

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

DALILA JUNQUEIRA BORGES

**EFEITO DE EPIBIONTES PARA O SUCESSO REPRODUTIVO EM
CARANGUEJOS ESTUARINOS**

SÃO VICENTE – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

**EFEITO DE EPIBIONTES PARA O SUCESSO REPRODUTIVO EM
CARANGUEJOS ESTUARINOS**

Discente: Dalila Junqueira Borges

Orientador: Dr. Murilo Zanetti Marochi

Co-orientadora: Dr^a. Tânia Marcia Costa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista (CLP), como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Gerenciamento Costeiro

São Vicente – SP

2022

B732e Borges, Dalila Junqueira
Efeito de epibiontes para o sucesso reprodutivo em caranguejos
estuarinos / Dalila Junqueira Borges. -- São Vicente, 2022
33 f.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências, São Vicente

Orientador: Murilo Zanetti Marochi

Coorientadora: Tânia Marcia Costa

1. Ecologia dos manguezais. 2. Caranguejos. 3. Embriologia. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

**EFEITO DE EPIBIONTES PARA O SUCESSO REPRODUTIVO EM
CARANGUEJOS ESTUARINOS**

**EFFECT OF EPIBIONTES ON REPRODUCTIVE SUCCESS IN ESTUARINE
CRABS**

Dalila Junqueira BORGES¹, Tânia Marcia COSTA², Murilo Zanetti MAROCHI³

¹ Discente de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista, São Vicente. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Praça Infante Dom Henrique, São Vicente, 11330-900, SP, Brasil; ² Docente na Universidade Estadual Paulista, São Vicente. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Praça Infante Dom Henrique, São Vicente, 11330-900, SP, Brasil e ³ Pós-Doutorado na Universidade Estadual Paulista, São Vicente, Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Praça Infante Dom Henrique, São Vicente, 11330-900, SP, Brasil

Autor de correspondência:

Dalila Junqueira Borges

E-mail: dalila.borges@unesp.br

O manuscrito foi formatado segundo a revista: Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom

Resumo

A presença de epibiontes, como ciliados e bactérias, associada a massa de ovos de braquiúros tem uma grande relevância na viabilidade dos embriões. Contudo, o papel destes epibiontes e/ou o tipo de interação entre estes e os embriões ainda é pouco conhecido para organismos estuarinos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da presença do ciliado Vorticellidae no desenvolvimento embrionário do caranguejo *Leptuca thayeri* na presença ou ausência de bactérias naturalmente encontrada nos embriões. Para isso, foram utilizadas como variáveis respostas, o volume dos ovos, o tempo para eclosão, a taxa de eclosão de larvas zoea I e a viabilidade de larvas zoea I após 24h da eclosão. Para avaliar o efeito da presença de ciliados Vorticellidae e bactérias ao longo do desenvolvimento embrionário *L. thayeri* nós utilizamos quatro tratamentos experimentais: embriões sem epibiontes ciliados Vorticellidae e sem bactérias (A), embriões com epibiontes ciliados Vorticellidae e com bactérias (C), embriões com epibiontes ciliados Vorticellidae e sem bactérias (CA), e embriões sem epibiontes ciliados Vorticellidae e com bactérias (Controle). A presença dos epibiontes ciliados Vorticellidae e/ou das bactérias não afetou o crescimento volumétrico dos embriões ou a sobrevivência larval após 24 horas de eclosão das larvas zoea de *L. thayeri*, contudo o tempo para eclosão apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo maior no tratamento A e o curto no tratamento C. Em relação à taxa de eclosão das larvas zoea I, o tratamento Controle apresentou a maior taxa de eclosão enquanto o tratamento CA a menor taxa. Nossos resultados indicam que a presença dos ciliados epibiontes na massa de ovos interfere negativamente no desenvolvimento embrionário de *L. thayeri* e as bactérias epibiontes têm efeito positivo para o basibionte.

Palavras-chaves: Bactéria, Caranguejo chama-maré, Desenvolvimento Embrionário, Epibiose

Abstract

The presence of epibionts, for example ciliates and bacteria, associated with brachyuran egg mass has great relevance in embryo viability. However, the role of these epibionts and/or the type of interaction between them and the embryos is still poorly understood for estuarine organisms. This work aimed to evaluate the effect of the presence of the ciliate Vorticellidae on the embryonic development of the crab *Leptuca thayeri* in the presence or absence of the bacterial community naturally found in the embryos. We used as response variable, the growth rate of hatching eggs, the hatching success and viability of zoea I larvae after 24h. To evaluate the effect of the presence of Vorticellidae ciliates and bacteria during the development of the tidal crab *Leptuca thayeri* we used four experimental treatments: embryos without Vorticellidae ciliated epibionts and without bacteria (A), ciliated epibionts embryos with bacteria (C), embryos with Vorticellidae ciliated epibionts and without bacteria (CA), and embryos without Vorticellidae ciliated epibionts and with bacteria (Control). The presence of ciliated Vorticellidae epibionts and/or bacteria did not affect the volumetric growth of the embryos or the larval survival after 24 hours of hatching of the zoea larvae of *L. thayeri*, however the time for hatching showed significant differences between the treatments, being longer in the treatment A and the short one in treatment C. Regarding the hatching rate of zoea I larvae, the Control treatment had the highest hatching rate while the CA treatment had the lowest rate. Our results indicate that the presence of ciliated epibionts in the egg mass negatively interferes with the embryonic development of *L. thayeri* and eggs with the presence of bacteria in their surface showed higher hatching success.

Keywords: Bacteria, Tidal Crab, Embryonic Development, Epibiosis

INTRODUÇÃO

A reprodução é o principal mecanismo que contribui para a continuidade das espécies, auxiliando na manutenção e regulação populacional (Costa, 2006). A energia despendida pelas fêmeas para esse mecanismo é dada pela razão entre o tamanho dos ovos e o número de ovos (rendimento reprodutivo) (Hines, 1992; Sampedro, *et al.*, 1997). Os Decápodes apresentam alto investimento reprodutivo, de modo que em algumas espécies a massa de ovos corresponde a cerca 11% do peso seco da fêmea (Hartnoll, 2006). Sua câmara abdominal atua como uma região de incubação para os embriões em desenvolvimento até o momento da eclosão larval (Farmer, 1974). Entretanto, o constante contato entre os ovos e o ambiente no qual a fêmea está inserida expõe os embriões a fatores abióticos como amplitude da maré, variação de salinidade, temperatura e pH (Gunderson *et al.*, 2016); e fatores bióticos, como predadores, parasitas e epibiontes (Aiken *et al.* 1985; Benetti, 2007). Essa exposição a condições estressoras pode afetar o sucesso reprodutivo e consequentemente o tamanho e manutenção de populações (Silva, *et al.*, 2007).

Epibiose refere-se à relação entre dois seres na qual ocorre a fixação de um organismo (epibionte) em outro organismo (basibionte) (Silva-Inácio, *et al.*, 2016). O termo engloba apenas à interação orgânica, sem qualificar o grau da associação como positiva ou negativa entre o basibionte e o epibionte (Wahl, 2008; Costa, *et al.*, 2010). A superfície corpórea de organismos marinhos está associada a trocas de macro e micromoléculas com o meio. Nesse processo, gases e pequenas partículas são liberadas ativa ou passivamente através da superfície do corpo em organismos adultos ou das membranas dos ovos durante a embriogênese (Harder, 2008; Wahl, 2008). A presença de epibiontes em embriões podem interferir nas trocas de moléculas pela superfície dos ovos (Simoni *et al.*, 2011).

Em muitos crustáceos, as fêmeas transportam os embriões até a eclosão larval, estando os ovos sujeitos a patógenos, agentes bio-incrustadores e simbioses prejudiciais (Nyholm, 2020). Embora comum, o impacto da presença concomitante de epibiontes no ovo hospedeiro (durante o desenvolvimento embrionário) é escasso na literatura. O efeito benéfico de epibiontes pode estar relacionado a mecanismos que reduzam a predação, evitem o contato de parasitas ou estabelecimento de patógenos, aumentando assim o rendimento reprodutivo do basibionte (Prescott, 1990; Dougherty & Russell, 2005; Wahl, 2008). A formação de biofilme bacteriano pode ser prejudicial para o embrião. Os ciliados Vorticellidae, encontrados comumente aderidos aos embriões de crustáceos, se alimentam de bactérias (Song, *et al.*, 2016), que podem ser prejudiciais ao desenvolvimento do embrião. Por outro lado, epibiontes também podem ter efeitos negativos para o embrião, como dificultar as trocas gasosas e/ou excretas devido ao contato com a superfície dos ovos, assim como morte do embrião devido à intensidade da infestação (Kuris *et al.*, 1991). A formação de biofilme epibiótico (agregado de microrganismos organizados que vivem sobre uma superfície viva embebidos em uma matriz polimérica extracelular), também pode ter efeitos negativos ao basibionte ao inibir o desenvolvimento embrionário (Fisher, 1976).

Tendo em vista que: 1) o sucesso reprodutivo é um fator essencial para a manutenção de populações e da continuidade de espécies; 2) que o efeito associado de grupos de epibiontes durante o desenvolvimento embrionário ainda é desconhecido para a maioria das espécies estuarinas/marinhas (Silva *et al.*, 2007; Chatterjee, 2015); 3) a presença de epibiontes, já foi confirmada em embriões do caranguejo chama-maré *Leptuca thayeri*, através da identificação de dez estirpes de bactérias, além de copépodes (Harpacticoida) e ciliados (Vorticellidae) (Silva, 2007; Borges *et al.*, 2021); 4) que a ocorrência destas bactérias pode estar relacionada com alterações na viabilidade dos embriões (Silva, 2003); 5)

epibiontes ciliados se alimentam de bactérias, a nossa hipótese é: a presença de epibiontes ciliados na massa de ovos das fêmeas de braquiúros pode prevenir a infestação por bactérias epibiontes, as quais podem ser prejudiciais durante o desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da presença do ciliado Vorticellidae no desenvolvimento embrionário do caranguejo *Leptuca thayeri* (Rathbun, 1900) na presença ou ausência de bactérias naturalmente encontrada nos embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos modelo

Dentre as espécies de caranguejo chama-maré que ocorrem no Brasil, *L. thayeri* destaca-se pela fácil identificação e elevada abundância na costa sudeste do Brasil (Gusmão-Junior *et al.*, 2012; Thurman *et al.*, 2013). A espécie habita o interior de manguezais em áreas com baixa exposição solar e solo com alto teor de matéria orgânica (Costa & Negreiros-Fransozo, 2002; Gusmão-Junior *et al.*, 2012), com distribuição predominante em zonas do infralitoral (De Grande *et al.*, 2018). O período reprodutivo ocorre durante todo o ano, contudo nos meses de verão são encontradas fêmeas ovígeras em maior quantidade (De Almeida, 2014). Assim, a abundância de *L. thayeri* em ambientes estuarinos e a fácil identificação das fêmeas ovígeras viabilizaram a escolha desta espécie como organismo modelo para o estudo (Costa & Negreiros-Fransozo 2002; Gusmão-Junior *et al.*, 2012).

Área de Estudo

As coletas foram realizadas no Parque Municipal Ézio Dall' Aqua, (23° 59' 14.1" S; 46°24' 20.8" W – Praia Grande/SP), no sistema estuarino do Mar Pequeno (Santos – São Vicente). Esse manguezal apresenta vegetação caracterizada pela presença de *Rhizophora*

mangle, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa* (Machado *et al.*, 2013). A localidade apresenta uma comunidade de braquiúros bem estabelecida, entre estas populações está *L. thayeri* (Checon & Costa, 2017; De Grande *et al.*, 2018). Fêmeas ovígeras de *L. thayeri* com presença de epibiontes nos embriões já foram confirmadas para a área do Parque Municipal Ézio Dal'Água (Pardo, 2018).

Manutenção dos organismos e Design experimental

Manutenção dos organismos

Durante a maré baixa de sizígia, 10 fêmeas ovígeras de *L. thayeri* foram coletadas manualmente. Somente fêmeas com ovos em estágio inicial de desenvolvimento (blástula) (Yamaguchi, 2001) foram utilizadas, reduzindo o efeito de variáveis que não temos como quantificar, como, por exemplo, a exposição física e biológica do manguezal sob o desenvolvimento embrionário. Após a coleta, as fêmeas ovígeras foram aclimatadas individualmente em béquer (600 ml) contendo água marinha artificial (composta por água destilada mais sal marinho artificial Hiker Ocean) com salinidade 33, aeração constante e com fotoperíodo de 12 horas claro /12 horas escuro por 24 horas. As temperaturas do ar e da água foram mantidas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A salinidade e temperatura para aclimação foram estabelecidas com base em valores médios para tocas de fêmeas da referida espécie (Pardo, 2018). Todas as fêmeas ovígeras foram devolvidas ao local de coleta após a realização dos experimentos.

Delineamento experimental

Para avaliar o efeito da presença de ciliados Vorticellidae e bactérias ao longo do desenvolvimento embrionário do caranguejo chama-maré *Leptuca thayeri* nós utilizamos quatro tratamentos experimentais: embriões sem epibiontes ciliados Vorticellidae e sem

bactérias (A), embriões com epibiontes ciliados Vorticellidae e com bactérias (C), embriões com epibiontes ciliados Vorticellidae e sem bactérias (CA), e embriões sem epibiontes ciliados Vorticellidae e com bactérias (Controle) (Figura 1). Nós consideramos a situação de embriões sem epibiontes ciliados Vorticellidae e com bactérias como tratamento controle por representar uma condição natural da massa de ovos (observação pessoal). Foram utilizadas como variáveis respostas, volume dos ovos (entre o estágio inicial e final de desenvolvimento embrionário), tempo para eclosão larval, taxa de eclosão de larvas zoea I e a viabilidade de larvas zoea I após 24h da eclosão. Foram classificados seis níveis de presença de Vorticellidae nas amostras: 1 (0%), 2 (0-25%), 3 (25-50%), 4 (50-75%), 5 (75%-100%) e 6 (100%) (adaptado de Silva, 2007). Apenas fêmeas com embriões com nível de presença de Vorticellidae categorizadas nos níveis 3-4 foram utilizados nas análises dos tratamentos C e CA.



Figura 1. Epibiontes ciliados Vorticellidae, em destaque pela seta, associados a embriões de *Leptuca thayeri*.

Para comprovar que a massa de ovos oriundas de campo já continham originalmente uma carga bacteriana, todos os embriões foram extraídos do corpo de duas fêmeas e mantidas em água salinidade 33 autoclavada (composta por água destilada Asfer e adição de sal marinho artificial Hiker Ocean) com aeração durante 30 minutos a fim de promover a liberação de parte da microbiota no meio aquoso. Em seguida, amostras da massa de ovos e da água utilizada na aeração foram diluídas serialmente nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e plaqueadas em meio nutritivo Infusão Cérebro-Coração (Flores & Welch, 1992). Todas as placas de Petri apresentaram crescimento bacteriano, sobretudo as placas 10^{-1} , com concentração semelhante à do ambiente. Assim, pode-se assumir a premissa da presença de bactérias na massa ovígera de *L. thayeri* provenientes do local de coleta.

Com o objetivo de eliminar as bactérias dos tratamentos A e CA, cada réplica destes tratamentos, foram mantidas em placas de cultivo celular (Kasvi, K12-012) contendo 2 ml de Ampicilina na concentração de 0,5 g/L e 2 ml de Tetraciclina na concentração de 0,025g/L em água salinidade 33 autoclavada (composta por água destilada Asfer e adição de sal marinho artificial Hiker Ocean), adaptado de Sison-Mangus (2015). Ambos os antibióticos atuam em bactérias gram positivas e gram negativas, ampliando o efeito bactericida (Melo, 2012; Anvisa, 2021). Os tratamentos A e CA ficaram em contato com os antibióticos durante 24 horas e mantidos em câmara de germinação (Tecnal, TE 4020) com temperatura constante (25°C) e fotoperíodo controlado de 12h:12h (claro/escuro). Após as 24 horas, as réplicas dos tratamentos A e CA foram retiradas do antibiótico e submersas em água salinidade 33 autoclavada (composta por água destilada Asfer e adição mais sal marinho artificial Hiker Ocean) com leve agitação com o objetivo de eliminar possíveis resíduos dos antibióticos. Essa imersão foi repetida 3 vezes em cada réplica para garantir a retirada de antibiótico da

superfície dos embriões. Em seguida, todas as réplicas dos tratamentos A e CA foram mantidas nas mesmas condições experimentais dos demais tratamentos, que serão descritos a seguir.

Para avaliar a taxa de crescimento volumétrico dos embriões, o tempo para eclosão, a taxa de eclosão e viabilidade larval, foram utilizadas 48 réplicas por tratamento (cada réplica foi constituída por em média $13 \pm 3,50$ embriões em estágio inicial de desenvolvimento) de um pool de massas de ovos proveniente de quatro fêmeas para o tratamento Controle e A e outro pool de massas de ovos proveniente de outras quatro fêmeas distintas para o tratamento C e CA. Foram utilizadas distintas fêmeas ovígeras coletadas na mesma área, pois os tratamentos C e CA apresentam epibiontes ciliados na massa de ovos, enquanto os tratamentos Controle e A não apresentam esses epibiontes. Por serem coletadas na mesma área, não são esperadas grandes variações na qualidade dos embriões devido a fatores ambientais semelhantes durante a formação dos ovos, antes da postura dos mesmos. As amostras provenientes das fêmeas foram escolhidas aleatoriamente para reduzir variáveis de origem materna, como fitness e cuidado materno que podem interferir no sucesso reprodutivo. Na análise das variáveis respostas (crescimento volumétrico, tempo de eclosão, taxa de eclosão e viabilidade larval), os embriões de todos os tratamentos foram mantidos em placas de cultivo celular (Kasvi, K12-012) com 12 poços, cada poço contendo 5 ml de água com salinidade 33 autoclavada (composta por água destilada Asfer e adição de sal marinho artificial Hiker Ocean) com aeração realizada manualmente durante 2 minutos a cada 24 horas. Essas placas foram mantidas em câmara de germinação (Tecnal, TE 4020) com temperatura constante (25°C), fotoperíodo controlado de 12h:12h (claro/escuro) com aeração diária até a eclosão das larvas. A cada 24 horas o desenvolvimento e viabilidade dos embriões foram analisados, utilizando estereomicroscópio em capela de fluxo laminar para evitar

contaminação das amostras (Figura 2). A inviabilidade do embrião foi dada pela ausência no avanço do desenvolvimento.

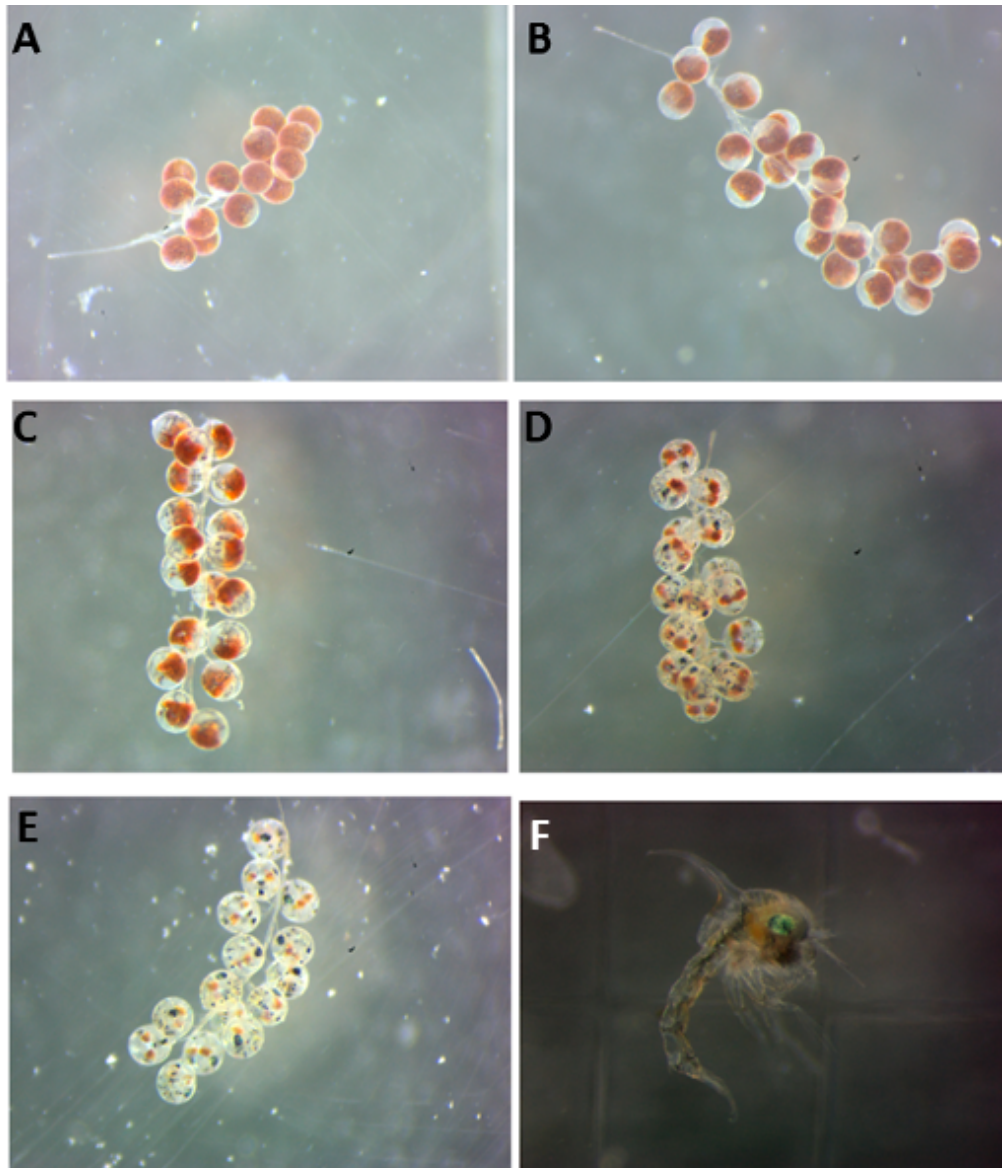


Figura 2. Estágios de desenvolvimento de embriões de *Leptuca thayeri*, adaptado de Simoni *et al.* (2011). Estágio I: Blástula, 100% de vitelo (A). Estágio II: Gástrula, o vitelo começa a ser consumido (B). Estágio III: primeira aparição de cromatóforos e manchas oculares (C). Estágio IV: olhos bem desenvolvidos (D). Estágio V: Pré eclosão - embrião bem desenvolvido, vitelo quase completamente consumido (E). Larva: larvas recém-eclodidas (F).

Para avaliar se a presença de epibiontes afeta o desenvolvimento embrionário, o volume de 144 embriões por tratamento (A, C, CA e Controle) foi mensurado utilizando a fórmula de esferóides oblatos: $V=1/6(\pi.d^2.D)$, onde d=menor diâmetro, D=maior diâmetro (Simoni *et al.*, 2011). O volume foi calculado utilizando fotos obtidas em estereomicroscópio (ZEISS Stereo Discovery.V8) e as mensurações obtidas com o software TPSDig2 em dois momentos: embriões em blástula no 1º dia de experimento (Figura 2A), e embriões em estágio avançado do desenvolvimento embrionário (vitelo quase totalmente consumido), no 12º dia de experimento (Figura 2E).

Para avaliar o tempo para eclosão o desenvolvimento embrionário de blástula até a eclosão foram comprados entre os tratamentos (N = 48 réplicas por tratamento). Para avaliar a taxa de eclosão larval (Controle = 619 embriões, A = 684 embriões, C = 639 embriões, CA = 624 embriões), o número de larvas vivas, mortas e embriões não eclodidos (inviáveis) foi contabilizado e comparado entre os quatro tratamentos. Para verificar a viabilidade larval, todas as larvas zoea I eclodidas (Controle = 67 larvas, A = 61 larvas, C = 35 larvas, CA = 26 larvas) foram individualizadas em placa de cultivo celular, mantidas por 24 horas em câmara de germinação com temperatura constante (25°C), fotoperíodo controlado de 12h:12h (claro/escuro) e alimentadas com microalgas *Tetraselmis gracilis* (Butcher, 1959). A viabilidade larval após as 24 horas foi confirmada pelo batimento caudal e atividade natatória larval (Anger, 1981). A produção das microalgas foi feita baseada no protocolo de Guillard's F/2 (Duerr *et al.*, 1998).

Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homocedasticidade (teste de Bartlett). Modelos Lineares Generalizados (GLM) foram

utilizados para avaliar se epibiontes bacterianos alteram o volume dos embriões, o tempo para eclosão, a taxa de eclosão e viabilidade larval sob presença dos ciliados Vorticellidae. Foi utilizado como variável preditora os tratamentos (A, C, CA e controle) em relação a variável resposta de interesse (volume dos embriões ou tempo para eclosão ou taxa de eclosão ou número de larvas vivas após um dia). Os modelos foram ajustados de acordo com a distribuição dos dados de cada variável (volume e tempo para eclosão utilizamos a família Guassiana, para a taxa de eclosão usamos a família Quasipoisson, e para a viabilidade larval utilizamos a binomial negativo). O critério de significância foi dado quando $p < 0,05$. Foram utilizados Teste de Tukey para analisar a significância a posteriori quando houve significância entre os tratamentos. As análises foram realizadas no ambiente R (R Development Core Team, 2021).

RESULTADOS

O crescimento volumétrico dos embriões não foi afetado pelos tratamentos ($p = 0,39$; $R^2 = 0,01$). O tempo de eclosão apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos analisados ($p < 0,05$; $R^2 = 0,31$) de modo que o tratamento A apresentou o maior tempo até a eclosão larval, seguido do tratamento Controle, tratamento CA e tratamento C. Os tratamentos C e CA apresentaram cerca de 2 dias a menos para a eclosão quando comparados aos tratamentos A e Controle. A taxa de eclosão de larvas zoea I também apresentou diferença significativa entre os tratamentos analisados ($p < 0,001$; $R^2 = 0,08$), sendo maior no tratamento Controle, seguido do tratamento A, tratamento C e tratamento CA, de modo que o tratamento Controle apresentou valores cerca de duas vezes maior que os tratamentos C e CA. Já a viabilidade larval após 24 horas de eclosão ($p = 0,48$; $R^2 = 0,04$) de *L.*

thayeri não foi afetada pela presença de ciliados Vorticellidae e/ou bactérias epibiontes (Figura 3.).

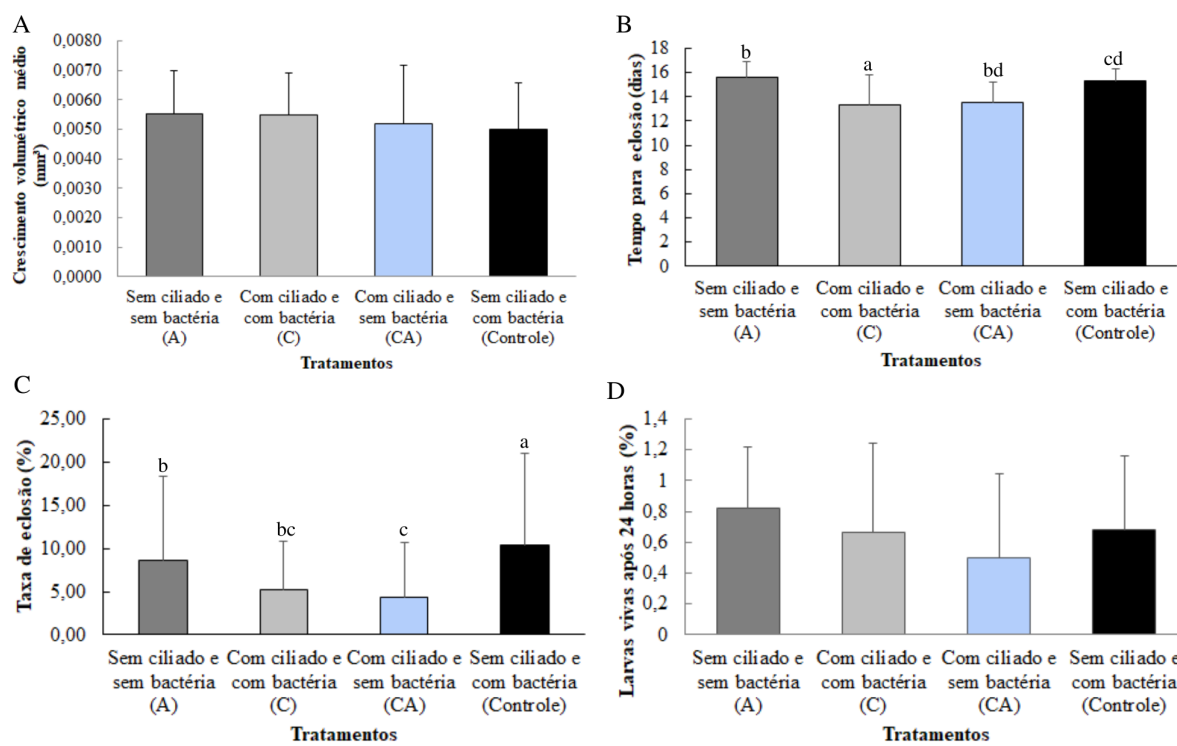


Figura 3. Média do crescimento volumétrico dos ovos (A), tempo médio para eclosão larval (B), taxa de eclosão larval (C) e taxa da viabilidade larval após 24 horas da eclosão (D) em embriões de *L. thayeri* nos diferentes tratamentos. Barras indicam o desvio padrão ($\pm$) e letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

A presença dos epibiontes ciliados Vorticellidae e/ou das bactérias não afetou o crescimento volumétrico dos embriões ou a sobrevivência larval após 24 horas de eclosão das larvas zoea I de *L. thayeri*. Por outro lado, a taxa de eclosão larval revela que os tratamentos com menor sucesso de nascimentos (C e CA) apresentaram embriões com a presença dos

ciliados Vorticellidae, indicando que essa epibiose pode interferir negativamente. Além disso, a taxa de eclosão das larvas zoea sugere que a presença de bactérias, sem ciliados Vorticellidae pode aumentar o sucesso de eclosão (A). A análise do tempo para eclosão larval demonstra que a presença concomitante de ciliados Vorticellidae e bactérias está associado ao desenvolvimento embrionário com menor duração (tratamento C), ao passo que a ausência desses epibiontes reflete no desenvolvimento embrionário com maior duração (tratamento A). Observa-se que a presença apenas de epibiontes ciliados Vorticellidae (tratamento CA) está relacionada com o desenvolvimento embrionário mais curto quando comparado ao tratamento apenas com a presença de epibiontes bacterianos (tratamento Controle), ou seja, a presença de ciliados Vorticellidae pode reduzir a duração do desenvolvimento embrionário. Portanto, nossa hipótese de que a presença do epibionte ciliado previne a proliferação e os possíveis efeitos negativos de epibiontes bacterianos ao desenvolvimento embrionário de *L. thayeri*, foi refutada.

A eliminação de excretas metabólicas, como amônia e CO₂, e absorção de oxigênio ocorre pela superfície dos ovos (Simoni *et al.*, 2011). Quando os epibiontes ciliados formam colônias no basibionte, a relação de epibiose pode passar a ser considerada amensalismo, podendo obstruir o fluxo de nutrientes e troca de gases do basibionte (Nanajkar, *et al.*, 2019). O suprimento de oxigênio para os ovos também pode ser afetado pela presença de microrganismos na membrana de ovos, reduzindo a área de trocas gasosas e também por utilizarem o oxigênio disponível no meio para a respiração (Cohen, 1996). A menor disponibilidade de oxigênio é apontada como principal causa do tempo de eclosão mais curto em embriões de gastrópodes aquáticos (Przeslawski, 2004; Eyster, 1986). Nossos resultados indicam que não houve diferença significativa no crescimento volumétrico entre os tratamentos com e sem a presença do ciliado. Por não ocorrer o aumento do volume interno

quando comparado a situações sem a presença do ciliado, os resultados indicam indiretamente que a eliminação de gases proveniente do metabolismo dos embriões não foi prejudicada. Além disso, a duração do desenvolvimento embrionário, bem como a taxa de eclosão larval foram menores nos tratamentos com a presença do epibionte ciliado (C e CA). Essa menor taxa de nascimentos de larvas pode ser uma consequência da presença dos ciliados na superfície dos ovos, reduzindo a disponibilidade de oxigênio durante a embriogênese e inviabilizando o desenvolvimento. Estudos que testem essa possível relação negativa avaliando a taxa de consumo de oxigênio pelos epibiontes ciliados são necessários para confirmar essa hipótese. Nossos resultados indicam que apesar do tempo e taxa de eclosão serem menores nos tratamentos com a presença do ciliado, ela não ocasionou uma redução significativa na viabilidade larval após 24 horas da eclosão de *L. thayeri*. Esse padrão também foi observado no copépode marinho *Boeckella triarticulata* (Thomson, 1883), com a presença de epibiontes ciliados não afetando a diferença no número de ovos por ciclo reprodutivo e sobrevivência da fêmea a longo prazo (Xu & Burns, 1991).

Os ciliados são organismos heterotróficos que se alimentam de bactérias (bacterivoria), sendo um grupo chave na ciclagem de nutrientes (Lee, 2004; Bickel, 2012). Esperava-se que nos tratamentos sem a presença dos ciliados (Controle e A), ocorresse uma proliferação de epibiontes bacterianos de modo a prejudicar o desenvolvimento embrionário de *L. thayeri*. Contudo, nossos resultados não confirmaram essa hipótese. A ausência de ciliados que se alimentam de bactérias não proporcionou o crescimento da comunidade de epibiontes bacterianos de modo a inviabilizar o desenvolvimento dos embriões. A epibiose entre bactérias naturalmente encontradas no ambiente associadas aos ovos de crustáceos do gênero *Daphnia* foi descrita como fortemente dependente para o desenvolvimento e reprodução do basibionte (Mushegian *et al.*, 2018). Os embriões dos tratamentos

experimentais A e CA, que tiveram a carga bacteriana reduzida pelo antibiótico, não tornaram-se inviáveis pela ausência das bactérias, demonstrando que a presença de tais bactérias não são obrigatórias, e nem prejudiciais, para o sucesso reprodutivo.

Alguns simbioses podem desempenhar funções defensivas para os ovos de alguns animais, sobretudo daqueles que estão expostos a ambientes com abundância de microorganismos (Wahl, 1989), como regiões estuarinas. Dentre esses simbioses, ocorrem epibioses com funções defensivas. Alguns estudos relataram a capacidade da microbiota bacteriana e seus metabólitos em proteger os ovos de crustáceos, sobretudo de infecções fúngicas (Cawthorn, 2011; Barry, et al., 1996). Infecções fúngicas podem comprometer toda a massa de ovos de caranguejos de manguezais (Leano, 2002). No presente estudo a presença de bactérias naturalmente encontradas nos ovos e sem a presença do ciliado (tratamento Controle) foi o que apresentou maior taxa de eclosão. Esses resultados podem ser um indicativo de que as bactérias possuem um papel benéfico durante o desenvolvimento embrionário evitando infecções fúngicas (que tem potencial de inviabilizar o desenvolvimento embrionário), porém essa hipótese precisa ser testada em experimentos futuros. A maneira como as bactérias ambientais beneficiam o basibionte não é compreendida na literatura (Nyholm, 2020). As bactérias associadas a ovos de camarão e lagosta produzem compostos antifúngicos, isatina e tirosol, respectivamente (Gil-Turnes, 1992; Gil-Turnes, 1989) que podem ser associados com o aumento no sucesso reprodutivo dos tratamentos com bactérias. Os metabólitos secundários originados de bactérias epibioses apresentam atividade antimicrobiana em ovos de invertebrados terrestres (Flóres, *et al.*, 2015; Engl, *et al.*, 2018). Poucos estudos foram realizados para investigar essa relação em organismos aquáticos,

contudo, ainda que pouco explicada, a atividade antimicrobiana incrustante por bactérias já foi documentada em ovos de moluscos marinhos (Kerwin, *et al.* 2019).

Nossos resultados indicam menor taxa de eclosão e tempo de desenvolvimento embrionário reduzido em tratamentos com a presença dos epibiontes ciliados Vorticellidae. Todavia, a redução dessas taxas não reflete uma menor sobrevivência larval de *L. thayeri*. A presença de epibiontes ciliados Vorticellidae afeta negativamente o desenvolvimento embrionário do caranguejo estuarino *L. thayeri*. Compreender se as bactérias naturalmente presentes nos ovos desempenham um papel remediador no desenvolvimento de fungos, bem como o efeito para o basibionte pela presença de outros epibiontes comumente encontrados em embriões são relevantes para a melhor compreensão dessas interações ecológicas e seus impactos para o sucesso reprodutivo de invertebrados estuarinos.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (LABECOM) da Universidade Estadual Paulista - Campus do Litoral Paulista pelo apoio logístico, nas atividades de campo e laboratório, assim como nas valiosas discussões teóricas.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi financiado pela FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo através de bolsas concedida à DJ Borges (#2020/06860-5); à MZ Marochi (#2017/07406-3), à TM Costa (#2015/50300-6) e à CCP Hardoim (#2016/17189-7).

REFERÊNCIAS

Aiken DE, Waddy SL and Uhazy LS (1985) Aspects of the biology of *Pseudocarcinonemertes homari* and its association with the *American lobster*,

Homarus americanus. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**(2), 351-356.

Andréasson J, Bergström S, Carlsson B, Graham P and Lindström G (2004) Hydrological change: climate change impact simulations for Sweden. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, **33**, 228–234.

Anger K and Dawirs RR (1981) Influence of starvation on the larval development of *Hysirius araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgoländer Meeresunters*, **34**, 287–311.

Anvisa Antimicrobianos Base teórica e uso clínico. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/tetraciclinas.htm Acessado 28 de maio de 2021.

Barry KJ and Wainwright NR (1996) Surface-dwelling bacteria on the eggs of *Crangon septemspinosa* restrict infection by the fungus *Lagenidium myophilum* in vitro. *The Biological Bulletin*, **191**, 317-318.

Bickel SL, Tang KW and Grossart HP (2012) Ciliate epibionts associated with crustacean zooplankton in German lakes: distribution, motility, and bacterivory. *Frontiers in Microbiology* **3**, 243.

Benetti AS, Negreiros-Fransozo ML and Costa TM (2007) Population and reproductive biology of the crab *Uca burgersi* (Crustacea: Ocypodidae) in three subtropical mangrove forests. *Revista de Biología Tropical* **55**(1), 55-70.

Borges DJ, Costa TM, Hardoim CCP and Marochi MZ (2021) Epibiontes afetam o desenvolvimento embrionário de caranguejos estuarinos? *Trabalho de Conclusão de*

Curso em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus do Litoral Paulista, (1), 1-33.

Cawthorn RJ (2011) Diseases of *American lobsters (Homarus americanus)*: a review. *Journal. Invertebrate Pathology*, **106**, 71-78.

Chatterjee S (2015) Reproductive biology and bioturbatory activities of two sympatric species of fiddler crabs *Uca lactea annulipes* and *Uca triangularis bengali* (Decapoda: Ocypodidae) at the east midnapore coastal belt of west Bengal, India. *Journal of Biology and Life Science*, **5(2)**, 106-126.

Checon HH and Costa TM (2017) Fiddler crab (Crustacea: Ocypodidae) distribution and the relationship between habitat occupancy and mouth appendages. *Marine Biology Research* **14**: 1-12.

Cohen S and Strathmann R (1996). Embryos at the edge of tolerance: effects of environment and structure of egg masses on supply of oxygen to embryo. *The Biological Bulletin*, **190**, 8–15.

Costa TM and Negreiros-Fransozo ML (2002) Population biology of *Uca thayeri* Rathbun, 1900 (Brachyura, Ocypodidae) in a subtropical south American mangrove area: results from transect and catch-per-unit-effort techniques. *Crustaceana*, **75(10)**, 1201–1218.

Costa TM, Silva SMJ and Negreiros-Fransozo ML (2006) Reproductive pattern comparison of *Uca thayeri* Rathbun, 1900 and *U. uruguayensis* Nobili, 1901 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49(1)**, 117-123.

- Costa TM, Christofolletti RA and Pinheiro MAA** (2010) Epibionts on *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) from Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, **27**, 387-394.
- De Almeida Farias, Castiglioni DS and Garcia JE** (2014) Population structure of the fiddler crab *Uca thayeri* Rathbun, 1900 (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) in a tropical mangrove. *Thalassas*, **30(1)**, 21-37.
- De Grande FR, Granado P, Sanches FHC and Costa TM** (2018) Organic matter affects fiddler crab distribution? Results from field and laboratorial trials. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **212**, 138-145.
- Dougherty JR and Russell MP** (2005) The association between the coquina clam *Donax fossor* say and its epibiotic hydroid *Lovenella gracilis* Clarke. *Journal of Shellfish Research*, **24**, 35–46.
- Duerr E, Molnar A and Sato V** (1998) Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology*, **6**, 65–70.
- Engl T, Kroiss J, Kai M, Nechitaylo TY, Svatoš A and Kaltenpoth M** (2018) Evolutionary stability of antibiotic protection in a defensive symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115 (9)**, 2020-2029.
- Eyster, L** (1986) The embryonic capsules of nudibranch molluscs: literature review and new studies on albumen and capsule wall ultrastructure. *American Malacological Bulletin*, **4**, 205–216.
- Farmer, ASD** (1974) Reproduction in *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae). *Journal of Zoology*, **174(2)**, 161–183.

- Fisher, WS** (1976) Relationships of epibiotic fouling and mortalities of eggs of the *Dungeness crab* (*Cancer magister*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* **33(12)**, 2849-2853.
- Flores M and D Welch** (1992) Mycology: culture media. *H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook - American Society for Microbiology, Washington, D.C.* **6 (1)**, 671-673.
- Flóres LV, Biedermann PHW, Engl T and Kaltenpoth M** (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*, **32**, 904–936.
- Gil-Turnes MS, Fenical W** (1992) Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biology Bulletin*, **182**, 105–108.
- Gil-Turnes MS, Hay ME, Fenical W** (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science*, **246**, 116–118.
- Gunderson, AR, Armstrong, EJ and Stillman JH** (2016) Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annual Review of Marine Science*, **8(1)**, 357-378.
- Gusmão-Junior JBL, Machado GBO, Costa TM** (2012) Burrows with chimneys of fiddler crab *Uca thayeri*: construction, occurrence and function. *Zoological Studie*, **51**, 598-605.
- Harder T** (2008) Marine epibiosis: concepts, ecological consequences and host defence. *Marine and industrial biofouling*, 219-231.

- Hartnoll RG** (2006) Reproductive investment in Brachyura. *Hydrobiologia*, **557(1)**, 31-40.
- Hines AH** (1992) Constraint of reproductive output in brachyuran crabs: pinnotherids test the rule. *American Zoologist*, **32**, 503-511.
- Kerwin AH, et al.** (2019) Shielding the next generation: symbiotic bacteria from a reproductive organ protect bobtail squid eggs from fungal fouling. *MBio*, **10(5)** 02376-19.
- Kuris AM, Blau SF, Paul AJ, Shields JD and Wickham, DE** (1991) Infestation by brood symbionts and their impact on egg mortality in the red king crab, *Paralithodes camtschatica*, in Alaska: geographic and temporal variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **48**, 559–568.
- Leano EM** (2002) *Haliphthoros* spp. from spawned eggs of captive mud crab, *Scylla serrata*, broodstocks. *Fungal Diversity*, **9**, 93-103.
- Lee S, Basu S, Tyler CW and Wei IW** (2004) Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Advances in Environmental Research*, **8(3-4)**, 371-378.
- Machado GBO, Gusmão-Junior JB and Costa TM** (2013) Burrow morphology of *Uca uruguayensis* and *Uca leptodactylus* (Decapoda: Ocypodidae) from a subtropical mangrove forest in the western Atlantic. *Integrative Zoology*, **8(3)**, 307-314.
- Melo VV, Duarte IP and Soares AQ** (2012) Guia Antimicrobianos. *Coordenação de Farmácia Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG)*, 1-57.

- Mushegian AA, Walser JC, Sullam KE and Ebert D** (2018). The microbiota of diapause: how host–microbe associations are formed after dormancy in an aquatic crustacean. *Journal of Animal Ecology*, **87**(2), 400-413.
- Nanajkar M, Fernandes V, Bogati K and Chatterjee T** (2019) Gregarious true-colonies of ciliate *Vorticella oceanica* on a chain forming diatom *Chaetoceros coarctatus*: indicating change in the nature of association. *Symbiosis*, **79**(3), 221-229.
- Nyholm SV** (2020) In the beginning: egg–microbe interactions and consequences for animal hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **375** (1808), 1-8.
- Pardo JCF** (2018) Espécies-chave estuarinas em um mundo em mudanças: como as fases iniciais da vida dos caranguejos violinistas responderão ao aquecimento e acidificação oceânica costeira? *Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu*, 1-72.
- Prescott RC** (1990) Sources of predatory mortality in the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck) – interactions with seagrass and epibiotic coverage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **144**, 63–83.
- Przeslawski R** (2004) A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Molluscan research*, **24**(1), 43-63.
- R version 4.0.5** (2021) -- "Shake and Throw" Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

- Sampedro MP, Fernández L, Freire J and Gonzéles-Guirriarán E** (1997) Fecundity and reproductive output of *Pisidia longicornis* (Decapoda, Anomura) in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Crustaceana* 95-110.
- Silva-Inácio LMD, Machado GBDO, Fortuna MDA, Sanches FHC and Costa TM** (2016). Infestation by the epibiont *Octolasmis lowei* in a portunid crab assemblage from a subtropical coast. *Nauplius*, **24**, 1-8.
- Silva P, Luppi TA and Spivak EDL** (2003) Limb autotomy, epibiosis on embryos, and brooding care in the crab *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Varunidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83**, 1015–1022
- Silva P, Luppi TA and Spivak EDL** (2007) Epibiosis on eggs and brooding care in the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae): comparison between mudflats and salt marshes. *Journal of the marine biological Association of the United Kingdom*, **87**, 893-901.
- Simoni R, Cannicci S, Anger K, Portner HO and Giomi F** (2011) Do amphibious crabs have amphibious eggs? A case study of *Armases miersii*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **409**, 107-113.
- Sison-Mangus M, Mushegian A and Ebert D** (2015) Water fleas require microbiota for survival, growth and reproduction. *The ISME Journal*, **9**, 59–67.
- Song Q, Qiu L, Zhang S, Wang J and Xie K** (2016) Research Status and Prospect Of Micro-polluted Water Pretreatment With Biological Aerated Filter. *4th International Conference on Sustainable Energy and Environmental Engineering*, **1**, 508-511.

- Thurman CL, Faria SC and McNamara JC** (2013) The distribution of fiddler crabs (*Uca*) along the coast of Brazil: implications for biogeography of the western Atlantic Ocean. *Marine Biodiversity Records*, **6**, 1-21.
- Wahl M** (1989) Marine epibiosis I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* **58**, 175-189.
- Wahl M** (2008) Ecological lever and interface ecology: epibiosis modulates the interactions between host and environment. *Biofouling*, **24(6)**, 427–438.
- Xu Z and Burns CW** (1991). Effects of the epizoic ciliate, *Epistylis daphniae*, on growth, reproduction and mortality of *Boeckella triarticulata* (Thomson) (Copepoda: Calanoida). *Hydrobiologia*, **209(3)**, 183–189.
- Yamaguchi T** (2001) Incubation of eggs and embryonic development of the fiddler crab, *Uca lactea* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana*, **74**, 449-458.

JOURNAL OF THE MARINE BIOLOGICAL ASSOCIATION OF THE UNITED KINGDOM

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Revised September 2018

Please read and follow these instructions
carefully

Manuscripts submitted to the *JMBA* must be original, not under consideration elsewhere and approved by all authors and institutions prior to submission. Papers should be written in clear succinct English and sentences must not start with an abbreviation. Acronyms must be written in full on their first occurrence and SI units should be used. Scientific names must be italicized (not underlined) and their first mention after the Abstract must be followed by the Authority and date in parenthesis when appropriate. Manuscripts should be arranged in the following order: Running Head, Title, Author(s), Address(es), Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure Legends, Tables and Appendices.

Manuscripts which do not comply with publication standards of written English will be rejected on submission. Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

<http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors&pageId=3608>

Please note that the journal uses software to screen papers where there is reason to believe that material may not be original. By submitting your paper you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer review and production processes.

Letters to the Editor. Letters are invited that discuss or comment on papers published in the Journal. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Letters should be concise, normally less than one printed page, have no more than 10 references and should not contain figures or tables. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue.

Submission. Please submit the manuscript for review to:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jmba>

Suggested reviewers. Please suggest the names, institutions and e-mail addresses of up to four potential reviewers. Suggested reviewers should be selected from an INTERNATIONAL (at least three different countries) and not a LOCAL (from author(s) own country or laboratory) group of scientists in the research field of the paper.

Experimental design. All studies must have been conducted in accordance with institutional, national and international guidelines concerning the use of animals in research and/or the sampling of endangered species.

Preparation. The *JMBA* invites contributions as:

1. Research articles + figures + tables.
2. Reviews of current topics of interest.

E-mail. Please provide an e-mail address for the corresponding author. This will appear on the title page of each article.

Title (bold font). Should be no more than 20 words with no authorities associated with the species. A running head of not more than 43 characters should be suggested.

Authors addresses should follow the title. Use superscript numbers to indicate different addresses.

Abstracts: A concise abstract should outline the scope, main results and conclusion(s) of the paper without discussion or authorities associated with species. Species name(s) will be roman (normal).

Keywords. Please provide up to ten key words.

Headings. Follow the style and hierarchy for each section as shown below (but see later for taxonomy):

INTRODUCTION (1st heading, upper case, left justified).

MATERIALS AND METHODS (1st heading, upper case, left justified).

RESULTS (1st heading, upper case, left justified) then:

The sampled population (2nd heading, bold, left justified)
DENSITY AND BIOMASS (3rd heading, small caps, left justified)
Reproduction and development (4th heading, lower case italics, left justified)

DISCUSSION (1st heading, upper case, left justified).
Subheadings, if used, should follow the instructions under RESULTS.

ACKNOWLEDGMENTS (1st heading, upper case, left justified).
You may acknowledge individuals or organizations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

FINANCIAL SUPPORT. Please provide details of the sources of financial support of all authors, including grant numbers. For example, 'This work was supported by the Medical Research Council (grant number XXXXXXXX)'. Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency, the different agencies should be separated by a semi-colon, with 'and' before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, 'This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, yyyy), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)'. Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: 'This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors'.

Taxonomy should be presented as follows:

SYSTEMATICS (1st heading, upper case, centre justified)
Order AMPHIPODA Latreille, 1816
Suborder GAMMARIDEA Latreille, 1803
Family UROTHOIDEAE Bousfield, 1978
Genus *Carangolia* Barnard, 1961
Carangolia barnardi sp. nov.
(Figures 1–6)

Carangolia spp.: Elizalde *et al.*, 1993; Sorbe & Weber, 1995; Dauvin & Sorbe, 1995. (left justified)

Citation of literature. References in the text should refer to the author's name (no initials) and year of publication. Two authors should be cited using '&' (Rainbow & Dellinger, 1993); for more than two authors, the name of the first author followed by '*et al.*' (Lallier *et al.*, 1987). Where an article is published but yet to be allocated to an Issue, the citation should take the form (Relles *et al.*, published online 24 August 2018). Online resources should be cited following the convention (Continuous Plankton Recorder Survey, accessed online 23 September 2018). When citing more than one publication use date order and a semi-colon as a separator, e.g. (Mykels & Skinner, 1985a, b; Skinner, 1996; Gorind *et al.*, 1997).

All literature quoted in the text must be listed in alphabetical and chronological order of author names at the end of each manuscript. When more than one publication with the same first author is cited the following order alphabetically applies: (a) single author, according to publication dates; (b) same author and one co-author; (c) same author and more than one co-author.

The manuscript should be carefully checked to ensure the details of authors and dates cited in the text exactly match those in the reference list. Cross checking of references in the text to the cited literature and vice versa is the responsibility of the author.

The style follows the full name according to the 'World List of Scientific Periodicals' latest edition, London. Titles of journals must be written in **FULL** (not abbreviated) and references to books should include the place of publication and the publisher.

Dashes. Hyphen between connecting words; en-dash between ranges e.g. 3–10, B–G, and between opposite words e.g. male– female pairs, size– frequency, etc.

REFERENCES (1st heading, upper case, left justified)

Journals; article allocated to an Issue:

Marshall SM, Nicholls AG and Orr AP (1939) On the growth and feeding of young herring in the Clyde. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **23**, 427–455.

Journals; article published online ahead of Issue allocation:

Relles NJ, Patterson MR and Jones DOB. Change detection in a Marine Protected Area (MPA) over three decades on Bonaire, Dutch Caribbean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Published online: 24 August 2018.

Books:

Cushing DH (1981) *Fisheries biology, a study in population dynamics*. 2nd edition. Madison: University of Wisconsin Press.

Chapters from books:

Weir BS (1990) Intraspecific differentiation. In Hillis D.M. and Moritz C. (eds) *Molecular systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, pp. 373–410.

Symposium proceedings:

Cinelli F, Fresi E, Mazzella L, Pansini M, Pronzato R and Svoboda A (1977) Distribution of benthic phyto- and zoocoenoses along a light gradient in a superficial marine cave. In Keegan B.F., Ceidigh P.O. and Boaden P.J.S. (eds) *Proceedings of the Eleventh European Symposium on Marine Biology, University College, Galway, 5–11 October 1976. Biology of benthic organisms*. Oxford: Pergamon Press, pp.173–183.

Book series:

El Haj AJ, Whiteley NM and Harrison P (1992) Molecular regulation of muscle growth over the crustacean moult cycle. In El Haj A.J. (ed.) *Molecular biology of muscle*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 151–165. [SEB Seminar Series, no. 46.]

Occasional Publications :

Moore PG (1984) The fauna of the Clyde Sea area. Crustacea: Amphipoda. *University Marine Biological Station Millport, Occasional Publications*, no. 2, 84 pp.

Reports:

Gaard E (1987) An investigation of the squid *Loligo forbesi* Steenstrup on Faroe Bank. *International Council for the Exploration of the Sea (CM Papers and Reports)*, CM 1987/K:18, 9 pp.

Baird Jr FT (1953) Observations on the early life history of the giant scallop (*Pecten magellanicus*). *Research Bulletin. Department of Sea and Shore Fisheries, Maine*, no. 14, 7 pp.

Theses:

Leighton DL (1968) *A comparative study of food selection and nutrition in the abalone, Haliotis rufescens Swainson, and the purple sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus Stimpson*. PhD thesis. University of California, San Diego, USA.

Online resources:

Continuous Plankton Recorder Survey. Phytoplankton Colour Index – Annual Mean, 2014. Geospatial Representation of CPR Data (North

Atlantic). <https://www.cprsurvey.org/data/map-data/> Accessed online 23 September 2018.

Processing. Manuscripts will be assessed by an expert Associate Editor and their nominated referees. A decision will be made by the Associate Editor based on the referees' reports and their opinions. Authors will be advised of the decision by e-mail from the ScholarOne system via <http://mc.manuscriptcentral.com/jmba>. If papers are sent back to the authors, for revision and for checking editorial corrections, they must be returned within three weeks. The acceptance date will appear on the first page of the published manuscript.

Revised manuscripts and figures must be uploaded to:

<http://mc.manuscriptcentral.com/jmba>

Proofs. The corresponding author will receive the proofs by e-mail as PDF files. Authors should send proof corrections by e-mail to the administrator.

Offprints. The contributing author will be provided with a PDF file of their article on publication. Extra printed offprints must be ordered before publication using the form provided with the proof.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**APRESENTAÇÃO REMOTA****Discente:** DALILA JUNQUEIRA BORGES**Título:** "Epibiontes podem evitar a proliferação bacteriana em embriões de caranguejos estuarinos?"**Orientador:** Dr. Murilo Zanetti Marochi**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/ Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Dr. Murilo Zanetti Marochi	APROVADO
Prof. Dr. Ivan Rodrigo Abrão Laurino	APROVADO

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Dalila Junqueira Borges** obteve o seguinte conceito:

☒

APROVADO

☐

REPROVADO

São Vicente, 24 de janeiro de 2022.



Dr. Murilo Zanetti Marochi
(Orientador)



Prof. Dr. Ivan Rodrigo Abrão Laurino