunow	Sim	Sim	Aut, Mar, Oc a Ner	Não	7	14	9
<i>Thalassiosira</i> sp.		Sim	Mar a Est, Ner	Não	2	4	2
<i>Thalassiosira rotula</i> Meunier	Sim	<b>Não</b>	Aut, Mar, Ner	Não	3	3	1
<i>Protozoa incertae sedis</i>							
<i>Hermesinum adriaticum</i> O.Zacharias	Sim	<b>Não</b>	Het, Mar	Não	-	1	-

### 3 CONCLUSÕES

- Uma vez que se faz necessário um método para confirmação da viabilidade dos táxons contidos nas águas de lastro, metodologias como citometria de fluxo, testes de permeabilidade de membranas e identificação molecular surgem como opções ao cultivo devido principalmente ao tempo necessário para tal (7 dias).

- Fica comprovada que apesar das condições adversas características ao ambiente dos tanques de lastro, existem organismos que podem sobreviver a estas condições e se mostrar viáveis após longos dias.

- Fica claro que a classe Bacillariophyceae, devido a maior frequência e ocorrência nas amostras analisadas, possui mecanismos fisiológicos que lhe dão vantagens frente aos demais táxons quanto a capacidade de sobreviver as condições adversas apresentadas nos tanques de lastro.

- Deve-se dar atenção aos navios provenientes dos portos a poucos dias de viagem com registro de ocorrência de espécies exóticas invasoras. São exemplos disto terminais portuários instalados no estuário do Rio da Prata, Lagoa dos Patos (Rio Grande do Sul) e Paranaguá (Paraná).

- Elevado tempo de retenção de água nos tanques de lastro e as trocas oceânicas mostraram-se eficientes como medidas de controle a potenciais espécies exóticas.

- Os dados de salinidade e os táxons identificados nas amostras analisadas mostram inconsistência com as declarações de troca oceânica fornecidas nos formulários entregues pelos responsáveis dos navios.

- Com o advento da NORMAM 20 a operação de troca oceânica tornou-se obrigatória aos navios que se utilizam de terminais portuários nacionais. Desta forma se faz necessária a conscientização dos responsáveis pelos navios e suas atividades sobre a correta e eficiente execução da NORMAN 20 uma vez que não estão sendo atendidas estas premissas.

- Uma vez que a administração portuária não tem responsabilidade sobre a gestão ou manutenção de programas sobre a água de lastro, a única parte cabível a administração portuária é o contínuo monitoramento para verificar se as normas, legislações ou programas vem sendo executadas a contento.

- Fica evidente o potencial de introdução de espécies exóticas inclusive invasoras nos diferentes ambientes, não só o marinho, encontrados ao largo do estuário do rio Itajaí-açú. Apesar da dinâmica gerada pela constante vazão do rio que poderia em consequência dificultar

a colonização deste ambiente, ambientes adjacentes ao canal com menor hidrodinâmica como o próprio Saco da Fazenda, poderiam sim propiciar as condições para o assentamento e posterior dispersão de espécies exóticas estuarinas ou até mesmo límnicas ao longo de toda a bacia.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ARMBRUST, E.V.; BERGES, J. A.; BOWLER, C. et al. **The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism.** *Science*, 306, 79–86, 2004.
- AGUSTÍ, S.; SANCHEZ, M.C. **Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a mem-brane permeability probe.** *Limnology and Oceanography*, 47, 818–828, 2002.
- AGUSTI, S.; ALOU, E.; HOYER, M. V.; FRAZER, T. K.; CANFIELD, D. E. **Cell death in lake phytoplankton communities.** *Freshwater Biology*. 51, 1496–1506, 2006.
- BARLOW, N.D.; KEAN, L.M. **Resource abundance and invasiveness: a simple model.** *Biol. Invasions.*, 6, 261-8, 2004.
- BARRY, S. C.; HAYES, K. R.; HEWITT, C. L.; BEHRENS, H. L.; DRAGSUND, E.; BAKKE, S. M. **Ballast water risk assessment: principles, processes, and methods.** *ICES Journal of Marine Science*, 65, 121–131, 2008.
- BATES, S. S.; STRAIN, P. M. **Nutrients and phytoplankton in Prince Edward Island in-lets during late summer to fall: 2001–2003.** Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, 2668 xii, 1–136, 2006.
- BAVESTRELLO, G.; ARILLO, A.; CALCINAI, B.; CATTANEOVIETTI, R.; CERRANO, C.; GAINO, E.; PENNA, A.; SARA, M. **Parasitic diatoms inside Antarctic sponges.** *Biol Bull*, 198, 29–3, 2000.
- BREEN, E.; METAXAS, A. **A comparison of predation rates by nonindigenous and in-digenous crabs (juvenile *Carcinusmaenas*, juvenile *Cancer irroratus*, and adult *Dyspa-nopeus sayi*) in laboratory and field experiments.** *Estuaries and Coasts*, 31, 728–737, 2008.
- BAX, N.; WILLIAMSON, A.; AGUERO, M.; GONZALEZ, E.; GEEVES, W. **Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity.** *Marine Policy*, 27: 313–323, 2003.
- BRANDINI, F.P.; LOPES, R.M.; GUTSEIT K.S.; SPACH H.L.; SASSI R. **Planctonolocia na Plataforma Continental do Brasil – Diagnose e Revisão Bibliográfica.** Fundação de Estudos do Mar (FEMAR), 1997.
- BRUGNOLI, E.; MUNIZ, P.; VENTURINI, N.; BURONE, L. **Environmental Perturbation and Coastal Benthic Biodiversity in Uruguay.** I. C. Willis. Ed. Progress in Environmental Research. Nova Publishers. p. 75-126, 2007.
- BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, J.; RIESTRA, G.; BOCCARDI, L.; BORTHAGARAY, A. **Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y gestión.** In: Menafrá R Rodríguez L Scarabino F & D Conde (Eds.). Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay. Montevideo. p. 351-362, 2006.
- BOWLER, C.; ALLEN, A. E.; BADGER, J. H. **The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes.** *Nature* 456:239–244, 2008.

- BURKHOLDER, J. M.; HALLEGRAEFF, G. M.; MELIA, G.; COHENH, A.; BOWERS, H. A.; OLDACH, D. W.; PARROW, M. W.; SULLIVAN, M. J.; ZIMBA, P. V.; ALLEN, E. H.; KINDER, C. A.; MALLIN, M. A. **Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U.S. military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices.** *Harmful Algae* 6, 486–518, 2007.
- CASTELEYN, G.; CHEPURNOV, V. A.; LELIAERT, F.; MANN, D. G.; BATES, S. S.; LUNDHOLM, N.; RHODES, L; SABBE, K; VYVERMAN, W. **Pseudo-nitzschia pungens (Bacillariophyceae): a cosmo-politan species?** *Harmful Algae*, 7:241–257, 2008.
- CARLTON, J.T. **Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: The biology of ballast water.** *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 23, 313–371, 1985.
- CARLTON, J.T. **Introduced Species into US Waters.** Carlton J.T. for Pew Oceans Commission, 2001.
- CARLTON, J.T.; GELLER, J.B. **Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms.** *Science*, 261, 78-82, 1993.
- CARLTON, J.T. **Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology.** *Biol. Conserv.*, 78, 97-106, 1996.
- CUNHA, K.J.O. **Variações espaciais e temporais da biomassa fitoplanctônica no trecho final dos Rios Piraquê-Açú e Piraquê- Mirim, Aracruz-ES.** Monografia do Curso de Graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; LI, X.; GONG, J. **Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. In: Methods in Cell Biology.** (Eds Z. Darzynkiewicz, J.P. Robinson & H.A. Crissman), Academic Press, New York, 15–38, 1994.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. **Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health.** *Science* 287, 443-449, 2000.
- DAVID, M.; GOLLASCH, S.; CABRINI, M.; PERKOVIC, M.; BOS`NJAK, D.; VIRGILIO, D. **Results from the first ballast water sampling study in the Mediterranean Sea – the Port of Koper study.** *Marine Pollution Bulletin* 54, 53–65, 2007.
- DAVID, M.; GOLLASCH, S. **EU shipping in the dawn of managing the ballast water issue.** *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1966–1972, 2008.
- DAVIDSON I.C.; SIMKANIN, C. **The biology of ballast water 25 years later.** *Biol Invasions*, 14, 9–3, 2012.
- EDWARDS, M.; JOHN, A. W. G.; JOHNS, D. G.; REID, P. C. **Case history and persistence of the non-indigenous diatom: Diatom *Coscinodiscus wailesii* in the north-east Atlantic.** *J Mar Biol Assoc, UK*, 81, 207–211, 2001.
- ELLIOTT, M. **Biological pollutants and biological pollution – an increasing cause for concern.** *Marine Pollution Bulletin*, n. 46, p. 275– 280, 2003.
- ENO, N. C. **Non-native marine species in British waters: effects and controls.** *Aquat Conserv*, 6, 215–228, 1996.

- ESKINAZI-LEÇA, E.; KOENING, M.L.; SILVA CUNHA, M.G.G. **O fitoplâncton: estrutura e produtividade.** In: BARROS, H.M., ESKINAZI-LEÇA, E., MACEDO, S.J. & LIMA, T. Gerenciamento participativo. Editora Universitária da UFPE, Recife, 2000, p.252.
- FINLAY, B. **Global dispersal of free-living microbial eukaryote species.** *Science*, 296, 1061–1063, 2002.
- FORBES, E., HALLEGRAEFF, G.M. **Transport of potentially toxic Pseudo-nitzschia diatom species via ballast water.** In: John J (ed) Proceedings of the 15th International Diatom Symposium. Gantner, Koenigstein, pp 509–520 1998.
- FORBES E.; HALLEGRAEFF, G.M. **Transport of potentially toxic Pseudo-nitzschia diatom species via ballast water.** 2002. GARCIA, M. C. C.; MIRON, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E.M.; CAMACHO, F. G. **Mixotrophic growth of the microalgae Phaeodactylum tricorutum: influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition.** *Process Biochem*, 40, 297–305, 2005.
- GALIL, B.; HULSMANN, N. **Protist transport via ballast water – biological classification of ballast tanks by food web interactions.** *Eur. J. Protistol.*, 33, 244-53, 1997.
- GENOVESI, P. **Eradications of invasive alien species in Europe: a review.** *Biol. Invasions.*, 7, 127-33, 2004.
- GOLLASCH, S.; LENZ, J.; DAMMER, M.; ANDRES, H.G. **Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea.** *Journal of Plankton Research*, V 22, 5, 923–937, 2000.
- GOLLASCH, S.; DAVID, M.; VOIGT, M.; DRAGSUND, E.; HEWITT, C.; FUKUYO, Y. **Critical review of the IMO International Convention on the Management of Ships' Ballast Water and Sediments.** In: Hallegraeff, G.M. (Ed.), *Harmful Algae*, 6, pp. 585–600, 2007.
- GUILLARD, R.R.L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA, 1975.
- HALLEGRAEFF, G.M.; BOLCH, C.J. **Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ship's ballast waters: implications for plankton biogeography and aquaculture.** *J. Plankton Res.* 8(14). 1067-1084, 1992.
- HALLEGRAEFF, G. M. **Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies.** *Marine Ecology Progress Series*. 168, 297-309, 1998.
- HAMER, J. P.; MCCOLLIN, T. A.; LUCAS, I. A. N. **Dinoflagellate cysts in ballast tank sediments: Between tank variability.** *Mar. Pollut. Bull.*, 40, 731-3, 2000.
- HAYES, K. R. **Ecological risk assessment for ballast water introductions: A suggested approach.** – *ICES Journal of Marine Science*, 55, 201–212, 1998.

- HILLIARD, R. W.; HUTCHINGS P.A.; RAAZMAKERS, S. **Ballast water risk assessment for twelve Queensland ports**. Stage 4: Review of candidate risk biota. EcoPorts Monograph Series, 13 (1997) a. Brisbane, Australia: Ports Corporation of Queensland. 60. +2 Appendices. IMO/MEPC. **Harmful aquatic organisms in ballast water**. Report of the Working Group on Ballast Water convened during MEPC 41. MEPC 42/8, IMO, 1998.
- IMO. **International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments**. International Maritime Organization, 36pp, 2004.
- IMO - **International Maritime Organization. Global Ballast Water Management Program**, 2007.
- ISHII, K.; ISHIKAWA, A.; IMAI, I. **Marine diatoms emerged from in situ surface sediment in a temperate embayment**. Phycologia. **48**(4, suppl.): 48, 2009.
- JEONG, H.J.; YOO, Y.D.; KIM, J.S.; SEONG, K.A.; KANG, N.S.; KIM, T.H. **Growth, Feeding and Ecological Roles of the Mixotrophic and Heterotrophic Dinoflagellates in Marine Planktonic Food Webs**. *Ocean Science Journal*, **45**(2):65-91, 2010.
- JOKELA, A.; RICCIARDI, A. **Predicting zebra mussel fouling on native mussels from physicochemical variables**. *Freshwater Biology*, **53**, 1845–1856, 2008.
- KACZMARSKA, I.; LOVEJOY, C.; POTVIN, M.; MACGILLIVARY, M. **Morphological and molecular characteristics of selected species of Minidiscus (Bacillariophyta, Thalassiosira- ceae)**. *Eur J Phycol.*, **44**(4), 2009.
- KIPP, R.; BAILEY, S. A.; MACISAAC, H. J.; RICCIARDI, A. **Transoceanic ships as vectors for nonindigenous freshwater bryozoans Diversity and Distributions**. *Diversity Distrib.*, **16**, 77–83, 2010.
- KLEIN, G.; KACZMARSKA, I.; EHRMAN, J. M. **The diatom Chaetoceros in ships' ballast waters – survivorship of stowaways**. *Acta Bot. Croat.*, **68** (2), 325–338, 2009.
- KLEIN, G.; MACINTOSH, K.; KACZMARSKA, I.; EHRMAN, J. M. **Diatom survivorship in ballast water during trans-Pacific crossings**. *Biol. Invasions*, **12**, 1031–1044, 2010.
- KOOISTRA, W. H. C. F.; SARNO, D.; BALZANO, S.; BALZANO, S.; GU, H.; ANDERSEN, R. A.; ZINGONE, A. **Global diversity and biogeography of Skeletonema species (Bacillariophyta)**. *Protist*, **159**, 177–193, 2008.
- LLABRÉS, M. & AGUSTÍ, S. **Extending the cell digestion assay to quantify dead phytoplankton cells in cold and polar waters** *Limnol. Oceanogr.: Methods* **6**, 659–666, 2008.
- LEBARON, P.; CATALA, P. & PARTHUISOT, N. Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (7): 2697-2700. 1998.
- LEWIS, J.; HARRIS, A.; JONES, K.; EDMONDS, R.E. **Long-term survival of marine planktonic diatoms and dinoflagellates in stored sediment samples**. *J. Plankton Res.* **21**, 343–354, 1999.

- MARTINS, M.T.; PESSOA, G.V.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; BRAYTON, P.R.; COLWELL, R.R. **Detection of *Vibrio cholera* O1 in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy.** World J. Microbiol. Biotechnol., 9, 390-2, 1993.
- MARTINS, M.T.; PESSOA, G.V.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; COIMBRÃO, C.A.; MONTEIRO, C.K.; MARQUES, E. **Occurrence of *V. cholera* O1 non-toxicogenic in wastewaters from São Paulo, Brazil.** Wat. Sci. Tech., 24, 363-6, 1991.
- MCCARTHY, H.P.; CROWDER, L.B. **An overlooked scale of global transport: phytoplankton species richness in ships' ballast water.** Biol Invasions, 2, 321–322, 2000.
- MACISAAC, E.A. & STOCKNER, J.G. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In: P.F. KEMP, B.F. SHERR, E.B. SHERR, J.J. COLE (eds.), **Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology**, Lewis Publishers, Boca Raton. pp. 187- 197, 1993.
- MEDLIN, L.K. **If everything is everywhere, do they share a common gene pool?** Gene, 406, 180–83, 2007.
- MELO MAGALHÃES, E.M.; GUEDES, E.A.C.; CAVALCANTI, M.O.; LIRA, M.C.A. **Composição fitoplanctônica do sistema estuarino lagunar de Jequiá, AL.** Bol.Estud.Ciênc.Mar.,n.9p.1- 18,1996.
- ET AL, 1996. MÉNDEZ, S. M. El impacto de las floraciones algales nocivas: origen, dispersión, monitoreo, control y mitigación. IN: Menafrá, R.; Rodríguez-Gallego, L; Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.) Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo. pp. 57-70, 2006.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente do Brasil. **Informe sobre espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil.** Projeto Biodiversidade 33, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Água de lastro.** Brasília: Projetos GGPAF, 2002.
- MOROZOVA, T. V.; SELINA, M. S.; STONIK, I. V.; SHEVCHENKO, O. G.; ZVYAGINTSEV, A. Y. **Phytoplankton in Ships' Ballast Waters in the Port of Vladivostok.** Russian J. of Biol. Invasions, 2, 29-34, 2011.
- MUNIZ, P; CLEMENTE, J.; BRUGNOLI, E. **Benthic invasive pests in Uruguay: a new problem or an old one recently perceived?** Marine Pollution Bulletin, 50: 1014-1018, 2005.
- OLENIN, S.; GOLLASCH, S.; JONUSAS, S.; RIMKUTE, I. **EnRoute Investigations of Plakton in Ballast Water on a Ship's Voyage from the Baltic Sea to the Open Atlantic Coast of Europe.** Internat. Rev. Hydrobiol., 85, 577-596, 2000.
- OMACHI, C. Y.; TAMANAHA, M. S.; PROENÇA, L. A. O. **Bloom of *Alexandrium fraterculus* in coastal waters off Itajaí, SC, southern Brazil.** Brazilian Journal of Oceanography, v 55, 1, 57-61, 2007.
- PAM, E. D.; LI, K. X.; WALL, A.; YANG, Z.; WANG, J. **A subjective approach for ballast water risk estimation.** Ocean Engineering 61, 66-76, 2013.



- PROENÇA, L.A.O.; FERNANDES, L.F. **Introdução de microalgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores.** In: SILVA, J.S.V.; SOUZA, R.C.C.L (Org.). *Água de lastro e bioinvasão.* Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2004. p. 77-97.
- RADCHENKO, I. G.; IL'YASH, L. V.; FEDOROV, V. D. **Effect of exogenous glucose on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira weissflogii* depending on nitrate nitrogen supply and illumination.** Biol Bull 31(1):77–85, 2004.
- RESGALLA, C. Jr; COUTINHO DE SOUZA, V. G.; RÖRIG, L. R.; SCHETTINI, C. A. F.; **Spatial and temporal variation of the zooplankton community in the area of influence of the Itajaí-Açu River, SC (Brazil).** Brazilian Journal of Oceanography, 56, 3, 211-24, 2008.
- RODRIGUE, J. P.; COMTOIS, C.; SLACK, B. **The geography of transport systems.** London, UK: Routledge, 2006. RODRÍGUEZ, M. **Distribución y dinámica poblacional de la Almeja asiática (*Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidae) en ríos de las zonas Centro-Sur y Este de Uruguay.** Tesis de Maestría en Biología. Opción Ecología. PEDECIBA. 60 p, 2007.
- RÖRIG, L. R.; RESGALLA JR., C.; SCHETTINI, C. A. F. **Estrutura da assembléia planctônica através do estuário e da pluma do rio Itajaí-açu.** Rer. Estud. ambient., Blumenau. v. 5, n.1, p. 76-94, 2003.
- RUIZ, G.M.; FOFONOFF, P.; HINES, A.H.; GROSHOLZ, E.D. **Nonindigenous species as stressors in estuarine and marine communities: assessing invasion impacts and interactions.** Limnol. Oceanogr. 44, 950–972, 1999.
- RUIZ, G.M.; MILLER, A.W.; LION, K.; STEVES, B.; ARNWINE, A.; COLLINETTI, E.; WELLS, E. **Status and trends of ballast water management in the United States. First biennial report of the National Ballast Information Clearinghouse: submitted to United States Coast Guard, 2001.** Available from [http://invasions.si.edu/NBIC/nbic\\_news.htm](http://invasions.si.edu/NBIC/nbic_news.htm)
- SASSI, R. **Phytoplankton and environmental factors in the Paraíba do Norte River estuary, northeastern Brazil: composition, distribution and quantitative remarks.** Bolm. Inst. Oceanografia, 39 (2), 93-115, 1991.
- SCHETTINI, C. A. F.; KUROSHIMA, K. N.; PEREIRA FILHO, J.; RÖRIG, L. R.; RESGALLA JR., C. **Oceanographic and ecological aspects of the Itajaí-açu river plume during a high discharge period.** An. Acad. Bras. Ciênc, v. 70, n. 2. p. 335-351, 1998.
- SCHETTINI, C. A. F. **Caracterização física do Estuário do Rio Itajaí-açu, SC.** Rev. Bras. Recursos Hídricos, v. 7, p. 123-142, 2002.
- SCHETTINI, C. A. F.; RESGALLA JR., C.; PEREIRA FILHO, J.; SILVA, M. A. C.; TRUCCOLO, E. C.; RÖRIG, L. R. **Variabilidade temporal das características oceanográficas e ecológicas da região de influência fluvial do rio Itajaí-açu.** Braz. J. Aquat. Sci. Technol., v. 9, n. 2, p. 93-102, 2005.
- SCHULZE, K.; LÓPEZ, D.A.; TILLICH, U.M. & FROHME, M. **A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and ImageJ.** BMC Biotechnology, 11:118, 2011.

- STOWE, K. **Exploring Ocean Science**. 2<sup>o</sup> Edição, John Wiley & Sons, 1995.
- TAKAHASHI, C.K.; LOURENÇO, N. G. G. S.; LOPES, T. F.; RALL, V. L. M.; LOPES, C. A. M. **Ballast Water: A review of the impact on the world public health**. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.14, n.3, p.393-408, 2008.
- VELDHUIS, M.J.W.; KRAAY, G.W. & TIMMERMANS, K.R. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. *Eur. J. Phycol.*, 36: 167-177, 2001.
- WERSCHKUN, B.; SOMMER, Y.; BANERJI, S. **Desinfection byproducts in ballast water treatment: An evaluation of regulatory data**. *Water Research*. 46, 4884-4901, 2012.
- WILLIAMS, R. J.; GRIFFITHS, F. B.; VAN DER WAL, E. J.; KELLY, J. **Cargo vessel ballast water as a vector for the transport of nonindigenous marine species**. *Estuarine Coast. Shelf Sci.*, 26, 409-10, 1988.
- WEBER, T.; GRUBER, A.; KROTH, P. G. **The presence and localization of thioredoxins in diatoms, unicellular algae of secondary endosymbiotic origin**. *Mol Plant*, 2, 468-477, 2009.
- ZVYAGINTSEV A. Y.; SELIFONOVA, J. P. **Hydrobiological Studies of the Ballast Waters of Cargo Ships in Russian Sea Ports**. *Oceanology*, Vol. 50, No. 6, pp. 924-932, 2010.