

ASPECTOS DA FISIOLOGIA, TOXINOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE
NUTRIÇÃO DO DINOFLAGELADO *Ostreopsis cf. ovata*

ELILIANE VASCONCELOS CORRÊA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2011

ASPECTOS DA FISIOLOGIA, TOXINOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE
NUTRIÇÃO DO DINOFLAGELADO *Ostreopsis cf. ovata*

ELILIANE VASCONCELOS CORRÊA

Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador (a): Prof. Dr^a Silvia Mattos Nascimento

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL DE 2011

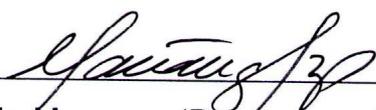
ASPECTOS DA FISIOLOGIA, TOXINOLOGIA E ESTRATÉGIAS
DE NUTRIÇÃO DO DINOFLAGELADO *Ostreopsis cf. ovata*

ELILIANE VASCONCELOS CORRÊA

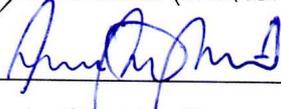
Dissertação apresentada ao Programa de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 28 de abril de 2011.

Comissão Examinadora:



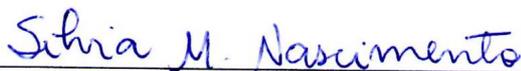
Dr^a. Mariângela Menezes (Doutora em Ciências Biológicas - Botânica) – UFRJ



Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença (Doutor em Oceanografia) - FURG



Dr. Paulo Pedrosa Andrade (Doutor em Ciências Ambientais) – UENF



Dr^a. Silvia Mattos Nascimento (Doutora em Oceanografia) – UENF Orientadora

*Aos meus pais, Elizeu e Neilda pelo amor,
cuidado e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela vida, pelo amor sem medidas, orientação e sabedoria concedida.

Aos meus pais, Elizeu e Neilda que sempre atentaram para a importância da educação em minha formação. Por serem sempre presentes e terem me educado com amor e responsabilidade.

Aos irmãos Elaine e Jônatas, pelo amor e abrigo nos momentos difíceis.

Ao Daniel pelo amor e por cultivar os sonhos que temos em comum.

A orientadora Silvia Mattos Nascimento pela orientação e por acreditar no meu trabalho.

Aos componentes da banca examinadora por aceitarem o convite.

A Dr^a Eliane Gonzales do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM por ceder o espaço e colaborar com a logística para as coletas e por ter nos hospedado em Arraial do Cabo quando precisamos.

Ao Dr. Wanderson Carvalho pela participação ativa no desenvolvimento do projeto, colaboração nas coletas e análise dos resultados relacionados à nutrição mixotrófica de *Ostreopsis* cf. *ovata* e pelos muitos favores prestados.

Ao Dr. Sérgio Lourenço da Universidade Federal Fluminense por ceder, gentilmente, as cepas de microalgas oferecidas como presas nos ensaios de mixotrofia.

A Profa. Dra. Ângela Wagener e sua aluna de pós-doc Juliana Felizola da Pontifícia Universidade Católica (PUC) pela identificação prévia das toxinas em LC-MS.

A Profa. Dra. Andrea Cristina Vetö Arnhold do laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da Uenf por permitir que o microscópio de fluorescência do LBR fosse usado nesse projeto e por colaborar com as análises feitas no citômetro de fluxo.

A Profa. Dra. Denise Dagnino do Laboratório de Biotecnologia da UENF pela colaboração nos procedimentos de extração das toxinas.

Ao Prof./Dr. Edésio José Tenório de Melo e sua aluna de doutorado Cristiane Virgílio do Laboratório de Biologia Celular da UENF por terem colaborado no

preparo de amostras e obtenção de imagens no microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Dr. Steve Morris do Center for Environment Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS) por realizar a identificação das toxinas em LC-MS/MS.

Aos amigos “canarinhos” pelos momentos descontraídos durante o mestrado.

A amiga Marianna por termos cumprido juntas todas as etapas desse mestrado, desde as longas horas de estudo para o processo seletivo. Por me fazer rir sempre e torcer por mim.

As amigas da sala 211 (Andréia, Albany, Rita, Carol e Aline) pelo carinho, apoio e amizade construída durante esses dois anos.

As minhas grandes amigas da graduação, Antônia, Andréa, Carol, Clarissa, Raquel, Elisângela, Keity, e Simone pela amizade duradoura e por estarem prontas a ouvirem minhas lamentações acadêmicas.

As amigas de laboratório Alice e Annaliza pelo ambiente de trabalho agradável e pelos momentos descontraídos que proporcionaram.

Aos amigos “extra acadêmicos” de longa data Marcella, Bibi, Helinho e as meninas da célula “Mais que Vencedoras” por eu poder contar sempre e pelos conselhos sábios.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Ciências Ambientais/UENF pelo uso do espaço físico e dos equipamentos.

Aos demais amigos, professores, companheiros e funcionários da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou.”

Eclesiastes 3: 1-2.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x	
LISTA DE TABELAS.....	xiii	
RESUMO.....	xiv	
ABSTRACT.....	xv	
CAPÍTULO 1		
1.1- Introdução Geral.....	1	
1.2- Área de Estudo.....	6	
1.3- Objetivos.....	8	
CAPÍTULO 2. Influência da temperatura sobre parâmetros de crescimento e fisiologia de <i>Ostreopsis cf. ovata</i>		9
2.1. Introdução.....	9	
2.2 Objetivo.....	11	
2.3 Material e Métodos.....	11	
2.4 Resultados.....	12	
2.5 Discussão.....	16	
CAPÍTULO 3. Investigação de mixotrofia em dinoflagelados epi-bentônicos com ênfase em <i>Ostreopsis cf. ovata</i>		20
3.1 Introdução.....	20	
3.2 Objetivo.....	24	
3.3 Material e Métodos.....	25	
3.3.1) 1º Ensaio de mixotrofia: teste com culturas de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> e possíveis presas detentoras de auto-fluorescência alaranjada.	25	
3.3.2) 2º Ensaio de mixotrofia: uso do fluorocromo específico para material genético, DAPI.....	25	
3.3.3) 3º Ensaio de mixotrofia: teste com população natural de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> e marcação dos núcleos de possíveis presas com DAPI.....	26	

3.3.4) 4º Ensaio de mixotrofia: investigação da presença de vacúolos digestivos em células da população natural de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> utilizando LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO).....	28
3.3.5) Ultraestrutura de <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	30
3.4 Resultados.....	31
3.5 Discussão.....	45
CAPÍTULO 4. Toxinas de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : identificação e quantificação.....	53
4.1 Introdução.....	53
4.2 Objetivo.....	56
4.3 Material e Métodos.....	56
4.4 Resultados.....	57
4.5 Discussão.....	61
CAPÍTULO 5	65
5.1- Discussão Geral.....	65
5.2- Conclusões.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Célula de *Ostreopsis cf. ovata* em microscopia ótica. Escala = 10 μm2

Figura 1.2. Pontos de ocorrência de *Ostreopsis cf. ovata* no Brasil.....5

Figura 1.3. Floração de *Ostreopsis cf. ovata* em Arraial do Cabo em 1998 e 2002. a & b - biofilme de *O. cf. ovata* cobrindo comunidade de macroalgas. c & d - Ouriços perdendo espinhos. e - Ouriço apresentando necrose. Fotos: C.E.L.Ferreira.....5

Figura 1.4. Floração de *Ostreopsis cf. ovata* na praia do Forno, Arraial do Cabo, em dezembro de 2006 – Biofilme marrom de *O. cf. ovata* cobrindo macroalga. Foto: C.E.L.Ferreira.....6

Figura 1.5. A) Mapa do Brasil. B) Mapa do estado do Rio de Janeiro. C) Costa do estado do Rio de Janeiro. 1- Armação dos Búzios (Praia da Tartaruga), 2- Arraial do Cabo.....7

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Curvas de crescimento da cepa LCA-E7 de *Ostreopsis cf. ovata* mantida a 16, 20 e 26 °C.....13

Figura 2.2. Variação da concentração de clorofila-a e feofitina ao longo do tempo de cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* (cepa LCA-E7) a 16, 20 e 26 °C, a - Quota celular de clorofila-a. b - Quota celular de feopigmentos. c - Concentração de clorofila-a por volume. d - Concentração de feofitina por volume.....15

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Micrografia em microscopia de epi-fluorescência de cultura mista de *Ostreopsis cf. ovata*, cepa LCA-E (célula indicada pela seta), e *Rhodomonas sp.* (células menores e alaranjadas). Cultivo em laboratório. Aumento de 200x. Escala = 10 μm32

Figura 3.2. Resultado obtido por citometria de fluxo de mistura de culturas de *Ostreopsis cf. ovata* e *Rhodomonas sp.* na proporção de 1000:1. a - tempo zero, b - após 30 min, c - após 60 min, d - após 90 min. Aumento de população de fluorescência distinta ao longo do tempo de incubação (em destaque pelo círculo). Notar que a porcentagem da nova população formada aumenta de 0,07% no tempo zero para 0,65 % após 90 min de incubação. FL2-H (eixo x) - fluorescência emitida na faixa de \cong 585 nm que corresponde a luz laranja (ficoeritrina). FL4-H (eixo y) -

fluorescência emitida na faixa de $\cong 600$ nm correspondente a luz vermelha (clorofila-a).....33

Figura 3.3. Micrografia em microscopia de epi-fluorescência de célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* com duas células de *Rhodomonas* sp. (indicadas pelas setas). Notar marcação azul (DAPI) da bainha de mucilagem de *O.* cf. *ovata*. Cultivo em laboratório. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....33

Figura 3.4: Núcleo de *Ostreopsis* cf. *ovata* (cepa LCA-B7) marcado com DAPI. Cultivo em laboratório. a - Microscopia ótica. b - Microscopia de epi-fluorescência. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....34

Figura 3.5. Célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo núcleo de possível presa marcado com DAPI (indicado pela seta). População natural, janeiro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência. b - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....35

Figura 3.6. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* com conteúdo avermelhado de fluorescência alaranjada (indicado pelas setas). População natural, janeiro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....36

Figura 3.7. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo vesículas (indicadas pelas setas). População natural, janeiro de 2010. a, c, e & g - Microscopia de epi-fluorescência. b, d, f & h - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m....36

Figura 3.8. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo estrutura circular de coloração esbranquiçada (setas amarelas) e numerosos pontos azuis (setas vermelhas). População natural, janeiro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....36

Figura 3.9. Ciliados com trato digestivo marcado em azul pelo LysoSensor. População natural, agosto de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....37

Figura 3.10. Aspecto da comunidade de organismos epífitos associada a amostras da macroalga *Amphiroa* sp. coletadas na Prainha, Arraial do Cabo. a - Agosto de 2010. b - Dezembro de 2010. Aumento de 200x. Escala = 10 μ m.....38

Figura 3.11. Célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo vesícula bem demarcada marcada por LysoSensor (setas azuis). População natural, agosto de 2010. a - Microscopia ótica. b, c & d - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b & c - Vesícula marcada em azul por LysoSensor. d - Perda da fluorescência após aproximadamente 3 minutos de observação. b & d - Observação de estruturas de coloração esbranquiçada sob fluorescência (setas amarelas). Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.....39

Figura 3.12. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* marcadas pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a, b, c & d - Células contendo vesículas marcadas pelo LysoSensor (indicadas pelas setas). e, f, g, h, i & j - Células apresentando marcação difusa por LysoSensor. a, c, e, g & i - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV.

b, d, f, h & j - Microscopia ótica. a - h: Aumento de 400x. i & j: Aumento de 200x. Escala = 10 µm.....40

Figura 3.13. Célula de *Ostreopsis cf. ovata* marcada por LysoSensor provavelmente devido ao processo de morte celular. População natural, dezembro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b – Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 µm.....41

Figura 3.14. a & b - Célula de *Coolia* sp com marcação difusa por LysoSensor. c & d - Célula de *Prorocentrum rhathymum* com marcação difusa por LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala= 10 µm.....42

Figura 3.15. Célula de *Coolia* sp. com vacúolo azul marcado pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 µm.....42

Figura 3.16. Células de *Ostreopsis cf. ovata* com conteúdo avermelhado de fluorescência alaranjada não marcado pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a, c & e - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b, d & f - Microscopia ótica. Aumento de 400x.....43

Figura 3.17: Imagens do conteúdo celular de *Ostreopsis cf. ovata* obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. 1- cloroplasto, 2 – grânulos de amido, 3 – membrana plasmática, 4 – núcleo.....45

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Estrutura da palytoxina (Ciminiello *et al.*, 2006).....54

Figura 4.2. Cromatogramas de identificação de PLTX e OVTX-a,-b, -c, -d, -e em extratos de *Ostreopsis cf. ovata*.....59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Taxa de crescimento (μ), rendimento máximo (RM), e tempo de duplicação (em dias) da cepa LCA-E7 de *Ostreopsis cf. ovata* cultivada em meio L2/2 a 16 °C, 20 °C e 26 °C. Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey-Kramer.13

Tabela 2.2. Valores mínimos e máximos das concentrações de clorofila-a e feofitina por célula (pg.cel^{-1}) e por volume ($\mu\text{g.L}^{-1}$) obtidos nos experimentos de crescimento de *Ostreopsis cf. ovata* (cepa LCA-E7) a 16, 20 e 26 °C.....15

Tabela 2.3. Intervalo de temperatura (T) testado por vários autores para o crescimento de cepas de *Ostreopsis* de diferentes áreas geográficas e as respectivas taxas de crescimento (μ) ótimo, rendimento máximo (RM) e temperaturas correspondentes.....17

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Macroalgas coletadas em agosto e dezembro de 2010 em Arraial do Cabo para obtenção de células de *Ostreopsis cf. ovata* e teste com LysoSensor. N°: número de identificação da amostra de macroalga.....30

Tabela 3.2. Tabela 3.2. Sumário dos resultados de janeiro de 2010: *Ostreopsis cf. ovata* após despigmentação e marcação com DAPI. Número total de células de *O. cf. ovata* observadas: 255.....35

Tabela 3.3. Sumário dos resultados de agosto de 2010: *Ostreopsis cf. ovata* após marcação com LysoSensor.....39

Tabela 3.4. Tabela 3.4. Sumário dos resultados de dezembro de 2010: *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum* sp. e *Coolia* sp. após marcação com LysoSensor. NQ- Não quantificado.....44

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Concentrações e porcentagens de pPLTX e ovatoxinas (pg.cel^{-1}) em culturas de *Ostreopsis cf. ovata* cultivadas sob condição padrão de cultivo. As amostras 4 e 5 foram cultivadas em meio L2 com N/2 e P/2 e a amostra 3 a 20 °C. FC- Fases de crescimento: Exp.- exponencial, Est.- estacionária.....60

Tabela 4.2. Concentração máxima de palytoxina e ovatoxinas (pg.cel^{-1}) produzidas por cepas de *Ostreopsis cf. ovata* reportadas na literatura.....62

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos estudar a influência da temperatura sobre o crescimento de uma cepa de *O. cf. ovata* em cultivo, avaliar o potencial mixotrófico da população de *O. cf. ovata* da costa leste Fluminense e verificar a produção de palytoxina e ovatoxinas por duas cepas isoladas localmente. Para tanto, a cepa LCA-E7 foi cultivada em meio L2/2, irradiância de $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas e parâmetros de crescimento foram medidos a 16, 20 e 26 °C. A fim de avaliar o potencial mixotrófico de *O. cf. ovata* foram realizados ensaios usando células em cultivo e da população natural de *O. cf. ovata*. Visando identificar presas e/ou vacúolos digestivos em células de *O. cf. ovata* o fluorocromo específico para material genético DAPI e o marcador de compartimentos ácidos LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) foram usados nos diferentes ensaios. A toxicidade das cepas LCA-E7 e LCA-B7 foi testada usando o método LC-MS/MS. Maior taxa de crescimento e rendimento máximo de *O. cf. ovata* foi observado a 20 e 26 °C em relação a 16 °C. Pequena parcela (< 0,5%) da população de *O. cf. ovata* estudada apresentou evidência de fagotrofia e uma maior parcela desta (46%) foi marcada de maneira difusa por LysoSensor, o que foi interpretado como evidência de osmotrofia. Outras espécies de dinoflagelados epibentônicos foram marcados com o mesmo padrão pelo sensor. As análises em LC/MS-MS permitiram a identificação e quantificação de ovatoxina-a, -b, -c, -d & -e. As concentrações dessas toxinas nos extratos analisados variaram entre 20-171 pg.cel⁻¹ de OVTX-a, 23-205 pg.cel⁻¹ de OVTX-b, 3-37 pg.cel⁻¹ de OVTX-c e 3-80 pg.cel⁻¹ de OVTX-d+e. OVTX-a e OVTX-b foram os componentes encontrados em maiores concentrações nos extratos das cepas LCA-E7 e LCA-B7. Esse resultado ressalta o risco que as frequentes florações de *O. cf. ovata* podem representar na costa leste Fluminense e a importância de estudos relacionados aos fatores envolvidos na formação desses eventos.

ABSTRACT

This study aims to study the influence of temperature on the growth parameters of *O. cf. ovata* strain LCA-E7, to evaluate the mixotrophic capability of the *O. cf. ovata* field population from Rio de Janeiro coastline and to identify and quantify palytoxin and ovatoxins produced by strains LCA-E7 and LCA-B7. To measure growth parameters, LCA-E7 strain was cultivated in L2/2 medium, with photon flux density of $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and light/dark cycle of 12h:12h and under three temperature regimes, 16, 20 and 26 °C. In order to evaluate *O. cf. ovata* mixotrophic potential, the fluorochrome DAPI and the acid compartments marker LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) were used in different assays. LCA-E7 and LCA-B7 strains toxicity was assessed using LC-MS/MS. The results indicated higher *O. cf. ovata* growth rates and maximum yield at 20 and 26 °C comparing to 16 °C. A small fraction (< 0,5%) of the *O. cf. ovata* population showed evidence of phagotrophy and a larger share of this population (46%) presented a diffuse LysoSensor marking, which was interpreted as evidence of osmotrophy. The same die pattern was observed in other epi-benthic dinoflagellate species. Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry identified OVTX-a, -b, -c, -d and -e. Estimated concentrations varied between 20-171 pg[OVTX-a].cell⁻¹, 23-205 pg[OVTX-b].cell⁻¹, 3-37 pg[OVTX-c].cell⁻¹ and 3-80 pg[OVTX-d+e].cell⁻¹. OVTX-a and -b were the major components of the toxin profile produced by strains LCA-E7 and LCA-B7. This result highlights the risk that *O. cf. ovata* blooms may represent in the study area and the importance of studies related to the factors that trigger these events.

Aspectos da fisiologia, toxinologia e estratégias de nutrição do dinoflagelado *Ostreopsis cf. ovata*

CAPÍTULO 1

1.1- Introdução Geral

Espécies de microalgas quando submetidas a condições favoráveis podem se multiplicar, aumentando sua biomassa e formando eventos conhecidos como florações. A densidade de células que caracteriza tais florações varia de acordo com a espécie em estudo e o conceito de floração pode ser melhor definido pelos seus potenciais efeitos deletérios do que por um valor específico de densidade (Smayda, 1997).

Das 5000 espécies de fitoplâncton marinho conhecidas, aproximadamente 300 foram reportadas como formadoras de florações. Dentre essas, cerca de 80 espécies são capazes de produzir toxinas. As florações de microalgas podem ser consideradas nocivas por alterarem o equilíbrio de ecossistemas devido a elevada biomassa produzida e/ou pelos efeitos negativos causados pelas toxinas produzidas por determinadas espécies (Hallegraeff, 1995).

Os impactos causados pela elevada biomassa de microalgas em ecossistemas aquáticos incluem: descoloração da água, possíveis danos físicos e obstrução das brânquias de organismos aquáticos e depleção de oxigênio dissolvido. A diminuição na concentração de oxigênio ocorre devido a decomposição da biomassa morta acumulada e resulta, muitas vezes, na morte de peixes e invertebrados por anoxia. Por outro lado, as florações de algas nocivas (FANs) causadas por microalgas produtoras de toxinas, além de poderem levar à morte peixes, moluscos, mamíferos e aves marinhas, representam um risco a saúde pública já que podem causar intoxicação de seres humanos pela ingestão de frutos do mar contaminados. As FANs também têm gerado prejuízos econômicos ao turismo e às atividades de pesca e aquicultura (Hallegraeff, 1995; Fogg, 2002).

Dentre as microalgas produtoras de toxinas está o dinoflagelado epibentônico *Ostreopsis ovata* Fukuyo 1981 (Figura 1.1), que é capaz de produzir uma das toxinas marinhas mais letais conhecidas, a palytoxina (Lenoir *et al.*, 2004) e toxinas análogas, tais como ostreocina-D (Usami *et al.*, 1995) e ovatoxinas-a,-b,-c,-d & -e (Ciminiello *et al.*, 2010).



Figura 1.1. Célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* em microscopia ótica. Escala = 10 µm.

O gênero *Ostreopsis* compreende dinoflagelados tecados que são geralmente encontrados associados à macroalgas ou outros substratos, como areia e corais (Tindall e Morton, 1998). Espécies de *Ostreopsis* geralmente ocorrem com outros dinoflagelados epi-bentônicos dos gêneros *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Prorocentrum* e *Amphidinium*. O gênero *Gambierdiscus* é conhecido por produzir toxinas que causam a síndrome da ciguatera pelo consumo de peixes contaminados (Lehane e Lewis, 2000). Entretanto, devido aos múltiplos sintomas que a ciguatera provoca (problemas gastrointestinais e neurológicos, podendo ser fatal), acredita-se que outras toxinas originadas na comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos possam contribuir na intoxicação humana (Tindall e Morton, 1998).

O gênero *Ostreopsis* é característico de regiões de clima tropical e subtropical (Lenoir *et al.*, 2004). Relatos da distribuição de espécies de *Ostreopsis* incluem a Polinésia Francesa, Havaí, Austrália, Flórida, Filipinas, Singapura, Vietnã, México, Porto Rico, Belize, Venezuela, Ilhas Virgens, Arquipélagos de Comores, Ilhas Bermudas, Bahamas, Ilhas Cook, Indonésia, Malásia, Madagascar e Zanzibar (Faust *et al.*, 1996; Tindall e Morton, 1998, Rhodes, 2010). Entretanto, principalmente na última década, houve um aumento na quantidade de estudos que reportam a ocorrência e novos eventos de floração de *Ostreopsis* em regiões temperadas como no Mar Mediterrâneo (Tognetto *et al.*, 1995; Brescianini *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2007; Ciminiello *et al.*, 2006), Japão (Taniyama *et al.*, 2003) e Nova Zelândia (Shears e Ross, 2009).

Segundo Rhodes (2010), a expansão da distribuição de *Ostreopsis* na última década se deu devido ao maior número de pesquisas sobre o gênero e ao aumento na facilidade de sua identificação. Contudo, Granéli *et al.* (2011) sugerem que o aumento da temperatura da superfície do mar, em decorrência do aquecimento

global, pode ser um fator determinante para a expansão da distribuição e o aumento da frequência e intensidade de florações de *Ostreopsis ovata*.

Tindall e Morton (1998) enfatizam que diferentes fatores podem estar relacionados à distribuição e formação de florações de dinoflagelados epibentônicos, tais como temperatura, turbulência da água, disponibilidade de substratos para fixação, intensidade luminosa, precipitação e condições nutricionais. Em geral, espécies de *Ostreopsis* apresentam maior crescimento no verão em ambientes de baixa hidrodinâmica e elevada salinidade e disponibilidade de nutrientes (Barone, 2007; Pistocchi *et al.*, 2010).

No Mar Mediterrâneo existe registro da ocorrência do gênero *Ostreopsis* desde os anos 70 (Taylor, 1979), e a espécie *O. ovata* foi encontrada pela primeira vez na região em 1994 na costa do Mar Tirreno (Tognetto *et al.*, 1995). Embora não se tenha certeza da ocorrência de *O. ovata* no Mar Mediterrâneo antes de registros dessa espécie começarem a ser feitos, os eventos de florações intensas de *O. ovata* com formação de biofilme marrom só se tornaram frequentes recentemente (Pistocchi *et al.*, 2010). Efeitos nocivos de florações de *O. ovata* também começaram a ser registrados nos últimos anos (Sansoni *et al.*, 2003; Brescianini *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006; Tichadou *et al.*, 2010). Intensas florações dessa espécie têm ocorrido na costa do Mar Mediterrâneo desde o verão de 1998, quando causaram impactos a comunidade bentônica e banhistas foram intoxicados devido a inalação de spray marinho na costa da Toscana, Itália (Sansoni *et al.*, 2003). Em 2005, intensa floração de *O. ovata* em Genova, também na Itália, levou a intoxicação de centenas de banhistas que precisaram de cuidados médicos após exposição ao spray marinho. Tais pacientes mostraram sintomas como febre, bronco constrição, dispnéia leve, conjuntivite e irritação na pele (Ciminiello *et al.*, 2006). Desde então, eventos semelhantes têm sido documentados na Itália, Espanha, França, Croácia, Tunísia e Grécia, e no verão de 2009 numerosos casos de pacientes sintomáticos na Argélia foram relatados em decorrência de florações de *O. ovata* (Tichadou *et al.*, 2010).

No Brasil, *O. ovata* foi reportada pela primeira vez em 2001 no Canal de São Sebastião, em São Paulo (Figura 1.2) (Naves e Freitas, 2001). Extratos obtidos a partir da população local apresentaram atividade hemolítica e efeito inibidor no desenvolvimento de ovos de ouriços (Naves e Freitas, 2001). *O. ovata* foi posteriormente registrada em janeiro de 2004 na Ilha do Arvoredo em Santa

Catarina associada à uma floração de *Trichodesmium* (Silva *et al.*, 2006) (Figura 1.2).

Extensas florações de *O. ovata* foram reportadas na costa de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, nos verões de 1999 e 2002 (Figura 1.2). Tais florações causaram envenenamento e morte de ouriços do mar (*Echinometra lucunter*) (Granéli *et al.*, 2002; Ferreira, 2006) (Figura 1.3), e indícios da presença de um análogo da palytoxina, denominado de ostreocina, foram detectados na população natural de *O. ovata* em 2002 (Granéli *et al.*, 2002). Efeito similar sobre ouriços marinhos (*Evechinus choloticus*) foi observado na costa da Itália devido à floração de *O. ovata* (Sansoni *et al.*, 2003) e na Nova Zelândia em 2004, quando a densidade desse herbívoro declinou de 50 a 60% por influência de floração da espécie *O. siamensis* (Shears e Ross, 2009).

Mais recentemente, florações de *O. ovata* foram observadas em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, em junho e dezembro de 2006 (Figura 1.2, 1.4) e abril e setembro de 2007 (Nascimento *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2010). *O. ovata* também já foi registrada em Pernambuco em amostras coletadas em 2006 e 2007 (Figura 1.2) (Nascimento, 2006 e dados não publicados). Na Bahia, banhistas apresentaram sintomas como garganta inflamada, dor de cabeça, mialgia, sensação de febre, tosse e rinorréia. Nessa ocasião, um análogo da palytoxina com espectro de massa característico de ovatoxina-a foi detectado em extratos da população local de *O. ovata* (Figura 1.2). Entretanto, não se pode afirmar que ovatoxina-a foi a causa dos sintomas apresentados pelos banhistas (Proença *et al.*, 2010). Em 2010, *O. cf. ovata* foi também encontrada nas praias de Penha e Bombinhas, em Santa Catarina (Figura 1.2) (Tibiriçá *et al.*, 2010).

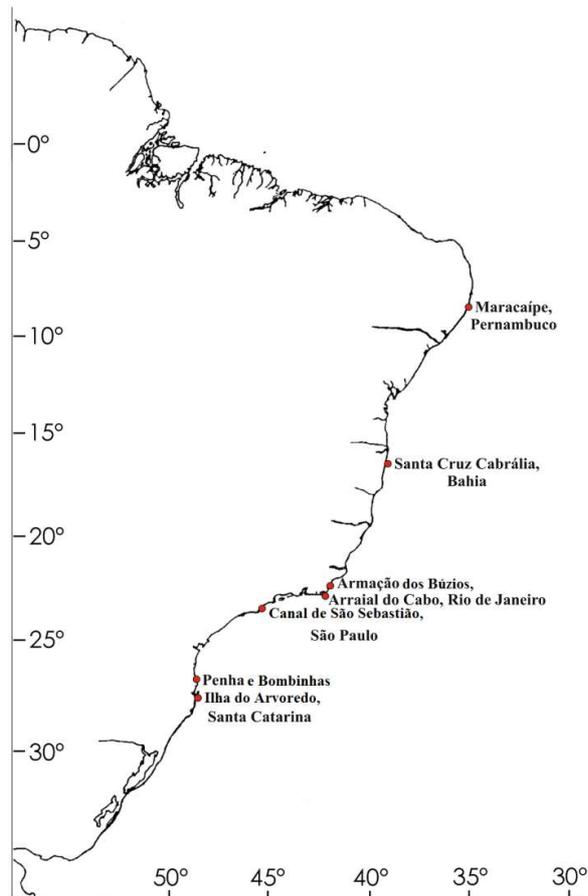


Figura 1.2. Locais onde a ocorrência de *Ostreopsis cf. ovata* já foi registrada na costa do Brasil.

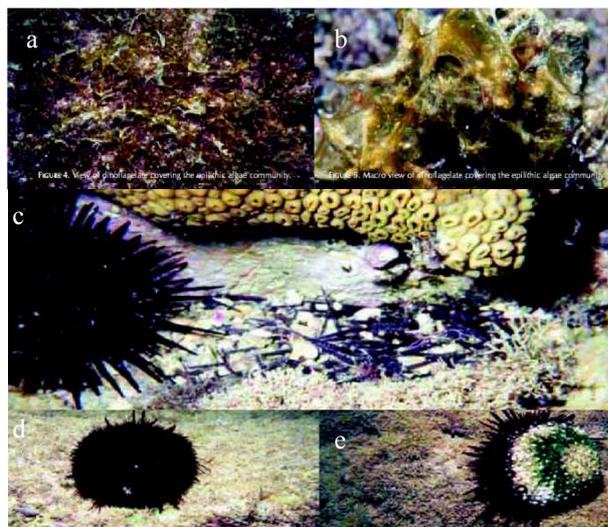


Figura 1.3. Floração de *Ostreopsis cf. ovata* em Arraial do Cabo em 1998 e 2002. a & b - biofilme de *O. cf. ovata* cobrindo comunidade de macroalgas. c & d - Ouriços perdendo espinhos. e - Ouriço apresentando necrose. Fotos: C.E.L.Ferreira.



Figura 1.4. Floração de *Ostreopsis cf. ovata* na praia do Forno, Arraial do Cabo, em dezembro de 2006 – Biofilme marrom de *O. cf. ovata* cobrindo macroalga. Foto: C.E.L.Ferreira.

Considerando o risco que as frequentes florações de *O. cf. ovata* podem representar na costa leste Fluminense, esses eventos merecem atenção com relação a sua toxicidade, assim como os fatores que os acarretam.

1.2- Área de Estudo

Nas diferentes etapas deste estudo foram usadas duas cepas de *O. cf. ovata*, LCA-E7 e LCA-B7, isoladas da Praia da Tartaruga em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro (Figura 1.5). Além disso, a população natural de *O. cf. ovata* de diferentes estações de amostragem em Arraial do Cabo foi também estudada (Figura 1.5).

O município de Armação dos Búzios (22°44'49"S 41°52'55"W) possui área de 71,7 km². O clima da região é seco com temperatura atmosférica média anual de 25 °C. A precipitação média anual é de 800 mm e podem ocorrer até cinco meses de seca (Dantas *et al.*, 2009). Arraial do Cabo (22°57'58"S 42°01'40"W) possui área de 158,1 km² com 35 km de praias oceânicas. O clima é quente e úmido com temperatura atmosférica média de 25 °C no verão e entre 17 e 23 °C no inverno. A média pluviométrica anual também é de 800 mm (Prefeitura Municipal de Arraial do Cabo, 2011). O ambiente marinho em Arraial do Cabo sustenta rica fauna e flora recifal com diversas espécies de peixes habitando diferentes zonas do costão rochoso que é coberto basicamente de uma diversa comunidade de algas epilíticas (Guimaraens e Coutinho, 1996). Esponjas, ascídias, briozoários, hidrozoários são também importantes componentes do bentos marinho nesta região (Lages *et al.*, 2006).

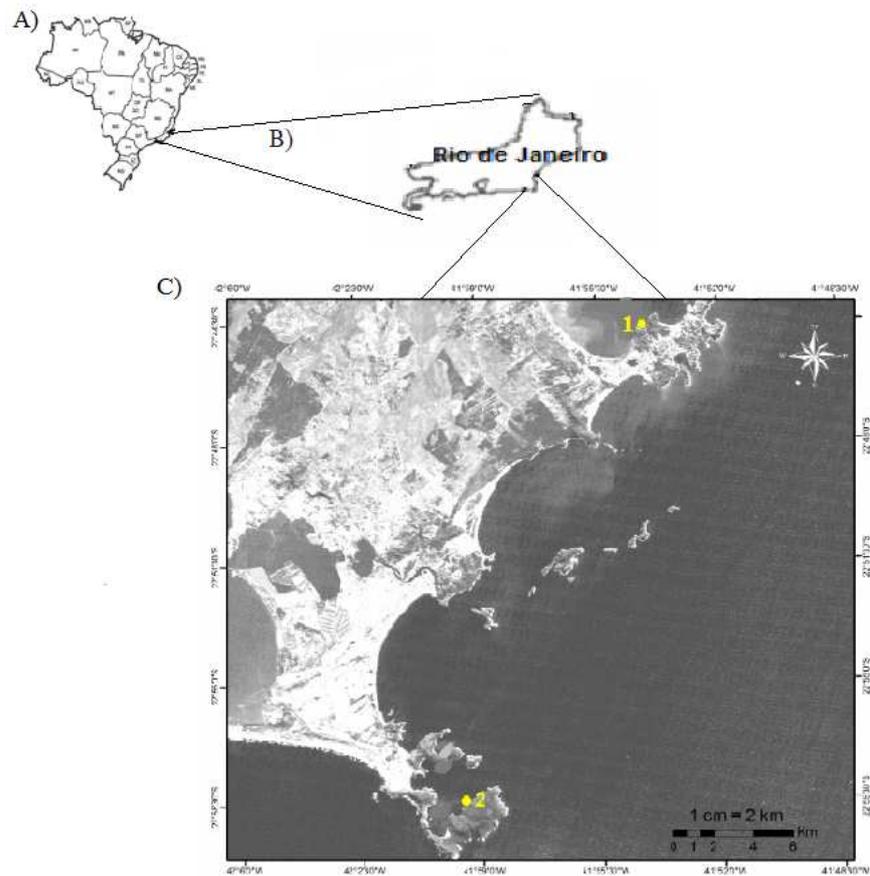


Figura 1.5. A) Mapa do Brasil. B) Mapa do estado do Rio de Janeiro. C) Costa do estado do Rio de Janeiro. 1- Armação dos Búzios (Praia da Tartaruga), 2- Arraial do Cabo.

A produtividade marinha dos municípios de Armação dos Búzios e Arraial do Cabo é influenciada pelo fenômeno da ressurgência que consiste no afloramento das massas de água mais profundas, frias e ricas em nutrientes, o que favorece a produtividade primária e influencia a cadeia alimentar da região (Silva et al., 2006). Este fenômeno ocorre em razão do vento Nordeste soprar paralelo à costa o que força o deslocamento da corrente superficial para alto mar, carregando a água quente da corrente do Brasil e permitindo que a água mais profunda do Atlântico Sul aflore (Silva et al., 2006). Na costa leste do Rio de Janeiro a ressurgência ocorre entre os municípios de Macaé ao norte e Maricá ao sul e tem seu ponto central no Focinho do Cabo, na ilha de Cabo Frio (Arraial do Cabo). Nessa região, quando o fenômeno da ressurgência não está acontecendo, a água superficial geralmente apresenta temperatura acima de 21° C, salinidade entre 35 e 36 e baixa concentração de nutrientes. Já em períodos de ressurgência a temperatura da água cai abaixo de 18 °C, podendo chegar a 13 °C e a concentração de nutrientes, principalmente nitrato, se torna mais elevada (Valentin, 1984).

1.3- Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos estudar aspectos fisiológicos e ecológicos de *O. cf. ovata* de maneira a melhor compreender os fatores relacionados à formação de florações dessa espécie, como a temperatura e a estratégia de nutrição. Pretendeu-se também investigar a produção de palytoxina e análogos por cepas de *O. cf. ovata* isoladas localmente, a fim de avaliar o risco potencial de tais florações para a saúde pública. Tais objetivos foram explorados em quatro capítulos:

O CAPÍTULO 2 trata do estudo da influência da temperatura sobre parâmetros de crescimento de uma cepa de *Ostreopsis cf. ovata* usando culturas em laboratório;

O CAPÍTULO 3 descreve a investigação acerca do modo de nutrição de *Ostreopsis cf. ovata* a partir de experimentos com culturas e estudo da população natural dessa espécie, avaliando sua habilidade em realizar mixotrofia, ou seja, obtenção de energia pela combinação de fotossíntese e heterotrofia;

O CAPÍTULO 4 aborda a identificação e quantificação de toxinas (palytoxina e ovatoxinas) produzidas por duas cepas de *Ostreopsis cf. ovata* (LCA-E7 e LCA-B7), isoladas da Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, usando método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Esse estudo foi feito em colaboração com o Dr. Steve Morris do CEFAS (Center for Environment, Fisheries & Aquaculture Science);

No CAPÍTULO 5 uma discussão geral é apresentada a fim de integrar os pontos estudados e responder os objetivos levantados.

Apesar de um estudo prévio sobre a biologia molecular de uma das cepas utilizadas nesse trabalho ter confirmado que esta se trata da espécie *Ostreopsis ovata* (Mariângela Menezes, comunicação pessoal), devido a falta de dados moleculares associados a espécie *O. ovata* da localidade de onde foi primeiramente isolada (localidade tipo), Penna *et al.* (2010) recomendaram cautela ao citar a espécie e, por esse motivo, o presente trabalho adotou a nomenclatura *Ostreopsis cf. ovata*. Entretanto, a nomenclatura utilizada nos trabalhos citados nesse estudo foi respeitada.

CAPÍTULO 2

Influência da temperatura sobre parâmetros de crescimento e fisiologia de *Ostreopsis cf. ovata*

2.1- Introdução

A temperatura é um dos importantes fatores que controlam as atividades diárias e sazonais dos organismos vivos e pode ser limitante ao seu crescimento e sobrevivência. Segundo Margalef (1968), a combinação de temperatura e salinidade rege os processos fundamentais da mecânica marinha, desde o aporte de nutrientes, à mistura e dispersão de populações, além de influenciar na viscosidade da água e outras propriedades importantes.

O crescimento dos microorganismos pode ser afetado diretamente pela temperatura, que influencia processos enzimáticos da maioria das atividades celulares, incluindo captação de nutrientes, síntese molecular, respiração, fotossíntese, divisão celular e mobilidade (Taylor 1987; Martinez *et al.* 1999). Por outro lado, a influência da temperatura no crescimento destes organismos também pode ser indireta quando, por exemplo, altera a solubilidade de gases importantes no meio como o oxigênio e o gás carbônico (Martinez *et al.* 1999).

Em microalgas geralmente se observa aumento da taxa de crescimento com o aumento da temperatura ambiente até um valor ótimo, depois do qual a taxa de crescimento declina abruptamente (Darley, 1982). A temperatura ótima de crescimento para várias espécies de fitoplâncton marinho e de água doce varia entre 18 °C e 25 °C (Darley, 1982). Cepas dos dinoflagelados *Alexandrium tamiyavanichii* e *A. minutum* isoladas da Malásia quando cultivadas a 15, 20, e 25 °C e irradiâncias de 10, 40, 60 e 100 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por exemplo, apresentaram maiores taxas de crescimento associadas a valores mais elevados de temperatura e irradiância e não cresceram a 15 °C (Lim *et al.*, 2006). Maiores taxas de produção de toxina nessas espécies foram obtidas em maiores temperaturas, e os autores sugerem que esses resultados podem representar uma adaptação fisiológica de espécies tropicais de *Alexandrium*. Xu *et al.* (2010) testaram o crescimento de *Prorocentrum donghaiense* a 10, 15, 20, 24, 27 e 31 °C, e apesar de ter ocorrido crescimento entre 10 e 27 °C, o crescimento ótimo dessa espécie ocorreu a 27 °C. A influência da salinidade no crescimento de *P. donghaiense*

também foi testada, mas notou-se que a temperatura foi o fator de maior influência sobre a taxa de crescimento. *Prorocentrum minimum* quando cultivada sob diferentes temperaturas cresceu entre 13 e 31 °C e a faixa de crescimento ótimo ocorreu entre 16 e 26,5 °C, com maior taxa de crescimento a 26,5 °C (Grzebyk e Berland, 1996).

Dinoflagelados epi-bentônicos isolados de regiões tropicais e subtropicais apresentam, em geral, taxa de crescimento acima de 0,1 divisões por dia em cultivos mantidos entre 22 e 31 °C. Entretanto, a faixa de temperatura ótima de crescimento para esse grupo, em cultivo, varia de 25 a 29 °C (Tindall e Morton, 1998). Em um estudo que testou o crescimento de dinoflagelados epi-bentônicos em diferentes temperaturas, *Ostreopsis heptagona* e *O. siamensis* apresentaram maior crescimento a 25 °C, enquanto *Prorocentrum lima*, *P. concavum* e *P. mexicanum* tiveram crescimento ótimo entre 26 e 28 °C e *Gambierdiscus toxicus* e *Coolia monotis* a 29 °C (Morton *et al.*, 1992).

O gênero *Ostreopsis* já foi registrado em ambientes com temperatura variando entre 7 e 30 °C no Mar Mediterrâneo (Monti *et al.*, 2007; Mangialajo, *et al.*, 2008; Selina e Orlova, 2010). Na costa do Rio de Janeiro, as florações de *O. ovata* que ocorreram em 1998, 2002, 2006 e 2007 em Armação dos Búzios e Arraial do Cabo coincidiram com períodos nos quais a temperatura do ar foi superior a 23 °C. Esses dados podem indicar a influência direta da temperatura sobre a formação de florações de *O. cf. ovata*, como já sugerido por Granéli *et al.* (2002), ou ainda que a temperatura pode representar um conjunto de condições ambientais como pressão atmosférica, irradiância e hidrodinâmica que favoreça o desenvolvimento desses eventos.

Dados do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) apontam que as emissões continuadas de gases estufa na atmosfera poderão levar a um aumento de 1,8 a 4,0 °C da temperatura média mundial ao longo do século 21 (IPCC, 2007). Existem opiniões controversas sobre a influência do aumento da temperatura superficial da água do mar em decorrência do aquecimento global e o crescimento de *O. ovata*. Lejeusne *et al.* (2009) relacionam as evidências de aumento da temperatura da superfície do Mar Mediterrâneo com a expansão de *O. ovata* e suas florações na região. Granéli *et al.* (2011) também sugerem que a elevação da temperatura da superfície do mar pode ser um fator importante para o aumento da frequência de florações de *O. ovata*. Por outro lado, Rhodes (2010)

argumenta que, aparentemente, o clima não é um fator determinante para a formação de florações de *Ostreopsis*, já que estas são registradas tanto em regiões de clima tropical quanto temperado. Torna-se importante, portanto, estudar o efeito da temperatura sobre o crescimento de *O. cf. ovata* a fim de obter subsídios para melhor compreender essa questão. Além disso, investigações sobre a tolerância de dinoflagelados a diferentes faixas de temperatura podem prover conhecimento sobre os processos de adaptação desses organismos a seus ambientes (Kobiyama *et al.*, 2010) e informação estratégica para programas de monitoramento.

2.2- Objetivo

Estudar a influência da temperatura sobre parâmetros de crescimento e produção de clorofila-a e feofitina por cepa de *Ostreopsis cf. ovata* isolada da Praia das Tartarugas, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro.

2.3- Material e Métodos

A fim de avaliar a influência da temperatura sobre parâmetros de crescimento e quota celular de pigmentos (clorofila-a e feopigmentos) de *O. cf. ovata* a cepa LCA-E7 de *O. cf. ovata* do banco de culturas de microalgas do Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) da UENF foi cultivada em meio de cultura L-2/2 (Guillard, 1995), preparado em água do mar (salinidade 35) filtrada em filtro de fibra de vidro GF/F e autoclavada. O meio L2 diluído foi usado já que as células apresentaram formato aberrante quando cultivadas em meio L2 com concentração padrão. As culturas estoque foram mantidas à temperatura de 24 °C, irradiância de 60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (radiação fotossinteticamente ativa) e fotoperíodo de 12 horas, sendo essa a condição padrão de cultivo.

Durante os experimentos foram realizados cultivos sob temperatura de 16, 20 e 26 °C. As condições de irradiância e fotoperíodo foram mantidas como na condição padrão de cultivo. Antes de cada experimento, as células foram aclimatadas à nova condição de temperatura pelo tempo correspondente a pelo menos quatro gerações (~ 20 dias no caso de *O. cf. ovata*, cepa LCA-E7).

Os cultivos foram realizados em tubos de vidro com 10 mL de meio L-2/2. Em intervalos de tempo regulares (3 dias para os experimentos a 20 e 26 °C e 5 dias a 16 °C) e em horário fixo, três tubos (réplicas) foram amostrados. Dos 10 mL contidos nos tubos, 5 mL foram filtrados em filtro de fibra de vidro Millipore para

posterior análise da clorofila-a e feofitina e o restante da amostra foi fixado com lugol neutro para contagem do número de células usando câmara de Sedgewick-rafter. A clorofila-a e feofitina foram extraídos das células contidas nos filtros utilizando solução de acetona 90% e a absorbância do extrato foi medida em espectrofotômetro (UV-160A, Shimadzu) a 750 e 665 nm. Para análise de feofitina esse extrato foi acidificado e a absorbância novamente lida a 750 e 665 nm (Carmouze,1994). A concentração dos pigmentos foi determinada usando a equação de Lorenzen (1967).

A taxa de crescimento das células em diferentes condições de temperatura foi determinada a partir da variação dos valores de densidade de células ($\ln_1 - \ln_0$) no tempo, sendo representado pela inclinação da reta. Neste cálculo foram considerados apenas os dias correspondentes à fase de crescimento exponencial. Os valores de rendimento máximo da cultura (a maior densidade de células obtida durante o cultivo) e tempo de duplicação (tempo de duplicação = $\ln 2$ /taxa de crescimento) também foram determinados.

O teste de Lilliefors foi usado para verificar a normalidade dos dados, usando o programa SAEG, e os testes paramétricos ANOVA e Tukey-Kramer foram realizados usando o programa GraphPad InStat a fim de testar as diferenças entre os parâmetros de crescimento obtidos em cada temperatura de cultivo.

2.4- Resultados

A cepa LCA-E7 apresentou taxas de crescimento de 0,11, 0,19 e 0,22 divisões por dia (div.d^{-1}) a 16 °C, 20 °C e 26 °C (Tabela 2.1). Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$) e o teste de Tukey-Kramer revelou que as taxa de crescimento a 20 e a 26 °C foram significativamente maiores que a taxa de crescimento a 16 °C ($p < 0,01$). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre as taxas de crescimento a 20 e 26 °C ($p > 0,05$).

Os tempos de duplicação encontrados foram de 6,1, 3,6 e 3,2 dias para as culturas de *O. cf. ovata* incubadas a 16, 20 e 26 °C, respectivamente. Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$), sendo que os tempos de duplicação a 20 e 26 °C foram menores que o tempo de duplicação a 16 °C ($p < 0,001$), e não houve diferença significativa entre os valores encontrados a 20 e 26 °C ($p > 0,05$).

O rendimento máximo também foi diretamente proporcional a temperatura

testada: 929 células.mL⁻¹ a 16°C, 17.867 células.mL⁻¹ a 20 °C e 19.844 células.mL⁻¹ a 26 °C (Tabela 2.1). Houve diferença significativa entre os tratamentos (p<0,01), sendo que não houve diferença entre os rendimentos máximos a 20 e 26 °C (p>0,05), e esses valores foram maiores que o rendimento máximo encontrado a 16 °C (p<0,001).

Tabela 2.1. Taxa de crescimento (μ), rendimento máximo (RM), e tempo de duplicação (em dias) da cepa LCA-E7 de *Ostreopsis cf. ovata* cultivada em meio L2/2 a 16 °C, 20 °C e 26 °C. Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey-Kramer.

Temperatura (°C)	μ (div.dia ⁻¹)	RM (células.mL ⁻¹)	Tempo de duplicação (dias)
16	0,11 ^A	929 ^A	6,1 ^A
20	0,19 ^B	17.867 ^B	3,6 ^B
26	0,22 ^B	19.844 ^B	3,2 ^B

Temperaturas maiores possibilitaram maior taxa de crescimento e rendimento máximo e menor tempo de duplicação de *O. cf. ovata*. A 16 °C foi registrada baixa taxa de crescimento e rendimento máximo, e após aproximadamente duas semanas a cultura entrou em fase de declínio (Tabela 2.1, Figura 2.1).

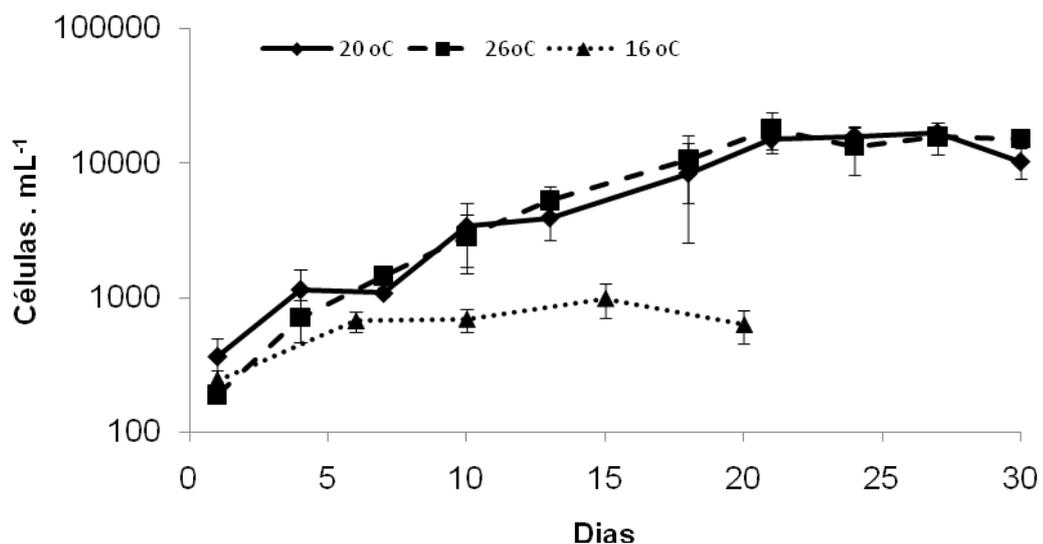


Figura 2.1. Curvas de crescimento da cepa LCA-E7 de *Ostreopsis cf. ovata* mantida a 16, 20 e 26 °C.

A determinação da concentração de clorofila-a e feopigmentos, produto de degradação da clorofila-a, durante o experimento de crescimento em cultivo é importante a fim de avaliar o estado fisiológico das culturas.

As culturas mantidas a 16 °C, além de terem apresentado baixo crescimento, apresentaram aspecto esbranquiçado bem diferente das demais. A quota celular de clorofila-a das células mantidas a 16 °C mostrou valores similares, e por vezes superiores, àqueles das células mantidas a 20 e 26 °C, com tendência de aumento ao longo dos 20 dias de cultivo (Figura 2.2a). Contudo, este é um artefato causado pelo baixo número de células dessa cultura, inferior ao número de células encontrado nas culturas mantidas a 20 e 26 °C. As concentrações de clorofila-a por volume de meio demonstraram as baixas concentrações deste pigmento nas culturas mantidas a 16 °C (Figura 2.2c, Tabela 2.2). As concentrações de feofitina por célula e por volume a 16 °C também foram baixas (Figura 2.2b & d, Tabela 2.2) o que mostra que a condição de estresse causada pela menor temperatura testada não provocou degradação de clorofila-a, mas pode ter afetado a produção deste pigmento.

A 20 °C a concentração de clorofila-a variou entre 35 e 134 pg.cel⁻¹ e entre 13 e 1593 µg.L⁻¹. Nas culturas mantidas a 26 °C a variação foi entre 43 e 132 pg.cel⁻¹ e 69 e 1192 µg.L⁻¹ (Tabela 2.2). Em ambas as temperaturas as maiores concentrações de clorofila-a foram observadas no início da fase exponencial de crescimento e decresceram no final do experimento (Figura 2.2a & c).

A concentração máxima de feofitina foi maior a 26 °C do que a 16 e 20 °C, especialmente a feofitina por volume de meio (Tabela 2.2). A variação de feofitina por volume durante o tempo de cultivo mostra que a partir do décimo dia de cultivo a 26 °C a produção de feofitina começou a aumentar e atingiu o pico próximo ao fim do experimento (Figura 2.2d), que coincide com a queda das concentrações de clorofila-a (Figura 2.2c). Este padrão pode indicar que apesar da maior temperatura testada ter levado a maior taxa de crescimento e rendimento máximo, também propiciou maior degradação da clorofila-a.

Foram encontrados elevados valores de desvio padrão referentes às concentrações médias de clorofila-a e feopigmentos. É possível que isto seja causado pelo fato das culturas de *O. cf. ovata* formarem agregados de células, que por mais que se tenha cuidado em desfazê-los previamente à coleta das amostras dificultam a amostragem de células dessa espécie.

Tabela 2.2. Valores mínimos e máximos das concentrações de clorofila-a e feofitina por célula ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$) e por volume ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtidos nos experimentos de crescimento de *Ostreopsis cf. ovata* (cepa LCA-E7) a 16, 20 e 26 °C.

Temperatura (°C)	Clorofila-a mín – máx ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$)	Feopigmentos mín – máx ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$)	Clorofila-a mín – máx ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Feopigmentos mín – máx ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
16	0 – 132	0 – 0.4	0 – 113	0 – 2.8
20	35 – 134	1,6 – 40	13 – 1593	11 – 52
26	43 – 132	6,5 – 56	69 – 1192	38 – 354

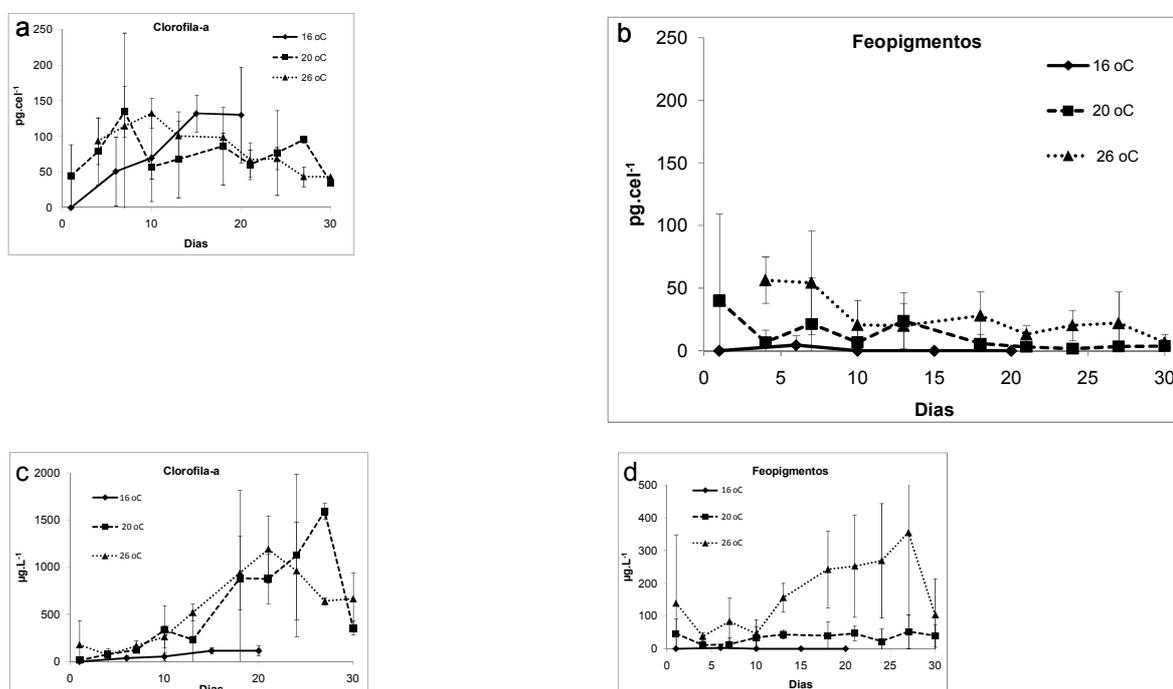


Figura 2.2. Variação da concentração de clorofila-a e feofitina ao longo do tempo de cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* (cepa LCA-E7) a 16, 20 e 26 °C, a - Quota celular de clorofila-a. b - Quota celular de feopigmentos. c - Concentração de clorofila-a por volume. d - Concentração de feofitina por volume.

2.5- Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a hipótese de que maiores temperaturas estimulam o crescimento de *O. cf. ovata* já que, apesar das células terem se mantido nas três temperaturas testadas, seu crescimento foi maior em temperaturas mais elevadas (20 e 26 °C). A 16 °C a taxa de crescimento foi aproximadamente metade das taxas de crescimento a 20 e 26 °C. Do mesmo modo, os rendimentos máximos observados a 20 e 26 °C foram aproximadamente 20 vezes maiores que o obtido a 16 °C (Tabela 2.1). As baixas concentrações de clorofila-a por volume de cultura durante o tempo de cultivo e o aspecto esbranquiçado das células confirmam seu estado fisiológico comprometido a 16 °C.

Zingone *et al.* (2010) testaram o crescimento de três cepas de *O. ovata* isoladas de três pontos distintos da costa italiana (Trieste, Nancona e Napoli) sob diferentes temperaturas (14, 18, 22, 26, 30 e 34 °C) e dois valores de irradiância (50 e 200 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esses autores verificaram que *O. ovata* cresceu na faixa de temperatura de 18 a 30 °C. A 14 °C as células se mantiveram, mas não houve crescimento e a 34 °C as células morreram. A maior taxa de crescimento encontrada foi de 1.2 div. dia^{-1} e ocorreu a 26 °C sob 200 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 2.3).

Granéli *et al.* (2011), ao cultivarem cepa de *O. ovata* isolada de Genova, Itália, em meio F/10 sob 140 μmol de fluxo de fótons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 16, 20, 24, 26, 28 e 30 °C, verificaram que a cepa não cresceu a 16 °C e que maiores temperaturas possibilitaram maiores taxas de crescimento. As taxas de crescimento encontradas foram de 0,74, 0,59 e 0,53 div. dia^{-1} a 30, 29 e 26 °C, respectivamente (Tabela 2.3). Segundo esses autores, a maior densidade de células (5.670 células. mL^{-1}) foi obtida a 26 °C, seguida dos rendimentos máximos alcançados a 28 e 30 °C de 5.410 e 5.130 células. mL^{-1} , respectivamente. Só houve diferença significativa entre o rendimento máximo obtido a 30 °C e àqueles a 16, 20, 24 e 28 °C e entre 28 °C e 16 e 20 °C (Granéli *et al.*, 2011).

Rhodes *et al.* (2000) testou o crescimento de cepa de *O. siamensis* isolada de Northland na Nova Zelândia e cultivada em meio GP (20%) sob 100 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 °C. A espécie *O. siamensis* apresentou crescimento ótimo (0,3 div. dia^{-1}) a 25 °C, mas nessa temperatura as células morreram após quatro dias de cultivo (Tabela 2.3). O crescimento foi mais

lento a 20 °C, mas a cultura se manteve por mais tempo. A 10 e 30 °C as células morreram e a 15 °C a cultura sobreviveu, mas não houve crescimento.

Ballantine *et al.* (1992), ao testar o crescimento de uma cepa de *Ostreopsis lenticularis* isolada da costa de Porto Rico e crescida sob diferentes temperaturas (20, 22, 24, 26, 29, 31 e 33 °C) e irradiâncias (10-150 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), encontrou crescimento ótimo (1,50 div. dia^{-1}) a 29 °C e irradiância de 60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A 20 °C as culturas não cresceram e só se mantiveram por duas semanas. Na temperatura máxima testada (33 °C) as culturas tiveram um rápido crescimento inicial, mas morreram em seguida, sem uma fase estacionária bem estabelecida. O rendimento máximo também foi encontrado a 29 °C e foi de 2711 células. mL^{-1} (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Intervalo de temperatura (T) testado por vários autores para o crescimento de cepas de *Ostreopsis* de diferentes áreas geográficas e as respectivas taxas de crescimento (μ) ótimo, rendimento máximo (RM) e temperaturas correspondentes.

Espécie	Local	Condições de cultivo (irradiância e fotoperíodo)	Intervalo de T (°C) testado	μ ótimo (div. dia^{-1}) - (T, °C)	RM (cél. mL^{-1}) - (T, °C)	Referência
<i>O. ovata</i>	Itália (Trieste, Napona e Napoli)	200 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 15:9 h	14 - 34	1,2 - (26)	-	Zingone <i>et al.</i> (2010)
<i>O. ovata</i>	Itália (Gênova)	140 μmol de fluxo de fótons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 16:8h	16 - 30	0,7 - (30)	5.670- (26)	Granéli <i>et al.</i> (2011)
<i>O. siamensis</i>	Northland (Nova Zelândia)	100 μmol de fluxo de fótons $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 14:10h	5 - 35	0,3 - (25)	-	Rhodes <i>et al.</i> (2000)
<i>O. lenticularis</i>	Caribe (Porto Rico)	60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 16:8h	22 - 33	1,5 - (29)	2.711- (29)	Ballantine <i>et al.</i> (1992)
<i>O. cf. ovata</i>	Brasil (Armação dos Búzios-RJ)	60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 12 h	16 - 26	0,2 - (26)	19.844- (26)	Presente estudo

Como mostrado na tabela 2.3, a temperatura associada a maior taxa de crescimento encontrada no presente estudo (26 °C) está de acordo com a temperatura ótima de crescimento descrita na literatura para *Ostreopsis* em cultivo, que é entre 25 e 30 °C.

Os resultados obtidos em cultivo corroboram com o que tem sido encontrado em Armação dos Búzios e Arraial do Cabo, já que os eventos de florações de *O. ovata* registrados na região ocorreram quando a temperatura do ar foi superior a 23 °C (a temperatura da água não foi medida) (Granéli *et al.*, 2002; Nascimento *et al.* 2010). Sansoni *et al.* (2003) relataram florações mais intensas de *O. ovata* na costa da Itália (Mar Mediterrâneo) quando a temperatura média da água atingiu máximo de 25 °C, em 1998. Em 2006, florações mais intensas de *O. ovata* foram encontradas na Itália quando a temperatura da superfície do mar estava entre 26 e 30 °C (Mangialajo *et al.*, 2008). Em Civitavecchia, região do Lácio em Roma, a ocorrência de *O. cf. ovata* coincidiu com o aumento da temperatura da água do mar e abundâncias mais elevadas dessa espécie foram encontradas quando a temperatura foi entre 28 e 29 °C (Tognetto *et al.*, 1995). Além disso, florações de *O. cf. siamensis* ocorreram na costa do Marrocos, África, em 2004, 2008 e 2009, quando a temperatura da superfície do mar variou entre 20 e 24 °C (Silva *et al.*, 2010). Shears e Ross (2009) estudaram floração de *O. siamensis* na Nova Zelândia em 2004 e constataram que esta ocorreu em período de baixa hidrodinâmica e temperatura da água mais elevada que a temperatura média ao longo do ano (20 °C).

Contudo, nem sempre as florações de *O. ovata* coincidem com elevados valores de temperatura. Em Cannero Riviera, no norte do mar Adriático, foi verificado que a densidade de *O. ovata* aumentou quando a temperatura da água estava em decréscimo (de 21,8 para 16,8 °C) (Totti *et al.*, 2010). Selina e Orlova (2010) registraram *O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis* no Mar do Japão quando a temperatura da água variou de 7 a 25 °C, e maior abundância de *Ostreopsis* spp. (10.970 células por peso seco de macroalga) foi encontrada à temperatura de 9 °C. Vila *et al.* (2001) não observaram correlação clara entre a abundância relativa de dinoflagelados epi-bentônicos e a temperatura ao longo da costa da Espanha.

Considerando que os trabalhos que não registraram correlação positiva entre densidades de *Ostreopsis* e a temperatura (Selina e Orlova, 2010; Totti *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2001) foram feitos no ambiente, não se pode dizer que estes confrontam

a hipótese de que *O. ovata* cresce melhor em temperaturas mais elevadas, já que no ambiente outros fatores estão envolvidos e podem ser mais importantes na formação de florações dessa espécie. Como exemplo, Totti *et al.*, (2010) verificaram que apesar das florações de *O. ovata* terem ocorrido em temperaturas mais baixas, o hidrodinamismo nestas ocasiões estava favorável ao seu crescimento. Vila *et al.*, (2001) também apontaram o hidrodinamismo e a disponibilidade de substrato como fatores determinantes para a abundância de espécies de dinoflagelados epibentônicos na costa da Espanha, no Mar Mediterrâneo.

Pode-se considerar que a temperatura é um fator importante para a formação de florações de *O. cf. ovata* e é aconselhável que a densidade dessa espécie seja monitorada durante meses de temperatura mais elevada. Por outro lado, a temperatura não deve ser avaliada isoladamente, e outras variáveis como disponibilidade de substrato, salinidade, luminosidade e hidrodinamismo e suas relações com a temperatura devem ser consideradas para o estabelecimento de critérios em possíveis programas de monitoramento de florações de *O. cf. ovata*.

CAPÍTULO 3

Investigação de mixotrofia em dinoflagelados epi-bentônicos com ênfase em *Ostreopsis cf. ovata*

3.1- Introdução

Ao longo de sua trajetória evolutiva, os organismos fitoplanctônicos desenvolveram diferentes estratégias para adquirir os elementos necessários ao seu crescimento (Jones, 1994). As células autotróficas utilizam nutrientes inorgânicos e luz para produzir energia a partir do processo de fotossíntese. Em contraste, os organismos heterotróficos utilizam matéria orgânica para suprir sua necessidade energética. Por outro lado, existem organismos que são capazes de combinar os processos de fotossíntese e heterotrofia para obter energia e estes são chamados mixotróficos (Jones, 1994).

O termo mixotrofia significa “nutrição mista” (Jones, 1994) e dois tipos de heterotrofia podem ser considerados em sua definição: o processo de fagotrofia, que é a ingestão de partículas orgânica com formação de vacúolos digestivos; e a osmotrofia, que é a absorção de matéria orgânica dissolvida (MOD) (Carvalho, 2007).

Jones (2000) revisou classificação feita por Jones (1997) que dividiu os organismos mixotróficos em quatro grupos considerando a fagotrofia como estratégia heterotrófica:

Grupo A - inclui os organismos que são predominantemente heterotróficos, mas são capazes de se manter por fotossíntese quando a concentração de presas é limitante;

Grupo B - inclui os organismos predominantemente fotossintetizantes que se beneficiam da fagotrofia para obtenção de carbono suplementar em condições de limitação por luz;

Grupo C- mixotróficos predominantemente fotossintetizantes que realizam fagotrofia a fim de suprir uma necessidade nutricional devido a baixa disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos específicos;

Grupo D- mixotróficos que ingerem presas para se manterem apenas quando apresentam baixa taxa de crescimento durante prolongado período de limitação de luz ou escuridão.

Existe, portanto, um gradiente de mixotrofia que varia entre os organismos que só obtêm energia por heterotrofia aos estritamente autotróficos. O dinoflagelado autotrófico *Gyrodinium galatheanum*, por exemplo, pode realizar fagotrofia para aumentar a eficiência fotossintética, especialmente em condições de escassez de nutrientes e baixa luminosidade (Li *et al.*, 1999). O dinoflagelado *Fragilidium subglobosum* é um tipo de mixotrófico facultativo, já que é capaz de crescer em condições estritamente heterotróficas ou autotróficas, mas tem seu crescimento aumentado em condições mixotróficas (Skovgaard, 1996). Já o dinoflagelado *Gymnodinium gracilentum* é tipicamente fagotrófico, mas retém cloroplastos de algas ingeridas a fim de obter uma fonte de carbono alternativa em situações de baixa densidade de presas (Skovgaard, 1998).

A mixotrofia pode ter diferentes finalidades. Dependendo da espécie e das condições as quais esta está submetida, a heterotrofia pode ser realizada a fim de obter suplemento de carbono orgânico, suprir necessidades nutricionais devido à baixa luminosidade, depleção de nutrientes inorgânicos ou elementos traço necessários ao crescimento (Stoecker *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Diferentes fatores podem influenciar a ocorrência de mixotrofia, tais como intensidade luminosa, concentração de nutrientes inorgânicos, densidade de presas, temperatura, pH e matéria orgânica dissolvida. Além disso, a resposta de organismos mixotróficos a esses fatores pode variar de espécie para espécie (Carvalho, 2007). Já foi descrito, por exemplo, que elevada intensidade luminosa inibe a fagotrofia em *Fragilidium subglobosum* (Skovgaard, 1996) enquanto estimula a fagotrofia em *Prorocentrum minimum* (Stoecker *et al.*, 1997).

A mixotrofia tem sido apontada para explicar florações de algumas espécies de dinoflagelados (Jacobson e Anderson, 1996) e acredita-se que pode ocorrer em organismos da maioria das ordens de dinoflagelados incluindo: Prorocentrales, Dinophysiales, Gymnodiniales, Noctilucales, Gonyaulacales, Peridinales, Blastodinales, Phytodinales e Dinamoebales (Stoecker, 1999). Dentre as mais de 1.000 espécies de dinoflagelados existentes (Steidinger e Baden, 1984), 40 são consideradas mixotróficas e espécies que foram inicialmente classificadas como estritamente autotróficas têm sido reclassificadas como mixotróficas (Jacobson e Anderson, 1996; Li *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 2004; 2005).

No processo de fagotrofia em dinoflagelados as presas ingeridas podem ser outros dinoflagelados, membros de outras classes de algas, ciliados, nematódeos e

larvas de poliquetas (Graham e Wilcox, 2000). Dependendo do tamanho da presa e da estrutura do dinoflagelado fagotrófico, as estratégias de captura podem variar. Espécies atecadas geralmente engolfam as presas inteiras e as digerem em um vacúolo digestivo. Nas espécies fagotróficas tecadas as presas podem ser ingeridas inteiras através de uma abertura ventroposterior, como ocorre em espécies de *Ceratium* (Bockstahler e Coats, 1993), ou ter parte do seu conteúdo celular sugado através de um tubo peduncular que se projeta da região ventral da célula na área do cíngulo (Graham e Wilcox, 2000). Esse pedúnculo pode servir também para a sustentação a substratos (Graham e Wilcox, 2000). O gênero *Dinophysis* e a espécie *Peridiniopsis berolinensis* (Jacobson e Andersen, 1994; Graham e Wilcox, 2000) são exemplos de dinoflagelados que utilizam pedúnculo para a captura de presas. Essa última espécie inicialmente estende um filamento citoplasmático para estabelecer contato com a presa e posteriormente ingere a presa inteira ou parte do seu conteúdo (Graham e Wilcox, 2000). *F. subglobosum* é um exemplo de dinoflagelado tecado com habilidade peculiar em ingerir presas inteiras. Essa espécie expande o espaço entre suas placas tecais permitindo a entrada da presa, o que é possível, acredita-se, por esse organismo possuir maior número de placas tecais de tamanho menor (Graham e Wilcox, 2000).

Considerando a osmotrofia, existem diferentes estratégias para internalização da matéria orgânica dissolvida (MOD) e o uso destas depende do tamanho da molécula a ser absorvida (Lindehoff, 2009). A matéria orgânica considerada dissolvida consiste de compostos orgânicos menores que 0,2 μm (Lindehoff, 2009). Estes são divididos em matéria orgânica de alto peso molecular (1KDa), como por exemplo ácidos úmicos e fúlvicos, peptídeos e matéria orgânica polimérica; e de baixo peso molecular (< 1KDa) como uréia, aminoácidos dissolvidos, aminas, amidas, purinas, ácidos nucleicos, polipeptídios e polissacarídeos (Glibert e Lengrand, 2006; Lindehoff, 2009).

Em teoria, a matéria orgânica de baixo peso molecular pode passar passivamente pela membrana celular durante o processo de osmose. Entretanto, isso só ocorre quando a MOD se encontra em elevadas concentrações fora da célula, o que não é frequente no ambiente (Lindehoff, 2009). Outro inconveniente para o processo de absorção direta de MOD é que no ambiente grande parte dos compostos orgânicos dissolvidos são de alto peso molecular e devido ao seu tamanho precisam ser transportados ativamente para o interior da célula (Glibert e

Lengrand, 2006). O processo de pinocitose é uma estratégia usada para internalização de MOD em organismos osmotróficos. Este processo consiste na formação de uma vesícula em torno da molécula a ser internalizada (Lindehoff, 2009). A pinocitose está no limiar entre a osmotrofia e a fagotrofia, que resulta na formação de vacúolos digestivos, e espécies como *Alexandrium* spp. podem usar a mesma via para capturar MOD ou presas (Glibert e Lengrand, 2006).

Algumas espécies de microalgas têm a habilidade de quebrar moléculas orgânicas na superfície da célula usando enzimas que podem oxidar ou hidrolisar moléculas orgânicas (Glibert e Lengrand, 2006). Em células de *Prorocentrum minimum*, por exemplo, a enzima leucina amino peptidase é um exemplo de protease que hidrolisa peptídeos e libera aminoácidos. Já a enzima fosfatase alcalina é responsável pela hidrólise de fontes orgânicas de fósforo, como fosfolipídios, e sua atividade aumenta em situação de limitação por fósforo (Dyhrman, 2005). Existem também enzimas com atividade intracelular que podem ter a função de hidrolisar a MOD dentro da célula (Glibert e Lengrand, 2006). Como exemplo, a enzima uréase, que é constitutiva de muitas espécies de microalgas e tem sua atividade aumentada em espécies de algas nocivas capazes de metabolizar uréia (Fan *et al.*, 2003).

A mixotrofia pode propiciar maiores taxas de crescimento (Glibert e Lengrand, 2006; Burkholder *et al.*, 2008). Em algas nocivas, a mixotrofia associada ao efeito alelopático das toxinas sobre seus predadores e competidores pode contribuir para formação e manutenção de florações (Burkholder *et al.*, 2008). Sheng *et al.* (2009) comprovaram que a karlotoxina, toxina produzida pelo dinoflagelado *Karlodinium veneficum*, possui efeito imobilizador sobre as presas desse organismo mixotrófico. Outros autores já sugeriram a liberação de toxinas por microalgas nocivas mixotróficas como estratégia para imobilização de presas (Skovgaard e Hansen, 2003; Tillman, 2003). Estep e MacIntyre (1989) sugeriram que espécies do gênero *Chrysochromulina* realizam um processo que eles denominaram dasmotrofia, que consiste em usar toxinas extracelulares para perfurar a membrana celular de presas, induzindo a liberação de compostos orgânicos que ficam então disponíveis para incorporação.

A capacidade mixotrófica de espécies de *Ostreopsis* já foi especulada e sugerida anteriormente. Faust *et al.* (1996) e Faust (1998) ao analisarem células de *Ostreopsis* provenientes da população natural de Belize por microscopia eletrônica

de transmissão (MET) e microscopia ótica, respectivamente, observaram células contendo diatomáceas cêntricas, ciliados e pequenas microalgas e sugeriram que a habilidade mixotrófica pode ser comum no gênero. Faust e Morton (1995) e Faust (1998) ainda observaram células de *Ostreopsis* contendo estrutura esférica de cor avermelhada e sugeriram que tais estruturas sejam presas ingeridas, possivelmente um ciliado. Estes autores especularam que em células de *Ostreopsis* as presas são internalizadas através de um poro ventral, observado através de MET. Tal poro possui tamanho variável e é possível que tenha capacidade de contração e extensão, sendo semelhante a um pedúnculo que seria usado para captura de presas e liberação da mucilagem produzida por células do dinoflagelado (Faust e Morton, 1995; Faust *et al.*, 1996; Faust, 1998). Barone (2007) observou, por microscopia ótica, uma estrutura alongada na parte ventral de células de *Ostreopsis* que poderia ser um pedúnculo usado no processo de fagotrofia, e ainda levantou a questão de que a produção de mucilagem e toxinas por *O. ovata* pode estar envolvida na imobilização de predadores e/ou presas.

A espécie *O. cf. ovata* é dominante na comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos na costa leste do Rio de Janeiro e forma densas florações com frequência na região (Nascimento *et al.* 2010). Estudos sobre as taxas de crescimento de cepas de dinoflagelados epi-bentônicos isoladas de Armação dos Búzios em condições controladas de laboratório mostraram que duas cepas de *O. ovata* apresentaram taxas de crescimento menores que as de cepas de *Prorocentrum lima*, *Coolia malayensis* e *Amphidinium* sp. (Corrêa *et al.*, 2007). Dessa forma, esse capítulo visou avaliar a habilidade de *O. ovata* em realizar mixotrofia, considerando que esta estratégia pode contribuir para o desenvolvimento de florações da espécie.

3.2- Objetivo

Avaliar o potencial mixotrófico de *Ostreopsis cf. ovata* a partir de experimentos em laboratório e usando populações naturais de dinoflagelados epi-bentônicos de Armação dos Búzios e Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, considerando que esta habilidade pode ser uma vantagem ecológica para o desenvolvimento de florações da espécie.

3.3- Material e Métodos

A fim de investigar a capacidade de *Ostreopsis cf. ovata* de realizar nutrição mixotrófica, foram inicialmente oferecidas presas potenciais à culturas da cepa LCA-E7 mantidas sob condição padrão de cultivo (ensaios 1 e 2). Posteriormente, os ensaios de mixotrofia compreenderam testes com a população natural de *O. cf. ovata* coletada em Arraial do Cabo e Armação dos Búzios, RJ (ensaios 3 e 4).

3.3.1) 1º Ensaio de mixotrofia: teste com culturas de *Ostreopsis cf. ovata* e possíveis presas detentoras de auto-fluorescência alaranjada

Foram realizados experimentos usando cepas cultivadas em laboratório de forma a oferecer presas potenciais ao dinoflagelado *O. cf. ovata* (cepa LCA-E7) segundo metodologia descrita por Li *et al.* (1996). Para tanto, uma alíquota de 2mL de uma cultura de *Rhodomonas sp.* (*Cryptophyta*) foi adicionada a 100 mL de uma cultura de *O. cf. ovata*, mantida na condição padrão de cultivo para avaliar o potencial de ingestão de células de *Rhodomonas sp.* por *O. cf. ovata*. Após 2 horas de incubação, as células de *O. cf. ovata* foram observadas em microscópio de epi-fluorescência (Axio Plan Zeiss, Germany) para verificar a presença de inclusões alaranjadas, já que criptófitas como *Rhodomonas sp.* possuem ficoeritrina, pigmento que possui autofluorescência amarelo-laranja quando excitado por luz azul ou ultravioleta. A cepa de *Rhodomonas sp.* foi cedida pelo Dr. Sérgio Lourenço da Universidade Federal Fluminense.

Além dos experimentos usando o microscópio de epi-fluorescência, o citômetro de fluxo foi usado com o intuito de monitorar a intensidade de fluorescência da clorofila-a e da ficoeritrina de uma mistura de culturas de *O. cf. ovata* (cepa LCA-E7) e *Rhodomonas sp.*, e identificar a ocorrência de um padrão que pudesse indicar predação de células de *Rhodomonas sp.* por *O. cf. ovata*. Para tanto, foram estabelecidas misturas de culturas de *O. cf. ovata* e *Rhodomonas sp.* nas proporções (v/v) 1:1, 2:1, 10:1 e 1000:1, e tais misturas foram analisadas no citômetro de fluxo no tempo zero e após 30, 60 e 90 minutos.

3.3.2) 2º Ensaio de Mixotrofia: uso do fluorocromo específico para material genético, DAPI

O resultado dos experimentos de observação da fluorescência natural da ficoeritrina não foi satisfatório, pois a fluorescência da ficoeritrina se confundiu com

a clorofila-a que apresenta fluorescência na faixa do vermelho. Por esse motivo, se fez necessária a marcação prévia de possíveis presas com marcador de fluorescência distinta da clorofila-a. Para tanto, células de *Rhodomonas* sp. foram marcadas com o fluorocromo DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole) que possui fluorescência azul.

Uma alíquota de 4mL de uma cultura de *Rhodomonas* sp. contendo 397.000 céls.mL⁻¹ foi marcada com 16 µL de DAPI 1 mg.mL⁻¹. Após uma hora, 1 mL da cultura marcada foi adicionado a 9 mL de uma cultura de *O. cf. ovata* (cepa LCA-E7) contendo 8.167 céls.mL⁻¹ (proporção 5:1). O controle consistiu da adição de 1mL do filtrado de uma cultura de *Rhodomonas* sp. a 9 mL de cultura de *O. cf. ovata*. Foram testados tempos de incubação de 1, 2, 3 e 4 horas. Após a incubação, 2 mL da mistura foram fixados com paraformaldeído 4% e as células de *O. cf. ovata* foram observadas em microscópio de epi-fluorescência (Axio Plan Zeiss, Germany) com luz UV (100–400 nm) para observação de presas marcadas no seu interior.

3.3.3) 3º Ensaio de Mixotrofia: teste com população natural de *Ostreopsis cf. ovata* e marcação dos núcleos de possíveis presas com DAPI

Com o intuito de avaliar a presença de presas em células da população natural de *Ostreopsis cf. ovata* de Armação dos Búzios e Arraial do Cabo, o fluorocromo DAPI foi utilizado a fim de marcar os núcleos de *O. cf. ovata* e de possíveis presas encontradas em seu interior. Antes da marcação das células com DAPI foi adotado procedimento para remoção de pigmentos das células e, conseqüentemente, da fluorescência da clorofila-a e pigmentos acessórios, evitando sua interferência na observação nítida dos núcleos. Este procedimento foi testado, anteriormente ao teste com amostras naturais, em laboratório usando a cepa LCA-B7 de *O. cf. ovata* e mostrou ser eficiente nesse propósito.

Para obtenção das células de *O. cf. ovata*, um total de 17 amostras de macroalgas foram coletadas, tendo sido 8 amostras de *Sargassum vulgare* provenientes da Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios e 4 amostras de *Sargassum vulgare*, 1 de *Spyridia* sp. e 4 de *Amphiroa* sp. coletadas na Pedra Vermelha, Ilha de Cabo Frio, Arraial do Cabo. Cada macroalga foi colocada em saco plástico ao qual foi adicionado em torno de 50 mL de água do mar filtrada, e as amostras foram agitadas durante 2 minutos para dissociação dos organismos epífitos.

A suspensão de epífitos foi filtrada em uma malha de 125 µm para retirar partículas maiores e o volume final foi medido. Do volume total (50 mL) 20 mL foram retirados e divididos em dois tubos falcon contendo 10 mL cada para tratamento das células e avaliação da presença de presas em seu interior.

*Remoção dos pigmentos das células de *Ostreopsis cf. ovata**

Aos tubos falcon contendo 10 mL da suspensão de epífitos foram adicionados 1,5 mL de solução de tampão fosfato (fosfato de sódio 100 mM suplementado com NaCl 1 mM) e as células foram fixadas com 3 mL de paraformaldeído 10% diluído em água destilada estéril. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas em refrigerador por 30 minutos e em seguida centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e aos pellets foram adicionados 5 mL de tampão fosfato diluído (10X) em água destilada estéril para lavagem das células. As amostras foram armazenadas novamente no refrigerador por 30 min.

Após centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e 5 mL de etanol 70% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi homogeneizada em vortex e armazenada novamente no refrigerador por 30 minutos. Após centrifugação (2000 rpm por 3 minutos), os pellets foram ressuspensos novamente em 5 mL de etanol 70% e armazenados no refrigerador por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas (2000 rpm por 3 minutos) e as células ressuspensas em 1 mL de etanol 70%, transferidas para eppendorffs estéreis e mantidas a - 20 °C até a análise. Tanto os procedimentos de fixação quanto despigmentação das células foram feitos no Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) em colaboração com o Dr. Wanderson Fernandes Carvalho.

*Marcação das células de *Ostreopsis cf. ovata* com DAPI*

Para marcação das células da população natural de *O. cf. ovata*, a suspensão de células fixadas e armazenadas em etanol 70% foi centrifugada por 1 min a 1300 rpm. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 100 µL de tampão fosfato diluído (10x).

Antes da observação das células, 2 µL de solução de DAPI (50 µg/mL) foram adicionados à solução de células e o eppendorff foi mantido no escuro durante 15 minutos. Logo após a marcação, foram preparadas lâminas para observação em

microscopia ótica e de epi-fluorescência com luz UV (Axio Plan Zeiss, Germany). Todo volume contido nos eppendorffs foi observado quanto a presença de células de *O. cf. ovata* contendo presas ou outras características que indicassem presença de vacúolos digestivos. Foram anotadas as características das 15 primeiras células de *O. cf. ovata* observadas em cada uma das 17 amostras, totalizando 255 células observadas.

*3.3.4) 4º Ensaio de Mixotrofia: investigação da presença de vacúolos digestivos em células da população natural de *Ostreopsis cf. ovata* utilizando LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO)*

Tendo em vista que o teste utilizando DAPI só é eficaz nos casos em que o núcleo da presa permanece intacto após esta ser ingerida por células de *O. cf. ovata*, o marcador de compartimentos ácidos LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (PDMPO) (LysoSensor) foi testado na tentativa de identificar a presença de vacúolos digestivos em células da população de *O. cf. ovata* de Arraial do Cabo.

Marcadores do tipo LysoSensor são bases fracas que podem ser seletivamente concentradas em organelas ácidas como resultado de protonação. Tal protonação resulta em fluorescência da molécula e, devido a esta estar positivamente carregada, não atravessa membranas facilmente, ficando retida em organelas ácidas. O LysoSensor™ Yellow/Blue, especificamente, possui faixa de pH mais ampla de atuação. Em organelas mais ácidas emite fluorescência predominantemente amarela quando excitado por luz azul (488nm), enquanto em organelas menos ácidas e quando excitado por luz UV (360 nm) emite fluorescência azul (Molecular Probes, 2007).

A fim de obter indivíduos da população natural de *O. cf. ovata* foram realizadas coletas de amostras de macroalgas da região de Arraial do Cabo nos meses de agosto e dezembro de 2010, visando comparar amostras em que a espécie é dominante, como ocorre frequentemente nos meses de verão (dezembro de 2010), com aquelas nas quais a densidade de *O. cf. ovata* costuma ser mais baixa, padrão típico de meses de inverno, representado pelas amostras coletadas em agosto de 2010.

Em agosto de 2010 foram coletadas 4 amostras de macroalgas na Prainha, 2 na Pedra Vermelha (Ilha de Cabo Frio) e 4 no Banco de Sargassum (Ilha de Cabo Frio). Amostra do plâncton com rede de 20 µm de abertura de malha para teste

prévio do sensor também foi coletada. Em dezembro de 2010 foram coletadas 3 amostras de macroalgas na Prainha, 3 amostras no Banco de Sargassum e 2 na Praia dos Anjos. As espécies de macroalgas correspondentes de cada amostra estão descritas na tabela 3.1.

As macroalgas foram coletadas juntamente com a porção de água em seu entorno, colocadas em sacos plásticos e agitadas por 2 minutos para dissociação dos organismos epífitos. Em seguida, o volume total da suspensão de epífitos foi medido e 50 mL foram fixados com lugol neutro para contagem de células. O volume restante foi filtrado inicialmente em uma malha de 125 µm para retirada de partículas maiores e posteriormente em malha de 20 µm para concentração das células de interesse. Os epífitos foram então ressuspensos em aproximadamente 30 mL de água do mar, transferidos para tubos falcon de 15 mL ou 50 mL e deixados em repouso para sedimentação das células.

Após obtenção do concentrado de células, 1 mL deste foi transferido para eppendorff ao qual foram adicionados 2 µL de LysoSensor. A mistura foi deixada incubando no escuro por 5 minutos e células de *O. cf. ovata* e outras espécies de dinoflagelados epi-bentônicos foram observadas em microscopia ótica e de epi-fluorescência com luz UV (Olympus BX51) para detecção de vacúolos digestivos (vesículas de fluorescência amarela ou azul).

As densidades médias por peso úmido de macroalga (cél. g PU⁻¹) de *O. cf. ovata* e outras espécies de dinoflagelados epi-bentônicos associados à três amostras de macroalgas coletadas na Prainha, Arraial do Cabo, nos meses de agosto e dezembro de 2010, foram calculadas após contagens usando-se microscópio óptico invertido.

Tabela 3.1. Macroalgas coletadas em agosto e dezembro de 2010 em Arraial do Cabo para obtenção de células de *Ostreopsis cf. ovata* e teste com LysoSensor. N^o: número de identificação da amostra de macroalga.

Agosto de 2010			Dezembro de 2010		
Estação	N ^o	Espécies de macroalgas	Estação	N ^o	Espécies de macroalgas
Prainha	1	<i>Amphiroa fragilissima</i>	Prainha	1	<i>Spyridia</i>
	2	<i>Amphiroa</i>		2	<i>Amphiroa</i>
	3	<i>Jania capillacea</i> + <i>Amphiroa fragilissima</i>		3	<i>Amphiroa</i>
	4	<i>Dictyota ciliolata</i> + <i>Canistrocarpus cervicornis</i> + <i>Spyridia hypnoides</i> + <i>Hypnea spinella</i> + <i>Champia vicillardii</i>			
Banco de <i>Sargassum</i>	1	<i>Spyridia</i>	Banco de <i>Sargassum</i>	1	<i>Sargassum</i>
	2	<i>Amphiroa fragilissima</i> + <i>Jania capillacea</i> + <i>Neosiphonia gorgoniae</i> + <i>Amphiroa beauvoisii</i>		2	<i>Sargassum</i> + <i>Amphiroa</i> + <i>Padina</i> + <i>Dictyota</i>
	3	<i>Amphiroa</i> + <i>Jania</i> + <i>Bryozoa</i>		3	<i>Padina</i>
	4	<i>Amphiroa</i>			
Pedra Vermelha	1	<i>Amphiroa</i>	Praia dos Anjos	1	<i>Spyridia</i>
	2	<i>Amphiroa</i> + <i>Hypnea spinella</i>		2	<i>Sargassum</i>

3.3.5) Ultraestrutura de *Ostreopsis cf. ovata*

Ao observar o interior das células de *O. cf. ovata* para análise de vacúolos digestivos, ficou evidente a necessidade de uma melhor compreensão de sua organização celular de forma a identificar suas organelas com mais precisão. Para tanto, foi utilizada técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Amostras da macroalga *Sargassum vulgare* foram coletadas na Prainha (Arraial do Cabo, Rio de Janeiro) em janeiro de 2010. As macroalgas foram colocadas em sacos plásticos aos quais foram adicionados 40 mL de água do mar filtrada e os organismos epífitos dissociados por agitação durante 2 minutos. A suspensão de epífitos foi filtrada em malha de 125 µm, e 10 mL do filtrado foram transferidos para tubos falcon de 50 mL e fixados com 20 mL de solução de fixação (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1%, cloreto de cálcio 5 mM, em tampão Cacodilato 0,1 M, contendo 5% de sacarose).

Após 64 horas de fixação, a mistura foi centrifugada a 2800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi retirado e as células das duas amostras transferidas para tubos falcon de 15 mL. Os pellets foram lavados três vezes com 2 mL de tampão

Cacodilato 0,1 M por 30 minutos. Antes da última lavagem as células foram transferidas para eppendorffs. Após centrifugação a 2500 rpm por 10 min o pellet foi ressuspenso em 1 mL de tampão Cacodilato e foram adicionadas duas gotas de tetróxido de ósmio 1% e duas gotas de ferricianeto de potássio 1,6% (pós fixação). O material foi incubado por 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Após o tempo de pós fixação as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min e as células foram lavadas duas vezes com tampão Cacodilato 0,1 M por 30 minutos.

Após centrifugação iniciou-se a sequência de desidratação em acetona 30%, seguida por acetona 50% e 70%. No dia seguinte, as células foram desidratadas em acetona 90% e três vezes com acetona 100% (30 min em cada diluição). Após a desidratação, as células foram incluídas em resina de Epóxi. Para isso, foram adicionadas às células diferentes diluições de acetona:epóxi (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e apenas epóxi). O tempo de incubação foi de 6 horas para cada etapa, com exceção da etapa de diluição de 1:1 na qual o tempo de incubação foi de 24 horas. Após inclusão, a resina foi seca em estufa a 70 °C por 48 horas. Os eppendorffs foram cortados e o material foi moldado em forma de pirâmide e cortado em ultramicrótomo (REICH ercuts Leica).

Finalmente, para contrastar as amostras, uma gota de acetato de uranila 5% foi adicionada a cada corte ultrafino coletado em grades de cobre e estes foram deixados no escuro por 20 min. Em seguida, as amostras foram secas e coradas com uma gota de citrato de chumbo. Após 5 minutos o material foi lavado com água destilada e após secar por 1 hora as células foram observadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss – TEM 900).

O preparo das amostras e interpretação das imagens para ultraestrutura de *O. cf. ovata* foram feitos em colaboração com o Prof./Dr. Edésio José Tenório de Melo e a doutoranda Cristiane Virgílio do Laboratório de Biologia Celular da UENF.

3.4- Resultados

No 1º ensaio de mixotrofia, a predação de *Rhodomonas* sp. por células de *O. cf. ovata* não pôde ser confirmada em microscopia de epi-fluorescência, já que a fluorescência laranja da ficoeritrina presente nas espécies de criptófitas é semelhante a fluorescência vermelha da clorofila-a. Sendo assim, caso tenha ocorrido predação, essa não pôde ser registrada (Figura 3.1).

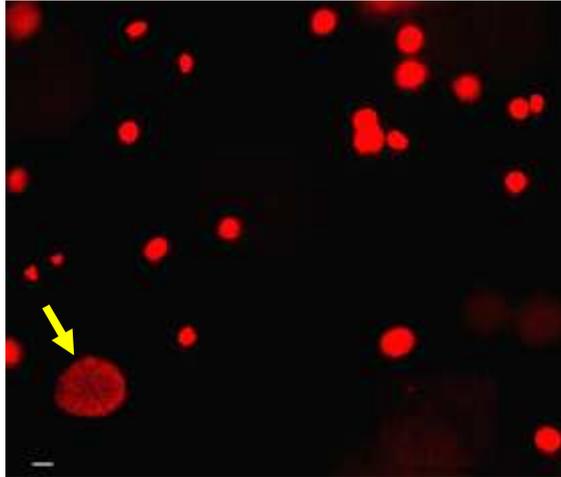


Figura 3.1: Micrografia em microscopia de epi-fluorescência de cultura mista de *Ostreopsis cf. ovata* (célula indicada pela seta), cepa LCA-E, e *Rhodomonas sp.* (células menores e alaranjadas). Cultivo em laboratório. Aumento de 200x. Escala = 10 µm.

Quanto aos resultados obtidos no citômetro de fluxo, nas misturas de culturas de *O. cf. ovata* e *Rhodomonas sp.* nas proporções de 1:1, 2:1 e 10:1 (v/v) não foi encontrado padrão que indicasse predação de *Rhodomonas sp.* por *O. cf. ovata*. Além disso, nessas proporções a população de *O. cf. ovata* não pôde ser claramente identificada nos gráficos devido ao baixo número de células dessa espécie. Na proporção de 1000:1 foi notado, durante o tempo de monitoramento, a formação de uma terceira população com fluorescência mais intensa que poderia representar a presença de células de *O. cf. ovata* que se alimentaram de células de *Rhodomonas sp.* (Figura 3.2). Entretanto, não se pode afirmar que a predação é a única razão para o padrão de fluorescência distinto encontrado, já que as pequenas células de *Rhodomonas sp.* são frágeis e quando se rompem seus cloroplastos ficam expostos e sua fluorescência fica mais intensa devido a ausência do envoltório celular. Além disso, com a morte das células, a fração de detritos ganha mais componentes, podendo gerar um padrão de fluorescência distinto durante o tempo monitorado com o citômetro de fluxo. Sendo assim, optou-se pelo uso de técnica de microscopia para o estudo de mixotrofia por *O. cf. ovata*.

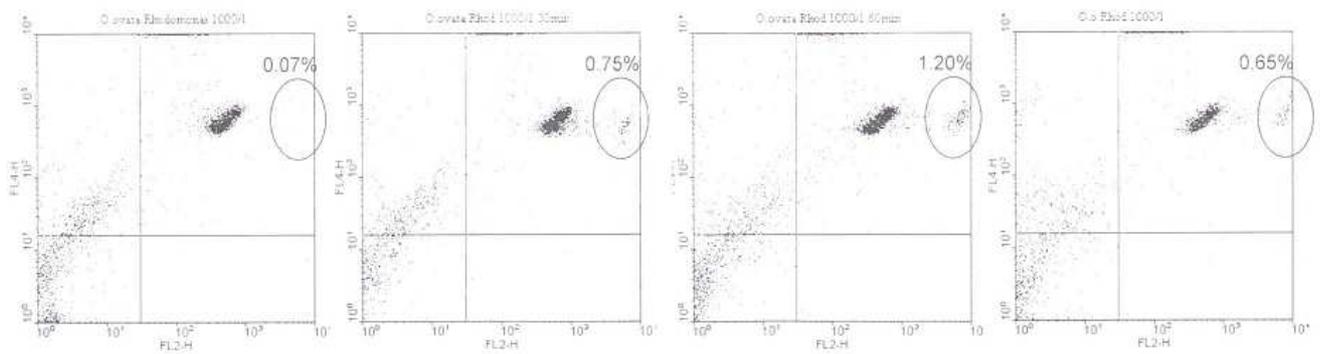


Figura 3.2. Resultado obtido por citometria de fluxo de mistura de culturas de *Ostreopsis cf. ovata* e *Rhodomonas sp.* na proporção de 1000:1. a - tempo zero, b - após 30 min, c - após 60 min, d - após 90 min. Aumento de população de fluorescência distinta ao longo do tempo de incubação (em destaque pelo círculo). Notar que a porcentagem da nova população formada aumenta de 0,07% no tempo zero para 0,65 % após 90 min de incubação. FL2-H (eixo x) - fluorescência emitida na faixa de $\cong 585$ nm que corresponde a luz laranja (ficoeritrina). FL4-H (eixo y) - fluorescência emitida na faixa de $\cong 600$ nm correspondente a luz vermelha (clorofila-a).

O marcador de material genético, DAPI, que apresenta fluorescência azul, foi testado no 2º ensaio de mixotrofia com o propósito de marcar células das presas (*Rhodomonas sp.*), facilitando sua visualização após a ingestão destas por *O. cf. ovata*. Entretanto, o DAPI presente no meio de cultivo causou marcação inespecífica da bainha de mucilagem das células de *O. cf. ovata*, o que impossibilitou a visualização nítida do interior destas células (Figura 3.3).

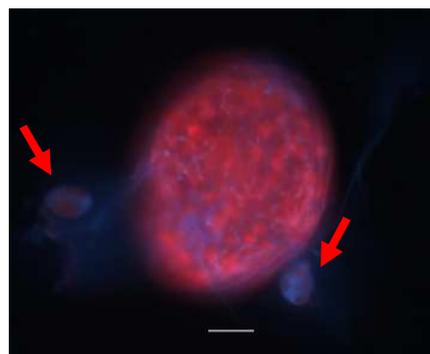


Figura 3.3. Micrografia em microscopia de epi-fluorescência de célula de *Ostreopsis cf. ovata* com duas células de *Rhodomonas sp.* (indicadas pelas setas). Notar marcação azul (DAPI) da bainha de mucilagem de *O. cf. ovata*. Cultivo em laboratório. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

No 3º ensaio de mixotrofia, o resultado do teste usando culturas de *O. cf. ovata* para retirada dos pigmentos das células com a finalidade de marcar com DAPI e visualizar apenas o núcleo dessas células foi satisfatório, já que possibilitou

a marcação do núcleo e a observação da posição desta organela na célula, além de ter eliminado a interferência da fluorescência vermelha da clorofila-a (Figura 3.4).

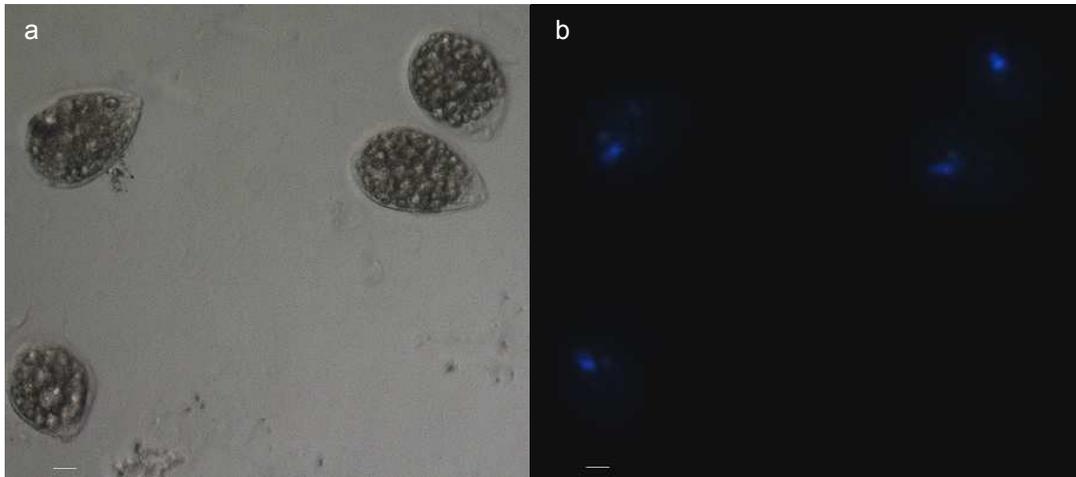


Figura 3.4: Núcleo de *Ostreopsis* cf. *ovata* (cepa LCA-B7) marcado com DAPI. Cultivo em laboratório. a - Microscopia ótica. b - Microscopia de epi-fluorescência. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

Dessa forma, a metodologia de despigmentação foi utilizada para avaliar a ingestão de presas pela população natural de *O. cf. ovata* da região de Arraial do Cabo e Armação dos Búzios, RJ. Nesse ensaio de mixotrofia realizado em janeiro de 2010 foram observadas 255 células da população natural de *O. cf. ovata* associadas as macroalgas da Praia da Tartaruga, em Armação dos Búzios, e da Pedra Vermelha, na Ilha de Cabo Frio, Arraial do Cabo.

O fluorocromo específico para material genético (DAPI) marcou com sucesso o núcleo de todas as células de *O. cf. ovata*. Entretanto, apenas uma célula apresentou outra inclusão azul que poderia ser o núcleo de uma presa (Tabela 3.2, Figura 3.5).

Em uma amostra da macroalga *Amphiroa* sp. coletada na Pedra Vermelha foram encontradas três células de *O. cf. ovata* contendo uma estrutura de autofluorescência alaranjada em seu interior (Figura 3.6). Tal estrutura apresentava coloração avermelhada quando observada na microscopia ótica e também foi observada em uma célula de *O. cf. ovata* de uma amostra da macroalga *Sargassum vulgare* coletada na praia da Tartaruga (Tabela 3.2). A princípio, tal fluorescência alaranjada foi interpretada como associada ao pigmento ficoeritrina (pigmento que fluoresce na faixa do laranja) proveniente de uma presa.

Outras estruturas que podem indicar o comportamento mixotrófico de *O. cf. ovata* foram registradas. Das 255 células de *O. cf. ovata* observadas, 42 células

apresentaram vesículas bem demarcadas em microscopia ótica que variaram em tamanho e que podem ser vacúolos digestivos ou vesículas de regulação osmótica. (Tabela 3.2, Figura 3.7). Numerosos e pequenos pontos azuis foram encontrados em 80 células de *O. cf. ovata* (Tabela 3.2, Figura 3.8). Tais pontos podem ser material genético de bactérias aderidas à superfície das células ou contidas em seu interior.

Quando observadas na epi-fluorescência, as 255 células de *O. cf. ovata* apresentaram estruturas circulares de coloração esbranquiçada sob epi-fluorescência que variaram de 1 a 8 por célula. Tais estruturas parecem ser características da espécie e são semelhantes a grânulos de amido (Tabela 3.2, Figura 3.8).

Tabela 3.2. Sumário dos resultados de janeiro de 2010: *Ostreopsis cf. ovata* após despigmentação e marcação com DAPI. Número total de células de *O. cf. ovata* observadas: 255.

Nº de células de <i>O. cf. ovata</i>	Estruturas observadas
1	Inclusão de fluorescência azul além do núcleo de <i>O. cf. ovata</i>
3	Inclusão de fluorescência alaranjada
42	Vesículas bem demarcadas sob microscópio ótico
80	Pontos de fluorescência azul
255	Estruturas de coloração esbranquiçada

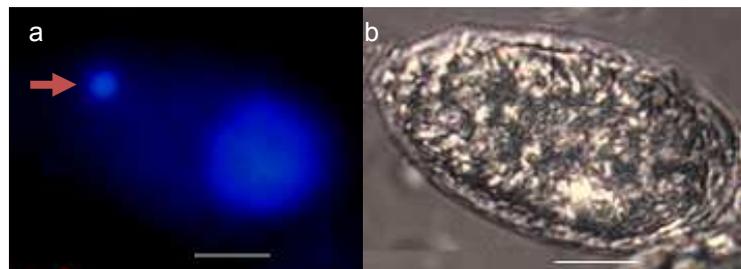


Figura 3.5. Célula de *Ostreopsis cf. ovata* contendo núcleo de possível presa marcado com DAPI (indicado pela seta). População natural, janeiro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência. b - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 µm.

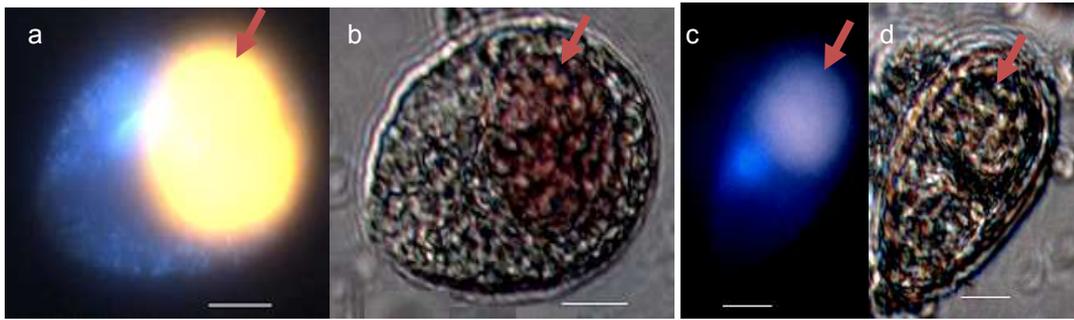


Figura 3.6. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* com conteúdo avermelhado de fluorescência alaranjada (indicado pelas setas). População natural, janeiro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

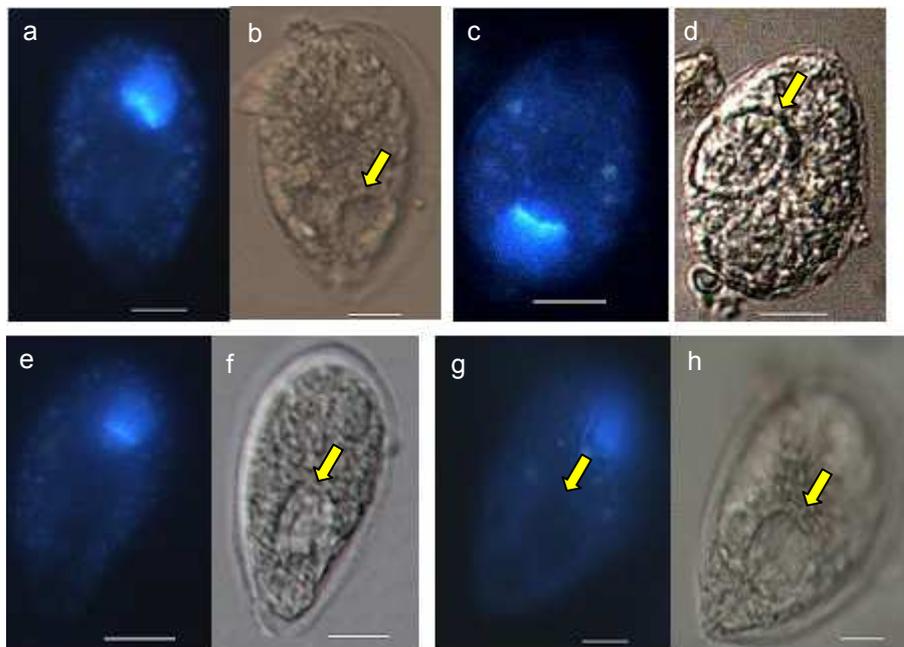


Figura 3.7. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo vesículas (indicadas pelas setas). População natural, janeiro de 2010. a, c, e & g - Microscopia de epi-fluorescência. b, d, f & h - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

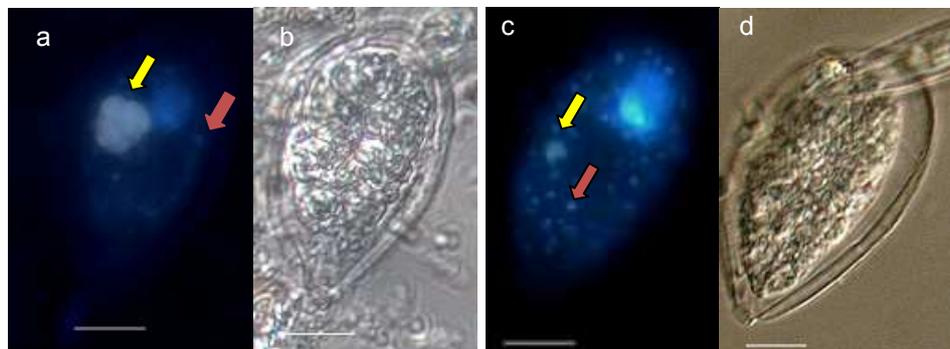


Figura 3.8. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo estrutura circular de coloração esbranquiçada (setas amarelas) e numerosos pontos azuis (setas vermelhas). População natural, janeiro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

Para que o DAPI marcasse o núcleo de possíveis presas no interior de células de *O. cf. ovata*, seria necessário que as presas fossem ou ingeridas inteiras ou que tivessem seu conteúdo sugado através de um tubo peduncular, levando consigo o núcleo da presa. Nos casos em que apenas o conteúdo citoplasmático de presas (sem ingestão do núcleo) é sugado, o DAPI não é eficaz. Dessa forma, decidiu-se testar o sensor de compartimentos ácidos, LysoSensor, no 4º ensaio de mixotrofia, com intuito de marcar vacúolos digestivos (que tipicamente apresentam pH ácido) independente da maneira como a presa foi ingerida.

A efetividade do LysoSensor foi inicialmente testada em uma amostra de rede (20 µm) de Arraial do Cabo. A amostra continha células de organismos heterotróficos e o trato digestivo dos ciliados encontrados foi marcado pelo sensor, confirmando o desempenho do mesmo (Figura 3.9).

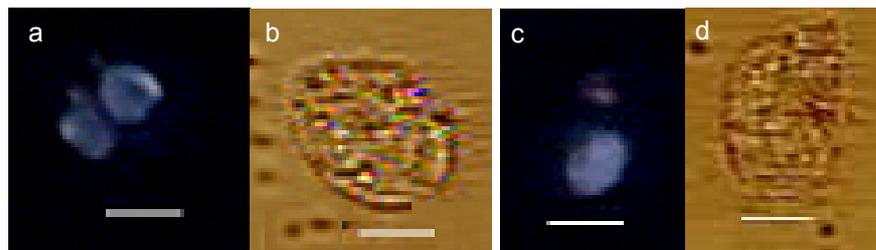


Figura 3.9. Ciliados com trato digestivo marcado em azul pelo LysoSensor. População natural, agosto de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 µm.

O LysoSensor foi testado em duas ocasiões no ano de 2010 (inverno e verão) visando verificar possíveis diferenças no padrão de mixotrofia em células de *O. cf. ovata* e de outros dinoflagelados epi-bentônicos em momentos com diferentes densidades desses organismos. No mês de agosto de 2010 a comunidade de organismos epífitos associados à macroalgas em Arraial do Cabo foi marcada pela prevalência de diatomáceas (Figura 3.10a) e a baixa densidade de dinoflagelados epi-bentônicos. Em contrapartida, em dezembro de 2010 *Ostreopsis cf. ovata* foi a espécie dominante na maioria das amostras, apresentando elevadas densidades. Maiores densidades de *Coolia* sp. e *Prorocentrum* spp. também foram encontradas (Figura 3.10b). Nas amostras do Banco de *Sargassum*, nas quais a densidades de dinoflagelados epi-bentônicos não foi quantificada, *Prorocentrum* sp. foi um componente importante da comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos, junto com *O. cf. ovata*.

A densidade média de *O. cf. ovata* associado a três amostras da macroalga *Amphiroa* sp. coletadas na Prainha (Arraial do Cabo) em agosto de 2010 foi de 59 céls.g PU⁻¹. Os dinoflagelados epi-bentônicos *Coolia* sp. e *Prorocentrum* spp. apresentaram densidades média de 10 e 5 céls.g PU⁻¹, respectivamente. Em dezembro de 2010 as densidades médias de *Ostreopsis cf. ovata*, *Coolia* sp. e *Prorocentrum* spp. em duas amostras de *Amphiroa* sp. da Prainha foram de 18.490, 1.703 e 134 céls.g PU⁻¹, respectivamente. Nesse mês, uma amostra da macroalga *Spyridia* sp. coletada no mesmo local apresentou densidades de *O. cf. ovata*, *Coolia* sp. e *Prorocentrum* spp. de 338.230, 18.737 e 569 céls.g PU⁻¹, respectivamente.

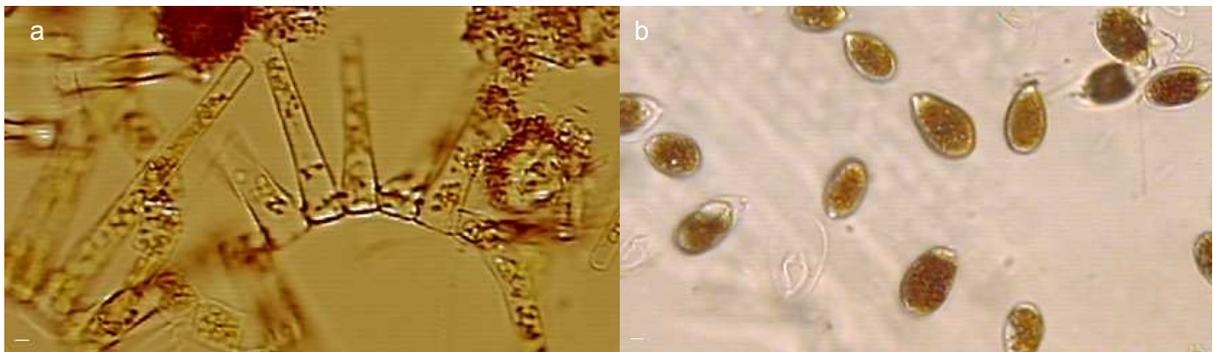


Figura 3.10. Aspecto da comunidade de organismos epífitos associada a amostras da macroalga *Amphiroa* sp. coletadas na Prainha, Arraial do Cabo. a - Agosto de 2010. b - Dezembro de 2010. Aumento de 200x. Escala = 10 µm.

Em agosto de 2010 foram observadas 227 células de *O. cf. ovata*. Deste total, apenas uma célula, associada à macroalga *Amphiroa* sp. coletada na Pedra Vermelha, Arraial do Cabo (Tabela 3.1), apresentou vesícula com fluorescência azul (Figura 3.11, Tabela 3.3). Tal fluorescência desapareceu após aproximadamente 3 minutos de observação. Isso acontece porque o LysoSensor marca células vivas e após certo tempo de exposição a luz UV as células entram em colapso.

Todas as células de *O. cf. ovata* observadas em agosto de 2010 apresentaram estruturas de coloração esbranquiçada sob fluorescência (Figura 3.11b & d) (Tabela 3.3). Tal fluorescência foi verificada tanto em amostras que não haviam sido incubadas com o sensor quanto naquelas marcadas com o LysoSensor. A fluorescência esbranquiçada está associada a uma estrutura celular que já havia sido observada anteriormente, quando o DAPI foi testado e especulou-se que possam ser grânulos de amido, produto de reserva de dinoflagelados (Figura 3.8).

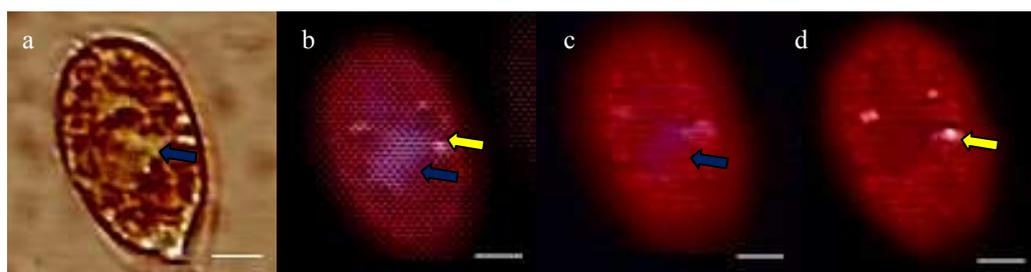


Figura 3.11. Célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* contendo vesícula bem demarcada marcada por LysoSensor (setas azuis). População natural, agosto de 2010. a - Microscopia ótica. b, c & d - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b & c.- Vesícula marcada em azul por LysoSensor. d - Perda da fluorescência após aproximadamente 3 minutos de observação. b & d - Observação de estruturas de coloração esbranquiçada sob fluorescência (setas amarelas). Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

Tabela 3.3. Sumário dos resultados de agosto de 2010: *Ostreopsis* cf. *ovata* após marcação com LysoSensor.

<i>Local de coleta</i>	<i>Prainha</i>	<i>Banco de Sargassum</i>	<i>Pedra Vermelha</i>	Total
Número de amostras de macroalgas	4	4	2	10
Total de células de <i>O. cf. ovata</i> observadas	73	87	67	227
Células de <i>O. cf. ovata</i> marcadas pelo Lysor Sensor (n ^o)	0	0	1	1
Varição do n ^o de estruturas de coloração esbranquiçada	1-8	1-8	1-7	-

Em dezembro de 2010, foram observadas 713 células de *O. cf. ovata* correspondentes as três amostras de macroalgas coletadas na Prainha, três amostras coletadas no Banco de *Sargassum* e duas da Praia dos Anjos, Arraial do Cabo (Tabela 3.1). Dentre as 713 células observadas, 325 foram marcadas pelo sensor (Tabela 3.4). A fluorescência apresentada pelas células marcadas, diferente do esperado, não se concentrou em locais específicos das células, o que caracterizaria a presença de vacúolos digestivos, mas foi observada difusa pelas extremidades e inespecificamente no citoplasma das células (Figura 3.12). Apenas três células de *O. cf. ovata* associadas à macroalga *Amphiroa* coletada na Prainha, aparentaram ter vesículas marcadas pelo sensor, também observadas na microscopia ótica. Neste caso, a fluorescência foi mais intensa na região da vesícula, mas outras partes da célula também foram marcadas pelo sensor (Figura 3.12a, b, c & d). A figura 3.12i mostra células de *O. cf. ovata* marcadas pelo sensor ao lado de células não marcadas.

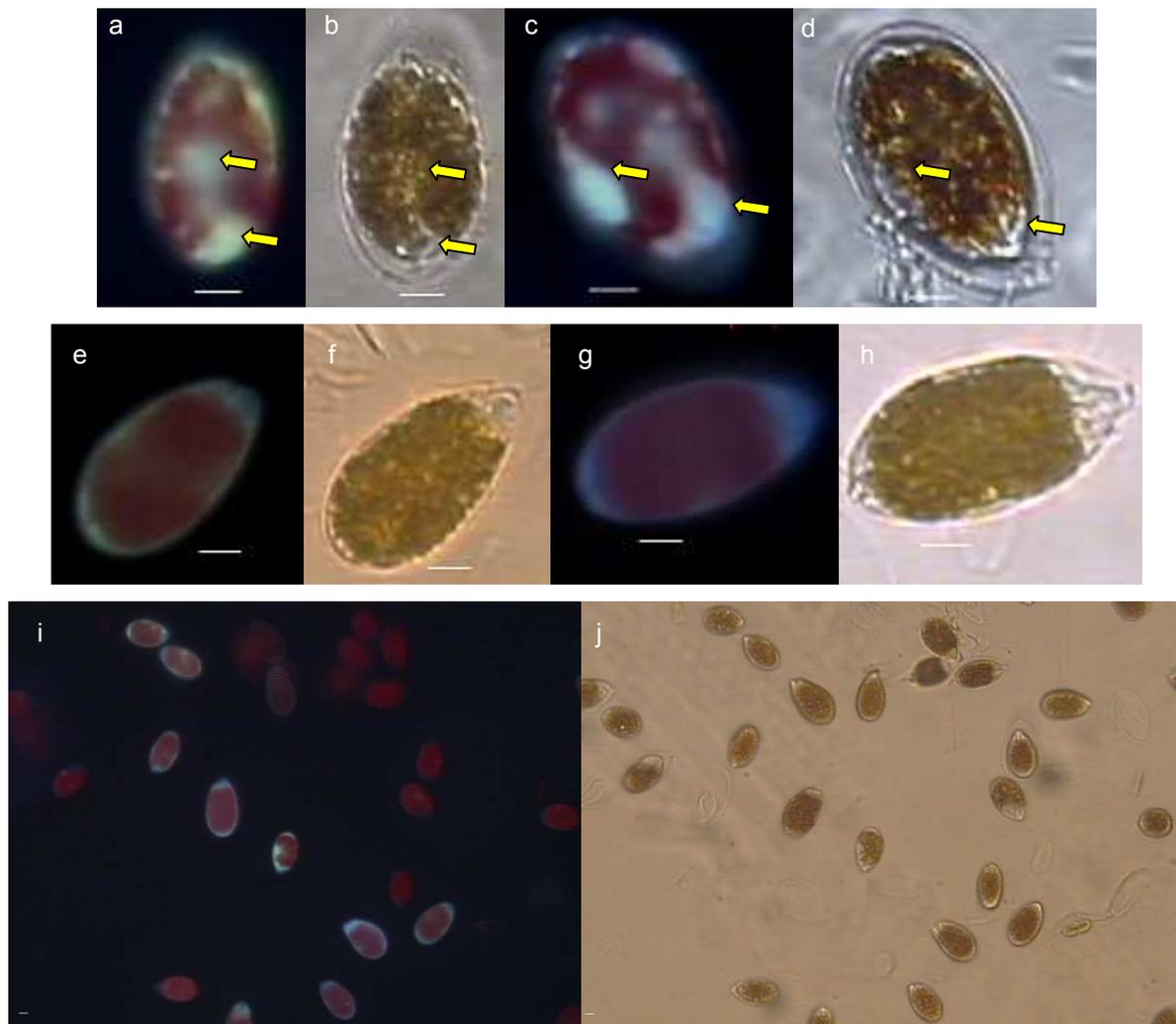


Figura 3.12. Células de *Ostreopsis cf. ovata* marcadas pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a, b, c & d - Células contendo vesículas marcadas pelo LysoSensor (indicadas pelas setas). e, f, g, h, i & j - Células apresentando marcação difusa por LysoSensor. a, c, e, g & i - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b, d, f, h & j - Microscopia ótica. a - h: Aumento de 400x. i & j: Aumento de 200x. Escala = 10 μ m.

Células em processo de degradação também foram marcadas pelo LysoSensor. Neste caso, a fluorescência se concentrou em partes das células onde o conteúdo celular não estava mais presente (Figura 3.13). Tais células não foram contadas. Por outro lado, as demais células fluorescentes que foram quantificadas estavam vivas demonstrando aspecto normal e mobilidade.

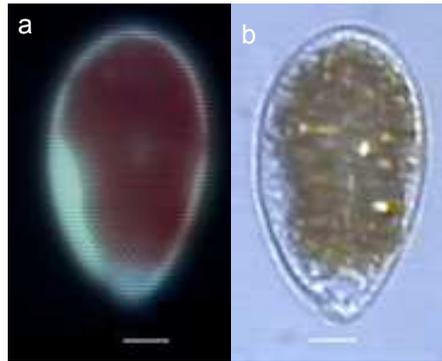


Figura 3.13. Célula de *Ostreopsis* cf. *ovata* marcada por LysoSensor provavelmente devido ao processo de morte celular. População natural, dezembro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência com filtro UV. b – Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

Em dezembro de 2010, devido à maior ocorrência de dinoflagelados epi-bentônicos, células de outros gêneros, além de *O. cf. ovata*, também foram contadas. Indivíduos dos gêneros *Prorocentrum*, *Coolia* e *Amphidinium* presentes nas amostras coletadas no Banco de *Sargassum* e na Praia dos Anjos foram contados. Um total de 330 células de *Prorocentrum* spp. foi registrado e dentre estas 52 foram marcadas pelo sensor. Foram contadas 134 células de *Coolia* sp., das quais 33 foram marcadas pelo sensor, e 3 células de *Amphidinium* sp., todas marcadas (Tabela 3.4). É provável que devido a elevada mobilidade de *Amphidinium* sp. outras células desse gênero estivessem presentes nas amostras, mas não puderam ser observadas. Por este mesmo motivo as células observadas não foram fotografadas. A fluorescência proveniente do LysoSensor nas células de *Prorocentrum* sp., *Coolia* sp. e *Amphidinium* sp. apresentou padrão difuso semelhante ao observado nas células de *O. cf. ovata* (Figura 3.14). Somente três células de *Coolia* sp. associadas às macroalgas *Sargassum* sp. e *Padina* sp. coletadas na estação Banco de *Sargassum* apresentaram vesículas definidas e fluorescentes (Figura 3.15).

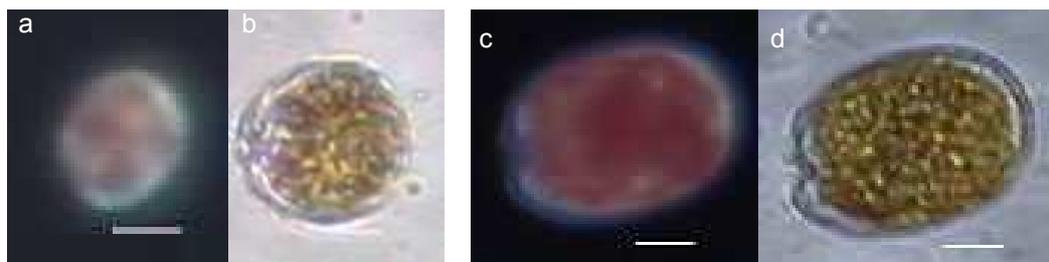


Figura 3.14. a & b - Célula de *Coolia* sp com marcação difusa por LysoSensor. c & d - Célula de *Prorocentrum rathymum* com marcação difusa por LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a & c - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b & d - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala= 10 μ m.

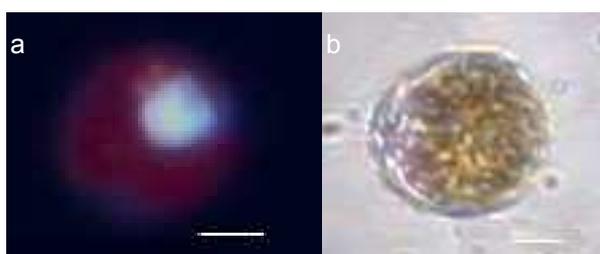


Figura 3.15. Célula de *Coolia* sp. com vacúolo azul marcado pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b - Microscopia ótica. Aumento de 400x. Escala = 10 μ m.

Considerando a parcela da população de *O. cf. ovata* marcada pelo sensor em cada estação de amostragem em dezembro de 2010, as amostras do Banco de *Sargassum* apresentaram maior porcentagem de células marcadas (59%), seguidas pelas amostras da Prainha (42%) e Praia dos Anjos (25%). As células de *Prorocentrum* spp. e *Coolia* sp. das amostras da Prainha não foram quantificadas devido a baixa densidade desses gêneros nessa estação. No entanto, assim como ocorreu com *O. cf. ovata*, a porcentagem de células de *Prorocentrum* spp. e *Coolia* sp. marcadas pelo LysoSensor no Banco de *Sargassum* foi maior que a encontrada na Praia dos Anjos para ambos os gêneros. No Banco de *Sargassum* a porcentagem de células de *Coolia* sp. e *Prorocentrum* sp. marcadas pelo sensor foi de 31 e 17% e na Praia dos Anjos de 19 e 10%, respectivamente (Tabela 3.4).

Dentre as células de *O. cf. ovata* observadas em dezembro de 2010, duas provenientes da Prainha (amostras da macroalga *Amphiroa* sp.) e três da Praia dos Anjos (amostra da macroalga *Spyridia* sp.) apresentaram inclusão de autofluorescência alaranjada semelhante às células que foram observadas em janeiro de 2010 no ensaio usando DAPI (Figura 3.16, Tabela 3.4). Tais estruturas não foram marcadas pelo LysoSensor.

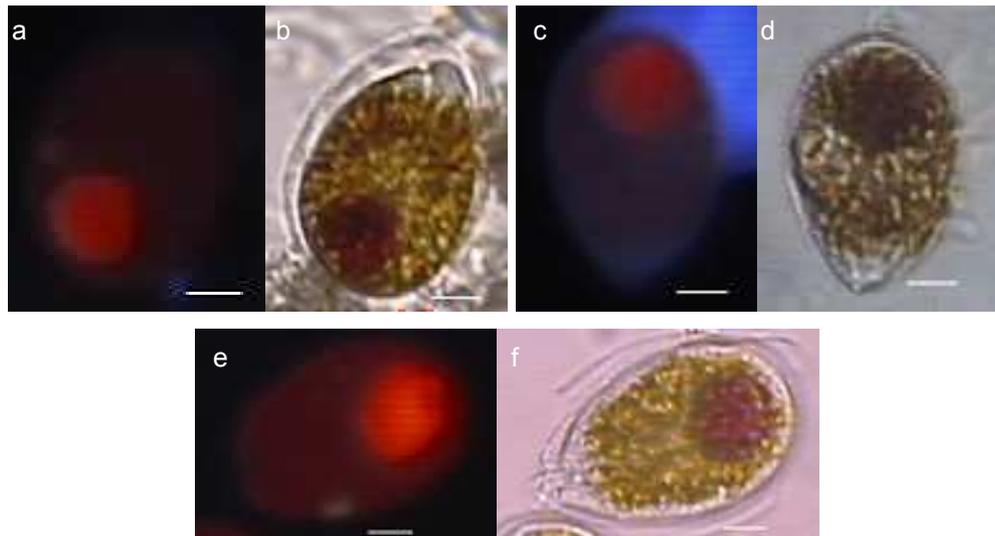


Figura 3.16. Células de *Ostreopsis* cf. *ovata* com conteúdo avermelhado de fluorescência alaranjada não marcado pelo LysoSensor. População natural, dezembro de 2010. a, c & e - Microscopia de epi-fluorescência com luz UV. b, d & f - Microscopia ótica. Aumento de 400x.

Todas as células de *O. cf. ovata* observadas em dezembro de 2010 apresentaram estruturas de coloração esbranquiçada sob fluorescência (Tabela 3.4), tal como em agosto (teste com LysoSensor) e janeiro de 2010 (teste com DAPI). Estas estruturas foram observadas tanto em amostras que não haviam sido incubadas com o sensor quanto naquelas marcadas com o LysoSensor, e também foram encontradas em células de *Coolia* sp. e *Prorocentrum* sp. (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Sumário dos resultados de dezembro de 2010: *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum sp.* e *Coolia sp.* após marcação com LysoSensor. NQ- Não quantificado.

	Local de coleta				Total
	Prainha	Banco de Sargassum	Praia dos Anjos	Total	
Número de amostras de macroalgas	3	3	2	8	
Total de células de <i>O. cf. ovata</i> observadas	358	249	106	713	
Células de <i>O. cf. ovata</i> com vesícula marcada pelo Lyso Sensor (n°)	3	-	-	3	
Células de <i>O. cf. ovata</i> com marcação difusa pelo Lyso Sensor (n°)	152	146	27	35	
% de células de <i>O. cf. ovata</i> marcadas	42	59	25	46	
Variação do n° de estruturas de coloração esbranquiçada	1-5	1-9	1-7	-	
Células de <i>O. cf. ovata</i> com inclusão de autofluorescência alaranjada (n°)	2	-	3	5	
Total de células de <i>Prorocentrum sp.</i> observadas	NQ	278	52	330	
Células de <i>Prorocentrum sp.</i> com marcação difusa pelo Lyso Sensor (n°)	NQ	47	5	52	
% de células de <i>Prorocentrum sp.</i> marcadas	NQ	17	10	16	
Variação do n° de estruturas de coloração esbranquiçada	NQ	1-12	1-8	-	
Total de células de <i>Coolia sp.</i> observadas	NQ	57	77	134	
Células de <i>Coolia sp.</i> com vesícula marcada pelo Lyso Sensor (n°)	NQ	3	-	3	
Células de <i>Coolia sp.</i> marcadas pelo Lyso Sensor (n°)	NQ	15	15	30	
% de células de <i>Coolia sp.</i> marcadas	NQ	31	19	25	
Variação do n° de estruturas de coloração esbranquiçada	NQ	1-12	1-4	-	

Nas observações feitas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi possível identificar algumas das estruturas de *O. cf. ovata*. Das duas amostras preparadas para observação no MET, apenas a segunda resultou em imagens de qualidade, enquanto o resultado da primeira amostra não foi satisfatório, pois o conteúdo citoplasmático das células foi extraído durante a preparação. Nas imagens da segunda amostra, apesar das células também terem apresentado alguma perda do citoplasma, foi possível observar as seguintes estruturas: membrana plasmática, cloroplastos, grânulos de amido e o núcleo (Figura 3.17).

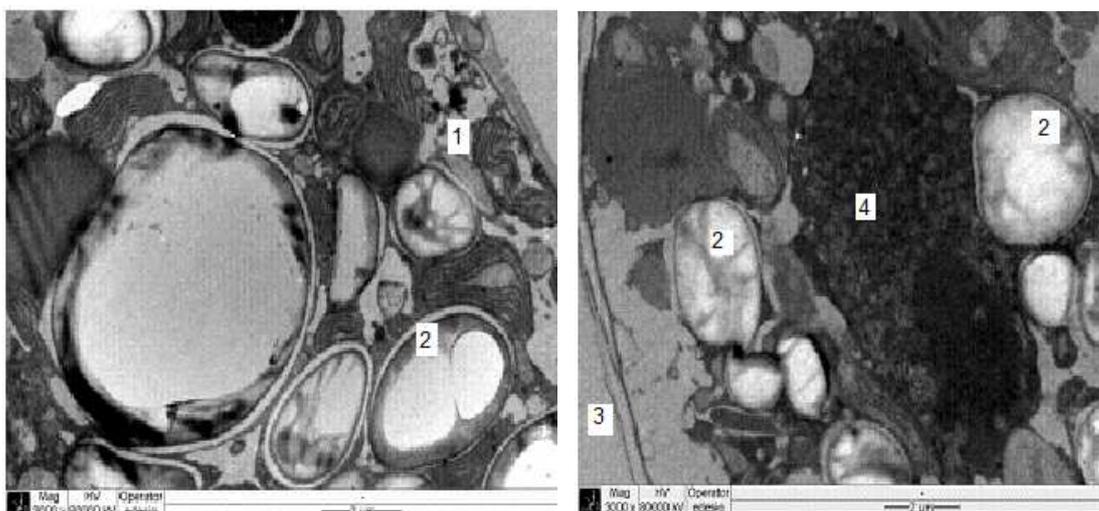


Figura 3.17: Imagens do conteúdo celular de *Ostreopsis* cf. *ovata* obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. 1- cloroplasto, 2 – grânulos de amido, 3 – membrana plasmática, 4 – núcleo.

Nas imagens obtidas por MET pôde-se notar a presença de vários grânulos de amido que podem ser as estruturas de coloração esbranquiçada observadas sob o microscópio de epi-fluorescência (Figura 3.8; 3.11b& d).

3.5- Discussão

Durante os ensaios de mixotrofia realizados com a população natural de *O. cf. ovata* foram encontradas poucas células com evidências de fagotrofia. Em janeiro de 2010, quando o fluorocromo DAPI foi utilizado em amostras naturais, apenas uma célula apresentou inclusão com fluorescência azul que poderia ser o núcleo de uma presa. Faust (1998) realizou a marcação de amostras naturais de dinoflagelados epi-bentônicos, incluindo *Ostreopsis*, com DAPI com o intuito de estudar a habilidade mixotrófica desses organismos e observou a marcação do núcleo de uma presa apenas em células de *Gambierdiscus toxicus*. No ensaio

usando o LysoSensor apenas uma célula de *O. cf. ovata*, obtida em agosto de 2010, e três células obtidas em dezembro de 2010, além de três células de *Coolia* sp., apresentaram vesículas marcadas pelo sensor. A efetividade do LysoSensor como marcador de vacúolos digestivos já foi estudada anteriormente com sucesso quando vacúolos digestivos marcados em células de *Oxyrrhis marina*, *Dinophysis novergica* e *Prymnesium parvum* foram facilmente identificados por microscopia de epi-fluorescência (Carvalho, 2007).

Estudos anteriores já reportaram fagotrofia em células de *Ostreopsis labens* (Faust e Morton, 1995), *O. ovata*, *O. lenticulares* e *O. siamensis* (Faust *et al.*, 1996) ao analisarem populações naturais dessas espécies por microscopia ótica e registraram a presença de presas como cianobactérias, diatomáceas cêntricas, ciliados e pequenas microalgas, além de presa arredondada de coloração avermelhada (Faust e Morton, 1995; Faust *et al.*, 1996; Faust, 1998). Faust (1998) reportou que de 7 a 55% das células de *Ostreopsis* associadas à diferentes macroalgas coletadas em Belize continham presas em seu interior. Contudo, esses trabalhos foram realizados há mais de uma década e atualmente reconhece-se a dificuldade em se estudar fagotrofia em dinoflagelados, já que estruturas que anteriormente poderiam ser identificadas como presas ou vacúolos digestivos são hoje reconhecidas como gametas e até mesmo parasitas. Bactérias, fungos e protistas podem parasitar células de dinoflagelados (Park *et al.*, 2004). Como exemplo, Kim *et al.* (2004) apontaram dinoflagelados do gênero *Amoebophrya* como parasitas de células dos dinoflagelados *Alexandrium affine* e *Gonyaulax spinifera*. Coats *et al.* (1996) estudaram o parasitismo em dinoflagelados causadores de florações na Baía de Chesapeake (EUA) por *Amoebophrya ceratii* e encontraram maiores proporções de parasitismo nas populações de *Gyrodinium uncatenum* e *Scrippsiella trochoidea* coincidindo com o decréscimo na densidade desses hospedeiros. Os autores sugeriram que a infecção por *Amoebophrya ceratii* pode controlar a formação de florações de seus hospedeiros (Coats *et al.*, 1996).

Além disso, Faust (1998) reportou estruturas delimitadas por membrana contento cianobactérias em células de *O. labens*. Tais estruturas são semelhantes à vesículas observadas no presente estudo. Todavia, quando o LysoSensor foi testado tais vesículas não foram marcadas pelo sensor. A presença de vacúolos é característica comum em células de dinoflagelados (Sousa *et al.*, 1999; Granham e Wilcox, 2000), entretanto a função destes ainda não é bem conhecida. Sabe-se que

em células vegetais vacúolos têm função de armazenamento de sais e outras substâncias, além de regulação osmótica. Logo, é provável que as vesículas ou vacúolos não marcadas pelo LysoSensor tenham uma outra função que não digestiva.

Células de *O. cf. ovata* com conteúdo de autofluorescência alaranjada quando observadas sob epi-fluorescência e coloração avermelhada sob microscopia ótica foram registradas durante o presente estudo (Figuras 3.6 & 3.16). Li *et al.* (1996) explicaram a presença de corpos de fluorescência alaranjada em células dos dinoflagelados *Gyrodinium estuariale*, *Peridinium brevipes* e *Prorocentrum minimum* de amostras naturais como proveniente da ficoeritrina de presas ingeridas, já que quando espécies de criptófitas foram oferecidas aos dinoflagelados o número de inclusões fluorescentes aumentou. Stoecker *et al.* (1997) consideraram inclusões de fluorescência alaranjada em células de *Prorocentrum minimum* de amostras naturais como presas contendo ficoeritrina e verificaram que a frequência dessas estruturas variou com a abundância de criptófitas nas amostras. Jacobson e Anderson (1996) verificaram, usando MET, a presença de vacúolos de coloração avermelhada em células de *Ceratium longzpes* e *Amylax* sp. e concluíram que tais estruturas podem ser vacúolos digestivos resultantes de fagotrofia.

No presente estudo, quando foi feita a primeira observação de inclusões de fluorescência alaranjada em células de *O. cf. ovata*, admitiu-se a possibilidade destas serem vacúolos digestivos contendo pigmento de fluorescência natural proveniente de uma possível presa. Entretanto, tais estruturas também foram observadas no teste usando LysoSensor e as células que as continham não foram marcadas por esse sensor. Por esse motivo, é provável que essas estruturas não estejam relacionadas ao processo de fagotrofia.

A presença de glóbulo de coloração vermelha alaranjada em células de dinoflagelados já foi associada a formação de cistos desses organismos que podem ser estágios de resistência ou relacionados a reprodução sexuada (Granham e Wilcox, 2000). Segundo Steidinger (1983), nem todas as espécies de dinoflagelados se reproduzem sexuadamente. Entretanto, suspeita-se que espécies típicas de regiões neríticas e estuarinas possuam uma fase sexual em seu ciclo de vida (Granham e Wilcox, 2000). Durante a reprodução sexuada de dinoflagelados existe a formação de uma fase zigótica da célula denominada hipnozigoto. Segundo Steidinger e Baden (1984) a presença de glóbulo de coloração avermelhada em

hipnozigoto é uma das características que indica que o mesmo está em processo de maturação.

Meksumpun e Montani (2010) estudaram a composição química de inclusões de coloração vermelho-amarronzadas em cistos do dinoflagelado marinho *Scripsiella trochoidea* e verificaram que esse material é composto por fucoxantina, 19'-hexanoyl-fucoxantina, diadinoxantina e diatoxantina. Os autores sugeriram que esses pigmentos sejam úteis para o crescimento de células vegetativas após a germinação dos cistos.

Faust e Morton (1995) e Faust (1998) reportaram células de *Ostreopsis labens* e *O. lenticularis* contendo estrutura esférica de coloração avermelhada sob microscópio ótico e consideraram tais estruturas como presas. O formato e a posição dessas estruturas são semelhantes aos das estruturas encontradas no presente estudo e é possível que ambas sejam exemplos células de resistência ou formas de reprodução sexuada de *Ostreopsis*.

O LysoSensor é um marcador dependente de pH e pode marcar, além de vacúolos digestivos, outras organelas ácidas tais como vacúolos de parasitas e vesículas autofágicas (Carvalho, 2007). A primeira alternativa pode ser descartada neste trabalho já que não foram observadas, sob microscópio ótico e nem de epi-fluorescência, estruturas semelhantes às formadas por parasitas. No caso da formação de vesículas autofágicas, estas podem ser formadas durante o processo de diferenciação, envelhecimento e morte celular (Reggiori e Klionsky, 2002). De fato, a marcação de células em processo de degradação e morte foi observada no presente estudo (Figura 3.13). Entretanto, tais células foram facilmente diferenciadas das células saudáveis e não foram contabilizadas.

Em dezembro de 2010, aproximadamente 50% das células de *O. cf. ovata* observadas foram marcada pelo LysoSensor. Entretanto, tais células apresentaram fluorescência difusa na periferia e em outras regiões da célula, ou seja, não concentrada em vesículas específicas. Células de *Coolia* sp., *Prorocentrum* sp. e *Amphidinium* sp. observadas em dezembro também foram marcadas de maneira difusa pelo sensor, mas em menores proporções que *O. cf. ovata*. Aproximadamente 15 e 20% das células de *Prorocentrum* sp. e *Coolia* sp., respectivamente, apresentaram fluorescência, e as únicas três células de *Amphidinium* sp. observadas foram marcadas.

O padrão de marcação do LysoSensor encontrado na maioria das células marcadas nesse estudo, no qual a fluorescência se apresentou difusa pela célula e não concentrada em vesículas definidas (vacúolos digestivos), sugere que as células observadas não realizaram fagotrofia, já que este processo pressupõe a formação de vacúolos. Contudo, isto não anula a possibilidade de mixotrofia nessas células, já que a fluorescência na periferia da célula e no citoplasma pode indicar que a célula realizou osmotrofia e a digestão da matéria orgânica dissolvida (MOD) pode estar ocorrendo na superfície das células e/ou no citoplasma. Segundo Burkholder *et al.* (2008), o crescimento de várias espécies de microalgas está relacionado a osmotrofia ou a capacidade de absorção de substratos como uréia, aminoácidos, dentre outros.

A utilização de carbono orgânico dissolvido tem sido demonstrada em espécies de *Dinophysis* como estratégia para compensar baixos níveis de luminosidade (Glibert e Legrand, 2006). O dinoflagelado planctônico *Prorocentrum minimum*, espécie relacionada à ambientes estuarinos e costeiros com concentração elevada de MOD, é capaz de usar nutrientes orgânicos e MOD proveniente do ambiente terrestre como fonte de nitrogênio e carbono para sustentar suas florações (Granéli e Moreira, 1990; Heil, 2005). A espécie *P. minimum* produz determinadas ectoenzimas como leucino amino peptidase e fosfatase alcalina, que agem na superfície da célula ou no espaço periplásmico hidrolisando a MOD de alto peso molecular, que se torna disponível para absorção (Dyhrman, 2005). Stoecker e Gustafson (2003) também reportaram atividade da enzima proteolítica leucino amino peptidase na superfície de *P. minimum*, *Alexandrium tamarense* e *Heterocapsa triquetra* com o uso de substrato artificial (L-leucina 7-amido-4-metil cumarina). Segundo esses autores, proteases da superfície celular podem ser importantes para dinoflagelados mixotróficos, pois disponibilizam aminoácidos para assimilação, assim como possibilitam, alternativamente, que tais aminoácidos sejam transformados por aminoácido oxidases, liberando amônio que pode ser usado como fonte de nitrogênio (Stoecker e Gustafson, 2003). Já foi observado também que a atividade da enzima urease, que age no ambiente intracelular, foi maior em *Aureococcus anophagefferens* e *P. minimum*, espécies reconhecidas como capazes de metabolizar uréia, que na diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, que não tem essa habilidade (Fan *et al.*, 2003).

Estudos verificaram que extratos das macroalgas *Halymenia floresia* e *Portieria hornemanii* estimulam o crescimento de *O. ovata* (Grzebyk *et al.*, 1994), e extrato da alga vermelha *Acanthophora spicifera* já foi citado como estimulador do crescimento de *O. lenticulares* (Tosteson *et al.*, 1988). É possível que a causa do estímulo do crescimento de *Ostreopsis* spp. pelos extratos das macroalgas esteja relacionada a absorção de nutrientes orgânicos dissolvidos presentes em tais extratos. Além disso, a mucilagem produzida por células de *O. cf. ovata*, que já foi apontada como estratégia de imobilização de presas e predadores (Barone, 2007), pode também ser, no caso da osmotrofia, um componente que facilitaria a absorção de matéria orgânica dissolvida. Tal mecanismo já foi sugerido para a espécie *Prymnesium parvum* (Haptophyceae), um mixotrófico capaz de realizar tanto fagotrofia quanto osmotrofia (Lindehoff, 2009).

De acordo com os resultados aqui reportados, ficou claro que o provável processo de osmotrofia não é habilidade exclusiva da espécie *O. cf. ovata*, já que *Coolia* sp., *Proocentrum* spp. e *Amphidinium* sp. apresentaram padrão semelhante de marcação pelo LysoSensor, além de três células de *Coolia* sp. terem apresentado fluorescência concentrada em vacúolos específicos, o que é uma indicação de fagotrofia nesse gênero. Por outro lado, a proporção de células de *O. cf. ovata* marcadas pelo sensor foi duas vezes maior que nos demais gêneros de dinoflagelados. Com base nas observações de presas sob microscópio óptico, Faust (1998) reportou mixotrofia nos gêneros *Proocentrum*, *Gambierdiscus* e *Ostreopsis*, tendo sido *Ostreopsis* o gênero que apresentou maior proporção de células mixotróficas, o que está de acordo com as observações aqui reportadas.

No presente trabalho foi encontrada diferença no resultado obtido entre os meses de inverno e verão. Em dezembro de 2010 as espécies que compõem a comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos apresentaram maior abundância e houve floração de *O. cf. ovata* na Prainha. Neste mês, uma maior proporção das populações de *O. cf. ovata*, *Proocentrum* sp. e *Coolia* sp. foi marcada pelo LysoSensor. Em contraste, em agosto, quando foram registradas menores densidades de *O. cf. ovata*, praticamente não foi observada marcação pelo LysoSensor. Jones (1994) ressalta que existe um gradiente de mixotrofia que varia entre autotrofia e heterotrofia estritas e que a posição dos organismos nesse gradiente é determinada pelas necessidades fisiológicas em resposta a variações ambientais. Sendo assim, é possível que mudanças nas condições às quais as

populações de *O. cf. ovata* estejam expostas nas diferentes estações de amostragem e em diferentes momentos no tempo determinem diferenças no “investimento” em vias alternativas de obtenção de nutrientes.

Comparando as áreas amostradas em dezembro de 2010, verifica-se que as amostras coletadas no Banco de *Sargassum* apresentaram maior porcentagem de células de dinoflagelados marcadas pelo LysoSensor, seguida pelas amostras da Prainha e da Praia dos Anjos. O Banco de *Sargassum* se localiza em uma região mais profunda que os costões rochosos amostrados na Prainha e Praia dos Anjos. Por esse motivo, provavelmente o Banco de *Sargassum* apresenta menor incidência de luz para a realização da fotossíntese o que poderia ser um fator a estimular processos alternativos de obtenção de energia à fotossíntese. Além disso, o Banco de *Sargassum* possui substrato de fundo arenoso em comparação aos costões rochosos da Prainha e Praia dos Anjos, e pode ser que o substrato menos consolidado do Banco de *Sargassum* propicie maior disponibilidade de MOD neste local.

Em resumo, o uso do LysoSensor com o intuito de marcar vacúolos digestivos resultantes de processo de fagotrofia demonstrou que este não é um processo comum na população de *O. cf. ovata* estudada. Além disso, a fluorescência difusa apresentada pelas células de *O. cf. ovata*, *Coolia* sp., *Prorocentrum* sp. e *Amphidinium* sp. marcadas com LysoSensor foi considerada como evidência de osmotrofia. Entretanto, deve-se considerar que o LysoSensor marca exclusivamente compartimentos ácidos, e que enzimas com atividade em valores de pH mais elevados também podem estar envolvidas no processo de osmotrofia, como a fosfatase alcalina (Dyhrman, 2005). Por esse motivo, outros métodos devem ser empregados futuramente a fim de dar continuidade a investigação do processo de osmotrofia em *O. cf. ovata* e em outros dinoflagelados epi-bentônicos.

Entre os métodos que podem ser empregados para estudar osmotrofia em células de *O. cf. ovata* e outros dinoflagelados epi-bentônicos está o uso de autoradiografia que possibilitou a detecção de substâncias únicas radioativamente marcadas e internalizadas por *Alexandrium catenella* (Doblin *et al.*, 2001). Outro método que pode ser utilizado constitui a marcação prévia de moléculas orgânicas com fluorocromos fluorescentes e a investigação destas em células de *O. cf. ovata* após determinado tempo de incubação. O acúmulo de dextranas (polímeros de

glicose) pré marcadas com substância fluorescente foi verificado em pequenas vesículas dentro de células de *A. catenella* (Legrand e Carlsson, 1998). Outra opção é apresentada por Loureiro *et al.* (2009) que cultivaram *Pseudo-nitzschia delicatissima* separadamente em meio enriquecido com amônio e nitrogênio orgânico dissolvido, e encontraram crescimento equivalente nas duas condições.

CAPÍTULO 4

Toxinas de *Ostreopsis cf. ovata*: Identificação e quantificação

4.1- Introdução

A palytoxina foi primeiramente isolada de corais do gênero *Palythoa* (Moore e Scheuer, 1971). Entretanto, sua origem em *Palythoa* tem sido especulada e autores sugerem que a palytoxina é sintetizada por microorganismos associados aos corais. Soares *et al.* (2006) ao estudar a toxicidade do coral *Palythoa caribaeorum* confirmaram que a palytoxina não é sintetizada por este coral, e sugeriram a produção desta por organismos associados ao sedimento, como bactérias ou dinoflagelados. Por outro lado, diversos trabalhos já relataram que espécies do gênero *Ostreopsis* são produtoras de palytoxina e análogos (Usami *et al.*, 1995; Onuma *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2003, Ciminiello *et al.*, 2006; 2008; 2010).

A palytoxina possui estrutura molecular complexa que constitui-se de longa cadeia carbônica com regiões lipofílicas e hidrofílicas (Moore e Bartolini, 1981) (Figura 4.1), tendo massa molecular de 2680 Da (Uemura *et al.*, 1981). A toxicidade da palytoxina se dá através de sua ligação aos receptores de Na⁺/K⁺ causando uma conformação da bomba Na⁺/K⁺ ATPase que permite o fluxo de íons nas duas direções, o que altera a permeabilidade celular a cátions monovalentes (Artigas e Gadsby, 2003). Esta toxina e seus análogos são caracterizados por possuírem atividade hemolítica tardia neutralizada pelo glicosídeo ouabaína (Haberman *et al.*, 1981). Doses de palytoxina entre 0,03 e 0,45 µg Kg⁻¹, por administração intravenosa em ratos, coelhos, cachorros e macacos foram letais e para humanos, por extrapolação, as doses tóxicas variam entre 2,3 e 31,5 µg Kg⁻¹ (Riobó *et al.*, 2007).

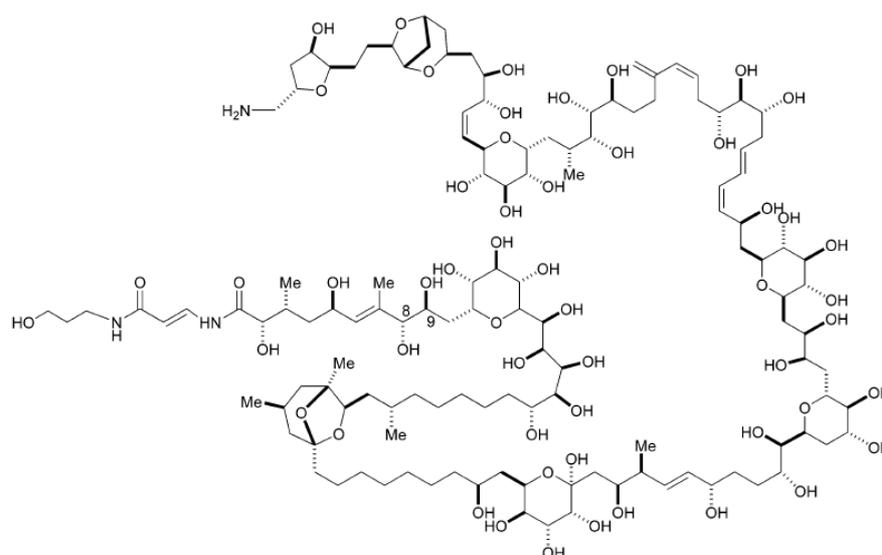


Figura 4.1. Estrutura da palytoxina (Ciminiello *et al.*, 2006).

A palytoxina já causou efeitos danosos em ouriços e outros organismos bentônicos (Granéli *et al.*, 2002; Sansoni *et al.*, 2003; Shears e Ross, 2009), mas também foi encontrada em anêmonas do mar (Mahnir *et al.*, 1992), caranguejos (Yasumoto *et al.*, 1986), peixes (Fukui *et al.*, 1987; Kodama *et al.*, 1989; Onuma *et al.*, 1999) e mexilhões (Aligizaki *et al.*, 2008) sem causar efeitos nocivos em tais animais. Mebs (1998) argumenta que a resistência dos organismos marinhos a palytoxina permite que esta seja acumulada na rede trófica e cause envenenamento humano por intoxicação alimentar. A palytoxina e seus análogos já foram causa de envenenamento humano pela ingestão de organismos marinhos contaminados, tais como caranguejos (Alcala *et al.*, 1998), peixe papagaio (Noguchi *et al.*, 1988) e sardinha (Onuma *et al.*, 1999). O clupeotoxismo, envenenamento humano por consumo de peixes clupeídeos caracterizado por alta taxa de mortalidade, é causado por intoxicação por palytoxina (Onuma *et al.*, 1999).

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para detecção de palytoxina e seus análogos. Durante anos, bioensaios de toxicidade com camundongos foram realizados, entretanto, por questões éticas, metodologias alternativas têm sido desenvolvidas (Ledreux *et al.*, 2009). Ensaios de hemólise, incluindo inibição hemolítica específica por ouabaína, têm sido feitos para estimar a concentração de palytoxina e análogos em algas e tecidos de animais marinhos (Rhodes *et al.*, 2002; Lenoir *et al.*, 2004; Riobó *et al.*, 2007; Aligizaki *et al.*, 2008; Corrêa, 2008) e métodos cromatográficos associados a espectrometria de massa têm sido utilizados para quantificar tais toxinas (Ciminiello *et al.*, 2006; 2008; 2010).

Espécies do gênero *Ostreopsis* já foram reportadas como produtoras de diferentes análogos de palytoxina. Usami *et al.* (1995) detectaram um análogo de palytoxina nomeado de ostreocina-D produzido por uma cepa de *O. siamensis* isolada de Okinawa, Japão. A ostreocina-D foi identificada por método de cromatografia líquida e se diferencia da palytoxina pela presença de prótons no lugar de dois grupos metila e uma hidroxila (Usami *et al.*, 1995). Posteriormente, Lenoir *et al.* (2004) detectaram dois análogos de palytoxina denominados mascarenotoxinas A e B em uma floração de *O. mascarenensis* no sudoeste do oceano Índico. A identificação desses compostos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – “high performance liquid chromatography”) acoplada a detector de arranjo de fotodiodo, e posteriormente por HPLC acoplada a espectrometria de massa. Apesar das estruturas químicas das mascarenotoxinas não terem sido elucidadas, presume-se que estas se diferenciem entre si e da palytoxina por poucas substituições como ocorre na ostreocina-D (Lenoir *et al.*, 2004). Ciminiello *et al.* (2006, 2008) identificaram o análogo ovatoxina-a (OVTX-a) em extratos de *O. ovata* de amostras naturais e provenientes de culturas estabelecidas a partir de floração dessa espécie no Mar Mediterrâneo em 2006. A identificação de OVTX-a foi realizada através de método de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Recentemente, Ciminiello *et al.* (2010) identificaram quatro novas ovatoxinas (OVTX-b, -c, -d, & -e) através de método de LC-MS/MS. OVTX-a difere da palytoxina por apresentar dois átomos de oxigênio a menos, OVTX-b apresenta dois átomos de carbono, quatro hidrogênios e um átomo de oxigênio a mais que OVTX-a; OVTX-c possui dois átomos de carbono, quatro hidrogênios e dois átomos de oxigênio a mais que OVTX-a; e OVTX-d e OVTX-e apresentam um átomo de oxigênio a mais que OVTX-a (Ciminiello *et al.*, 2010). Rossi *et al.* (2010) reportaram um complexo perfil toxicológico em uma cepa de *O. cf. ovata* isolada do Golfo de Nápoles, Itália, e descreveram quatro novas ovatoxinas.

A toxicidade de cepas de *O. cf. ovata* brasileiras tem sido foco de poucos estudos. Riobó *et al.* (2006) reportaram a presença de um composto relacionado ao análogo ostreocina D em duas cepas de *O. ovata* isoladas do Rio de Janeiro. Mais recentemente, análises de LC-MS/MS identificaram ovatoxina-a em uma cepa de *O. cf. ovata* isolada no estado de Santa Catarina, sul do Brasil (Tibiriçá *et al.*, 2010). Considerando as frequentes florações de *O. cf. ovata* na costa do Rio de Janeiro e

que algumas dessas florações ocorrem próximas a áreas de cultivo de mexilhões (Praia do Forno, Arraial do Cabo), se faz necessária a caracterização da toxicidade de cepas isoladas nessa área.

4.2- Objetivo

Identificar e quantificar palytoxina e ovatoxinas produzidas pelas cepas de *O. cf. ovata*, LCA-E7 e LCA-B7, isoladas de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, usando método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, LC-MS/MS.

4.3- Material e Métodos

Com o intuito de identificar e quantificar os análogos de palytoxina produzidos pelas cepas de *O. cf. ovata*, LCA-E7 e LCA-B7, foram utilizados concentrados de culturas (pellets úmidos) destas cepas armazenados em freezer a -70 °C. Tais culturas haviam sido mantidas em meio L2/2, 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 12h e 60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (condição padrão de cultivo). Duas culturas (amostras 4 & 5 - Tabela 4.1) usadas na análise de LC-MS/MS foram mantidas em meio L-2 com apenas N/2 e P/2 e outra (amostra 3 – Tabela 4.1) foi cultivada a 20 °C. Foram analisadas culturas da cepa LCA-E7 concentradas nas fases exponencial e estacionária de crescimento, enquanto que da cepa LCA-B7 foram avaliadas apenas culturas na fase estacionária (Tabela 4.1).

As toxinas dos concentrados de células de *O. cf. ovata* foram extraídas pela adição de 1 mL de metanol 80% e pelo rompimento das células em vórtex por 3 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 1600 g a 10 °C, o sobrenadante foi recolhido e o procedimento repetido duas vezes adicionando 500 μL de metanol 80%. Os sobrenadantes foram reunidos e secos por evaporação utilizando nitrogênio gasoso. Cada extrato seco foi ressuspenso em 1mL de metanol 80% para análise das toxinas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS).

A identificação prévia das toxinas em LC-MS foi feita na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC) através de colaboração com a Profa. Dra. Ângela Wagener e a pós-doutoranda Juliana Felizola. Entretanto, essa análise não pôde ser continuada na PUC porque o LC-MS disponível possui capacidade limitada para fragmentar moléculas até abaixo de 1/3 de sua massa principal, o que

é necessário nas análises de palytoxina e ovatoxinas. Dessa forma, a identificação e a quantificação destas toxinas foi feita em colaboração com o Dr. Steve Morris no “Center for Environment Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS)”, Reino Unido.

As toxinas foram caracterizadas quimicamente por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa (LC-MS/MS) de acordo com o método descrito por Ciminiello *et al.* (2010). Foram analisados sete extratos metanólicos provenientes de culturas de *O. cf. ovata* (5 da cepa LCA-E7 e 2 da cepa LCA-B7). Neste procedimento a cromatografia líquida foi feita em coluna C18 (Gemini) com coluna guarda (50 x 2,0 mm; 3 µm; Phenomenex, Reino Unido; 25°C). O cromatógrafo estava acoplado a um espectrômetro de massa (Quattro Micro triple quadrupole - Waters Ltd., UK) operado no modo íon positivo com ionização por electrospray. Foi utilizado padrão de palytoxina (purificado de *Palythoa tuberculosa*, Wako Chemicals GmbH, Alemanha) preparado em metanol:água (1:1 v/v). Os parâmetros do espectrômetro de massa foram otimizados para a identificação do íon precursor $[M+2H+Na]^{3+}$ de relação carga massa equivalente a 902 *m/z* e do íon de transição $[M+H-B \text{ fração}-H_2O]^+$ de 327 *m/z* obtido após fragmentação da palytoxina (Ciminiello *et al.*, 2008).

A partir da composição elementar e das fórmulas dos análogos de palytoxina: OVTX-a, OVTX-b, OVTX-c, OVTX-d & e descritos por Ciminiello *et al.* (2010), foi feito o monitoramento de reações múltiplas desses compostos (MRM) usando os íons precursores $[M+2H+Na]^{3+}$ e os parâmetros do espectrômetro otimizados para palytoxina. Os íons precursores de 891, 906, 911 e 896 *m/z* foram usados para OVTX-a, -b, -c, & -d & -e, respectivamente. A partir desses íons precursores e seguindo Ciminiello *et al.* (2010), os íons correspondentes aos fragmentos de $[M+H-B \text{ fração}-H_2O]^+$ foram adquiridos durante o experimento de MRM. Os íons monitorados foram 327 *m/z* para OVTX-a & OVTX-d, 371 *m/z* e 343 *m/z* para OVTX-c & OVTX-e. Pela inexistência de padrões das ovatoxinas a quantificação destas foi feita adotando curva de calibração de cinco pontos do padrão de palytoxina e assumindo que as ovatoxinas produzem uma resposta molar equivalente aquela da palytoxina.

4.4- Resultados

Com relação às análises feitas na PUC, o espectro obtido mostrou dois picos característicos de ovatoxina em um extrato da cepa LCA-B7 com tempos de

retenção de 12,94 e 13,57 minutos e massas de 1325.47 m/z e 1317.38 m/z e um pico relacionado a palytoxina com tempo de retenção de 13,28 min e massa de 1339.66 m/z (Anexo 1a). Três outros picos foram encontrados (Anexo 1b), mas estes não foram característicos de análogos de palytoxina.

O método LC-MS/MS possibilitou detectar em todas as amostras analisadas (das cepas LCA-E7 e LCA-B7) quatro tipos de ovatoxinas descritos recentemente por Ciminielo *et al.* (2010): ovatoxina-a (OVTX-a), ovatoxina-b (OVTX-b), ovatoxina-c (OVTX-c) e ovatoxina-d+e (OVTX-d+e) com tempos de retenção de 13,78, 13,54, 13,68 e 13,94 minutos, respectivamente (Figura 4.2). A presença de mistura de compostos relacionados a palytoxina (“putative palytoxin” - pPTX) foi detectado em apenas um dos extratos (amostra 1) com tempo de retenção de 12,52 minutos (Figura 4.2) e concentração de 0,62 pg.cel⁻¹ (Tabela 4.1). As concentrações de OVTX-a, OVTX-b, OVTX-c e OVTX-d+e em cada amostra estão apresentadas na tabela 4.1.

Em geral, ovatoxina-a e ovatoxina-b foram os compostos que apresentaram maiores concentrações nos extratos das cepas LCA-E7 e LCA-B7 e representaram entre 45 e 95% do total da concentração celular de ovatoxinas + pPLTX. Apenas nas amostras 3 e 5 (cepa LCA-E7) a porcentagem de OVTX-a+b foi similar as de OVTX-c+d+e e a razão OVTX-a+b/OVTX-c+d foi próxima a 1 (0,9 e 0,8, respectivamente). Nas outras amostras essa razão variou entre 2,5 e 19.

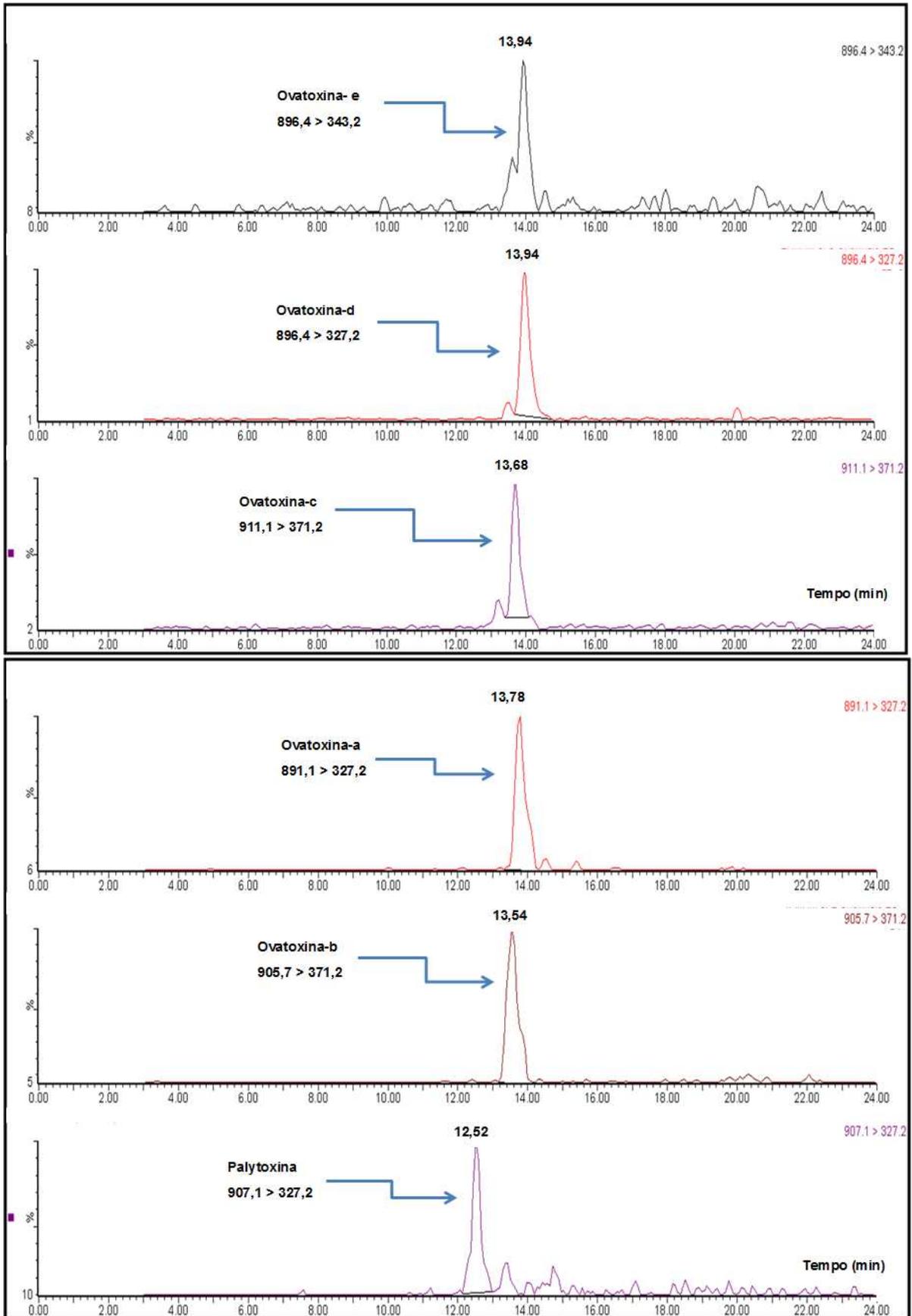


Figura 4.2. Cromatogramas de identificação de PLTX e OVTX-a, -b, -c, -d, -e em extratos de *Ostreopsis cf. ovata*.

Tabela 4.1 Concentrações e porcentagens de pPLTX e ovatoxinas (pg.cel⁻¹) em culturas de *Ostreopsis cf. ovata* cultivadas sob condição padrão de cultivo. As amostras 4 e 5 foram cultivadas em meio L2 com N/2 e P/2 e a amostra 3 a 20 °C. FC- Fases de crescimento: Exp.- exponencial, Est.- estacionária.

Amostra	Cepa	FC (Dias em cultivo)	Concentração da toxina (pg.cel ⁻¹)					Contribuição (%) de cada toxina para o conteúdo total					
			pPLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d+e	Total de OVTXs	pPLTX (%)	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d+e (%)
1	LCA-E7	Exp. (21)	0,62	20	23	7	10	60	1	33	38	12	16
2	LCA-E7	Est. (38)	Nd	71	77	10	23	181	0	39	42	6	13
3	LCA-E7	Exp. (19)	Nd	23	32	22	43	120	0	19	27	18	36
4	LCA-E7	Exp. (26)	Nd	37	45	4	3	89	0	42	51	4	3
5	LCA-E7	Exp.(23)	Nd	40	50	30	80	200	0	20	25	15	40
6	LCA-B7	Est. (23)	Nd	171	205	37	55	468	0	36	44	8	12
7	LCA-B7	Est.(21)	Nd	78	87	3	5	173	0	45	50	2	3

4.5- Discussão

As concentrações de ovatoxina-a, -b, -c & -d+e em extratos das cepas LCA-E7 e LCA-B7 obtidas no presente estudo, usando LC-MS/MS, foram maiores, mas na mesma ordem de magnitude, que as concentrações reportadas na literatura. Ciminiello *et al.* (2010) analisaram cepa de *O. ovata* isolada do Mar Adriático (Mar Mediterrâneo) cultivada em meio f2/5 a 20 °C, fotoperíodo de 16:8 h e irradiância de 90 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; e reportaram concentrações de OVTX-a, OVTX-b, OVTX-c e OVTX-d+e de 18, 9, 2 e 4 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$, respectivamente. Guerrini *et al.* (2010) usaram método de LC-MS/MS descrito por Ciminiello *et al.* (2008) e encontraram ovatoxina-a e mistura de compostos relacionados a palytoxina (pPLTX) em concentrações de 42,17 e 3,63 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$, respectivamente, em uma cepa de *O. ovata* isolada do Mar Adriático e concentrações de 32,70 e 1,91 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ de OVTX-a e pPLTX em cepa isolada do Mar Tirreno, Itália. As duas cepas foram cultivadas a 20 °C, fotoperíodo de 16:8 h e irradiância de 90 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Outra cepa de *O. ovata* isolada da costa da Ligúria (Itália) e cultivada a 25 °C, fotoperíodo de 16:8h apresentou 3,85 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ de OVTX-a e 0,55 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ de pPLTX (Ciminiello *et al.*, 2008) (Tabela 4.2).

Com relação ao tempo de cultivo, em geral, as amostras correspondentes a fase estacionária de crescimento, apresentaram concentrações mais elevadas de ovatoxinas. Granéli *et al.* (2011) também constataram que a concentração de toxinas por célula mensurada por ensaio hemolítico variou com a fase de crescimento e foi maior durante a fase de declínio. Guerrini *et al.* (2010) detectaram por LC-MS/MS concentrações significativamente mais altas de pPLTX e OVTX-a em extratos de culturas concentradas na fase estacionária que na fase exponencial de crescimento. O mesmo ocorreu em análises efetuadas para determinar as concentrações das toxinas dissolvidas no meio de cultivo. Guerrini *et al.* (2010) sugerem que o acúmulo das toxinas no meio ao longo do cultivo de *O. cf. ovata* ocorra devido à ruptura de células que acumularam toxina até a fase estacionária de crescimento. Essa liberação de toxinas pode ser uma explicação para os efeitos destas sobre organismos marinhos e banhistas através do spray marinho (Guerrini *et al.*, 2010).

Tabela 4.2. Concentração máxima de palytoxina e ovatoxinas ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$) produzidas por cepas de *Ostreopsis cf. ovata* reportadas na literatura.

Local	Condições de cultivo	Método de análise	pPLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d+e	Referência
Ligúria	25 °C e 16:8h	LC-MS/MS (Ciminiello et al., 2008)	0,5	3,8	-	-	-	Ciminiello et al. (2008)
Mar Adriático	20 °C, 16:8 h e 90 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LC-MS/MS (Ciminiello et al., 2008)	3,6	42,2	-	-	-	Guerrini et al. (2010)
Mar Tirreno	20 °C, 16:8 h e 90 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LC-MS/MS (Ciminiello et al., 2008)	1,9	32,7	-	-	-	Guerrini et al. (2010)
Mar Adriático	20 °C, 16:8 h e 90 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LC/MS-MS (Ciminiello et al., 2008 com modificações)	0,2	18,0	9,0	2,0	4,0	Ciminiello et al. (2010)
Armação dos Búzios (LCA-E7)	24 °C, 12 h e 60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LC/MS-MS (Ciminiello et al., 2010)	0,6	71,0	77,0	30,0	80,0	Presente estudo
Armação dos Búzios (LCA-B7)	24 °C, 12 h e 60 μmol de fluxo de fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LC/MS-MS (Ciminiello et al., 2010)	-	171,0	205,0	37,0	55,0	Presente estudo

O maior valor de concentração total de ovatoxinas por célula encontrado neste estudo (468 pg.cel^{-1}) refere-se à amostra 6 da cepa LCA-B7, concentrada na fase estacionária de crescimento. Em laboratório nota-se que a cepa LCA-B7 cresce mais lentamente que a cepa LCA-E7. O crescimento mais lento de LCA-B7 é uma provável razão para o maior conteúdo de toxinas encontrado em suas células, já que com taxa de divisão celular mais baixa as toxinas são acumuladas nas células.

Granéli *et al.* (2011) reportaram que a toxicidade de *O. ovata* é influenciada pela temperatura e que temperaturas mais baixas (20-22 °C) induzem a maior toxicidade por célula, já que nessas temperaturas o crescimento é mais lento e as toxinas se acumulam nas células (Granéli *et al.*, 2011). No presente estudo, uma cultura da cepa LCA-E7 mantida a 20 °C (amostra 3) apresentou concentração de ovatoxinas semelhante àquelas mantidas a 24 °C. Isso ocorreu, provavelmente, por não haver diferença significativa entre a taxa de crescimento a 20 e 26 °C (Capítulo 2), sendo improvável que o crescimento a 24 °C seja diferente.

A toxicidade das cepas analisadas no presente estudo já havia sido avaliada anteriormente por ensaios de hemólise, com eritrócitos de coelho, nos quais a porcentagem de hemólise foi proporcional ao número de células correspondente a cada extrato e foi completa ou parcialmente inibida por ouabaína (1 mM) (Corrêa, 2008). Nesses testes foi observado que extratos contendo mais que 70.000 células de *O. cf. ovata* provocaram 100% de hemólise (Corrêa, 2008 - Gráficos de hemólise, Anexo 2).

Considerando as amostras 1, 3, 4 e 5 (Tabela 4.1) analisadas no presente estudo por LC-MS/MS que referem-se à culturas concentradas na fase exponencial de crescimento (fase em que as culturas usadas nos ensaios de hemólise foram concentradas), a faixa de concentração total de ovatoxinas por célula variou de 60 a 200 pg.cel^{-1} (Tabela 4.1). Fazendo uma relação com os dados de hemólise apresentados em Corrêa (2008), as 70.000 células capazes de causar 100% de hemólise corresponderiam entre 4.200 e 14.000 ng de ovatoxinas ou 42 a 140 ng OVTX. μl^{-1} (o volume de cada extrato de toxinas + solução salina + solução de eritrócitos foi de 100 μl).

Cepas de *O. ovata* provenientes de regiões tropicais já foram consideradas como de limitada toxicidade (Tindall *et al.*, 1990; Nakajima *et al.*, 1981). Tindall *et al.* (1990) estudaram a toxicidade de duas cepas de *O. ovata* isoladas das Ilhas Virgens e mantidas a 28 °C usando bioensaio com camundongos, enquanto

Nakajima *et al.* (1981) estudou cepas de *O. ovata* isoladas da Ilha de Ishigaki, Okinawa, Japão, e crescidas a 25 °C usando bioensaio com camundongo e ensaio de hemólise. A diferença na toxicidade entre as cepas de *O. ovata* isoladas do Brasil, Japão e Caribe pode ter ocorrido em decorrência de variações nas condições de cultivo e dos métodos analíticos empregados ou de características genéticas intrínsecas de cada cepa.

Considerando a toxicidade apresentada pelas cepas analisadas e as frequentes florações de *O. cf. ovata* na costa do Rio de Janeiro, torna-se importante o planejamento de programas de monitoramento dessas florações (medidas das densidades de *O. cf. ovata*) e das concentrações de ovatoxinas em organismos marinhos usados na alimentação humana.

CAPÍTULO 5

5.1- Discussão Geral

Deve-se considerar que um complexo conjunto de fatores pode estar envolvido na formação de florações de dinoflagelados epi-bentônicos. Estes incluem a turbulência da água, disponibilidade de substrato para fixação, intensidade luminosa, precipitação e concentração de nutrientes (Tindall e Morton, 1998), além da interação com seus competidores, predadores e parasitas. Essa complexidade explica as respostas variáveis que certas espécies podem apresentar quando um determinado parâmetro é avaliado em regiões e/ou momentos distintos.

Neste estudo foram abordados a influência da temperatura sobre as taxas de crescimento de *O. cf. ovata* e a habilidade desta espécie em realizar mixotrofia; tendo como objetivo extrair informação sobre essas questões que podem ser partes-chave da explicação da formação de florações por *O. cf. ovata*.

A cepa LCA-E7 de *O. cf. ovata* apresentou maiores taxas de crescimento quando cultivada em maiores temperaturas. Esse resultado é corroborado por outros estudos que relacionaram a temperatura ao crescimento de cepas e populações naturais de *O. cf. ovata* (Zingone *et al.*, 2010; Granéli *et al.*, 2011; Mangialajo *et al.*, 2008; Tognetto *et al.*, 1995).

Os ensaios de mixotrofia mostraram evidências de que o processo de osmotrofia se mostrou mais freqüente que a fagotrofia na comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos estudada. Além disso, uma maior proporção da população de *O. cf. ovata* estudada, em relação às demais espécies, apresentou evidência de osmotrofia e é possível que este processo desempenhe algum papel para a dominância dessa espécie.

Considerando os efeitos potenciais causados pelas florações de *O. cf. ovata*, a toxicidade das cepas isoladas da costa do Rio de Janeiro foi investigada e revelou que as mesmas produzem ovatoxinas (OVTX-a, OVTX-b, OVTX-c e OVTX-d+e). A toxicidade de certas espécies pode ser afetada por fatores como a fase de crescimento, temperatura, salinidade, luz e concentração de nutrientes (Edvardsen e Paasche, 1998). É provável, portanto, que as concentrações de toxinas em populações naturais de *O. cf. ovata* variem com as condições ambientais. Sendo assim, estudos futuros relacionados não só aos fatores que podem influenciar a formação de florações de *O. cf. ovata* na costa do Rio de Janeiro, mas também a

influência destes e outros fatores na toxicidade dessas florações virão a complementar os resultados aqui apresentados.

Tais estudos são necessários a fim de fundamentar o planejamento de programas de monitoramento de florações de *O. cf. ovata* na costa do Rio de Janeiro.

5.2- Conclusões

- *O. cf. ovata* (cepa LCA-E7) apresentou maiores valores de taxa de crescimento e o rendimento máximo a 20 e 26 °C do que a 16 °C. Esse resultado indica que temperaturas mais elevadas podem otimizar o crescimento da população de *O. cf. ovata* e por isso a densidade dessa espécie deve ser monitorada principalmente durante os meses mais quentes.

- Apenas uma pequena proporção (menos de 0,5 %) da população de *O. cf. ovata* estudada apresentou indício de fagotrofia. Contudo, uma parcela significativa desta população (46 %) apresentou marcação difusa pelo LysoSensor, que foi interpretada como evidência de osmotrofia. Células de *Coolia* sp. e *Prorocentrum* spp. também foram marcadas pelo LysoSensor, representando cerca de 25 % e 16 % da população de cada espécie, respectivamente.

- A evidência de osmotrofia se mostrou mais freqüente na comunidade de dinoflagelados epi-bentônicos no mês de verão (dezembro), quando a densidade desses organismos foi maior. Além disso, *O. cf. ovata*, espécie dominante na maioria das estações amostradas, apresentou maior parcela de sua população com atividade osmotrófica.

- Os ensaios de mixotrofia possibilitaram a observação de inclusões esféricas de fluorescência alaranjada em células de *O. cf. ovata*. Tais estruturas não foram relacionadas a processo de fagotrofia, como anteriormente sugerido por outros autores.

- Análises em LC/MS-MS propiciaram a detecção de pPLTX, OVTX-a, OVTX-b, OVTX-c e OVTX-d+e nas cepas de *O. cf. ovata* (LCA-E7 e LCA-B7) isoladas da Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. Em geral, os compostos OVTX-a e OVTX-b apresentaram maiores concentrações nos extratos analisados.

- As concentrações de toxinas produzidas pelas cepas de *O. cf. ovata* no presente estudo foram mais elevadas, apesar de na mesma ordem de magnitude,

que as concentrações já reportadas na literatura para cepas de *O. cf. ovata* do Mar Mediterrâneo.

- Notou-se uma tendência de maior concentração de ovatoxinas em culturas concentradas na fase estacionária de crescimento comparada àquelas correspondentes a fase exponencial, como relatado em outras cepas de *O. cf. ovata*.

- A toxicidade apresentada pelas cepas coletadas na costa do Rio de Janeiro confirma o risco que frequentes florações de *O. cf. ovata* podem representar nessa região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcala, A. C., Alcala, L. C., Garth, J. S., Yasumura, D., Yasumoto, T. (1988). Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon*, 26:105-7.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A. (2008). First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, 51: 418-427.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G. (2006). The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* e *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae*, 5: 717-730.
- Artigas, P., Gadsby, D. C. (2003). Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 501-505.
- Ballantine, D. L., Bardales, A. T., Alvey, M. E. (1992). The culture of three dinoflagellates associated with ciguatera. *Proceedings of the 2nd RP-USA Phycology Symposium/ Workshop*, 261- 268.
- Banse, K. (1982). Cell volumes, maximal growth rates of unicellular algae and the role of ciliates in the marine pelagic. *Limnol. Oceanography*, 27:1059-1071.
- Barone, R. (2007). Behavioral trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *Harmful Algae News*, 33:1-3.
- Bockstahler, K. R., Coats, D. W. (1993). Spatial and temporal aspects of mixotrophy in Chesapeake Bay dinoflagellates. *J. Eukaryotic Microbiol.*, 40:49-60.
- Brescianini, C., Grillo, C., Melchiorre, N., Melchiorre, R., Ferrar, A., Vivaldi, B., Icardi, G., Gramaccioni, L., Funari, E., Scardala, S. (2006). *Ostreopsis cf. ovata* blooms

- affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Eurosurveillance Weekly*, 11 (9).
- Burkholder, J. M., Glibert, P. M., Skelton, H. M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, 8: 77–93.
- Carmouze, J. P. (1994). O Metabolismo dos Ecossistemas Aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 253 p.
- Carvalho, W. F. (2007). The role of mixotrophy in the ecology of marine “Phytoplankton”. *Doctoral Dissertation*. Faculty of Natural Science. University of Kalmar.
- Ciminiello, P., Aversano, C. D., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G. S., Tartaglione, S., Grillo, C., Melchiorre, N. (2006). The Genoa 2005 outbreak. determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal. Chem.*, 78: 6153-6159.
- Ciminiello, P., Aversano, C. D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, S., Grillo, C., Melchiorre. (2008). Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass Spectrum*, 19:111–120.
- Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Dell’Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R. (2010). Complex palytoxin like profile of *Ostreopsis ovata*. identification of four new ovatoxins by high resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrum*, 24: 2735–2744.
- Coats, D. W., Adam, E. J., Gallegos, S. H. (1996). Parasitism of photosynthetic dinoflagellates in a shallow subestuary of Chesapeake Bay, USA. *Aquat. Microb. Ecol.*, 11: 1-9.
- Corrêa, E. V. (2008). Fisiologia e Toxicologia de *Ostreopsis ovata* um dinoflagelado epi-bentônico causador de florações na costa leste fluminense. *Monografia de conclusão de curso*. Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Corrêa, E. V., Silva, C. S., Nascimento, S.M. (2007). Autoecologia de cepas de *Amphidinium* sp., *Coolia* cf. *monotis* e *Ostreopsis* cf. *ovata* isoladas da costa leste Fluminense. *Resumos do VII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu, MG.

- Dantas, H. G. R., Lima, H. C., Bohrer, A. (2009). Mapeamento da vegetação e da paisagem do município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 60: 025-038.
- Darley, W. M. (1982). Phytoplankton: environmental factors affecting growth. In: *Algal Biology: a physiological approach*. Blackwell Scientific Publications, 45: 46.
- Doblin, M., Lengrand, C., Carlsson, P., Granéli, E., Hallegraeff, G. (2001). Uptake of radioactively labeled humic substances by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. In: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. Harmful Algal Blooms. IOC-UNESCO, paris, 336-339.
- Doval, M. D., Salgado, X. A. A. S., Pérez, F. F. (1997). Dissolved organic matter in a temperate embayment affected by coastal upwelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 21-37.
- Dyhrman S. T. (2005). Ectoenzymes in *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae*, 4: 619-627.
- Edvarsen, B., Paasche, E. (1998). Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M. *The physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer Verlag.
- Estep, K., MacIntyre F. (1989). Taxonomy, life cycle, distribution and dasmotrophy of *Chrysochromulina*: a theory accounting for scales, haptonema, muciferous bodies and toxicity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 57:11-2.
- Fan, C., Glibert, P. M., Alexander, J., Lomas, M. W. (2003). Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii*. *Marine Biology*, 142: 949-958.
- Faust, M. A. (1998). Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. *Harmful Algae*. VIII International Conference, Vigo 1997, 390-393.
- Faust, M. A., Morton, S. L., Quod, J. P. (1996). Further SEM study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 32, 1053-1065.
- Faust, M. A., Morton, S. L. (1995). Morphology and Ecology of the Marine Dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 31: 456-463.
- Ferreira, C.E.L. (2006). Sea urchins killed by toxic algae. *JMBA Global Marine Environment*, spring, 3: 23-24.
- Fogg, G. E. (2002). Harmful algae - a perspective. *Harmful Algae*, 1: 1-4.

- Fukui, M., Murata, M., Inoue, A., Gawel, M., Yasumoto, T. (1987). Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. *Toxicon*, 25:1121-4.
- Fukuyo, Y. (1981). Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47: 967- 978.
- Glibert, P. M., Lengrand, C. (2006). The diverse nutrient strategies of harmful algae: Focus on osmotrophy. In: Granéli, E., Turner, J. *Ecology of harmful algae*. Springer, New York. 163-175.
- Graham, L. E., Wilcox, L. W. (2000). Dinoflagellates. In: *Algae. Ed. Prentice Hall Upper Saddle River*. 198-231.
- Granéli, E., Ferreira, C. E. L., Yasumoto, T., Rodrigues, E., Neves, M. H. B. (2002). Sea urchins poisoning by the benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on the Brazilian coast. *10th International Conference on Harmful Algae*, St. Petersburg, Florida, EUA. 113.
- Granéli, E., Moreira, M. (1990). Effects of river water of different origin on the growth of marine dinoflagellates and diatoms in laboratory cultures. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 136: 89-106.
- Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaranatunga, P.R.T., Scenati, R. (2011). Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae*, 10:165-172.
- Grzebyk, D., Berland, B. (1996). Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, 18: 1837- 1849.
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B. A., Bosi, C., Arnoux, A. (1994). Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (S. W. Indian Ocean). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 178: 51-66.
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell` Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R. (2010). Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon*, 55: 211–220.
- Guillard, R. R. J. (1995). Culture Methods. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manual and Guides no 33. UNESCO: 45-56.

- Guimaraens, M. A., Coutinho, R. (1996). Spatial and temporal variation of benthic marine algae at the Cabo Frio upwelling region, Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Botany* 52: 283–299.
- Haberman, E., Ahnert-Hilger, G., Chhatwal, G. S., Beress, L. (1981). Delayed haemolytic action of palytoxin: general characteristics. *Biochim. Biophys. Acta*, 649: 481-486.
- Hallegraeff, G.M. (1995). Harmful algal blooms: a global overview. In G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, and A.D. Cembella (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides*, 33, UNESCO, Paris, France. 551.
- Heil, C. A. (2005). Influence of humic, fulvic and hydrophilic acids on the growth, photosynthesis and respiration of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. *Harmful Algae*, 4:603-618.
- IPCC. (2007). Climate Change 2007: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York: Cambridge University Press. <http://www.ipcc.ch>.
- Jacobson, D. M., Andersen, R. A. (1994). The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. *Phycology*, 33:97-110.
- Jacobson, D. M., Anderson, D. M. (1996). Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *J. Phycol.*, 32: 279-285.
- Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Kim, S. J., Kim, T. H., Kim, J. H., Kang, N. S., Yih, W. (2004). Mixotrophy in the Phototrophic Harmful Alga *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae): Prey Species, the Effects of Prey Concentration, and Grazing Impact. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51: 563-569.
- Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Park, J. Y., Song, J. Y., Kim, S. T., Lee, S. H., Kim, K. Y., Yih, W. H. (2005). Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquat. Microb. Ecol.*, 40: 133-150.
- Jones, R. I. (1994). Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Protozooplankton Ecology- Methods and Seasonal Successions*, 87-96.

- Jones H.L.J. (1997) A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biology*, 37: 35–43.
- Jones, R. I. (2000). Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology*, 45: 219–226.
- Kim, S., Park, M. G., Yih, W., Coats, D. W. (2004). Infection of the bloom-forming thecate dinoflagellates *Alexandrium affine* and *Gonyaulax spinifera* by two strains of *Amoebophrya* (Dinophyta). *J. Phycol*, 40: 815–822.
- Kobiyama, A., Tanaka, S., Kaneko, Y., Lim, P., Ogata, T. (2010). Temperature tolerance and expression of heat shock protein 70 in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 9: 180-185.
- Kodama, A. M., Hokama, Y., Yasumoto, T., Fukui M., Manea, S. J., Sutherland N. (1989). Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). *Toxicon*, 27:1051-3.
- Lages, B. G., Fleury, B. G., Ferreira, C. E. L., Pereira, R. C. (2006). Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328: 127- 135.
- Ledreux, A., Krysz, S., Bernard, C. (2009). Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxina and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon*, 53: 300-308.
- Legrand, C., Carlsson, P. (1998). Uptake of high molecular weight dextran by the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 16:81-86.
- Lehane, M., Lewis, R. J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*, 61: 91-125.
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C. F., Pérez, T. (2009). Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology and Evolution*, 25-4.
- Lenoir, S., Ten- Hage, L., Turquet, J., Quod, J. P., Bernard, C., M-C, H. (2004). First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern India Ocean. *Journal of Phycology*, 40: 1042-1051.
- Li, A., Stoeckerl, D. K., Coats, D. W., Dam, E. J. (1996). Ingestion of fluorescently labeled and phycoerythrin-containing prey by mixotrophic dinoflagellates. *Aquat Microb Ecol.*, 10: 139-147.

- Li, A., Stoecker, D. K., Adolf, J. E. (1999). Feeding, pigmentation, photosynthesis and growth of the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 19: 163-176.
- Lim, P. T., Leaw, C. P., Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., Ogata, T. (2006). Effect of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum*. *J. Phycol.*, 42:786-799.
- Lindehoff, E. (2009). Importance of dissolved organic nitrogen for marine phytoplankton growth and toxicity. *Doctoral Dissertation*. Faculty of Natural Science. University of Kalmar.
- Lorenzen, C.F. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanog.*, 16: 990-992.
- Loureiro, S., Jauzein, C., Garcés, E., Collos, Y., Camp, J., Vaqué, D. (2009). The significance of organic nutrients in the nutrition of *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Plankton Res.*, 31: 399-410.
- Mahnir, V. M., Kozlovskaya, E.P., Kalinovsky, A.I. (1992). Sea anemone *Radianthus macrodactylus* a new source of palytoxin. *Toxicon*, 30:1449-56.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N. (2008). The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1209–1214.
- Margalef, R. (1968). Perspectives in ecological theory. *University of Chicago Press*, 3:111 pp.
- Martinez, M. E., Jiménez, J. M., Yousfi, F. El. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 67: 233-240.
- Mebis, D. (1998). Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon*, 36: 1519-1522.
- Meksumpun, S., Montani, S. (2010). Chemical components of red-brown material in cyst of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae). *Thai Agricultural Research Repository*.
- Moore R. E., Bartolini G. (1981). Structure of palytoxin. *Journal of American Chemical Society*, 103, 2491-2494.
- Moore, R. E., Scheuer, P. J. (1971). Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate. *Science*, 172: 495 – 498.

- Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Ivesa, L. (2007). First record of *Ostreopsis ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 598–601.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W. (1992). Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 157: 79-90.
- Nakajima, I., Oshima, Y., Yasumoto, T. (1981). Toxicity of Benthic Dinoflagellates in Okinawa. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47, 1029-1033.
- Nascimento, S. M. (2006). Epiphytic dinoflagellates from the Brazilian coastline. *12th International Conference on Harmful Algae*, Copenhagen. 248.
- Nascimento, S. M., Monteiro, P. O., Ferreira, C. E. E. L., Rodriguez, G.(2008). *Ostreopsis cf. ovata* booms on Rio de Janeiro coast. *Harmful Algae News*, 37: 1-4.
- Nascimento, S. M., Monteiro, P. O., Alencar, A. G., Meneguelli, A. C. (2010). Epi-benthic dinoflagellates from the Rio de Janeiro coastline, Brazil. *GEOHABOSM on Benthic HABS*, Honolulu, Hawaii.
- Naves, J. L., Freitas, J. C. (2001). Dinoflagelados portadores de toxinas no canal de São Sebastião, São Paulo. *XVI Simpósio de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo*, São Sebastião. 47.
- Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, G., Daigo, K., Sato, S., Ozaki, H., Kawai, N., Ito, M., Hashimoto, K. (1988). Palytoxin as the causative agent in parrotfish poisoning. *Toxicon*, 26, 34.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, N., Naoki, H., Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*, 37: 55-65.
- Park, M. G., Yih, W., Coats, D. W. (2004). Parasites and phytoplankton, with special emphasis on dinoflagellate infections. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51: 145-155.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M. G., Riobó, P., Vernesi, C. (2010). A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography*, 37: 830–841.
- Pistocchi, R., Pezsolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell’ Aversano, C., Fattorusso, E. (2010). A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon*, *In press*.
- Proença, L. A. O., Boemer, G. L., Dias, J.P., Hatherly, M. M., Mendes, I. L., Mendes, L. A. M., Mendes, M. C. Q., Rossi, W. C., Tamanaha, M. S., Tenenbaum, D. R.,

- Schramm, M. A. (2010). Can the cases of airborne intoxication of beach users in south coast of Bahia (16°24' S, 39°02' W) be related to microalgae? GEOHAB OSM on Benthic HABS, Honolulu, Hawaii.
- Reggiori, F., Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eucaryotic Cell*, 1:11-21.
- Rhodes, L. (2010). World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon*, *In press*.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Ian, G. (2000). Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34: 371-383.
- Rhodes, L., Towers, N., Briggs, L., Munday, R., Adamson, J. (2002). Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36: 631-636.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J. M. (2006). Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 566: 217-223.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V. (2010). New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon*, 56: 1381-1387.
- Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Rustighi, C. (2003). Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale*, 17: 17-23.
- Selina, M.S., Orlova, T.Yu, (2010). First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. *Bot. Mar.*, 53, 243–249.
- Shears, N. T., Ross, P. M. (2009). Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae*, 8: 916-925.
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J. E., Place, A. R. (2009). A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. PNAS Early Edition.
- Skovgaard, A. (1996). Mixotrophy in *Fragilidium subglobosum* (Dinophyceae): growth and grazing responses as functions of light intensity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 143: 247-253.

- Skovgaard, A. (1998). Role of chloroplast retention in a marine dinoflagellate. *Aquatic Microbial Ecology*, 15: 293-301.
- Skovgaard, A., Hansen, P. G. (2003). Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins. *Limnology and Oceanography*, 48: 1161-1166.
- Silva, A., Brotas, V., Orive, E., Neto, A. (2010). First records of *Ostreopsis* cf. *siamensis* in Moroccan Atlantic upwelling waters. *Harmful Algae News*, 42.
- Silvia, G. L., Dourado, M. S., Candella, R. N. (2006). Estudo preliminar da climatologia da ressurgência na região de Arraial do Cabo, RJ. *XI Encontro Nacional dos Grupos PET*, Florianópolis.
- Silva, L. M., Ávila, T., Odebrecht, C., Matthiensen, A. (2006). *Ostreopsis ovata* (Dinoflagelado) associado a mancha de *Trichodesmium* (Cianobactéria) próximo a Ilha do Arvoredo, SC (Brasil). In: *XI Congresso Brasileiro de Ficologia*, Itajaí. 67.
- Smayda, T. J. (1997). What is a bloom? A commentary. *Limnology Oceanography*, 42: 1132-1136.
- Soares, C. L. S., Pérez, C. D., Maia, M. B. S., Silva, R. S., Melo, L. F. A. (2006). Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcolico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 463-468.
- Souza, L., Rivas-Carballo, M. R., Pais, J. (1999). Dinoflagelados. *Ciências da Terra*, 13: 35-57.
- Steidinger, K. A. (1983). A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. *Progress in Phycological Research*, Vol. 2. Elsevier Science Publisher.
- Steidinger, K. A., Baden, D. G. (1984). Toxic marine dinoflagellates. In: *Dinoflagellates*. Academic Press.
- Stoecker, D. K. (1999). Mixotrophy among Dinoflagellates. *J Eukaryot Microbiol.*, 46: 397-401.
- Stoecker, D. K., Jr. Gustafson, D. E. (2003). Cell-surface proteolytic activity of photosynthetic dinoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology*, 30: 175-183.
- Stoecker, D. K., Li, A., Coats, D. W., Gustafson, D. E., Nannen, M. K. (1997). Mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 152:1-12.
- Taylor, F.J.R. (1979). A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor,

- D.L., Seliger, H.H. Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier/North-Holland, New York. 71–76.
- Taylor, F. J. R. (1987). Ecology of Dinoflagellates. *The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Scientific Publications*, 11:399-529.
- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmuda, Y., Noguchi, T. (2003). *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*, 42: 29–33.
- Tibiriçá, C. E. J., Proença, L. A. O., Schramm, M. A. (2010). Investigação da ocorrência de dinoflagelados epífitos em duas enseadas na região centro-norte de Santa Catarina. XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, Paraty. 313.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Men e, R., Kantin, R., Lasalle, J., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., Haro, L. (2010). Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical Toxicology*, 48: 839-844.
- Tillman, U. (2003). Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate *Prymnesium parvum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 32: 73-84.
- Tindall, D. R., Morton, S. L. (1998). Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M. Physiological ecology of harmful algal blooms. Springer: 293-313.
- Tindall, D.R., Miller, D.M., Tindall, P.M. (1990). Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands. In: Gran eli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M. Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York. 424–429.
- Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C. (1995). Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Bot. Mar.*, 38, 291-295.
- Tosteson, T. R., Ballantine, D. L., Tosteson, C. G., Hensley, V., Bardales, A. T. (1988). Associated Bacterial Flora, Growth, and Toxicity of Cultured Benthic Dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 137-141.

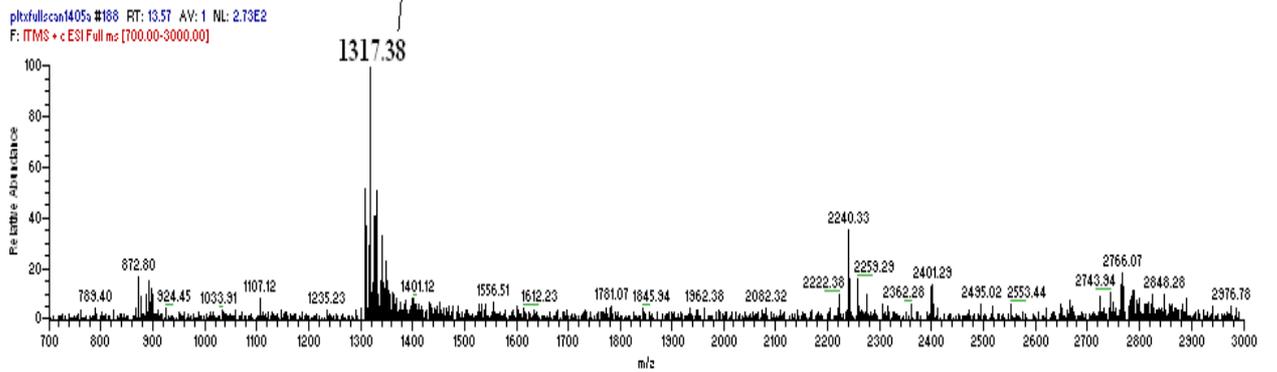
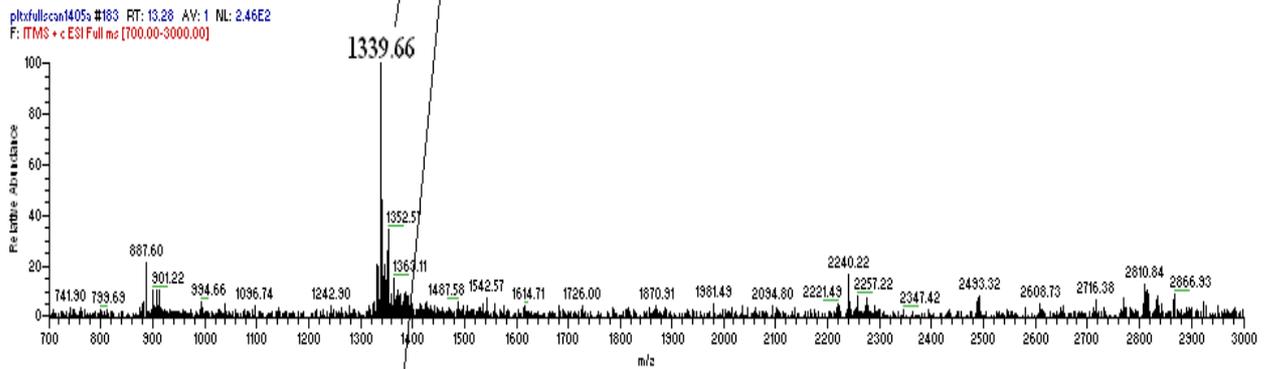
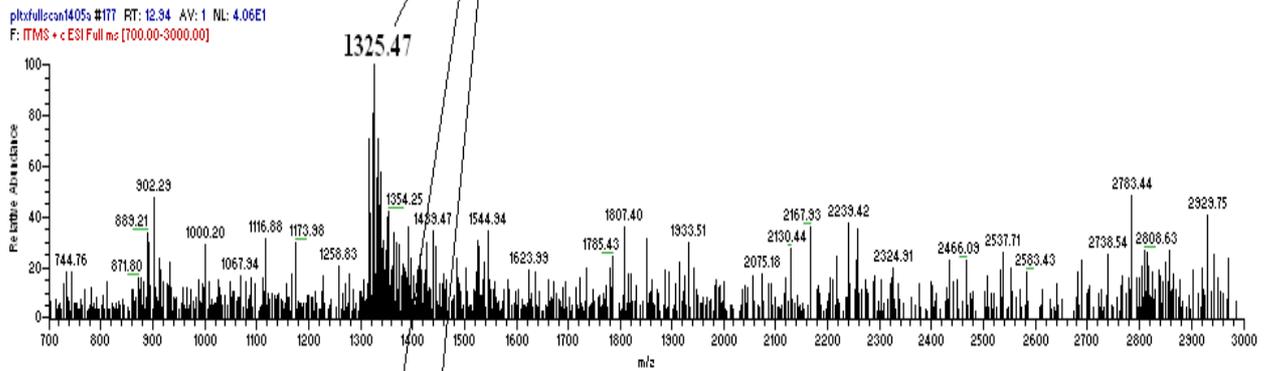
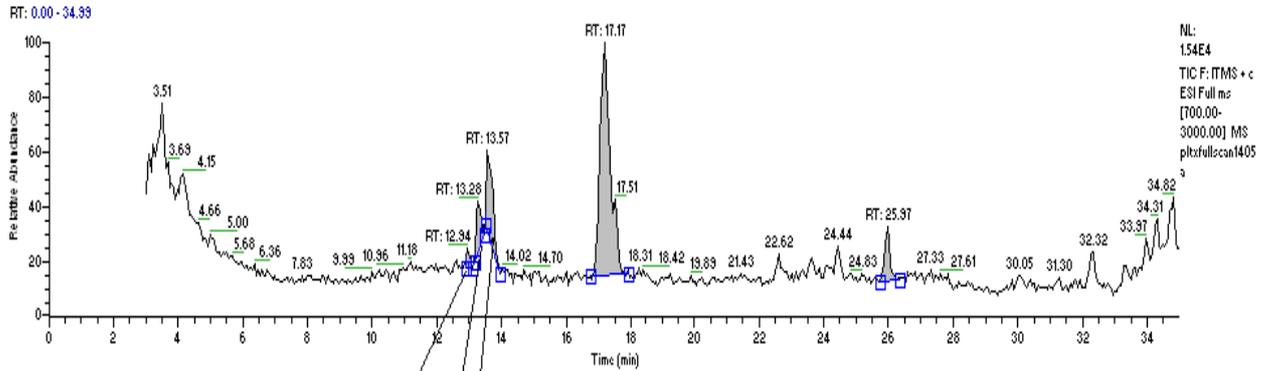
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T. (2010). *Ostreopsis ovata* bloom along the Cannero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae*, 9: 233-239.
- Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y. (1981). Further studies on palytoxin. II. Structure of palytoxin. *Tetrahedron Lett*, 22: 2781–2784.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kau, Y., Yasumoto, T. (1995). Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of American Chemical Society*, 117: 5389-5390.
- Valenfin, J. (1984). Analyses des parametres hidrobiologiques dans la remontée de Cabo Frio (Brésil). *Mar. Biol.*, 82: 259-276.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M. (2001). Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 51-60.
- Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., Takahashi, T., Alcala, A. A., Alcala, L. C. (1986). Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 163-166.
- Xu, N., Duan, S., Li, A., Zhang, C., Cai, Z., Hu, Z. (2010). Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae*, 9: 13-17.
- Zingone, A., Scalco, E., Marino, F., Montresor, M. (2010). Growth response of *Ostreopsis ovata* over a range of temperature and photoperiod combinations. GEOHAB OSM on Benthic HABS, Honolulu, Hawaii.

ANEXO 1

a

C:\Xcalibur\plyb\plb\fullscan1405a

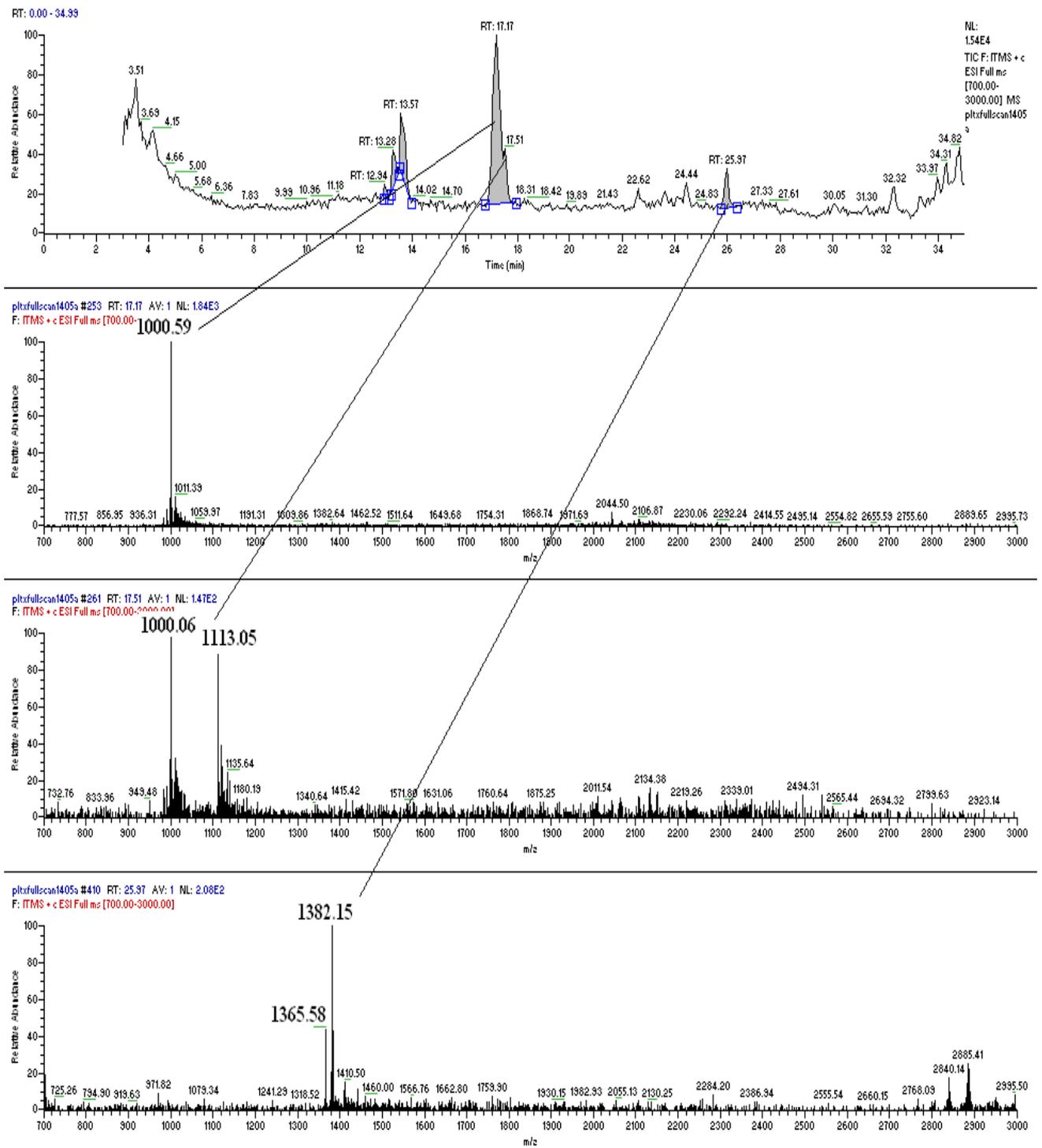
5/14/2010 3:37:39 PM



b

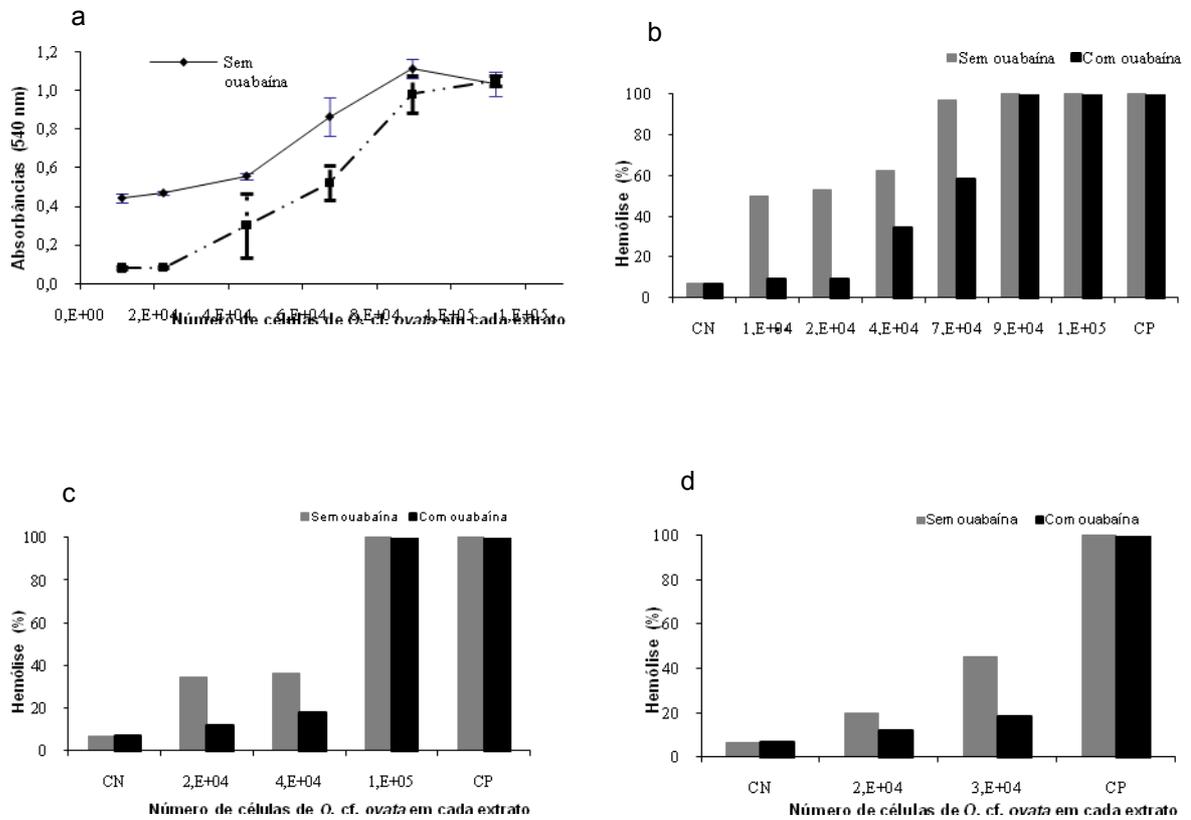
C:\Xcalibur\plyb\plb\fullscan1405a

5/14/2010 3:37:39 PM



Cromatogramas de análise de extrato da cepa LCA-B7 por LC-MS. a - Picos característicos de ovatoxina e palytoxina. b - Picos não identificados.

ANEXO 2



Resultado de ensaios de hemólise descritos por Corrêa (2008). a) Variação da absorbância a 540 nm com o número de células de *Ostreopsis cf. ovata*. b, c & d) Porcentagem de hemólise com o número de células de *Ostreopsis cf. ovata*. CN – controle negativo; CP- controle positivo. a, b & c) cepa LCA-E7. d) cepa LCA-B7.