

MUSEU NACIONAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MORFOTAXONOMIA E TOXICIDADE DE ESPÉCIES DE RAPHIDOPHYCEAE (OCHROPHYTA) DO RIO DE JANEIRO E SANTA CATARINA

SUEMA BRANCO



UFRJ

MORFOTAXONOMIA E TOXICIDADE DE ESPÉCIES DE RAPHIDOPHYCEAE (OCHROPHYTA) DO RIO DE JANEIRO E SANTA CATARINA

SUEMA BRANCO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientadore (s): Dra. Mariângela Menezes

Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença



MORFOTAXONOMIA E TOXICIDADE DE ESPÉCIES DE RAPHIDOPHYCEAE (OCHROPHYTA) ISOLADAS DO RIO DE JANEIRO E SANTA CATARINA

Suema Branco

Aprovada por:

Dra. Maria Beatriz de Barros Barreto (Presidente)

Dr. Luis Laureno Mafra Junior

Dr. Joel Campos de Paula

Branco, Suema.

Morfotaxonomia e toxicidade de espécies de Raphidophyceae (Ochrophyta) do Rio de Janeiro e Santa Catarina/ Suema Branco.

Rio de Janeiro. – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), 2012.

Orientadores: Mariângela Menezes

Luis Antônio de Oliveira Proença

1. Raphidophyceae. 2. *Chattonella*. 3. *Heterosigma*. 4. *Fibrocapsa*. 5. Taxonomia. 6. Toxicidade. 7. Florações

I. Mariângela Menezes, Luís Antônio de Oliveira Proença (Orientadores). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Museu Nacional. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Botânica). III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que contribuem e aos que contribuirão com pesquisas ou ações que de alguma forma ajudem nossa sociedade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela constante presença e proteção. À minha família e amigos pelo incentivo e pela compreensão da minha ausência durante muitos momentos nesses dois anos de Mestrado.

À Prof^a Dr^a Mariângela Menezes, por sua dedicação e carinho durante a orientação deste trabalho. Que desde o início de minha iniciação científica, em 2006, me mostrou a importância da taxonomia, um tema pelo qual me apaixonei. Por incentivar meu interesse no estudo taxonômico de espécies de microalgas potencialmente nocivas, me motivando e mostrando a relevância da taxonomia principalmente por suas ações junto a sociedade. Agradeço também por sua constante preocupação e disponibilidade de ajudar em diversas situações, muitas vezes não acadêmicas. Por ser orientadora e amiga, uma pessoa por quem guardo um grande carinho e admiração.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença, pela co-orientação através da incorporação de estudos sobre toxicidade nessa dissertação, um tema que embora difícil é muito interessante e de grande importância.

À Dr^a Catharina Alves de Souza, pela contribuição na construção de ideias e na revisão de parte desta dissertação. Por toda atenção e carinho e pela forma descontraída e alegre de trabalhar no laboratório.

À Prof^a Dr^a Silvia Mattos nascimento, por acompanhar o desenvolvimento da dissertação desde a apresentação dos resultados preliminares até a conclusão deste trabalho. Por todas as sugestões e correções durante as avaliações.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Ficologia do Museu Nacional, em especial aos alunos Gian Anthony Salazar e Leonardo de Magalhães que além do apoio moral ajudaram doando sangue para os pilotos dos testes hemolíticos.

Ao Laboratório de Laboratório de Biomineralização, Instituto de Biofísica Carlos Chaga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro pela cessão de espaço para a realização do preparo do material para a microscopia eletrônica de transmissão. Agradeço em especial à Mair Machado Medeiros por toda atenção e apoio durante a preparação das amostras e pelas imagens obtidas.

Agradeço também ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto de Biofísica Carlos Chaga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo suporte na realização dos testes hemolíticos, além da cessão de espaço na sala de cultivo para manutenção

das cepas de rafidofíceas. À disponibilidade e à atenção da Prof^a Dr^a Raquel Soares e do técnico Ricardo Frederico Guedes de Souza pelo auxílio no primeiro piloto do teste hemolítico com sangue de camundongos. À doutoranda Roberta Fernandes Pinto pelo auxílio na microscopia eletrônica de transmissão. Agradeço ainda o companheirismo dos alunos e professores do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, em especial à Simone Maciel da Costa, pelo ambiente muito agradável de trabalho e sempre dispostos em ajudar.

Ao Laboratório de Cultivo de Macroalgas, Instituto de Biologia, e ao Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese, Instituto de Química, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, respectivamente, pela cessão de espaço para a manutenção das cepas de radofíceas e pela cessão de espaço e meios de cultivo nos primeiros meses de manutenção das cepas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Mestrado através do Programa de Capacitação em Taxonomia – PROTAX.

RESUMO

Morfotaxonomia e toxicidade de espécies de Raphidophyceae (Ochrophyta) do Rio de Janeiro e Santa Catarina

Suema Branco

Dra. Mariângela Menezes

Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença

Resumo de dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

A classe Raphidophyceae caracteriza-se principalmente pelas células nuas com dois flagelos heterodinâmicos e citoplasma diferenciado em uma região ectoplasmástica e uma endoplasmática. Apresenta ampla distribuição e algumas espécies são nocivas à biota aquática. O presente trabalho apresenta o estudo morfotaxonômico e sobre a toxicidade de quatro espécies de Raphidophyceae (Chattonella subsalsa, C. marina var. antiqua, Heterosigma akashiwo e Fibrocapsa japonica) isoladas da Baía de Guanabara (RJ) e em Santa Catarina (SC). Além disso, apresenta um estudo de caso sobre florações recorrentes de H. akashiwo registradas no período de marco de 2007 a marco de 2008 na Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ), avaliando a influência de alguns fatores abióticos na formação das florações e investigando a presença de brevetoxinas em uma floração. As cepas foram mantidas em meio de cultivo f/2 sem sílica, temperatura de 21-23 C°, irradiância de 70 umol fotons.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas e salinidade variando de 20 a 30. A análise morfológica e taxonômica foi realizada com base em dados de estrutura (microscopia ótica) e de ultrastrutura (microscopia eletrônica de transmissão). Procedeu-se, também, análise de biologia molecular com base nas seqüências de rRNA 26S (LSU e ITS) em dois isolados de Chattonella. A toxicidade foi avaliada a partir de testes hemolíticos com a incubação de eritrócitos de coelho em diversas concentrações de extratos das cepas e a hemólise foi lida por absorbância em 540nm. As células mantidas sob cultivo mostraram morfologia como as descrita em literatura. Dentre as quatro espécies, C. marina var. antiqua foi a que mostrou maior variação de tamanho e forma celular, podendo ser confundida com outras espécies desse gênero se observada apenas as formas jovens. Os dados morfométricos e ultraestruturais diacríticos aplicados na separação entre as duas espécies de Chattonella (C. marina var. antiqua e C. subsalsa) isoladas foram corroborados pelos dados de biologia molecular, confirmando a identidade taxonômica de ambos os táxons. O resultado do teste hemolítico foi positivos para as quatro cepas, sendo F. japonica a que

apresentou maior atividade hemolítica. As florações de *H. akashiwo* na Lagoa Rodrigo de Freitas apresentaram densidades que variaram de $1,6 \times 10^6$ a 4×10^8 cel.L⁻¹ e estiveram restritas ao Canal do Piraquê. As elevadas abundâncias de *H. akashiwo* estiveram associadas aos baixos valores de salinidade e profundidade do canal (p < 0,05), parecendo determinar a formação de florações restritas a esse compartimento da lagoa. Não se observou mortalidade de peixes associada aos eventos de florações, tampouco foi detectada a presença de brevetoxinas no extrato celular obtido a partir da floração ocorrida em março de 2007.

Palavras chave: Raphidophyceae, *Chattonella, Heterosigma, Fibrocapsa*, Morfologia, Taxonomia, Toxicidade, Florações.

ABSTRACT

Morphotaxonomy and toxicity of Raphidophyceae (Ochrophyta) isolated from Rio de Janeiro and Santa Catarina

Suema Branco

Dra. Mariângela Menezes

Dr.Luis Antônio de Oliveira Proença

Abstract de Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

The class Raphidophyceae is mainly characterized by naked cells with two heterodynamic flagella and cytoplasm divided into ectoplasmatic and endoplasmatic regions. The class presents a wide word distribution and some species are harmful to aquatic biota. This dissertation deals with the morphotaxonomical and toxicity studies on four Raphidophyceae species (Chattonella subsalsa, C. marina var. antiqua, Heterosigma akashiwo and Fibrocapsa japonica) isolated from Rio de Janeiro and Santa Catarina states. Moreover, this work presents a case study on recurrent blooms of H. akashiwo registered from March 2007 to March 2008 in the Rodrigo de Freitas Lagoon (RJ), evaluating the influence of some abiotic factors that triggers the bloom and investigating the presence of a brevetoxins in one bloom. The strains were maintained in f/2 culture medium without silica, at of 21-23 °C, 70 µmol photon.m⁻².s⁻¹ on a 12:12h light/dark cycle and salinity ranging from 20 to 30. The taxonomic and morphological analysis was based on structure (optical microscopy) and ultrastructure (transmission electron microscopy) data. The molecular analysis of the 26S rRNA sequences (ITS and LSU) was done in two strains of Chattonella. Toxicity was assessed using hemolytic tests with the incubation of rabbit erythrocytes in different concentrations of strains extracts. The hemolysis was read by absorbance at 540 nm. Cells maintained in culture showed morphology as described in the literature. Among the four species, C. marina var. antiqua showed the greatest variation in cell size and shape and the young forms this species may be confused with other species of this genus. The ultrastructural and morphometric diacritic data used to distinguish between the two species of Chattonella (C. marina var. antiqua and C. subsalsa) were corroborated by data from molecular biology, confirming the taxonomic identity of both taxa. The hemolytic test results were positive for four strains, with F. japonica showing the highest hemolytic activity. The H. akashiwo blooms at Rodrigo de Freitas Lagoon had densities ranging from 1.6×10^6 to 4×10^8 cell.L⁻¹ and they were restricted to the

Piraquê Channel. The high abundances of *H. akashiwo* were associated with low values of salinity and depth of the channel (p < 0.05), this seemed to restrict the blooms to this compartment of the lagoon. Fish mortality was not observed during the bloom events and brevetoxins was not detected in the cell extract obtained from the bloom on March 2007.

Keywords: Raphidophyceae, *Chattonella, Heterosigma, Fibrocapsa*, Morphology, Taxonomy, toxicity, Blooms.

SUMÁRIO

1.	Introdução geral			
	1.1 Caracterização da classe Raphidophyceae			
	1.2 Justificativa do trabalho			
	1.3 Objetivos			
	1.4 Estruturação da dissertação	04		
2.	Capítulos			
	2.1 Morfotaxonomia de Raphidophyceae (Ochrophyta) isoladas do Rio de Janeiro			
	e Santa Catarina	05		
	2.1.1 Introdução	05		
	2.1.2 Histórico taxonômico	06		
	2.1.3 Material e métodos	08		
	2.1.3.1 Amostragem	08		
	2.1.3.2 Isolamento	08		
	2.1.3.3 Manutenção das cepas	08		
	2.1.3.4 Morfologia e taxonomia	08		
	2.1.3.5 Biologia molecular	09		
	2.1.4 Resultados	10		
	2.1.4.1 Morfologia e taxonomia	10		
	2.1.4.2 Biologia molecular	21		
	2.1.5 Discussão	22		
	2.2 Toxicidade de espécies de Raphidophyceae isoladas do Rio de Janeiro e			
	Santa Catarina	26		
	2.2.1 Introdução	26		
	2.2.2 Material e Métodos	28		
	2.2.2.1 Cultivo	28		
	2.2.2.2 Preparação dos extratos	28		
	2.2.2.3 Solução de eritrócitos	29		
	2.2.2.4 Atividade hemolítica do extrato	29		
	2.2.3 Resultados	30		

2.:	2.4 Discussão	33						
2.3 Estudo de caso: florações recorrentes de <i>Heterosigma akashiwo</i>								
(Raphid	(Raphidophyceae) em uma lagoa rasa tropical urbana. Lagoa Rodrigo de							
Freitas								
2.1	3.1 Introdução	36						
2.:	3.2 Área de estudo	37						
2.:	3.3 Material e métodos	38						
2.3.3.1 Monitoramento e coleta								
2.3.3.2 Morfologia e análise taxonômica								
2.3.3.3 Distribuição temporal e análise toxinológica								
2.3.4 Resultados								
2.3.4.1 Identificação Taxonômica								
2.3.4.2 Distribuição temporal e investigação da toxicidade								
2.3.5 Discussão								
2 Síntaga		62						
5. Sintese	-	02						
4. Conclus	. Conclusões							
5. Perspect	5. Perspectivas futuras							
6. Referên	6. Referências							
7. Anexos	7. Anexos							

xiii

Lista de Figuras

Figura 6. *Fibrocapsa japonica* em microscópio eletrônico de transmissão. Aspecto geral da célula (A), cloroplasto, mostrando pirenoide com penetração de tilacóides (B), mitocôndria com cristas (C), núcleo, Golgi e percursor de tricocisto, seta (D), e tricocisto em corte longitudinal (E) e transversal (F). C = Cloroplasto, P = Pirenóide, m = Mitocôndria, N = Núcleo e G = Golgi 18

Figura 12. Comparação da atividade hemolítica entre as quatro cepas de rafidofíceas, relativa ao número de células (A) e biomassa (B) dos extratos. Média e desvio padrão (n=3) 32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação morfológica e de ultraestrutura das quatro espécies de rafidofíceas estudadas 20						
Tabela 2. Local, salinidade e data de isolamento das cepas de rafidofíceas avaliadas nesse estudo 28						
Tabela 3. Número de células e biomassa (µg C) das três concentrações de extratos das cepas de rafidoficeas utilizados no teste hemolítico						
Tabela 4. Valores médios de absorbância e de eritrócitos lisados nos testes hemolíticos com trêsdiferentes concentrações de extratos das cepas de rafidofíceas						
Tabela 5. Valores médios, mínimos e máximos de algumas variáveis abióticas na superfície do Canal Piraque e do corpo principal da lagoa de março de 2007 a março de 2008. Os valores do corpo principal da Lagoa são as médias das quatro estações amostrais						
Tabela 6. Abundância e biovolume de <i>H. akashiwo</i> durante as florações observadas no Canal Piraquê de março de 2007 a março de 2008. Valores deoxigênio dissolvido (OD), salinidade,						

xvi

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. CARACTERIZAÇÃO DA CLASSE RAPHIDOPHYCEAE

A classe Raphidophyceae (Ochrophyta) caracteriza-se pelas células nuas, isto é, ausência de revestimento externo a membrana celular, e pelos dois flagelos heterodinâmicos que emergem de uma depressão rasa apical ou subapical, sendo o maior com mastigonemas e direcionado para frente, e o menor liso direcionado para trás (Hallegraeff e Hara 1995). A ausência de um revestimento externo rígido resulta na desintegração ou deformação das células na presença de soluções preservativas, o que inviabiliza, em geral, a identificação de material fixado (Throndsen 1993; Hargraves e Maranda 2002).

A reprodução usualmente é por divisão vegetativa longitudinal, porém há registros de sexualidade na classe, tanto em populações naturais como em cultura, com ciclo de vida diplôntico (Cronberg 2005; Figueroa e Rengefors 2006). Esse ciclo de vida inclui a formação de cistos, que em geral se depositam nos sedimentos (Nakamura *et al.* 1990). Entretanto, os resultados observados em representantes de ambiente marinho são contraditórios no que diz respeito à fusão celular e como/onde ocorre a meiose e a diploidização (Imai *et al.* 1998), quando comparados àqueles registrados para os representantes de água doce (Cronberg 2005; Figueiroa e Rengefors 2006).

Esta classe é formada por cinco gêneros marinhos e três gêneros de água doce. Os gêneros marinhos, com exceção de duas espécies de *Haramonas* Horiguchi (*H. viridis* Horiguchi & Hoppenrath e *H. pauciplastida* Yamaguchi, Hoppenrath, Takishita & Horiguchi) e o gênero *Chlorinimonas* Yamaguchi, Nakayama, Murakami & Inouye, apresentam fucoxantina como principal carotenóide o que lhes proporciona coloração amarela ou amarela acastanhada, enquanto os gêneros de água doce, juntamente com o gênero *Chlorinimonas* e as duas espécies de *Haramonas* apresentam diatoxantina como principal carotenóide conferindo-lhes coloração esverdeada (Yamaguchi *et al.* 2010a).

Diversas espécies marinhas e a espécie de água doce *Gonyostomum semem* (Ehrenberg) Diesing podem formar florações, fenômeno que consiste em um aumento do número de indivíduos da população em curto espaço de tempo (Imai *et al.* 1998; Tiffany *et al.* 2001; Pęczuła 2007; Shikata *et al.* 2008; Rengefors *et al.* 2008; Yamaguchi *et al.* 2010b). Além disso, algumas espécies formadoras de floração com capacidade de produção de cistos podem permanecer no sedimento, constituindo um risco potencial para a iniciação de futuras florações (Itakura *et al.* 1996; Imai e Itakura 1999; Cronberg 2005). Seis táxons marinhos (*Chattonella globosa* Hara & Chihara, *C. marina* (Subrahmanyan) Hara & Chihara, *C. marina* var. *antiqua* (Hada) Demura & Kawachi, *C. subsalsa* Biecheler, *Fibrocapsa japonica* Toriumi & Takano e *Heterosigma akashiwo* Hada ex Hara & Chihara) estão na lista de espécies tóxicas elaborada pela IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO). Essas espécies têm sido reportadas entre as que provocam as maiores mortandades de peixes em várias partes do mundo, causando grandes perdas econômicas principalmente para maricultura (Khan *et al.* 1997; Tiffany *et al.* 2001). Estudos mostram que a morte de peixes está associada a produção de brevetoxinas e análogos (Khan *et al.* 1996; Haque e Onoue 2001), compostos hemolíticos (Fu *et al.* 2004a; Bell *et al.*2007) substâncias reativas ao oxigênio (Oda *et al.* 1997) e muco que provoca uma anoxia mecânica (Bourdelais *et al.* 2002).

1.2. JUSTIFICATIVA

As rafidofíceas são reportadas mundialmente como formadoras de florações, na maioria dos casos associadas a mortandades de peixes (Imai *et al.* 1998; Tiffany *et al.* 2001; Hiroishi *et al.* 2005; Kempton *et al.* 2008), e muitas delas são comuns em sistemas costeiros brasileiros (Bergesch e Odebrecht 2001; Mafra *et al.* 2006). Embora as florações sejam consideradas fenômenos naturais, estes eventos tem incrementado em intensidade e em distribuição geográfica nas três últimas décadas, principalmente florações ocasionadas por fitoflagelados. O aumento nas florações está relacionado ao enriquecimento nutricional das águas costeiras em escala global (Smayda 1989). Por sua vez, a expansão da ocorrência de florações de algas potencialmente nocivas (FANs), que causam algum tipo de dano ao homem ou ao ambiente, pode estar associada ao crescente impacto antropogênico sobre as áreas costeiras, devido a alterações ambientais, introdução de espécies exóticas entre outros (Hallegraeff 1998; Cloern 1996; Hallegraeff 1993; Smayda 1990).

De um modo geral, os flagelados marinhos da costa brasileira, principalmente aqueles que não possuem um revestimento rígido, como as rafidofíceas, são pouco conhecidos (Bergesch e Odebrecht 2001). No Brasil, pelo menos um caso de mortandade de peixes foi associado a uma floração de *H. akashiwo* em um evento que ocorreu na Baia de Guaraqueçaba, complexo estuarino de Paranaguá, no verão de 2001 (Proença e Fernandes 2004). Outras florações de rafidofíceas foram observadas na costa do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Odebrecht *et al.* 2002; Proença 2005).

Apesar de ampla distribuição geográfica, não existem estudos taxonômicos tampouco toxinológicos de representantes marinhos de Raphidophyceae no Brasil. Mesmo na América do

Sul, há apenas um estudo realizado em *H. akashiwo* com base em material oriundo do Chile por Parra *et al.* (1991). A escassez de estudos ocorre principalmente em decorrência da necessidade da análise de material vivo, utilização de técnicas especiais para a sua correta identificação taxonômica e do reduzido número de especialistas neste grupo de algas.

1.3. OBJETIVOS

Geral

Estudar a morfotaxonomia e a toxicidade de espécies de Raphidophyceae da costa dos estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina.

Específicos

- Analisar a variação morfológica na população natural e em cultivo dos caracteres diacríticos utilizados na identificação dos representantes da classe Raphidophyceae.
- Avaliar a identidade taxonômica das cepas isoladas durante o estudo com base em dados de biologia molecular.
- Detectar a presença de atividade hemolítica nas cepas de Raphidophyceae isoladas e comparar a atividade hemolítica entre as cepas de Raphidophyceae isoladas.
- Caracterizar a morfologia de populações naturais de *H. akashiwo* observadas durante eventos de floração na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.
- Verificar a influencia de fatores abióticos nas florações recorrentes de *H. akashiwo* na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.
- Verificar a produção de brevetoxina em um evento de floração de *H. akashiwo* na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.
- Subsidiar trabalhos voltados à citologia, genética, ecologia, fisiologia, bioquímica, assim como o monitoramento costeiro, que demandem a identificação taxonômica de representantes da classe Raphidophyceae.

1.3. ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Os estudos realizados durante o desenvolvimento dessa dissertação estão apresentados sob a forma de três capítulos. O capítulo 3 já foi submetido à revista Brazilian Journal of Biology e os demais estão em processo de preparação para submissão visando às respectivas publicações. A discriminação de cada capítulo segue abaixo:

O CAPÍTULO 1 discute a taxonomia dos quatro isolados dos gêneros *Chattonella, Heterosigma* e *Fibrocapsa*, reunindo dados morfológicos de estrutura (microscopia ótica) e de ultrastrutura (microscopia eletrônica), além de dados de biologia molecular com base em LSU e ITS de dois isolados de *Chattonella*;

O CAPÍTULO 2 avalia a toxicidade dos quatro isolados dos gêneros *Chattonella, Heterosigma* e *Fibrocapsa* através da atividade hemolítica e compara a toxicidade dos extratos de cada cepa;

O CAPÍTULO 3 aborda aspectos morfológicos em microscopia ótica e eletrônica de transmissão de florações recorrentes de *Heterosigma akashiwo* registradas no período de março de 2007 a março de 2008 no Canal do Piraquê, Lagoa Rodrigo de Freitas (RJ), avaliando a influência de alguns fatores abióticos na formação desses eventos, além de investigar a presença de brevetoxinas em uma das florações observadas.

2. CAPÍTULOS

2.1 Morfotaxonomia de Raphidophyceae (Ochrophyta) isoladas do Rio de Janeiro e Santa Catarina

Resumo

Cepas das rafidofíceas *Chattonella subsalsa*, *Chattonella marina* var. *antiqua*, *Heterosigma akashiwo e Fibrocapsa japonica* foram isoladas da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, RJ e da costa norte do estado de Santa Catarina, Brasil. As cepas foram mantidas em meio f/2 sem sílica, temperatura de 21-23C°, irradiância de 70 µmol fótons.m⁻². s⁻ e fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro) e os valores de salinidade foram estabelecidos de acordo com o ambiente onde cada espécie foi coletada, que variou de 20 a 30. Células vegetativas das quatro espécies foram analisadas por microscopia óptica e eletrônica e mostraram morfologia como a descrita na literatura. Dentre as quatro espécies de rafidofíceas, *C. marina* var. *antiqua* foi a que mostrou maior variação de tamanho e forma celular, podendo ser facilmente confundida com outras espécies desse gênero se forem observadas apenas as formas jovens. Os dados morfométricos e de ultraestrutura das duas espécies de *Chattonella* isoladas do Rio de Janeiro e de Santa Catarina separam-as como táxons distintos, o que foi sustentado pela análise de biologia molecular.

Palavras chave: Chattonella, Heterosigma, Fibrocapsa, morfologia, taxonomia.

2.1.1. Introdução

As espécies de Raphidophyceae (Ochrophyta) apresentam o citoplasma diferenciado em uma região ectoplasmástica e uma endoplasmática (Mignot 1967, 1976; Heywood 1980). A região ectoplasmática apresenta numerosos vacúolos, algumas vezes distribuídos abaixo da membrana celular acompanhando-a em toda a sua extensão separando, então, a plasmalema dos cloroplastos, como em *Heterosigma* Hara ex Hara & Chihara e *Chlorinimonas* Yamaguchi, Nakayama, Murakami & Inouye (Yamaguchi *et al.* 2010a). O ectoplasma contém, ainda, os cloroplastos e os extrusomas (mucocistos ou tricocistos) (Mignot 1967, 1976; Heywood 1980). Os cloroplastos são numerosos, discóides, parietais, com disposição variada na célula, com os tilacóides reunidos em grupos de três. Os principais pigmentos fotossintéticos são as clorofilas a e c, com a fucoxantina ou diatoxantina como os carotenóides dominantes. Os pirenóides, quando presentes, podem conter lamelas de tilacóides em sua matriz ou invaginações (Hara e Chihara 1987; Potter *et al.* 1997; Yamaguchi *et al.* 2010a). Os tricocistos são estruturas naviculóides com tendência a se agruparem em regiões específicas da célula, p. ex. *Fibrocapsa* Toriumi & Takano e *Gonyostomum* Diesing, enquanto que os mucocistos são esferas refringentes (Mignot 1967). Ambos consistem de fibrilas osmiófilas provenientes dos dictiossomos contendo mucopolissacarídeo, que são descarregados sob alterações físicas e químicas (Mignot 1976; Heywood 1980). O endoplasma contém o núcleo, dictiossomos e as mitocôndrias (Mignot 1967, 1976; Heywood1980). O núcleo é grande e conspícuo podendo ocupar até 1/7 do volume celular como em *G. semen* (Ehrenberg) Diesing (Figueiroa e Rengefors 2006). Os dictiossomos são agrupados em inúmeros anéis ao redor da parte anterior do núcleo (Mignot 1976). As mitocôndrias são numerosas, esféricas ou elípticas, com cristas tubulares e, em geral com maior concentração ao redor do núcleo, às vezes em contato com os cloroplastos (Mignot 1967; Heywood 1980; Yamaguchi *et al.* 2010a).

2.1.2. Breve Histórico Taxonômico

As rafidofíceas foram agrupadas originalmente na classe Chloromonadophyceae Papenfuss 1955, contudo essa nomenclatura é inválida uma vez que *Chloromonas* constitui um gênero de algas verdes, o que fez com que Silva (1980) propusesse a classe Raphidophyceae Chadefaund *ex* Silva, nome válido e legítimo de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Mcneill *et al.* 2007).

A classe Raphidophyceae Chadefaud *ex* Silva pertence ao filo Ochrophyta (= Heterokontophyta) Cavalier-Smith, e compartilha com as outras classes desse Filo a presença de dois flagelos de comprimento e morfologia desiguais: um maior com mastigonemas com extremidade tripartida em ambos os lados do eixo principal do flagelo e, um menor, liso; presença das clorofilas a e c, arranjo dos tilacóides e a morfologia das cristas mitocondriais (Andersen 2004). A classe é amplamente reconhecida dentro do grupo dos heterocontos e mesmo sem consenso sobre as suas relações filogenéticas com as demais classes desse grupo, alguns estudos indicam as Raphidophyceae divergindo cedo dentro do Filo Ochrophyta (Cavalier-Smith e Chao 1996). Atualmente, estudos filogenéticos com base na subunidade 18S do rRNA sustentam fortemente que a classe é monofilética (Potter *et al.* 1997).

Inicialmente, a classe reunia a ordem Raphidomonadales e a única família Vacuolariaceae *sensu* Chadefaud, 1960. Posteriormente, Throndsen (1993) propôs a ordem Chattonellales, com base na presença da fucoxantina como carotenóide dominante e no habitat marinho, mantendo a

ordem Raphidomonadales com a família Vacuolariaceae proposta originalmente por Chadefaud para agrupar os representantes de água doce e com pigmentos semelhantes aos de Xanthophyceae.

Mais recentemente, os estudos filogenéticos realizados por Yamaguchi *et al.* (2010a) sugerem que o habitat marinho e a presença de fucoxantina são caracteres plesiomórficos em Raphidophyceae. Segundo estes autores, a migração de alguns representantes do grupo para ambiente de água doce foi acompanhada de uma mudança drástica na composição dos pigmentos, tendo ocorrido uma única vez na classe. Dessa forma, Yamaguchi *et al.* (2010a) propõem para a classe Raphidophyceae uma única ordem, Chattonellales Trondsen in Tomas 1993 emend. Yamaguchi, Murakami & Inouye, reunindo uma única família Vacuolariaceae Luther 1899 emend. Yamaguchi, Murakami & Inouye.

A classe Raphidophyceae apresenta um número relativamente pequeno de representantes, com os gêneros *Gonyostomum* (quatro espécies), *Merotricha* Mereschkowsky (uma espécie) e *Vacuolaria* Cienkowski (nove espécies e três variedades que não as típicas de suas espécies) de água doce e *Chattonella* Biecheler (três espécies e duas variedades que não as típicas da espécie), *Chlorinimonas* (uma espécie), *Fibrocapsa* (uma espécie), *Haramonas* (três espécies) *e Heterosigma* (uma espécie) de ambiente marinho. À exceção dos gêneros psâmicos Chlorinimonas e Haramonas, os demais são planctônicos (Horiguchi 1996; Horiguchi e Hoppenrath 2003; Yamaguchi *et al.* 2008, 2010a). O gênero marinho *Olisthodiscus* N.Carter foi tratado por muito tempo como um membro da classe Raphidophyceae, entretanto caracteres ultrastruturais (Hara *et al.* 1985) e de biologia molecular com base na subunidade menor do ribossomo (SSU rDNA) (Yamaguchi, dados não publicados) indicam que essa alga não é uma rafidofíceas. A espécie *Chattonella verruculosa* Hara & Chihara, com base em dados moleculares e caracteres morfológicos, foi transferida para a classe Dictyochophyceae, sob a nova combinação *Pseudochattonella verruculosa* (Hara *e Chihara*) Hosoi-Tanabe, Tanabe-Hosoi, Honda, Fukaya, Inagaki & Sako (Hosoi-Tanabe *et al.* 2007).

Atualmente, os táxons marinhos, à exemplo dos representantes de águas doces, são separados pela morfologia da célula, presença de uma invaginação tubular posterior na célula, inserção flagelar, tipo de movimento natatório, número e arranjo dos cloroplastos, presença e localização dos tricocistos, disposição dos cloroplastos e dos tilacóides, presença de pirenóides, e presença de lamelas de tilacóides no interior dos pirenóides (Hara *et al.* 1987; Yamaguchi *et al.* 2008, 2010a).

2.1.3 Material e Métodos

2.1.3.1 Amostragem

As coletas foram realizadas de janeiro a dezembro de 2010 em nove estações na Baia de Guanabara, estado do Rio de Janeiro, e em 20 estações ao longo da costa de Santa Catarina entre as cidades de Laguna e São Francisco do Sul. Em cada amostragem foi coletada água de subsuperfície acondicionada em garrafa de plástico transparente, medindo-se a temperatura da água e salinidade no local durante a amostragem.

2.1.3.2 Isolamento

O método usado para o isolamento das células seguiu os procedimentos gerais descritos por Schmidt (2007), que consiste no isolamento por meio de manipulação de um capilar de vidro e sucessivas lavagens. O isolamento foi realizado no Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese, Instituto de Química/UFRJ (LEAF), no Laboratório de Estudos sobre Algas Nocivas da UNIVALI (LEAN), e no Laboratório de Ficologia do Museu Nacional/UFRJ (LABFICO).

Para facilitar a obtenção de cepa monoalgal e visando evitar a contaminação por diatomáceas, muito comuns e abundantes em ambientes marinhos e estuarinos, adicionou-se ao meio de cultura uma solução de dióxido de germânio (GeO₂) em uma concentração final entre 1 a 10mg.L^{-1} (Lewin1 966).

2.1.3.3 Manutenção das cepas

As cepas de rafidofíceas foram mantidas em meio f/2 sem sílica (Andersen 2005), condicionadas em salas de cultivo a uma temperatura entre 21-23C°, irradiância de 70 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas. Os valores de salinidade foram estabelecidos de acordo com o ambiente onde cada espécie foi coletada, que variou de 20 a 30.

Os repiques foram realizados de 15 em 15 dias, sendo adicionados 10 mL da cultura antiga em 200 mL de meio novo. Os procedimentos foram feitos em capela de fluxo laminar, mantendo um ambiente estéril para evitar contaminações. Como medida de preucaução, as cepas foram mantidas em duplicata no LABFICO e no Laboratório de Cultivo de Macroalgas, Instituto de Biologia/UFRJ.

2.1.3.4 Morfologia e taxonomia

Para o detalhamento morfológico utilizou-se um conjunto de técnicas que envolvem diferentes tipos de iluminação em microscopia óptica (campo claro, contraste de fase, contraste de

interferência, epifluorescência) em amostras com células vivas, assim como a utilização de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As culturas de Raphidophyceae foram analisadas e fotografadas vivas através de uma câmara digital acoplada aos microscópios Olympus BH2 e BX51, com sistema de captura de imagem para fotos e software de análise de imagem Image Pro Plus version 6.1[®] (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) e QCapture Suíte version 2.68[®] (QImaging, Bethesda, MD, USA). Foram medidas no mínimo 30 células de cada cultura.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), a metodologia utilizada seguiu Tiffany et al. (2001), na qual a solução fixadora contém glutaraldeído, sacarose, tampão de cacodilato de sódio e tetróxido de ósmio. A adição da sacarose na solução fixadora objetiva minimizar as mudanças osmóticas ocorridas durante o processo de fixação, preservando com mais eficiência a morfologia das células (Katano et al. 2009). O tetróxido de ósmio é empregado por conferir maior dureza e condutividade elétrica às células, e em conjunto com glutaraldeído é indicado para manter formas celulares mais delicadas, assim como os flagelos (Boltovskoy 1995). Foram preparadas duas soluções, uma contendo glutaraldeído a 4% e 800 m osmol de sacarose em tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e outra de tetróxido de ósmio a 4%. Para cada 1 mL de cultura adicionou-se 1 mL da primeira solução, e logo em seguida 0,5 mL da segunda solução. Depois de 20 minutos em temperatura ambiente, as células da cultura foram lavadas três vezes com o mesmo tampão da solução fixadora. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação, desidratadas em séries crescentes de etanol, e em seguida embebidas em resina Spurr (SEM, Washington, EUA). As seções foram contrastadas com acetato de uranila (1%) e citrato de cobre (1%) e analisadas a partir de imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX, operado em 80 kV. O preparo do material para microscopia eletrônica de transmissão e as fotografias foram realizadas no laboratório de Biomineralização do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A identificação do material foi fundamentada em Tomas (1997), além de literatura específica e atualizada sobre Raphidophyceae. O sistema de classificação e a circunscrição dos táxons até o nível genérico seguiram Yamaguchi *et al.* (2010a).

2.1.3.5 Biologia molecular

Essa técnica foi aplicada visando confirmar a identidade taxonômica das células isoladas. Alíquotas de cada cultura foram retiradas para a extração do DNA. A extração foi realizada utilizando o "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada pela técnica de PCR usando o kit "GoTaq DNA polymerase kyt" (Promega Corporation). Para os domínios D1 e D2 do rRNA 26S, foram utilizados os primers D1R (5'- ACC CGC TGA ATT TAA GCA TA-3') e D2C (5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GA-3'). Para a região ITS foram utilizados os primers ITSF (59'-TAGAGGAAGGTGAAGTCG-39') e ITSR (59'-TTACTAGGGGAATCCGAG-39'). O programa de PCR realizado em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem) incluiu uma etapa de desnaturação (5 minutos a 95 °C), seguido por 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 95 °C), hibridização (45 segundos a 55 °C) e elongação (1 minuto e 15 segundos a 72 °C). A etapa final de elongação se realizou a 72 °C durante 7 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados usando as colunas de purificação "QIAquick" (Qiagen) segundo as especificações do fabricante. O seqüenciamento foi realizado usando-se um Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing version 3.0 (PE Biosystems®) e um ABI PRISM model 377 (version 3.3) na Estação Científica de Roscoff (França) usando os mesmos primers mencionados anteriormente.

As árvores filogenéticas considerando as sequências de rRNA 26S e a região ITS foram realizadas separadamente e incluíram tanto as sequências obtidas das cepas geradas neste trabalho como também outras sequências de Raphidophyceae disponíveis no GenBank (NBCI 2009) (Anexo 1 e 2). Para a árvore em ITS utilizou-se sequências de *Haramonas dimorpha* como "outgrup"e para árvore em LSU utilizou-se sequências de *Fibrocapasa japonica*, ambas obtidas também do GenBank. Todas as sequências foram alinhadas utilizando a versão *on line* do software MAFFT 6 (http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/index.html). As árvores filogenéticas foram então construídas com base nos métodos de parcimônia máxima (MP) e verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana (BI) utilizando-se PAUP* v. 4.0b10 (Swofford 2002), GARLI v. 0951 (Zwickl 2006) e MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist *et al.* 2005).

2.1.4 Resultados

2.1.4.1 Morfologia e taxonomia

Quatro cepas de diferentes espécies de rafidofíceas foram isoladas: *Chattonella marina* var. *antiqua* isolada na Baía Sul, Florianópolis (SC) em setembro de 2008; *Fibrocapsa japonica* isolada na Praia do Pereque, Porto Belo (SC) em abril de 2010; *Chattonella subsalsa* isolada na Baía de Guanabara (próximo a Foz do Rio Imboaçu), Rio de Janeiro (RJ) em maio de 2010 e *Heterosigma akashiwo* isolada na praia de São Miguel, Município de Biguaçú (SC) em maio de 2010. A seguir apresentam-se as descrições da morfologia e ultrastrutura das células das cepas estudadas. As características diacríticas de cada espécie estudada estão dispostas na tabela 1.

Chattonella marina var. antiqua (Hada) Demura & Kawachi

Phycologia 48 (6): 518-535. 2009.

Basiônimo: Hemieutreptia antiqua Hada, in Bull, Plank. Soc. Jap., 20: 124, f. 3-7.1974.

Figuras 1 e 2

Células isoladas, jovens ovadas a obovadas, células velhas piriformes, 49,86 - 85,50 x 26,54 - 39,45 µm, assimétricas lateralmente, às vezes com achatamento dorsoventral, processo caudal reduzido nas formas jovens (Fig. 1 A-C), desenvolvido nas adultas (Fig. 1 D)e nas células mais velhas atingindo até ca. de 29 µm de comprimento (Fig. 1 E). O citoplasma é nitidamente dividido em duas regiões, o ectoplasma amplo e altamente vacuolizado e o endoplasma denso (Fig. 2 A). A região ectoplasmática porta grandes vacúolos, alcançando até 6µm, localizados abaixo da plasmalema e entre os cloroplastos (Fig. 2 A e C). Os cloroplastos são numerosos, parietais, alongados, organizados radialmente (Fig. 1 G-I), coloração castanho-amarelada distribuídos por toda extensão ectoplasmática, cada um portando um pirenóide, com invaginação de tilacóides na matriz pirenoidal e estruturas osmiófilas esféricas no estroma (Fig. 2 B). Vesículas esféricas próximas à plasmalema, provavelmente corpos osmiófilos (Fig. 2 C), também observados no citoplasma (Fig. 2 D). Vesículas achatadas abaixo da plasmalema (Fig. 2 C). A região endoplasmática mostra um grande núcleo central, com cerca de 12µm de comprimento, dictiossomos e numerosas mitocôndrias (Fig. 2 A e E). Núcleo esférico com nucléolo (Fig. 2 A). Os dictiossomos são localizados na parte anterior da célula e laterais ao núcleo (Fig. 2 E). Mitocôndrias distribuídas por toda extensão do endoplasma, apresentando cristas tubulares (Fig. 2 E). Glóbulos lipídicos e estruturas supostamente precursoras de corpos osmiófilos próximos ao núcleo e também no ectoplasma (Fig. 2 D e E). Presenca de corpos osmiófilos formando protuberâncias próximas à superfície celular (Fig. 1 D-E e Fig. 2 D). Flagelos inseridos em depressão anterior subapical (Fig. 2 F), tamanhos desiguais, o anterior menor e atingindo quase o comprimento da célula, o posterior maior, aproximadamente 1,3 vezes o comprimento da célula.

Material examinado: cultura estabelecida a partir de isolado do estado de Santa Catarina.



Figura 1. *Chattonella marina* var. *antiqua*. Aspecto geral em cultura das células jovens (A-C), adultas (D) e mais velhas (E) em microscópio de campo claro, mostrando divisão celular (F) e em fluorescência (G-I) mostrando os cloroplastos alongados dispostos radialmente e região do núcleo (n). Escalas = 10µm.



Figura 2. *Chattonella marina* var. *antiqua* em microscópio eletrônico de transmissão. Aspecto geral da célula em corte longitudinal (A); cloroplasto com estruturas osmiófilas esféricas no estroma (seta de ponta dupla) e pirenoide com penetração de tilacóides (seta), (B); vesículas achatadas (seta de ponta dupla) e corpos osmiófilos (setas) abaixo da plasmalema (C); corpos osmiófilos também observados no citoplasma (D); núcleo, Golgi, percursor de corpos osmiófilos (seta) e mitocôndria com cristas (E); depressão anterior subapical (seta) por onde emergem os flagelos (F). C = Cloroplasto, P = Pirenóide, m = Mitocôndria, N = Núcleo, n nucléolo, G = Golgi, V = vesículas.

Comentários: A morfologia celular variou de acordo com a idade da cultura. As células jovens mostraram-se ovadas a obovadas, muito semelhantes as células de *Chattonella subsalsa* isolada do estado do Rio de Janeiro. Por outro lado, as células velhas apresentaram menor largura, maior comprimento e conspícuo processo caudal, exibindo a típica morfologia de *C. marina* var.

antiqua. A morfologia das células velhas associada a penetração dos tilacóides na matriz pirenoidal confirmaram a identidade taxonômica do presente material com *C. marina* var. *antiqua*.

Chattonella subsalsa Biecheler

Arch. Zool. Exp. Gén. 78: 79-83.1936.

Figuras 3 e 4

Células isoladas elípticas, obovadas a piriformes, 26,36 - 44,94 x 15,58 - 28,0 µm, processo caudal hialino pontiagudo ou arredondado, reduzido nas formas jovens a desenvolvidos nas formas velhas, 6 µm comprimento (Fig. 3 A-F). Numerosos cloroplastos alongados, organizados radialmente (Fig. 3 G-I), coloração castanho-amarelada, cada um portando um pirenóide, sem invaginação de tilacoides na matriz pirenoidal e estruturas osmiófilas esféricas no estroma (Fig. 4 B). A região endoplasmática apresenta um grande núcleo, dictiossomos e numerosas mitocôndrias (Fig. 4 A). Núcleo esférico com nucleólo (Fig. 4 A) localizado geralmente na porção mediana da célula e às vezes na região apical. Mucocistos projetados na superfície celular (Fig. 3 F). Flagelos inseridos em depressão anterior subapical, tamanhos desiguais, o anterior menor e atingindo quase que o comprimento da célula, o posterior maior, aproximadamente 1,2 vezes o comprimento da célula.

Material examinado: cultura estabelecida a partir de isolado do estado do Rio de Janeiro.

Comentários: Não foram encontradas diferenças morfológicas marcantes nas culturas com diferentes idades. Como mencionado no comentário anterior, essa cepa se aproximou morfologicamente das células jovens de *C. marina* var. *antiqua*, entretanto as menores dimensões celulares, a presença de mucocistos em forma de oboé e a ausência de invaginação de tilacoides na matriz pirenoidal confirmaram a sua identificação como *C. subsalsa*.



Figura 3. *Chattonella subsalsa*. Aspecto geral das células vivas (cultura) em microscópio de interferência (A-F) indicando os mucocistos (seta) e em fluorescência (G-I) mostrando os cloroplastos arredondados e região do núcleo (n). Escalas = 10µm



Figura 4. *Chattonella subsalsa* em microscópio eletrônico de transmissão. Região endoplasmática com núcleo (N) e nucléolo (n) e mitocôndria (m) (A) e cloroplasto com pirenoide (p) e inclusões lipídicas (seta) (B).

Fibrocapsa japonica Toriumi & Takano

Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 76: 25-35. 1973.

Figuras 5 e 6

Células isoladas elípticas, $21,75 - 23,64 - x 15,11 - 17,82 \mu m$, algumas vezes formando agregados (Fig. 5 A-B). Citoplasma dividido em duas regiões, o ectoplasma vacuolizado e o endoplasma denso (Fig. 6 A). A região ectoplasmática porta vacúolos localizados abaixo da plasmalema e entre os cloroplastos e mitocôndrias. Os cloroplastos são numerosos, parietais, alongados, organizados radialmente (Fig. 5 D-E), coloração castanho-amarelada, distribuídos por toda extensão ectoplasmática, cada um portando um pirenóide, com invaginação de tilacoides na matriz pirenoidal (Fig. 6 B). Mitocôndrias parecem estar distribuídas por toda extensão ectoplasmática e endoplasmática, apresentando cristas tubulares (Fig. 6 C). A região endoplasmática mostra um núcleo central, dictiossomos e precursores de tricocistos (Fig. 6 D). Tricocistos naviculóides (Fig. 6 E *e* F) concentrados na região posterior da célula. Flagelos inseridos em depressão anterior apical, tamanhos desiguais, o anterior menor e tão longo quanto o comprimento da célula, o posterior maior, aproximadamente 1,2 vezes o comprimento da célula.

Material examinado: cultura estabelecida a partir de isolado do estado de Santa Catarina.



Figura 5. *Fibrocapsa japonica*. Aspecto geral das células vivas (cultura) em microscópio de campo claro (A-C), indicando a formação de agregados de células (A) e tricocistos (setas), e em fluorescência (D-F) mostrando os cloroplastos e os pirenoides (seta). Escalas= 50µm (A), 10µm (B, C, D, E, F).

Comentários: *Fibrocapsa japonica* é facilmente identificada pelos tricocistos naviculóides concentrados na região posterior da célula. Comparada às demais células de rafidofíceas estudadas, *F. japonica* foi a espécie que apresentou movimento menos vigoroso. Além de células isoladas, foi freqüente a formação de agregados na fase exponencial das culturas. Não foram observadas variações morfológicas ao longo do desenvolvimento da cultura.



Figura 6. *Fibrocapsa japonica* em microscópio eletrônico de transmissão. Aspecto geral da célula (A), cloroplasto, mostrando pirenoide com penetração de tilacóides (B), mitocôndria com cristas (C), núcleo, Golgi e percursor de tricocisto, seta (D), e tricocisto em corte longitudinal (E) e transversal (F). C = Cloroplasto, P = Pirenóide, m = Mitocôndria, N = Núcleo e G = Golgi.

Heterosigma akashiwo (Hada) Hada ex Hara & Chihara

Bot. Mag. Tokyo 100: 151-163

Basiônimo: Entomosigma akashiwo Hada, Nat. Sci. 14: 1-26. 1967.

Figura 7 e 8

Células ovadas, arredondadas, elípticas, 14,43 - 22,5 x 10,81 - 19,21 µm, às vezes com achatamento dorsoventral (Fig. 7 A-C). Citoplasma dividido em duas regiões, o ectoplasma vacuolizado e o endoplasma denso (Fig. 8 A). Região ectoplasmática porta vacúolos, cloroplastos e algumas mitocôndrias (Fig. 8 A). Cloroplastos 8 - 28, parietais (Fig. 7 D-F), arredondados, organizados radialmente, frequentemente ausentes na porção mediana ventral (Fig. 7 E), coloração

castanho-amarelada, distribuídos por toda extensão ectoplasmática, cada um portando um pirenóide, com invaginação de tilacoides na matriz pirenoidal (Fig. 8 B). Mitocôndria com cristas (Fig. 8 E). Região endoplasmática mostra um núcleo na porção central da célula, dictiossomos (Fig. 8 D). Mucocistos na superfície celular (Fig. 8 F). Flagelos inseridos em depressão anterior subapical, tamanhos desiguais, o anterior menor e tão longo quanto o comprimento da célula, o posterior maior, aproximadamente 1,2 vezes o comprimento da célula.

Material examinado: população natural do estado do Rio de Janeiro e cultura estabelecida a partir de isolado do estado de Santa Catarina.

Comentários: *Heterosigma akashiwo* não apresentou variação morfológica ao longo do seu desenvolvimento em cultivo.



Figura 7. *Heterosigma akashiwo* em microscopia ótica. Aspecto geral das células vivas (cultura) em microscópio de campo claro (A-F), e em fluorescência (G-H) mostrando os cloroplastos. Escalas = 5μ m.



Figura 8. *Heterosigma akashiwo* em microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto geral das células (A), cloroplasto (B), mostrando pirenoide com penetração de tilacoides (seta) e inclusões lipídicas entre as lamelas de tilacóides (C), Núcleo e Golgi, setas (D), mitocôndria com cristas (E) e mucocisto na superfície celular (F). C = Cloroplasto, p = Pirenóide, m = Mitocôndria e N = Núcleo.

Tabela 1. Comparação morfológica e de ultraestrutura das quatro espécies de rafidofíceas estudadas.

	F. japonica	H. akashiwo	C. subsalsa	C. marina var. antiqua
Forma celular	Elípticas	Ovadas, arredondadas a elípticas	Elípticas, obovadas a piriformes	Ovadas a obovadas nas células jovens; piriformes células velhas
Dimensões (µm)	21,8 - 23,6 x 15,1 - 17,8	14,4 - 22,5 x 10,8 - 19,2	26,4 - 44,9 x 15,6 - 28,0	49,9 - 85,5 x 26,5 - 39,5
Processo caudal	Ausente	Ausente	Até 6 μm comprimento nas células velhas	Até 29 μm comprimento nas células velhas
Inserção flagelo	Apical	Subapical	Subapical	Subapical
Cloroplastos	Inúmeros	8 - 28	Inúmeros	Inúmeros
Tilacóides no pirenoide	Presente	Presente	Ausente	Presente
Tricocistos	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Mucocistos	Ausente	Presente	Presente	Ausente
2.1.4.2 Biologia molecular

Obteve-se resultado de produto de PCR apenas para as cepas de *Chattonella*. A partir das amplificações da região ITS foi encontrada uma sequência de bases com 670 bp para *C. subsalsa* e 676 para *C. marina* var. *antiqua*; e as amplificações da região LSU resultaram em uma sequência de 706 bp para *C. subsalsa* e 705 para *C. marina* var. *antiqua*. A árvore filogenética com base em sequências de ITS e LSU obtidas nesse trabalho e outras sequências disponíveis no GenBank detectou dois clados bem suportados. A árvore em ITS apresentou um clado com a sequência obtida de *C. subsalsa* agrupada com outras sequências dessa mesma espécie, com um bootstrap de 99%, e o outro clado mostra a sequência de *C. marina* var. *antiqua* agrupada com outras sequências dessa mesma espécie, com um bootstrap de 80% (Fig. 9). A árvore filogenética em LSU mostraroum o mesmo resultado que aquele observado para ITS, com bootstrap de 88% para *C. subsalsa* e 97% para *C. marina* var. *antiqua* (Fig. 10).



0.05

Figura 9. Árvore filogenética de *Chattonella* usando máxima verossimilhança (ML) nas análises de sequências ITS. Seqüências obtidas neste estudo estão em negrito, as demais obtidas do GenBank. Valores de bootstrap ML (superior a 70%) são relatados nos nós. Barra de escala corresponde a 0,05% de divergência.



Figura 10. Árvore filogenética de *Chattonella* usando máxima verossimilhança (ML) nas análises de sequências LSU. Seqüências obtidas neste estudo estão em negrito, as demais obtidas do GenBank. Valores de bootstrap ML (superior a 70%) são relatados nos nós. Barra de escala corresponde a 0,05% de divergência.

2.1.5 Discussão

A variação morfológica observada no crescimento em cultivo de *C. marina* var. *antiqua* já foi encontrada também em *C. marina* por Marshall e Hallegraeff (1999), Band-Schmidt *et al.* (2004) e Demura *et al.* (2009). As estruturas osmiófilas presentes no estroma do cloroplasto de *C. marina* var. *antiqua* foram registradas em *Vacuolaria virescens* (Heywwod 1980) e *C. subsalsa* (Mignot 1976), e pressupõem-se serem reservas lipídicas que podem ser encontradas também no citoplasma (Heywwod 1980). Além disso, o trabalho de Ishida *et al.* (2000) apresenta micrografias dos cloroplastos de *H. akashivo* com estruturas similares, sem entretanto comentá-las. Segundo Yamaguchi *et al.* (2010a), vesículas achatadas abaixo da plasmalema estão presentes apenas nas espécies *H. akashiwo* e *Chlorinimonas sublosa*, sendo que em *H. akashiwo* as vesículas apresentam em seu interior minúsculos grânulos. Contudo vesículas sem minúsculos grânulos

foram encontradas em *C. marina* var. *antiqua* no presente estudo e são visíveis também em micrografias de *V. virescens* nos trabalhos de Mignot (1967) e Heywwod (1980).

Tradicionalmente, Chattonella antiqua, C. marina (Subrahmanyan) Hara & Chihara e C. ovata Hara & Chiara têm sido separadas entre si com base, primariamente, na forma e dimensões celulares. Chattonella ovata mostra células elípticas ao contrário das outras duas espécies que exibem células com processo caudal. Chattonella antiqua e C. marina exibem células oblongas a obovadas e diferem nas dimensões celulares, maiores que 50 µm na primeira espécie e menores que 50 µm na segunda. Para C. antiqua e C. marina os registros de variação métrica com sobreposição de dimensões celulares entre ambos os táxons demonstram que esse caráter ocasiona dificuldades para uma identificação adequada dessas espécies (Band-Schmidt et al. 2004, Demura et al. 2009). A separação morfológica entre C. antiqua e C. marina torna-se ainda mais difícil porque, não raro, células de C. antiqua podem perder o processo caudal característico e assumir forma arredondada de reduzidas dimensões, assemelhando-se mais ainda a C. marina (Hosoi-Tanabe et al. 2006). Algumas vezes células de C. marina podem assumir maiores dimensões, dependendo das condições de cultura e, então se sobrepondo às dimensões de C. antiqua. Ambas as espécies exibem, também, respostas fisiológicas de crescimento a fatores ambientais (p.ex. salinidade, temperatura, luz) iguais, além de ciclo de vida iguais e cistos de resistência morfologicamente iguais sob as mesmas condições ambientais (Hosoi-Tanabe et al. 2006). Mais recentemente, Demura et al. (2009) mostraram uma variação contínua dos caracteres morfológicos nessas três espécies não havendo limites claramente definidos entre elas. Demura et al. (2009) ainda observaram divergência genética entre C. antiqua, C. marina e C. ovata usando diferentes marcadores (ITS, rbcl, COI e regiões selecionadas de microsatélite), entretanto as 104 cepas analisadas aparentemente formavamdo uma única população geográfica. Esses autores propuseram, então que as três espécies fossem tratadas como variedades conservando-se o nome de C. marina em função do princípio de prioridade (Demura et al. 2009).

Chattonella marina ainda se aproxima morfologicamente de *C. subsalsa* e a separação entre essas espécies também é confusa e divergente. Alguns autores consideram ambos os táxons como sinônimos sob o nome de *C. subsalsa* (Hollande e Eujumet 1956), enquanto outros os separam pela morfologia dos mucocistos e cloroplastos. De acordo com Hara e Chihara (1982) *C. marina* apresenta tilacóides na matriz pirenoidal, ao contrário de *C. subsalsa*, cujos tilacóides estão ausentes na matriz dos pirenoides. Ainda, *C. subsalsa* conta com mucocistos em forma de "oboé" (Hara e Chihara 1982). Hallegraeff e Hara (1995) descrevem *C. marina* desprovida de mucocistos e a separam de *C. subsalsa* também pela coloração dos cloroplastos verde a castanho-amarelada e

verde a castanha, respectivamente. Esses mesmos autores separam ainda *C. subsalsa* de *C. marina*, pela protusão dos mucocistos na superfície celular da primeira espécie (Hallegraeff e Hara 1995).

Mais recentemente Tiffany *et al.* (2001) descreveram *C. marina* em microscopia eletrônica com tilacóides na matriz pirenoidal e com corpos osmiófilos eletro-densos formando protuberâncias amplamente distribuídas na superfície da célula, entretanto sem a ocorrência de mucocistos distintos. O trabalho de Bowers *et al.* (2006), a partir de culturas oriundas de isolados de diferentes partes do mundo, indicaram o processo caudal hialino, i.e. desprovido de cloroplastos, como diacrítico em *C. subsalsa*, contrariamente ao observado em culturas de *C. marina*.

Embora no presente estudo *Chattonella subsalsa* tenha se aproximado morfologicamente de células jovens de *C. marina* var. *antiqua*, a presença de mucocistos em forma de oboé e a ausência de tilacoides na matriz pirenoidal em *C. subsalsa* a separaram de *C.marina* var. *antiqua* que não apresenta mucocistos e possui tilacóides na matriz pirenoidal (Hallegraeff eHara 1995; Hara e Chihara 1982). Por outro lado, nossos resultados apontam a necessidade de maior atenção na identificação de *C. marina* var. *antiqua*, considerando que suas células jovens podem apresentar menores dimensões celulares e processo caudal posterior reduzido, e neste caso serem confundidas com *C. subsalsa* ou ainda com *C. marina* var. *marina*. Dessa forma, a presença de processo caudal posterior desenvolvido, caráter diacrítico para a separação de *C. marina* var. *antiqua* de *C. subsalsa* e *C. marina* var. *marina* só pode ser usado em células maduras conforme apontado por Demura *et al.* (2009).

As células analisadas de *F. japonica* concordaram integralmente com a descrição do táxon, que além de constituir a única espécie do gênero, é facilmente identificada pelos tricocistos naviculóides concentrados na região posterior da célula (Hara e Chihara 1985). Os agregados de células de *F. japonica* detectados durante este estudo foram semelhantes aos descritos por de Boer *et al.* (2004). Segundo esses autores a formação de agregados em cultura de *F. japonica* é comum em condições não limitadas por nutrientes, ao contrário de meios com limitação de N quando não se observa essa formação. De acordo ainda com de Boer *et al.* (2004) a formação de agregados nessa espécie provavelmente constitui uma estratégia para se evitar a herbivoria.

Heterosigma akashiwo também constitui um gênero monoespecífico, contudo aproxima-se bastante de *O. luteus*. Essas espécies são separadas por características de estrutura e de ultraestrutura. *Olithodiscus luteus* tem menor número de cloroplastos (5-13) que são ausentes na região mediana da célula, ausência de mucocistos e canais citoplasmáticos na matriz do pirenóide (Hara e Chihara 1987; Hallegraeff e Hara 1995). *Heterosigma akashiwo* tem maior número de cloroplatos (10-30) distribuídos na periferia da célula e lamelas de tilacóides penetrando na matriz do pirenóide (Hara *et al.* 1985; Hara e Chihara 1987). A semelhança morfológica entre *H. akashiwo* e *O. luteus* por muito tempo fez com que o status taxonômico de ambas as espécies fosse confundido. Entretanto, trabalhos recentes com base em dados de biologia molecular demonstraram que *O. luteus* não pertence a classe Raphidophyceae e é, portanto, totalmente distinto de *Heterosigma* (Bowers *et al.* 2006; Yamaguchi *et al.* 2010a).

As árvores filogenéticas com base nas regiões LSU e ITS mostraram uma relação distante entre *C. subsalsa* e *C. marina* var. *antiqua*, separando as duas espécies, conforme registrado em literatura (Bowers *et al.* 2006; Demura *et al.* 2009). Os resultados filogenéticos sustentaram os dados morfológicos na separação das duas espécies, como indicado previamente por Bowers *et al.* (2006) e Demura *et al.* (2009).

Em síntese, nosso estudo demonstrou que forma e dimensões celulares, presença/mucocistos e tricocistos e ultraestrutura do cloroplasto são bons caracteres na separação das espécies de rafidofíceas estudadas, conforme indicado em literatura. Além disso, a separação entre as duas cepas de *Chattonella marina* var. *antigua* e *C. subsalsa* foi corroborada pelos dados de biologia molecular como apontado por Bowers *et al.* (2006) e Demura *et al.* (2009).

2.2. TOXICIDADE DE ESPÉCIES DE RAFIDOFÍCEAS ISOLADAS DO RIO DE JANEIRO E SANTA CATARINA

Resumo

Avaliou-se a toxicidade de quatro cepas de Raphidophyceae isoladas da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, RJ e da costa norte do estado de Santa Catarina, através de atividade hemolítica. As cepas foram mantidas em meio f/2 sem sílica, em temperatura de 21-23 C°, irradiância de 70 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas e os valores de salinidade entre 20 e 30, dependendo da cepa. Foram testadas três diferentes concentrações celulares de extrato (100%, 50% e 10%) de cada uma das quatro cepas utilizando-se sangue de coelho, estimando-se a hemólise através de um leitor de absorbância. Os resultados foram positivos para as quatro cepas. Os extratos de *Fibrocapsa japonica, Chattonella subsalsa* e *Chattonella marina* var. *antiqua* mostraram atividade hemolítica significativa (p < 0,005) nas concentrações a partir de 50%; enquanto que a cepa de *Heterosigma akashiwo* mostrou atividade hemolítica significantiva (p < 0,005) apenas nos extratos com concentração de 100%. Dentre as quatro espécies de Raphidophyceae estudadas *F. japonica* foi a que apresentou maior atividade hemolítica.

Palavras chave: Chattonella, Heterosigma, Fibrocapsa, atividade hemolítica.

2.2.1 Introdução

A classe Raphidophyceae é composta por um número relativamente pequeno de representantes, com gêneros de água doce e marinhos, amplamente distribuídos. Além disso, tanto representantes marinhos quanto de água doce (*Gonyostomum semem*) podem formar florações, fenômeno que consiste em um aumento do número de indivíduos da população em curto espaço de tempo (Imai *et al.* 1998; Tiffany *et al.* 2001; Pęczuła 2007; Shikata *et al.* 2008; Rengefors *et al.* 2008; Yamaguchi *et al.* 2010b). Algumas espécies marinhas (*Chattonella globosa, C. marina, C. marina* var. *antiqua, C. subsalsa, Fibrocapsa japonica* e *Heterosigma akashiwo*) têm sido reportadas entre as que provocam maiores mortandades de peixes em várias partes do mundo, causando grandes perdas econômicas principalmente para a maricultura (Khan *et al.* 1997; Tiffany *et al.* 2001).

O efeito nocivo das florações de rafidofíceas à biota aquática tem sido relacionado a diversos mecanismos. Um deles é o entupimento das guelras provocado pela produção de muco pelas

células das rafidofíceas, provocando uma anoxia mecânica com conseqüente mortandade de peixes (Bourdelais et al. 2002). Produção de brevetoxinas e análogos no grupo foi registrada por Khan et al. (1996) e Haque e Onoue (2001) em cepas de F. japonica, C. marina e C. marina var. antiqua isoladas do Japão e em cepas isoladas de florações de C. marina, C. subsalsa e F. japonica do Japão, Nova Zelândia e Estados Unidos (Bridgers et al. 2004). Por outro lado, diversos trabalhos não detectaram presença de brevetoxinas (Fu et al. 2004b; Zhang et al. 2004; Marshall et al. 2003; Keppler et al. 2006; Pezzolesi et al. 2010), de forma que a questão da produção de brevetoxinas em todas as espécies do grupo de rafidofíceas permanece em aberto. Em relação à atividade hemolítica, os compostos responsáveis por essa ação são ácidos graxos polinsaturados (AGPIs) (Fu et al. 2004a). Acredita-se que esses AGPIs presentes nos extratos são os primeiros produtos da cascata de lipoxigenase que começa logo após a lise celular (Jüttner 2001). Mais de um tipo de AGPI com atividade hemolítica pode estar presente em uma mesma espécie, como no caso de F. japonica, no qual três ácidos graxos polinsaturados foram descritos com atividade hemolítica (Fu et al. 2004a). Além disso, a quantidade ou o tipo de ácido graxo varia de acordo com a espécie (Bell et al. 1997; Fu et al. 2004a; Fu et al. 2004b). A intensidade da atividade hemolítica está relacionada a condições ambientais tais como salinidade, irradiância e limitação por nutrientes (Marshall et al. 2001; de Boer et al. 2004a). Oda et al. (1997) sugerem ainda que a produção de compostos hemolíticos pode estar associada a produção de substâncias reativas ao oxigênio (ROS). Substâncias reativas ao oxigênio são fortes oxidantes e considerados citotóxicas pelos danos que causam ao DNA e por provocarem a peroxidação lipídica, comprometendo a membrana plasmática (Marshall et al. 2005). Embora o ROS esteja associado à mortalidade de peixes, ele sozinho não é suficiente para causar a morte do animal, contudo desempenha um papel de cofator na toxicidade dos AGPIs, aumentando em até três vezes seu poder tóxico (Marshall et al. 2003).

A presença de espécies de rafidofíceas tem sido registrada ao longo da costa do Brasil, incluindo a formação de florações, com um dos eventos associado à mortandade de peixes no complexo estuarino de Paranaguá, estado do Paraná (sul do Brasil) no ano de 2001 (Proença e Fernandes 2004). E uma cepa de *H. akashiwo* isolada dessa mesma floração apresentou efeitos tóxicos sobre juvenis do misídaceo *Mysidopsis juniae* e larvas do molusco *Perna perna*, mas não foi associada a presença de brevetoxina (Mafra 2005). A presença de brevetoxinas também não foi constatada em floração ocorrida na Lagoa Rodrigo de Freitas (sudeste do Brasil) em março de 2007 (ver terceiro capítulo do presente trabalho). Embora haja registro de espécies de rafidofíceas e florações para diversas regiões da costa brasileira, o único estudo do potencial tóxico dessas

microalgas foi o trabalho de Mafra (2005) para *H. akashiwo*. O presente estudo objetiva verificar a atividade tóxica em cepas de rafidofíceas isoladas da costa norte de Santa Catarina e sul do Rio de Janeiro através de ensaios hemolíticos.

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Cultivo

Quatro cepas de espécies diferentes de rafidofíceas (Tabela 2) foram mantidas em meio f2 sem sílica (Andersen 2005), condicionadas em salas de cultivo a temperatura entre $21-23C^{\circ}$, irradiância de 70 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Os valores de salinidade foram estabelecidos de acordo com o ambiente onde cada espécie foi coletada.

Tabela 2. Local, salinidade e data de isolamento das cepas de rafidofíceas avaliadas nesse estudo.

Сера	Local de isolamento	Salinidade	Data
F. japonica	Praia do Pereque, Porto Belo (SC)	30	abr/10
H. akashiwo	Praia de São Miguel, Biguaçú (SC)	20	mai/10
C. marina var.antiqua	Baía Sul, Florianópolis (SC)	30	set/08
C. subsalsa	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro (RJ)	25	mai/10

2.2.2.2 Preparação dos extratos

Um volume de 250 mL de cada uma das culturas das quatro cepas de rafidofíceas na fase exponencial (em triplicata) foi centrifugado em 4.500 rpm. Previamente foi retirada uma alíquota de 1 mL de cultura que foi fixada com solução de lugol 1% para estimar a densidade celular a serem utilizadas no extrato. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pélete sedimentado foi extraído com 10 mL de metanol 100% em um recipiente de vidro. Após ficar sob agitação constante em temperatura ambiente durante 2h, o extrato foi mantido sob uma injeção de ar até a evaporação completa do metanol. Posteriormente, o material seco foi conservado a -18°C durante 48h. No dia da realização do teste, o extrato seco foi ressuspendido em 5ml de solução fisiológica de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 113; KH₂PO₄ 1,2; KCl 4; MgSO₄.7H₂O 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; C₆H₁₂O₆ 11,1) e colocado sob agitação constante em temperatura ambiente 1h.

Visando comparar a atividade hemolítica das cepas estudadas com dados de literatura, o potencial hemolítico foi calculado a partir da densidade celular do extrato (cel.mL⁻¹). Mas

considerando que as cepas de rafidoficeas apresentam dimensões distintas o potencial hemolítico foi avaliado também a partir da biomassa celular do extrato (μ g C). A estimativa da densidade celular do extrato de cada uma das quatro cepas foi obtida pela quantificação das células fixadas em lugol sob microscópio óptico, usando-se câmera de Fuchs-Rosenthal. A densidade celular de foi estimada a partir da média e desvio padrão da quantificação de triplicatas, sendo expresso em células por mililitro (cels.mL⁻¹). O biovolume de cada espécie foi calculado a partir de modelos geométricos aproximados à forma dasespécies (Hillebrand *et al.* 1999) e transformado em carbono (μ g C) de acordo com o trabalho de Montagnes *et al.* (1994).

2.2.2.3 Solução de eritrócitos

O teste hemolítico foi realizado de acordo com Malpezzi e Freitas (1991), utilizando-se sangue de coelhos. A coleta foi realizada na orelha dos animais com uma agulha e um tubo coletor contendo heparina. O sangue foi depositado em um Becker com solução fisiológica de Krebs-Henseleit (SF), na proporção de SF de 1:30. Posteriormente, a solução foi centrifugada e ressuspendida em SF, repetindo-se o processo por duas vezes. Em seguida, foi preparada uma suspensão de 100 mL de 0,5% V/V de eritrócitos em SF.

Para calcular a densidade de eritrócitos (cels.mL⁻¹) na solução fisiológica, triplicatas de alíquotas da solução de eritrócitos foram quantificadas em câmeras Neubauer sob microscópio ótico e o valor médio foi calculado.

2.2.2.4 Atividade hemolítica dos extratos

Foram testadas três diferentes concentrações celulares, 100%, 50% e 10% (Tabela 3) de extrato de cada uma das quatro cepas de Raphidophyceae obtidas por diluição em SF. No teste, 0,5 mL de cada concentração de extrato foi adicionado em 1 ml de solução de eritrócitos (SE) em tubos de plásticos de 1,5 mL. Dois controles foram utilizados: positivo com uma solução de detergente Triton 100 (1%) e SF em SE (0,4 mL de SF com 0,1 mL de solução de Triton em 1 ml de SE); e negativo com uma solução de SF em SE (0,5 ml de SF em 1 ml de SE). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Os tubos foram mantidos por duas horas em agitação constante á 23 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado e a atividade hemolítica foi medida no sobrenadante usando o leitor de absorbância Epectra Max M2^e (Molecular Devices, California) em 540nm.

O valor de absorbância obtido nas diferentes concentrções de extratos foi usado para

estimar a atividade hemolítica (número de eritrócitos lisados), considerando que a a absorbância obtida no controle positivo correspondeu a 100% de lise dos eritrócitos. A lise total dos eritrócitos incubados no comtrole positivo foi comprovada por observação em microscópio ótico. A comparação da atividade hemolítica entre as quatro cepas foi feita a partir dos valores de hemólise dos extratos em 100% de concentração. Para isso, esses valores foram padronizados dividindo o número de eritrócitos lisados pelo número de células de rafidofíceas presentes em cada extrato (eritrócitos lisados.cel⁻¹) e dividindo também o número de eritrócitos lisados pela biomassa de carbono das rafidofíceas presentes nos extratos (eritrócitos lisados. μ g C⁻¹). Para o teste estatístico, o número de eritrócitos lisados foram transformados logaritmicamente [ln (x +1)] e a significância da atividade hemolítica das diferentes concentrações de extratos em relação aos controles negativos foi obtida pelo teste Tukey através do programa SigmaPlot v.11.0.

Tabela 3. Número de células e biomassa (μ g C) das três concentrações de extratos das cepas de rafidoficeas utilizados no teste hemolítico. DP = desvio padrão.

		N° de C	éls	Biomassa	
	-	Céls .mL ⁻¹	DP	ug C.mL ⁻¹	DP
	10%	123958	14747	13,93	1,6
Heterosigma akashiwo	50%	619792	73737	68,63	8,1
	100%	1239583	147475	136,41	16,1
	10%	24479	4191	4,03	0,7
Fibrocapsa japonica	50%	122396	20955	19,85	3,4
	100%	244792	41910	39,46	6,7
Chattanalla marina	10%	23872	5352	140,20	31,2
Var antiqua	50%	119358	26759	690,92	153,6
van antiqua	100%	238715	53518	1373,26	305,3
	10%	42361	8909	63,20	13,2
Chattonella subsalsa	50%	211806	44544	311,45	65,0
	100%	423611	89089	619	129

2.2.3. Resultados

A atividade hemolítica das cepas na fase exponencial foi positiva para as quatro cepas de rafidofíceas testadas (Fig. 11). Os extratos de *F. japonica, C. subsalsa* e *C. marina* var. *antiqua* mostraram atividade hemolítica significativa (p<0,005), ou seja, significativamente diferentes dos

controles negativos nas concentrações de extrato a partir de 50%. *Heterosigma akashiwo* apresentou atividade hemolítica significativa (p<0,005) apenas nos extratos com concentração de 100% (Fig. 11). Os valores de absorbâncias e número de eritrócitos lisados são indicados na Tabela 4.



Figura 11. Variação do número de eritrócitos lisados de acordo com as concentrações 10%, 50% e 100% dos extratos de *H. akashiwo*, *F. japonica*, *C. marina* var. *antiqua*, *C. subsalsa*. As lises de eritrócito significativamente diferentes (p < 0,005) do controle negativo estão marcadas com asterisco (*). Média e desvio padrão (n=3).

A comparação da intensidade da hemólise entre as quatro cepas apresentou resultados distintos quanto à densidade (eritrócitos lisados.cel⁻¹) e biomassa em carbono de cada espécie de rafidofíceas (eritrócitos lisados.µg C⁻¹) (Fig.12). Em relação a densidade celular, *H. akashiwo* mostrou o menor valor de atividade hemolítica, seguida de *C. subsalsa*; enquanto que as cepas de *F. japonica* e *C. marina* var. *antiqua* apresentaram os maiores valores de atividade hemolítica. Apenas as atividades hemolíticas de *F. japonica* e *C. marina* var. *antiqua* apresentaram diferenças significativas (p = 0.991) entre si. Levando-se em conta os valores de biomassa de carbono, *C. marina* var. *antiqua* e *C. subsalsa*, seguidas da cepa de *H. akashiwo* apresentaram os

menores valores de atividade hemolítica; enquanto que a cepa de *F. japonica* destacou-se com o maior valor. Todas as atividades hemolíticas calculadas em função da biomassa de carbono foram significativamente diferentes entre si (p < 0,005).

		Absorbâr	ncia	Eritrócitos lisados	
		ABS (540nm)	DP	%	DP
	10%	0,047	0,001	22,4	0,6
Heterosigma akashiwo	50%	0,054	0,003	25,6	1,3
	100%	0,154	0,028	73,5	13,3
	10%	0,052	0,000	24,8	0,2
Fibrocapsa japonica	50%	0,065	0,011	31,0	5,3
	100%	0,178	0,020	85,0	9,6
Chattanalla marina	10%	0,050	0,002	23,8	1,1
Chattonella marina	50%	0,058	0,002	27,5	1,0
van anaqua	100%	0,162	0,005	77,6	2,3
	10%	0,051	0,003	24,4	1,6
Chattonella subsalsa	50%	0,058	0,005	27,6	2,3
	100%	0,144	0,003	68,8	1,5
Positivo		0,198	0,010	100,0	4,9
Negativo		0,047	0,002	22,4	0,7

Tabela 4. Valores médios de absorbância e de eritrócitos lisados nos testes hemolíticos com três diferentes concentrações de extratos das cepas de rafidofíceas. DP = desvio padrão.



Figura 12. Comparação da atividade hemolítica entre as quatro cepas de rafidofíceas, relativa ao número de células (A) e biomassa (B) dos extratos. Média e desvio padrão (n=3).

2.2.4. Discussão

Florações de rafidofíceas tem sido registradas em diversos países, p.ex. Alemanha, Brasil, Canadá, Estados Unidos, India, Itália, Japão e Suécia (Anexo2). Em muitos casos foram causadas pelas espécies estudadas no presente trabalho (*H. akashiwo, F. japonica* e *C. marina* var. *antiqua*) e seus eventos associados à mortalidade de peixes (Imai *et al.* 1998; Jungnu e Kripa 2009; Keppler *et al.* 2005; Tiffanny *et al.*2001). No Brasil, mais especificamente no Estado do Rio de Janeiro, já foram registradas recorrentes florações de *C. subsalsa* na Baía de Guanabara e de *H. akashiwo* na Lagoa Rodrigo de Freitas, ambos sem registros de mortalidade da biota aquática (Branco *et al.* dados não publicados). Contudo, florações de *H. akashiwo* na Baía de Paranaguá, Paraná, estiveram associadas à massiva mortandade de peixes em 2001 (Proença e Fernandes 2004). Em um dos eventos de floração nesta região, uma cepa de *H. akashiwo* foi isolada e sua toxicidade foi comprovada a partir de bioensaios em juvenis do misídaceo *Mysidopsis juniae* e larvas do molusco *Perna perna* (Mafra 2005).

Outras cepas de *H. akashiwo*, assim como *F. japonica, C. subsalsa* e *C. marina* isoladas de distintas regiões do mundo (p.ex. América do Norte, Ásia, Europa, Oceania) apresentaram resultados de toxicidade positivos para bioensaios com peixes, larvas de moluscos, ostras, crustáceos, ciliados, e camundongos (Anexo 2). Apenas as espécies *F. japonica, H. akashiwo* e *C. marina* apresentam trabalhos investigativos sobre sua atividade hemolítica, e na sua maioria com atividade confirmada (de Boer *et al.* 2004a; Fu *et al.* 2004b; Kuroda *et al.* 2005; de Boer *et al.* 2009; Ling e Trick 2010; Pezzolesi *et al.* 2010). Tanto quanto se sabe, não há avaliação de atividade hemolítica para *C. subsalsa* e *C. marina* var. *antiqua* descrita na literatura, portanto esse constitui o primeiro registro de atividade hemolítica para ambas as espécies.

A intensidade da atividade hemolítica entre as cepas de Raphidophyceae foi distinta para *H. akashiwo, C. subsalsa* e *C. marina* var. *antiqua* quando se considerou a lise de eritrócitos tanto pelo número de células (Eritrócitos lisados.cel⁻¹) quanto pela biomassa (Eritrócitos lisados.µg C⁻¹). Os resultados de hemolíse por células de rafidofíceas são interessantes para se verifivcar a relevância ecológica, através das densidades das florações causadas por essas espécies. Já os resultados obtidos apartir do biovolume do extrato é interessante para comparar a atividade hemolítica entre as espécies. Ao considerar o número de células utilizadas no extrato observou-se que as duas cepas de *Chattonella* apresentaram uma alta atividade hemolítica quando comparada a *H. akashiwo*. Contrariamente, ao se considerar o biovolume, a cepa de *H. akashiwo* apresentou uma intensidade hemolítica maior se comparado as duas cepas de *Chattonella*. Essa divergência

ocorreu principalmente devido as grandes dimensões celulares de *Chattonella* e as pequenas dimensões de *H. akashiwo*. Por outro lado, é interessante observar que ao se comparar a intensidade da atividade hemolítica da cepa de *F. japonica* com as outras cepas das três espécies analisadas, *F. japonica* mostrou a maior atividade considerando-se tanto a densidade de células quanto a biomassa (eritrócitos lisados.cel⁻¹ e eritrócitos lisados.µg C⁻¹, respectivamente). Isto ressalta ainda mais a capacidade hemolítica da cepa de *F. japonica* frente às outras cepas das demais espécies. Na literatura não há estudos comparativos do grau de toxicidade entre as quatro espécies estudadas. Contudo, sabe-se que baixas densidades de *F. japonica*, a partir de 1 x10³ cel.mL, já apresentam efeito ictiotóxico (Shen *et al.* 2010).

Estudos demostraram que a espécie F. japonica apresenta atividade hemolítica em concentrações celulares variando de 4×10^3 a 1,9 $\times 10^4$ cel.mL⁻¹ (de Boer *et al.* 2004; de Boer *et al.* 2009; Pezzolesi et al. 2010). No presente trabalho a atividade hemolítica foi detectada a partir de $1,2 \times 10^5$ cel.mL⁻¹, sendo maior do que as registradas na literatura. De Boer *et al.* (2009) comparou a atividade hemolítica entre 15 cepas de F. japonica isoladas da América do Norte, Ásia, Europa e Oceania, e encontrou resultado positivo para todas, mas com intensidades distintas. Para H. *akashiwo*, a densidade na qual se registrou atividade hemolítica $(1,2 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1})$ também foi superior as descritas na literatura (6×10^4 cel.mL⁻¹) (Ling e Trick 2010). Entretanto, uma cepa brasileira desta mesma espécie mostrou-se tóxica para juvenis misidaceos de Mysidopsis juniaea em densidade de 7,9 x 10³ cel.mL⁻¹ (Mafra 2005). Florações de *H. akashiwo* com densidades de cerca de 2 x 10³ cel.mL⁻¹ estiveram associadas a massiva mortandade de peixes no Paraná (Proença e Fernandes 2004). Porém, o número de células pode não ser o principal fator da mortadade de peixes, conforme observado p.ex. nas florações de H. akashiwo com densidades atingindo 4×10^5 cel.mL⁻¹ sem registro de mortalidade de peixes observadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro (Branco et al. 2010). De fato, estudos mostram que a toxicidade de espécies de rafidofíceas está associada a diversos fatores ambientais. Por exemplo, a atividade hemolítica de F. japonica está associada à salinidade, temperatura, nutrientes (de Boer et al. 2004) e luminosidade (de Boer et al. 2009).

Em síntese, o presente estudo mostrou que as quatro cepas das rafidoficeas *H. akashiwo, F. japonica, C. marina var. antiqua e C. subsalsa* isoladas da costa do Rio de Janeiro e de Santa Catarina apresentaram atividade hemolítica. Dentre as quatro espécies analisadas, *F. japonica* apresentou o maior potencial hemolítico. Essas quatro espécies são mundialmente citadas como formadoras de floração, inclusive no Brasil. Isso reforça a importância de um monitoramento mais acurado nas regiões sul e sudeste do país bem como de um levantamento sobre a ocorrência dessas

espécies ao longo da costa brasileira. Florações dessas espécies podem exercer efeitos nocivos à biota aquática, acarretando prejuízos de cunho econômico principalmente devido à produção pesqueira e a maricultura. Mesmo os eventos de florações sem mortandade de peixes alteram a qualidade da água, afetando as áreas de lazer para a comunidade local e o turismo da região.

2.3. FLORAÇÕES RECORRENTES DE *HETEROSIGMA AKASHIWO* EM UM SISTEMEA RASO URBANO (LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RJ)

Resumo

Seis florações de *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) foram observados em março de 2007 a março de 2008 na Lagoa Rodrigo de Freitas, um sistema semi-confinado eutrófico localizado no Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil). As células vegetativas de *H. akashiwo* analisadas por microscopia óptica e electrónica mostraram morfologia como descrito em literatura. As florações $(2.8 \times 10^4 \text{ to } 4 \times 10^8 \text{ cel.L-1})$ foram restritas à zona intermédia do canal Piraquê, que se situa na parte nordeste da lagoa e recebe aporte de água doce. A salinidade da sub-superfície da água e a profundidade do canal apresentaram correlação negativa significativa com a abundância de H. akashiwo e parecem determinar a formação de flores restritas a este compartimento da lagoa. Não houve mortalidade de peixes durante as florações de *H. akashiwo* e não foi detectada a presença de brevetoxinas em um extrato celular obtido a partir da floração observado em 19 de março de 2007.

Palavras chave: Heterosigma akashiwo, florações, lagoa costeira urbana.

2.3.1. Introdução

Florações da espécie da rafidofícea ictiotóxica *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada são amplamente distribuídas nos ecossistemas costeiros de diferentes latitudes onde são frequentemente responsáveis por extensas perdas de populações naturais ou cultivadas de peixes (Kempton *et al.* 2008; O'Halloran *et al.* 2006). Efeitos adversos e alelopáticos de *H. akashiwo* também são conhecidos sobre vários invertebrados marinhos, incluindo copepodos, ciliados, larvas e adultos de ostras, camarões e vieiras (Connell *et al.* 1997; Littik, 1998; Clough and Strom 2005; Keppler *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.* 2010). Até agora, nenhum efeito tóxico em humanos foi relatado. Embora as toxinas produzidas por *H. akashiwo* não tenham sido devidamente caracterizadas, seu mecanismo toxicológico parece estar relacionado à secreção de muco e a produção excessiva de substâncias reativas ao oxigênio (ROS) que podem danificar as brânquias de peixes e bloquear a troca de O₂, resultando em asfixia e morte (Ling e Trick 2010; Nakamura *et al.* 1998). Alternativamente, alguns estudos têm apontado a presença de compostos semelhantes à brevetoxina (Haque e Onoue 2002; Khan *et al.* 1997). De qualquer modo, a

toxicidade parece ser variável entre os diferentes ecótipos e ser também potencialmente afetada por condições ambientais, como concentrações de nutrientes (Rensel *et al.* 2010).

No Brasil, as florações de *H. akashiwo* foram reportadas pela primeira vez no complexo estuarino de Paranaguá, PR, situado no sul do país, em março de 2001 e novembro de 2004 com as densidades de células alcançando $2,6 \times 10^6$ cel. L⁻¹ (Proença e Fernandes 2004) e $0,5 \times 10^6$ cel. L⁻¹ (Mafra 2005), respectivamente; e no final de julho de 2002, com 19×10^6 cel. L⁻¹ no Balneário de Camboriu, SC, também localizado no sul do Brasil (Mafra 2005). A floração de 2001 esteve associada à mortandade de peixes, resultando em uma proibição da pesca e extração de mariscos durante 25 dias (Proença e Fernandes 2004). Além disso, uma cepa de *H. akashiwo* foi isolada dessa mesma floração e análises toxicológicas revelaram resultados positivos em juvenis misidaceos de *Mysidopsis juniaea* Silva além de inibir o desenvolvimento larval do mexilhão *Perna perna* Linnaeus (Mafra 2005).

Recentemente, florações recorrentes de *H. akashiwo* têm sido observadas em uma zona confinada da Lagoa Rodrigo de Freitas, um sistema costeiro raso localizado na cidade do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Branco *et al.* 2010). O objetivo do presente estudo foi o de caracterizar a morfologia (estrutura e ultraestrutura) da população de *H. akashiwo* observada durante um evento de floração ocorrido em março de 2007, além de avaliara influência de alguns fatores abióticos, bem como investigar a produção de brevetoxinas e seus análogos.

2.3.2. Área de Estudo

A Lagoa Rodrigo de Freitas é um sistema costeiro semi-confinado localizado na parte sul da cidade do Rio de Janeiro (22°57'02"S, 43°11'09"O, Figura 13). Apresenta uma superfície de 2,5 km², 6,5 milhões mm³ de volume e profundidade média de cerca de 4 m. Com águas eutrofizadas, a lagoa recebe entradas pontuais de esgoto doméstico local e água proveniente de sua bacia de drenagem, recebendo água do mar pelo Canal do Jardim de Alah e descarga de água doce dos rios Cabeças e Macacos pelo Canal do Piraquê, esse último situado na parte nordeste da lagoa. O Canal Piraquê é raso (<1,5 m), quando comparado com o resto da lagoa, apresentando também baixa turbulência e salinidade. O tempo de residência da água varia de acordo com a abertura/fechamento da comporta que regula a entrada de água dos rios. Embora essa conexão tenha um regime irregular, esteve aberta durante a maior parte do período do presente estudo.



Figura 13. Mapa da Lagoa Rodrigo de Freitas mostrando o Canal do Piraquê e indicando os cinco pontos de amostragem no corpo principal da lagoa.

2.3.3. Material e Métodos

2.3.3.1 Monitoramento e coleta

As amostras de água foram coletadas mensalmente de março de 2007 a março de 2008, em uma estação (S1), localizado na zona intermediária do Canal do Piraquê e quatro estações (S2 a S5) no corpo principal da lagoa (Fig. 12). As amostras foram obtidas por coleta de água de subsuperfície através da passagem de frasco e imediatamente fixadas com solução de Lugol. Subamostras foram mantidas vivas sob refrigeração (4 °C). Temperatura e salinidade da água (termosalinometro YSI-30), oxigênio dissolvido (oxímetro YSI-54) e transparência da água (disco de Secchi) foram medidas semanalmente em diferentes profundidades no Canal do Piraquê (superfície; 0,5 e 1,0 m) e na lagoa (superfície; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; e 4,0 m). A zona eufótica (Z_{eu}) foi calculada como sendo três vezes a profundidade do disco de Secchi (Cole 1994). A pluviosidade e a temperatura do ar foram obtidas a partir de uma estação meteorológica localizada no Jardim Botânico (http://www2.rio.rj.gov.br/georio/site/alerta/alerta.htm).

2.3.3.2 Morfologia e análise taxonômica

As análises morfológicas das células de *H. akashiwo* foram feitas em amostras vivas e fixadas, sob microscópio Olympus BH2 equipado com contraste de fase e software de captura de

imagem Pro Image Plus, versão 4.5.0.19 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA). Para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as células foram concentradas por centrifugação, fixadas por 2 h em glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4). Esse material foi lavado três vezes com o mesmo tampão e pós-fixado durante a noite em tetróxido de ósmio 1% tamponado com cacodilato de sódio 0,05 M. Em seguida, foi desidratado em séries de etanol e incluído em resina Epon 812 (Pelco). Após seccionar, os cortes foram colocados em grades de carbono revestido de cobre e contrastados duas vezes por 40 min com acetato de uranila 2% e por 1 min com citrato de chumbo a 1%. Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio eletrônico ZEISS EM 900 (Zeiss Jena, Alemanha) operando a 80kV. A identificação taxonômica foi baseada em caracteres morfológicos, tais como a forma e tamanho da célula, número, cor e forma dos cloroplastos, presença de mucocistos e ultra-estrutura dos cloroplastos e pirenóides, de acordo com Hara e Chihara (1987).

2.3.3.3 Distribuição temporal e análise toxinológica

A abundância de *H. akashiwo* (células.L⁻¹) foi estimada a partir das amostras fixadas em solução de Lugol neutro 1% usando microscópio invertido (Utermöhl 1958) em 400× de ampliação. O biovolume (μ m³) foi calculado de acordo com Hillebrand *et al.* (1999) e multiplicado pela abundancia (mm³.L⁻¹). A correlação entre variáveis abióticas e a abundância de *H. akashiwo* foi avaliada por análise de correlação de Spearmam usando o programa Statistica 7.0 (StatSoft). Foram considerados os dados obtidos na superfície do Canal do Piraquê e do corpo principal da Lagoa Rodrigo de Freitas (n= 65). Antes das análises, todo o conjunto de dados foi transformado logaritmicamente [ln (x +1)].

A presença de brevetoxins e seus derivados foi investigada em uma amostra coletada durante a floração de *H. akashiwo* observado em 19 de março de 2007. Um total de 1,5 L de água foi suavemente filtrado sob vácuo para um filtro de fibra de vidro (poro 0,45 µm, Sartorius). O material retido no filtro foi extraído em metanol a 100%, concentrou-se no fluxo de N₂, e depois analisado por LC-MS em um sistema de cromatografia líquida de Agilent 1200 ligado a um quadrupolo triplo espectrómetro modelo de massa de iões de armadilha-3200 Q-Trap (Applied Biosystems), equipado com uma fonte de ESI Turbo pulverizador. O sistema foi calibrado com padrões de brevetoxins a partir de NRC Canadá. Os compostos foram separados por cromatografia líquida em coluna rápida de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 50 mm (1,8 uM) a 35 °C. Para a cromatografia, duas fases móveis (A e B) foram usadas, com um fluxo de 750 uL min-1 durante 10 min. Fase A consistia em 90% de água e acetonitrilo a 10%, enquanto a fase B era 10%

de água e acetonitrilo 90%, ambos com uma concentração de 5 mM de formato de amónio e 53 mM de ácido fórmico.

2.3.4. Resultados

2.3.4.1 Identificação Taxonômica

As células de *H. akashiwo* estavam solitárias, apesar de aglomerados de células esféricas imóveis de *H. akashiwo* cercados por mucilagem terem sido observados em 19 de Março de 2007 (Fig. 14). A forma da célula variou de ovóide a elíptica, medindo 10,75 - 17,57 µm (máximo de 20,13 µm, n=40) de comprimento e 6,21 -11,89 µm (máximo de 12,21 µm, n=40) de largura. Os cloroplastos mostraram-se tipicamente castanho-amarelados, apesar de algumas vezes exibirem coloração amarelo-esverdeada. Foram visualizados 8 - 18 cloroplastos discóides situados na periferia da célula, com tilacódes paralelos à superfície da célula (Fig. 15 A). Cada cloroplasto mostrou um abaulamento de pirenóide localizado no extremo interno com a matriz pirenoidal penetrada por tilacóides (Fig. 15 B). Diversos mucocistos pequenos e esféricos (Fig. 15 B) estavam distribuídos ao longo da periferia da célula. O núcleo mostrou-se situado na parte central da célula, às vezes na parte superior. (Fig. 15 C).



Figura 14. Fotos de microscopia ótica de aglomerados (A e B) e células solitárias (C e D) de células vivas de *Heterosigma akashiwo*. Escalas = 5µm.



Figura 15: Fotos de microscopia eletrônica de transmissão de *Heterosigma akashiwo*. Corte longitudinal da célula inteira (A); corte longitudinal com detalhes da parte anterior da célula (B); corte transversal da célula, com distinto nucléolo (C). C = Cloroplasto, P = Pirenóide, M = Mitocôndria, N = Núcleo, n= nucléolo. Escalas = $5.0\mu m$ (A), $0.5\mu m$ (B), $2.0\mu m$ (C).

2.3.4.2 Distribuição temporal e investigação da toxicidade

Duas estações (seca e chuvosa) foram reconhecidas durante o período de estudo (Fig. 16). A estação seca (Março a Outubro de 2007) foi caracterizada pela pluviosidade mensal entre 0 e 84 mm, enquanto os valores mais altos (186 - 269 mm) foram observados durante a estação chuvosa (Novembro de 2007 a Março de 2008). Estas estações não estiveram relacionadas com a temperatura do ar, sendo os valores mais baixos desta variável (17,2 - 18,9 °C) observados entre Maio e Agosto de 2007. Embora a temperatura da água tenha apresentado valores semelhantes no Canal do Piraquê e no corpo principal da lagoa (Fig. 17 A e B), diferentes padrões de salinidade e de oxigênio dissolvido foram observados nestes compartimentos (Fig. 17 C - F). Quando comparado com o corpo principal da lagoa, o Canal do Piraquê foi caracterizado por menores valores de oxigênio dissolvido (4 - 6 mg L^{-1}) e salinidade (2 - 11) na superfície, este último resultando na formação de um haloclina permanente.



Figura 16. Variação sazonal das temperaturas mínima e máxima do ar (° C) e precipitação total (mm) mensais de março de 2007 a março de 2008.

Seis florações de *H. akashiwo* foram registradas durante o período estudado (Fig. 18). Estas florações foram observadas exclusivamente no Canal do Piraquê, dentro de uma faixa de salinidade de 1,6 - 14,4 e temperatura da água de 24,4 - 30,9 °C. A maior abundância de *H. akashiwo* (4×10^8 cel. L⁻¹) foi observada em 19 de Março de 2007 sob valores de salinidade e temperatura de 7,5 e 28,4°C, respectivamente. *Heterosigma akashiwo* foi a espécie dominante da comunidade fitoplanctônica apenas em março de 2007, enquanto que nos demais meses as cianobactérias *Pseudanabaena catenata*, *Pseudanabaena galeata* e *Synechocystis salina* foram as dominantes (Branco 2009). Os dados das variáveis abióticas do canal e do corpo principal da lagoa e os dados de densidade e biovolumede células de *H. akashiwo* durante os seis eventos de florações estão apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente. A análise de correlação do rank de Spearman indicou que *H. akashiwo* esteve negativamente correlacionada com a profundidade da coluna de água (R = - 0.48, *p* < 0.001), oxigênio dissolvido (R = - 0.38; p = 0.001) e salinidade (R = - 0.30; p = 0.011).

Brevetoxinas e derivados não foram detectados no extrato obtido durante a floração observada em 19 de março de 2007 (Fig. 19).



Figura 17. Distribuição temporal e vertical da temperatura (°C) (A-B), salinidade (C-D) e oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) (E-F) registrados no Canal do Piraquê (esquerda) e no corpo principal da Lagoa Rodrigo de Freitas (direita) de março de 2007 a março de 2008. Os valores do corpo principal da lagoa são as médias das quatro estações amostrais.



Figura 18. Abundâncias de *H. akashiwo* (cels L⁻¹) no Canal do Piraquê de março de 2007 a março de 2008.





Figura 19. Cromatograma de LC-MS/MS do padrão de brevetoxina PbTx2 (A) e do extrato coletado durante a floração de *H. akashiwo* em 19 de março de 2007 (B) para equivalentes massas de diferentes brevetoxinas.

6.0

Time, min

8.0

7.0

9.0

10.0

11.0

5.0

4.24

4.0

0

1.0

2.0

3.0

44

Tabela 5. Valores médios, mínimos e máximos de algumas variáveis abióticas na superfície do Canal do Piraquê e do corpo principal da lagoa de março de 2007 a março de 2008. Os valores do corpo principal da lagoa são as médias das quatro estações amostrais.

	(Canal	Lagoa		
	Média	Min-Max	Média	Min-Max	
Temperatura (°C)	26,5	20,4 - 22,5	27,8	21,4 - 31,5	
Oxigenio dissolvido (mg L^{-1})	4,8	0 - 11,5	8,4	4,9 - 13,9	
Salinidade	7	0 - 16,8	12,5	7,2 - 17,2	
Zona eufófica máxima (m)	até o fundo	1,2 - até o fundo	1,8	1,5 - 2,7	
Profundidade (m)	1	0,8 - 1,5	3,9	3 - 4	

Tabela 6. Abundância e biovolume de *H. akashiwo* durante as florações observadas no Canal Piraquê de março de 2007 a março de 2008. Valores deoxigênio dissolvido (OD), salinidade, temperatura da água, disco de Secchi e profundidade da zona eufótica (Zeu) são também mostrados. n.d. = Não determinado.

Data	Abundância	Biovolume	OD	Salinidade	Temperatura	Disco de Secchi	Profundidade máxima
	(cels L^{-1})	$(\mathrm{mm}^3\mathrm{L}^{-1})$	$(\text{mg } \text{L}^{-1})$		(°C)	(m)	(m)
19/03/2007	40×10^8	115,292	3,5	7,5	28,4	0,6	n.d.
24/04/2007	$1,6 \times 10^{6}$	0,462	1,6	8,4	29,5	0,4	1,1
09/07/2007	$2,8 imes 10^4$	0,008	5	14,4	24,5	n.d.	n.d.
14/01/2008	$5,7 imes 10^4$	0,016	5,5	1,6	29	0,7	0,8
18/02/2008	$3,7 \times 10^{6}$	1,073	2,7	5,2	30,7	0,7	0,8
17/03/2008	$1,0 \times 10^{7}$	2,859	7,3	7,0	27,7	0,5	0,8

2.3.5. Discussão

A identificação de *H. akashiwo* com base em caracteres morfológicos nem sempre é fácil, considerando suas células pleomórficas de tamanho reduzido. Além disso, *H. akashiwo* pode ser confundida com *Olisthodiscus luteus* N. Carter, sendo estas espécies separadas pela morfologia celular e ultra-estrutura. *Olisthodiscus luteus* tem menor número de cloroplastos (5 - 13) que estão ausentes na região ventral da célula, além de não apresentar mucocistos e lamelas de tilacóides na

matriz pirenoidal (Hallegraeff e Hara 1995; Hara e Chihara 1987). Já *H. akashiwo* mostra maior número de cloroplastos (10-30) distribuídos na periferia da célula, presença de mucocistos e lamelas dos tilacóides penetrando na matriz pirenoidal (Hara e Chihara 1987; Hara *et al.* 1985). Recentes estudos de biologia molecular argumentam que *Heterosigma* inclui apenas a espécie *H. akashiwo*, distinta de *Olisthodiscus* e de outros gêneros de Raphidophyceae (Connell 2000; Bowers *et al*, 2006; Yamaguchi *et al.* 2010a). *Heterosigma* também é muito próximo do gênero *Chlorinimonas* Yamaguchi, Nakayama, Murakami & Inouye, no entanto, a ausência de invaginação de tilacóides na matriz pirenoidal distingue o último gênero de *Heterosigma* (Yamaguchi *et al.* 2010a).

A morfologia das células de *H. akahiswo* registradas na Lagoa Rodrigo de Freitas concordaram em geral com as descrições e ilustrações dessa espécie apresentadas por Hara *et al.* (1985) e Hara e Chihara (1987). Células da população coletada em 19 março de 2007 mostraram freqüentemente número e distribuição dos cloroplastos, semelhante às encontradas em *O. luteus* (dados não apresentados), às vezes com a cor (amarelo-esverdeado) e número de cloroplastos (dados não apresentados) semelhantes às células de *Chlorinimonas*, que podem contribuir para identificação errônea das espécies. No entanto, as características ultra-estruturais dos cloroplastos confirmaram a identidade taxonômica das populações do canal como *H. akashiwo*.

A formação de florações de H. akashiwo em ambientes costeiros tem sido associada ao escoamento de água doce geralmente acompanhado de uma redução da salinidade para valores <15 (Taylor e Haigh 1993), além da estratificação da coluna d'água (Yamochi 1989). Essas condições ambientais estiveram de acordo com as observadas durante as florações de H. akashiwo no Canal do Piraquê, onde o escoamento de água doce dos rios contribuiu para a diminuição da salinidade, resultando em uma haloclina permanente. Isto também explicaria a ausência de florações de H. akashiwo no corpo principal da lagoa, que apresenta valores mais elevados de salinidade distribuídos de forma homogênea em toda a coluna de água. Segundo a literatura, florações de H. akashiwo geralmente ocorrem em valores de salinidade entre 20 e 35, atingindo seu ideal em torno de 20 - 25 (Martinez et al. 2010; Kempton et al. 2008; Mafra 2005; Proença e Fernandes 2004; Haque e Onoue 2002; Honjo 1993). O crescimento de H. akashiwo também tem sido reportado em valor de salinidade abaixo de 5, mas o crescimento ótimo ocorre em salinidades de 10 - 30 (Zhang et al. 2004). As florações de H. akashiwo durante este estudo foram observadas dentro de uma faixa de salinidade de 1,6 - 14,4, indicando que essa espécie tolera valores mais baixos de salinidade do que o anteriormente registrado. Estudos prévios com base em material de campo e cultura revelaram que distintas populações ou cepas de Heterosigma têm diferentes

valores ótimos de temperatura e salinidade; além disso, seu crescimento mostra respostas diferentes a uma variedade de fatores ecológicos (Fredrickson *et al.* 2011; Han *et al.* 2002; Smayda 1998; Honjo 1993).

Heterosigma akashiwo apresenta um histórico de vida alternando estágios pelágicos e bentônicos (Smayda 1998; Tomas 1978). Os estágios bentônicos (células de resistência e cistos) permitem a espécie sobreviver sob condições ambientais desfavoráveis, principalmente sob baixas temperaturas da água e condições de escuro (Shikata et al. 2007; Han et al. 2002). As células de resistência diferem dos cistos porque não requerem um período de maturação para a germinação. Além disso, as células de resistência são circundadas por um envoltório de polissacarídeo, além de manterem os flagelos (Han et al. 2002). Às vezes, essas células consistem de massas aglutinadas de células não-móveis acastanhadas (Smayda 1998; Tomas 1978). Já os cistos são, em geral, esféricos, sem flagelos, rodeados por material mucilaginoso com sedimentos e têm um período obrigatório de dormência (Itakura et al. 1996). As células de H. akashiwo formando massas de células imóveis cercadas por mucilagem detectadas durante este estudo foram semelhantes as células de resistênciadescritas por Tomas (1978) com base em material cultivado. Segundo esse autor, as células de resistência mantiveram-se viáveis no escuro por 15 semanas e entre 5 e 10 °C, morrendo em temperaturas superiores a 15 °C. Han et al. (2002) demonstraram que a indução da formação de células de resistência em culturas de H. akashiwo é mais eficaz em condições de privação de luz e baixas temperaturas (abaixo de 10 °C). Estudos de campo também apontam a temperatura como determinante para a indução de células de resistência em H. akashiwo (Imai e Itakura 1999, 1991; Taylor e Haigh 1993). As células de resistência de H. akashiwo podem germinar em temperaturas baixas e sob baixa intensidade de luz, no entanto a espécie requer alta temperatura e forte luz para a sobrevivência e crescimento imediato das células germinadas (Shikata et al. 2008). Durante a ocorrência das células de resistência de H. akashiwo no Canal do Piraquê, a temperatura da água foi de 28,4 °C em toda a coluna d´água e os dados do disco Secchi e zona eufótica indicaram disponibilidade de luz no fundo do canal. Uma vez que as células de resistência de H. akashiwo não foram encontradas em amostras de sedimentos durante as florações (Branco et al., dados não publicados) podemos inferir que essas células foram ressuspendidas do fundo para a coluna d'água, previamente à formação das florações, permitindo uma germinação imediata e rápido crescimento das células vegetativas (Shikata et al. 2008).

Brevetoxinas e seus derivados não foram detectados durante este estudo. Da mesma forma, não registramos mortandade de peixes associados às florações de *H. akashiwo*, o que contrasta com os dados reportados para o sul do Brasil, onde florações de *H. akashiwo* estiveram associadas a mortandade de peixes (Proença e Fernandes 2004). A ausência de toxicidade em peixes observada durante este estudo pode estar relacionada às altas temperaturas observadas durante as florações de *H. akashiwo* (27,7 - 30,9 °C), o que poderia inibir ou minimizar a toxicidade desta espécie (Ono *et al.* 2000). Por outro lado, baixos valores de salinidade como os registrados durante os eventos de floração no Canal do Piraquê também têm sido apontados como um dos fatores relacionados à produção de toxina nesta espécie (Haque e Onoue 2002). De fato, diversos fatores ambientais, incluindo temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes, têm sido associados com a toxicidade de *H. akashiwo* (Fredrickson *et al.* 2011). Além disso, elevada variabilidade genética e fenotípica dentro de populações regionais de *H. akashiwo* têm sugerindo a existência de ecótipos distintos que podem estar relacionados a diferentes fatores, tais como a origem geográfica da população e do momento da floração.

No entanto, brevetoxina não é o único fator relacionado com a toxicidade de *H. akashiwo*. Outros mecanismos, como anoxia mecânica, compostos hemolíticos e substâncias reativas a oxigênio também estão associados com os efeitos nocivos de *H. akashiwo* (Kuroda *et al.* 2005; Marshall *et al.* 2005; Ling e Trick 2010). Além disso, mesmo que as florações não atuem diretamente nos peixes, elas podem ser prejudiciais para muitos organismos, incluindo copépodes ciliados, larvas e adultos de ostras, camarões e vieiras (Connell *et al.* 1997; Llittik 1998; Clough e Strom 2005; Keppler *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006; Yu *et al.* 2010), afetando diferentes níveis tróficos.

3. Síntese

As rafidofíceas constituem um grupo de microalgas amplamente distribuído e responsável pela formação de florações em geral associadas à mortalidade da biota aquática. Embora apresentem ampla distribuição geográfica, contam com poucos estudos taxonômicos, principalmente devido à dificuldade de identificação dos seus caracteres diacríticos que requerem técnicas acuradas (Throndsen 1993; Hargraves e Maranda 2002).

Essa dissertação apresenta uma abordagem multidisciplinar e constitui trabalho pioneiro sobre a taxonomia, biologia molecular e toxicidade de *Fibrocapsa japonica, Heterosigma akashiwo, Chattonella marina* var. *antiqua* e *Chattonella subsalsa* isoladas do Rio de Janeiro e de Santa Catarina.

Nosso estudo demonstrou que forma e dimensões celulares, presença/ausência de mucocistos e tricocistos e ultraestrutura do cloroplasto são bons caracteres na separação das espécies de rafidofíceas estudadas, conforme indicado em literatura. Além disso, a separação entre *Chattonella marina* var. *antigua* e *C. subsalsa* foi corroborada pelos dados de biologia molecular como apontado por Bowers *et al.* (2006) e Demura *et al.* (2009).

No que diz respeito à toxicidade, nossos resultados apontaram atividade tóxica positiva in vitro para as quatro cepas estudadas, com *F. japonica* apresentando a maior intensidade hemolítica.

As florações de *H. akashiwo* observadas na Lagoa Rodrigo de Freitas mostraramcorrelacionadas com baixas salinidades e profundidade. Essas variáveis pareceram restringir esses eventos ao Canal do Piraquê, localizado na parte nordeste da lagoa, onde o escoamento de água doce dos rios contribui para a diminuição da salinidade, resultando em uma haloclina permanente. Resultados similares para outros sistemas costeiros também têm associado florações dessa espécie a baixos valores de salinidade (Taylor e Haigh 1993) e estratificação da coluna d'água (Yamochi 1989).

4. Conclusões

O presente trabalho suporta claramente a necessidade da utilização de microscopia eletrônica de transmissão e biologia molecular na identificação taxonômica de espécies de rafidofíceas, com base em populações naturais e culturas. Aponta, também, para a importância de um monitoramento mais acurado na costa brasileira, considerando os resultados tóxicos positivos

do teste hemolítico das quatro cepas das rafidoficeas H. akashiwo, F. japonica, C. marina var. antiqua e C. subsalsa.

5. Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, pretende-se continuar o estudo taxonômico molecular do grupo, aplicando-se outros marcadores nas espécies estudadas e agregando-se isolados de outras regiões da costa brasileira, com o objetivo de mapear a biodiversidade do grupo no País. Pretende-se também prosseguir na análise de variações métricas e morfológicas de cepas do grupo sob diferentes temperaturas e salinidades, bem como avaliar a influência das fases de crescimento em cultivo na toxicidade destas rafídofíceas.

6. Referências

- Andersen, R.A. & Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In Andersen,R.A. (ed.) Algal Culturing Techniques. Amsterdan: Elsevier/Academic Press. Pp. 83-100.
- Andersen, R.A. 2004. Biology and Systematics of Heterokont and Haptophyte Algae. Am. J. Bot. 91(10): 1508–1522.
- Band-Schmidt, J.C., Morquecho, L., Hernández-Becerril, D.U., Reyes-Salinas, A. & Bravo-Sierra,E. 2004. Raphidophyceans on the coasts of Mexico. Hydrobiologia 515: 79–89.
- Bell, M.V., Dich, J.R. & Pond, D.W. 1997. Octadecapentaenoic acid in a raphidophyte alga, *Heterosigma akashiwo*. Phytochemistry 45: 465–471.
- Bergesch, M. & Odebrecht, C. 2001. Characteristics and importance of plankton flagellates in marine coastal and oceanic ecosystems. In: Faria, B.M., Farjala, V.F. & Esteves, F.A. (eds.) Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, IX: 173-196.
- Boltovskoy, A. 1995. Taxonomia y morfología de los dinoflagelados: métodos de trabajo. In:Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, E. C. & Sar, E. (eds.) Manual de métodos ficológicos.Concepción: Editora Anibal Pinto S.A. Pp. 55-82
- Bourdelais, A.J., Tomas, C.R., Naar, J., Kubanek, J. & Baden, D.G. 2002. New Fish-Killing Alga in Coastal Delaware Produces Neurotoxins. Environ. Health Perspect. 110 (5): 465-470.
- Bowers, H.A., Tomas, C., Tengs, T., Kempton, J.W., Lewitus, A.J. e Oldach, D.W. 2006. Raphidophyceae [Chadefaud ex Silva] systematics and rapid identification: sequence analyses and real-time PCR assays. J. Phycol. 42: 1333-1348.
- Branco, S. 2009. Algas flageladas no Canal do Piraquê da Lagoa Rodrigo de Freitas, com ênfase nas espécies potencialmente nocivas. 32p. Monografia. Bacharelado em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Branco, S., Menezes, M. & Domingos, P. 2010. Flagellate blooms in Rodrigo de Freitas Lagoon,Rio de Janeiro, Brazil. In: 13th International Conference on Harmful Algae, 2010, HongKong. Proceedings 13th International Conference on Harmful Algae, 2010. v. 1. p. 8-13.
- Bridgers, A., McConnell, E., Naar, J., Weidner, A., Tomas, L. & Tomas, C. 2004. Comparison of regional clones of the genera Chattonella and Fibrocapsa for growth characteristics and potential toxin production. In Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R. & Vargo, G.A. (eds) Harmful algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Pp. 405-407

- Cavalier-Smith, T. & Chao, E. E. (1996). 18S rRNA sequence of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae), and the phylogeny of heterokont algae (Ochrophyta). Phycologia 35: 500-510.
- Cloern, J. 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. Rev. Geo. 34 (2): 127-168.
- Cole, G.A. 1994. Textbook of Limnology. Illinois, Waveland press Inc., Prospect Heights.
- Connell, L., Welling, K.A. & Cattolico, R.A. 1997. Algal organic metabolites affect survival of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, larvae. J. Shellfish Res. 16: 493–501.
- Connell, L.B. 2000. Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta, Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. Mar.Biol., 136: 953–960.
- Cronberg, G. 2005. The life cycle of *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae). Phycologia 44 (3): 285–293.
- de Boer M.K.; Tyl, M.R.; Vrieling, E.G. e van Rijssel M. 2004. Effects of salinity and nutrient conditions on growth and haemolytic activity of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). Aquat. Microb. Ecol. 37: 171–181.
- de Boer M.K., Tyl, M.R., Fu, M, Kulk, G., Liebezeit, G., Tomas, C.R., Lenzi, A.; Naar, J., Vrieling, E.G. & van Rijssel M. 2009. Haemolytic activity within the species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). Harmful Algae 8: 699–705.
- Demura, M., Noel, M.L., Kasai, F., Watanabe, M.M. & Kawachi, M. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovate* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. Phycologia48 (6): 518–535.
- Figueroa, R.I. & Rengefors, K. 2006. Life Cyle and sexuality of the freshwater raphidophyte *Gonyostomum Semen* (Raphidophyceae). J. Phycol. 42: 859–871.
- Fredrickson, K.A., Strom, S.L. & Ryan Crim. 2011. Interstrain variability in physiology and genetics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) from the West Coast of North America. J. Phycol. 47: 25–35.
- Fu, M., Koulmanb, A., van Rijsselc, M., Lu[¨]tzend, A., de Boerc, M.K. Tylc, M.R. & Liebezeit, G. 2004a. Chemical characterisation of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae).Toxicon43: 355–363.
- Fu, M., Van Rijssel, M. & Liebezeit, G. 2004b. Haemolytic compounds from *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). In: Harmful Algal Blooms 2002. Steidinger, K. A., J. H.

Landsberg, C. R. Tomas, and G. A. Vargo (Eds.). 2004. Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Pp. 207-209.

- Hallegraeff, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32: 79-99.
- Hallegraeff, G. M. 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. Mar. Ecol. Prog. Ser. 168: 297-309.
- Hallegraeff, G.M. & Hara, Y. 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (eds.), Manual on harmful marine microalgae, Paris: Unesco. Pp. 365-371.
- Han, M.S., Kim, Y.P. & Cattolico, R.A. 2002. *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) resting cell formation in batch culture: strain identity versus physiological response. J. Phycol. 38 (2): 304–317.
- Haque, S.M. & Onoue, Y. 2001. Variation in toxin composition of two harmful raphidophytes, *Chattonella antiqua* and *Chatonella marina*, at different salinities. Environ. Toxicol. 17 (2): 113–118.
- Haque, S.M. & Onoue, Y. 2002. Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Bot. Mar.45: 356–363.
- Hara, Y. & Chihara, M. 1987. Morphology, ultrastructure and taxonomy of the raphidophycean alga *Heterosigma akashiwo*. Bot. Mag. Tokyo 100: 151-163.
- Hara, Y. & Chihara, M. 1985. Ultrastructure and taxonomy of *Fibrocapsa japonica* (class Raphidophyceae). Arch. Protistenk. 130:133-242.
- Hara, Y. & Chihara, M. 1982. Ultrastructure and taxonomy of *Chattonella* (class Raphidophyceae) in Japan. Jap. . Phyol. 30:47-56.
- Hara, Y., Inouye, I. & Chihara, M. 1985. Morphology and ultrastructure of *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae) with special reference to the taxonomy. Bot. Mag. Tokyo 98: 251–262.
- Hargraves, P. & Maranda, L. 2002.Potentially toxic or harmful microalgae from the northeast coast. Northeast. Nat. 9(1): 81-120.
- Heywood, P. 1980. Chloromonads.In: Cox, E. R. (ed.) Phytoflagellates.New York Elsevier. Pp.351–379.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollingher, D. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol. 35: 403–424.

- Hiroishi, S., Okada, H., Imai, I. & Yoshida, T. 2005. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. Harmful Algae 4: 783-78.
- Hollande, A. & Enjumet, M. 1956. Sur une invasion des eaux du Port d'Algar par *Chattonella subsalsa* (= *Hornellia marina* sub.) Biecheler. Remarques sur la toxiciteé de cette Chloromonadine. Bull Trav. Publ. Stat. Aquic. Pêche Castiglione, N.S. 8: 273-280.
- Honjo, T. 1993. Overview on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y., (eds.) Toxic phytoplankton blooms in the sea.
 Amsterdam, Elsevier. Pp. p 33–41
- Horiguchi, T. & Hoppenrath, M. 2003. *Haramonas viridis* sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokontophyta), a new sand-dwelling Raphidophyte from cold temperate waters. Phycol. Res. 51: 61–67.
- Horiguchi, T. 1996. *Haramonas dimorpha* gen. et sp. nov. (Raphidophyceae), a new marine Raphidophyte from Australian Mangrove. Phycol. Res. 44:143–50.
- Hosoi-Tanabe, S., Honda, H., Fukaya, S., Otake, I., Inagaki, Y. & Sako, Y. 2007. Proposal of *Pseudochattonella verruculosa* gen. nov., comb. nov. (Dictyochophyceae) for a formar raphidophycean alga *Chattonella verruculosa*, based on 18S rDNA phylogeny and ultrastructural characteristics. Phycol. Res. 55:185–192.
- Imai, I. & Itakura, S. 1991. Densities of dormant cells of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan.Bulletin of Japanese Society of Microbiology and Ecology, vol. 6, p. 1-7.
- Imai, I. & Itakura, S. 1999. Importance of cysts in the population dynamics of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Mar. Biol. 133: 755–762.
- Imai, I., Yamaguchi, M. & Watanabe, M. 1998. Ecophysiology, life cycle, and bloom dynamics of *Chattonella* in the Seto Inland Sea, Japan. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M. (eds.) Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, Nato-Asi series 41, Berlin: Springer. Pp. 93-112.
- Ishida, K., Cavalier-Smith, T. & Green, B.R. 2000. Endomembrane ultrastructure and possible chloroplast protein import pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). J. Phycol. 36: 1135-1144.
- Itakura, S., Nagasaki, K., Yamaguchi, M. & Imai, I. 1996. Cyst formation in the red tide flagellate Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae). J. Plank. Res. 18(10): 1975-1979.

- Jugnu, R. & Kripa, V. 2009. Effect of *Chattonella marina* [(Subrahmanyan) Hara et Chihara 1982] bloom on the coastal fishery resources along Kerala coast, India. Indian J. Mar. Sci. 38(1): 77-88.
- Juttner, F. 2001. Liberation of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defence reaction in epilithic diatom biofilms. J. Phycol. 37:744–755.
- Katano, T., Yoshida, M., Lee, J., Han, M.-S. & Hayami, Y. 2009. Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. Phycologia 48(6): 473–479.
- Kempton, J., Keppler, C. J., Lewitus, A., Shuler, A. & Wilde, S. 2008. A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters. Harmful Algae 7: 235-240.
- Keppler, C.J., Hoguet, J., Smith, K., Ringwood, A.H. & Lewitus, A.J. 2005. Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (Crassostrea virginica). Harmful Algae 4, 275–285.
- Keppler, C.J., Lewitus A.J., Ringwood A. H., Hoguet, J. & Staton, T. 2006. Sublethal cellular effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 312: 141–147.
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1996. A toxicological study of the marine dinoflagellate, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). Phycologia 35(3): 239-244.
- Khan, S., Arakawa, O. & Onoue, Y. 1997.Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. Aquac. Res. 28:9-14.
- Kuroda, A., Nakashima, T., Yamaguchi, K. & Oda, T. 2005. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. Comp. Bioch. Physiol. C 141: 297–305.
- Lewin, J. 1966. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. Phycologia 6:1–12.
- Lewittus, A.J. & Holland, A.F. 2003. Initial results from a multi-institutional colaboration to monitoring harmful algal Bloooms in South Carolina in costal monitoring through partnerships. In: Melzian, B.D., Engle, V., McAlister, M. &Sandhu, S. (eds) Proceedings of the Fifth Symposium on the Environmental Monitoring and Assessment Program.Pp. 361-371

- Li, Y. & Smayda, T. J. 2000. *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae): on prediction of the week of bloom initiation and maximum during the initial pulse of its bimodal bloom cycle in Narragansett Bay. Plankton Biol. Ecol. 47(2):10-84.
- Ling, C. & Trick, C.G. 2010. Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. Harmful Algae 9:522–529.
- Littik, S.A.M. 1998. The effects of the toxic phytoplankter (*Heterosigma carterae*) on the coonstripe shrimp (*Pandalus danae*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 54p. M.Sc. Thesis. Simon Fraser University.
- Mafra, L.L. 2005. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá: subsídios para o monitoramento. 156p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Botânica, UFPR, Paraná.
- Mafra, L.L., Fernandes, L.F. & Proenca, L.A.O. 2006. Harmful algae and toxins in Paranaguá bay, Brazil: bases for monitoring. Braz. J. Oceanogr. 54:107-121.
- Malpezzi, E.L.A. & Freitas, J.C. 1991. Hemolytic activity of the nemathocyst venom from the sea anemone *Bonodosoma caisssarum*. Braz. J. Med. Biol. Res. 24: 1245-1250.
- Marshall, J.A. & Hallegraeff, G. 1999. Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. J. Plank. Res. 21 (10):1809-1822.
- Marshall, J.A., Munday, B., Yoshizawa, Y. & Hallegraeff, G.M., 2001. Effect of irradiance on superoxide production by *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australia and Japan. In Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (eds.) Harmful Algal Blooms 2001. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 316– 319.
- Marshall, J.A., Salas, M., Oda, T. & Hallegraeff, G. 2005. Superoxide production by marine microalgae. Mar. Biol.147: 533-540.
- Marshall, J.A., Nichols, P.D.; Hamilton, B., Lewis, R.J. & Hallegraeff, G.M. 2003.
 Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. Harmful Algae 2: 273–281.
- Martinez, R., Orive, E., Laza-Martinez, A. & Seoane, S. 2010. Growth response of six strains of *Heterosigma akashiwo* to varying temperature, salinity and irradiance conditions. J. Plankton Res. 32: 529–538.
- Mcneill, J., F. R. Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V. Hawsworth, D.L., Marhold, K., Nikolson, D.H., Prado, J.,Silva, P.C., Skog, J.E., Wiersema, J.H. &. Turland, N.J. (eds.).
 2007. Código Internacional de Nomenclatura Botânica (Código de Viena- 2006). Traduzido por C. E. M. Bicudo & J. Prado. Instituto de Botânica, São Paulo. Pp. 181..
- Mignot, J.-P. 1967. Structure et ultrastructure de quelques Chloromonadines. Protistologia 3: 5-23.
- Mignot, J.-P. 1976. Compléments a l'ètude des chloromonadines ultrastructure de *Chattonella subsalsa* Biecheler flagellé d'eau saumâtre. Protistologica 12: 279–93.
- Montagnes, D.J. S., Berges, J.A., Harrison, P. J. & Taylor, F. J. R. 1994, Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 39(5):1044-1060.
- Nakamura, A., Okamoto, T., Komatsu, N., Ooka, S., Oda, T., Ishimatsu, A. &Muramatsu, T. 1998. Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. Fish. Sci64: 866–869.
- Nakamura, Y., Umemori, T., Watanabe, M., Kulis, D. M. & Anderson, D. M. 1990. Encystment of *Chattonella antiqua* in laboratory cultures. J. Oceanogr. Soc. Japan. 46: 35–43.
- O'Halloran, C., Silver, M., Holman, T. & Scholin, C. 2006. *Heterosigma akashiwo* in central California waters. Harmful Algae 5 (2): 124–132.
- Oda, T., Nakamura, A., Shikayama, M., Kawano, I., Ishimatsu, A. & Muramatsu, T. 1997.
 Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. Biosci.
 Biotechnol. Biochem. 61:1658–1662.
- Odebrecht, C., Azevedo, S.M.F.O., Garcia , V.M.T., Huszar, V.L.M., Magalhaes, V.F., Menezes, M., Proença, L.A.O., Rörig, L.R., Tenenbaum, D.R., Villac M.C. & Yunes J.S. 2002.
 Floraciones de Microalgas Nocivas en Brasil: Estado del Arte y Projectos en Curso. In Sar, E.A., Ferrario, M.E. & Reguera, B. (org.) Floraciones Algales Nocivas en El Cono Sur Americano. 1 ed. Madrid: Instituto Espanhol de Oceanografia. Pp. 307.
- Ono, K., Khan, S. & Onoue, Y. 2000. Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Aquac. Res. 31: 427-433.
- Parra, O., Rivera, P., Floyd, G.L &Wilcox, L.W. 1991. Cultivo, morfología, ultraestructura y taxonomía de un fitoflagelado asociado a mareas rojas en Chile: *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada. Gayana18(4): 101-110.
- Pęczuła, W. 2007. Mass development of the algal species *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae) in the mesohumic Lake Płotycze (Central Eastern Poland). Institute of Oceanography, University of Gdańsk, Poland. Pp. 163-172.

- Pezzolesi, L., Cucchiari, E., Guerrini, F., Pasteris, A., Galletti, P., Tagliavini, E., Totti, C. & Pistocchi, R. 2010. Toxicity evaluation of *Fibrocapsa japonica* from the Northern Adriatic Sea through a chemical and toxicological approach. Harmful Algae9:504–514.
- Potter, D., Saunders, G.W. & Andersen, R.A. 1997. Phylogenetic relationships of the Raphidophyceae and Xanthophyceae as inferred from nucleotide sequences of the 18s ribosomal RNA Gene. Amer. J. Bot. 84(8): 966–972.
- Powers, L., Creed, I.F. & Trick, C.G. 2010. Sinking of *Heterosigma akashiwo* results in increased toxicity of this harmful algal bloom species, Harmful Algae:1-43.
- Proença, L.A.O. & Fernandes, L.F. 2004. Introdução de microalgas no ambiente marinho: impactos negativos e fatores controladores. In Silva, J.S.V. & Souza, R.C.C.L (eds.) Água de lastro e bioinvasão. Rio de Janeiro: Editora Interciência. Pp. 224.
- Proença, L.A.O. 2005. Algal Blooms in Coastal Zones: Examples of Harmful Impacts From the Brazilian Coast. J. Coast. Res. 39:76-78.
- Reifel, K.M., McCoy, M.P., Rocke, T.E., Tiffany, M.A., Hurlbert, S.H. & Faulkner, D.J. 2002. Possible importance of algal toxins in the Salton Sea, California. Hydrobiologia 473: 275– 292.
- Rengefors, K., Pålsson, C., Hansson, L.-A. & Heiberg L. 2008. Cell lysis of competitors and osmotrophy enhance growth of the bloom-forming alga *Gonyostomum semen*. Aqua. Microb. Ecol. 51: 87–96.
- Rensel, J.E.J., Haigh, N. & Tynan, T.J. 2010. Fraser river sockeye salmon marine survival decline and harmful blooms of *Heterosigma akashiwo*.Harmful Algae 10(1): 98-115.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Van Der Mark, P. 2005. MrBayes v. 3.1.USA.
- Schmidt, C.J.B. 2007. Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. In Arredondo, V.B.O. & Domenico, V. (eds.) Metodos y herramientas analiticas en la evaluacion de la biomasa microalgal. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. Pp. 1-16.
- Shen, M., Xu, J., Tsang, T.Y. & Au, D. W.T. 2010. Toxicity comparison between *Chattonella marina* and *Karenia brevis* using marine medaka (*Oryzias melastigma*): Evidence against the suspected ichthyotoxins of Chattonella marina. Chemosphere80: 585–591.
- Shikata, T., Nagasoe, S., Matsubara, T., Yoshikawa, S., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Jenkinson, I.R. & Honjo, T. 2008. Factors influencing the initiation of blooms of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* and the diatom *Skeletonema costatum* in a port in Japan. Limnol. Oceanogr. 53(6): 2503–2518.

- Shikata, T., Nagasoe, S., Matsubara, T., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y. & Honjo, T. 2007.Effects of temperature and light on cyst germination and germinated cell survival of the noxious raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. Harmful Algae6: 700–706,
- Shikata, T., Nagasoe, S., Matsubara, T., Yoshikawa, S., Yamasaki, Y., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Jenkinson, I.R. &Honjo, T. 2008. Factors influencing the initiation of blooms of the raphidophyte *Heterosigma akashiwo* and the diatom *Skeletonema costatum* in a port in Japan. Limnol.Oceanogr. 53(6): 2503–2518.
- Silva, P. C. 1980. Names of classes and families of living algae. Reg. Veg. 103: 1–156.
- Smayda, T, J. 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. Pp. 29-40. Zn Toxic marine phytoplankton: Proceedings of 4th International Conference. Elsevier.
- Smayda, T. 1998. Ecophysiology and bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). In: Anderson, D.M.; Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M. (eds.) Physiological ecology of harmful algal blooms. Berlin, Springer-Verlag. Pp. 113-131.
- Smayda, T. J. 1989. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Graneli, E, Sundström, B., Edler, L. e Anderson, D.M. (eds.) Toxic Marine Phytoplankton. New York: Elsevier Science Publishing Co. Pp.29-40.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tang, J.Y.M. & Au, D.W.T. 2004. Osmotic distress: a probable cause of fish kills on exposure to a Subbloom concentration of the toxic alga *Chattonella marina*. Envir. Toxicol. Chem. 23(11): 2727–2736.
- Taylor, F.J.R. & Haigh, R. 1993. The ecology of fish-killing blooms of the chloromonad flagellate*Heterosigma akashiwo* in the Strait of Georgia and adjacent waters. In: Smayda, T.J.; Shimizu, Y. (eds.) Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam, Elsevier. Pp. 705–710.
- Throndsen, J. 1993. The Plankton Marine Flagellates. In: Tomas, C. (ed.) Identifying marine phytoplankton. San Diego: Academic Press. Pp. 28-32.
- Tiffany, M.A., Barlow, S.B., Matey, V.E. & Hurlbert, S.H. 2001. Chattonella marina (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. Hydrobiologia 446: 187-194.
- Tillmann, U. & Reckermann, M. 2002.Dinoflagellates grazing on the raphidophyte *Fibrocapsa japonica*. Aquat. Microb. Ecol. 26:247-257.

- Tomas, C.R. 1993. Marine Phytoplankton: A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. Academic Press. Pp. 28-32.
- Tomas, C.R. 1978. *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). II. Formation and survival of a benthic stage. J. Phycol.14: 314-319.
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. Mitt. int. ver. Limnol.n9: 1-38.
- Waite, A.M. & Lindahl, O. 2006. Bloom and decline of the toxic flagellate *Chattonella marina* in a Swedish fjord. Mar. Ecol. Prog. Ser. 326: 77–83.
- Wang, L., Yan, T., Zhou, M., 2006. Impacts of HAB species *Heterosigma akashiwo* on early development of the scallop Argopecten irradians Lamarck. Aquaculture 200: 374–383.
- Yamaguchi, H., Hoppenrath, M., Takishita, K. & Horiguchi, T. 2008. Haramonas pauciplastida sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokontophyta) and phylogenetic analyses of Haramonas species using small subunit ribosomal RNA gene sequences. Phycol. Res. 46: 127-138.
- Yamaguchi, H., Nakayama, T., Murakami, A. & Inouye, I. 2010a. Phylogeny and taxonomy of the Raphidophyceae (Heterokontophyta) and *Chlorinimonas sublosa* gen. et sp. nov., a new marine sand-dwelling raphidophyte. J. Plant. Res. 123(3): 333-342.
- Yamaguchi, H., Mizushima, K., Sakamoto, S. & Yamaguchi, M. 2010b. Effects of temperature, salinity and irradiance on growth of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). Harmful Algae 9:398–401.
- Yamochi, S. 1989. Mechanisms for outbreak of <u>Heterosigma akashiwo</u> red tide in Osaka Bay, Japan. In: Okaichi, X, Anderson, R. & Nemoto, X. (eds.) Red tides: biology, environmental science, and toxicology. New York, Elsevier, p. 253–256.
- Zhang, C., Glasgow, H.B., Moeller, P. D. R., Burkholder, J.M., Lewitus, A. J., Melia, G.M., Morton, S.L. & Allen E.H. 2004. Evaluation of Toxicity in Nine Raphidophyte Strains Isolated from Different Geographic Regions. In Steidinger, K. A., J. H. Landsberg, C. R. Tomas, and G. A. Vargo (eds.) Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D. & Diana Sarno. 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). Harmful Algae 5: 321–337.

Zwickl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

Anexo 1. Lista com os dados das sequências ITS obtidas do GenBank.

Espécie	Сера	N° GenBank	Local	Ano do isolamento	Artigo
Chattonella marina	NI	AY704165	Sai Kung, China	2001	Kai <i>et al</i> . 2006
Chattonella marina	KA-11-m-1	AB286927	Harima-Nada, Japão	1999	Kamikawa et al. 2007
Chattonella marina	NIES3	AF137074	NI	NI	Connell 2000
Chattonella marina	CMSTAC AI-6	AY858860	Harima-Nada, Japão	1981	Bowers et al. 2006
Chattonella marina	CMSTAC NR 5	AY858862	North Carolina, USA	2000	Bowers et al. 2006
Chattonella marina	DEM-5011	AB334344	Harima-Nada, Japão	2006	Demura <i>et al.</i> 2009
Chattonella marina var. antiqua	CCMP 2049 (NIES121)	AY858858	Kagoshima Bay, Japan	1982	Bowers <i>et al.</i> 2006
Chattonella marina var. antiqua	NIES1	AF13676	NI	NI	Connell 2000
Chattonella marina var. antiqua	NIES1	AB286925	Harima-Nada, Japão	1978	Kamikawa et al. 2009
Chattonella marina var. antiqua	DEM-5004	AB334327	Harima-Nada, Japão	2006	Demura <i>et al.</i> 2009
Chattonella marina var. ovata	NIES849	AB286918	Hiroshima Bay, Japão	NI	Demura <i>et al.</i> 2009
Chattonella marina var. ovata	MH-14	AB334365	Osaka Bay, Japão	2006	Demura <i>et al</i> . 2009
Chattonella marina var. ovata	NI	AY704166	Sai Kung, China	2001	Kai <i>et al.</i> 2006
Chattonella marina var. ovata	CCMP 216	AY858872	T. Okaichi, Japão	NI	Bowers et al. 2007
Chattonella minima	NIES848	AB286928	Kii Channel, Japão	1983	Kamikawa et al. 2008
Chattonella minima	DEM-4011	AB334366	Harima-Nada, Japão	2006	Demura <i>et al</i> . 2009
Chattonella subsalsa	CCMP217	AB334367	Golfo do México, USA	NI	Demura et al. 2009
Chattonella subsalsa	CCMP2191	AB334368	Indian River Bay, USA	2001	Demura <i>et al.</i> 2009
Chattonella subsalsa	NI	AF409126	NI	NI	Ben <i>et al.</i> 2002
Haramonas dimorpha	NIES-761	AB334370	Daintree River, Australia	1991	Demura et al. 2009

Anexo 2. Lista com os dados das sequências LSU obtidas do GenBank.

Espécie	Сера	N° GenBank	Local	Ano do isolamento	Artigo
Chattonella marina	MS-3-P	AB217639	Suou Nada, Japão	1985	Tanabe <i>et al.</i> 2006
Chattonella marina	G-12	AB217638	Hiuchi Nada, Japão	1986	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina	S-11	AB217637	Suou Nada, Japão	1986	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina	NIES-559	AB217636	Maizuru Bay, Japão	1975	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina	N.I.	AY704162	Sai Kung, Hong Kong	2001	Kai <i>et al.</i> 2006
Chattonella marina	CCMP-217	AF210739	Florida, USA	1982	Bowers et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	CCMP2052	FJ030891	N.I.	N.I.	Riisberg <i>et al</i> . 2009
Chattonella marina var. antiqua	NIES-86	AB217868	Uranouchi Bay, Japão	1980	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	G-8	AB217634	Hiuchi Nada, Japão	1988	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	NIES-558	AB217632	Mikawa Bay, Japão	N.I.	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	OA-3	AB217633	Osaka Bay, Japão	1984	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	NIES-1	AB217631	Harima Nada, Japão	1978	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. antiqua	N.I.	AF210737	N.I.	N.I.	Tyrrell et al. 2001
Chattonella marina var. ovata	ovata-P	AB217641	Harima Nada, Japão	1993	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. ovata	NIES-603	AB217640	Harima Nada, Japão	1984	Tanabe et al. 2006
Chattonella marina var. ovata	N.I.	AY704163	Sai Kung, Hong Kong	2001	Kai <i>et al.</i> 2006
Chattonella marina var. ovata	N.I.	AF210738	N.I.	N.I.	Tyrrell et al. 2001
Chattonella minima	NIES848	AB286928	Kii Channel, Japão	1983	Kamikawa et al. 2007
Chattonella subsalsa	N.I.	AF210736	N.I.	N.I.	Tyrrell et al. 2001
Chattonella subsalsa	N.I.	AF409126	N.I.	N.I.	Ben Ali <i>et al.</i> 2002
Chattonella subsalsa	CCMP2793	EU165295	N.I.	N.I.	Scorzetti et al. 2009
Fibrocapsa japonica	N.I.	AF210740	N.I.	N.I.	Tyrrell et al. 2001

NI= dado não informado

Anexo 1: Florações e testes de toxicidade de Raphidophyceae registradas para diversas regiões do mundo.

Espécie	Floração	Mortandade de peixes	População	Brevetoxina	Teste de toxicidade	Resultado	Densidade (cel.mL ⁻¹)	Local	Data	Autor
	sim	IN	P. natural	sim	,	ı	14133	Carolida do Sul (EUA)	mai-01	Lewittus e Holland 2003
	sim	IN	P. natural	IN		ı	90400	Carolida do Sul (EUA)	mai-01	Lewittus e Holland 2003
	IN	IN	Isolado	IN	Hemolítico	positivo	4000 a 19000	USA, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Holanda, Alemanha	1970 a 2000	de Boer et al. 2009
	sim	IN	P. natural	não	ı	I	41000	Carolida do Sul (EUA)	ago-04	Keppler et al. 2006
	IN	IN	Isolado	não		ı	5000 a 24000	Carolida do Sul (EUA)	IN	Zhang et al. 2004
	sim	IN	Isolado	não	Hemolítico	positivo	IN	Alemanha	1995	Fu et al. 2004
Fibrocapsa japonica	IN	IN	Isolado	sim	Ictiotoxicidade	positivo	IN	Carolida do Sul (EUA) e Nova Zelândia	IN	Bridgers et al. 2004
	IN	IN	Isolado	IN	Ictiotoxicidade	positivo	1000 a 35000	NI	IN	Shen et al. 2010
	sim	IN	Isolado	não	Ictiotoxicidade	positivo	5000	Italia	2004 e 2006	Pezzolesi et al. 2010
	sim	IN	Isolado	não	Bioensaio (Artemia)	positivo	80000	Italia	2005 e 2006	Pezzolesi et al. 2010
	sim	IN	Isolado	não	Hemolítico	positivo	75000	Italia	2006 e 2006	Pezzolesi et al. 2010
	IN	IN	Isolado	IN	Hemolítico	positivo	IN	Japão	ĪZ	Kuroda et al. 2005
	sim	IN	Isolado	não	Hemolítico	positivo	17000	Alemanha	1995	de Boer et al. 2004
	sim	IN	P. natural	não		ı	199000	Carolida do Sul (EUA)	mai-01	Lewittus e Holland 2003
	sim	sim	P. natural	IN	Bioensaio (ostras)	positivo	19000	Carolida do Sul (EUA)	abr-03	Keppler et al. 2005
	sim	IN	Isolado	IN	Bioensaio (ostras)		11000	Carolida do Sul (EUA)	abr-03	Keppler et al. 2005
	sim	sim	P. natural	baixa concentracão	ı	ı	3000	Paraná (Brasil)	mar-01	Proença e Fernandes 2004
	IN	IN	Isolado	, IN	Hemolítico	positivo	60000	Canada, USA, Espanha	1981 a 2002	Ling e Trick 2010
	IN	IN	Isolado	sim	Ictiotoxicidade	positivo	IN	Suo-Nada (Japão)	1978	Ono et al. 2000
Heterosıgma akashıwo	IN	IN	Isolado	não	ı	·	48000 a 140000	Carolida do Sul (EUA), Canada, Japão	IN	Zhang <i>et al.</i> 2004
	IN	IN	Isolado	IN	Bioensaio (ciliados)	positivo	IN	Washington (EUA)	2006 2 2007	Fredrickson et al. 2011
	IN	IN	Isolado	IN	Hemolítico	positivo	IN	Japão	ĪN	Kuroda et al. 2005
	IN	IN	Isolado	IN	Bioensaio (Artemia)	positivo	15000	Canada e Espanha	Ī	Powers et al 2011
	sim	não	P. natural	não	ı	I		Rio de Janeiro (Brasil)		presente estudo
	sim	IN	Isolado	NI	Bioensaio (misidáceos)	positivo	7910	Paraná (Brasil)	jun-05	Mafra 2005
	sim	IN	P. natural	sim	ı	I	440	Carolida do Sul (EUA)	mai-01	Lewittus e Holland 2003
	IN	IN	Isolado	IN	Bioensaio (camudongo)	positivo	IN	Mar Mediterrâneo (Itália)	IN	Zingone et al. 2006
Chattonalla subsalsa	sim	IN	P. natural	não		ı	4500	Carolida do Sul (EUA)	jun-04	Keppler et al. 2006
Chuintena musura	IN	IN	Isolado	não			6000 a 29000	Carolida do Sul (EUA)	IN	Zhang <i>et al.</i> 2004
	IN	IN	Isolado	sim	Ictiotoxicidade	positivo	IN	EUA	IN	Bridgers et al. 2004
	sim	não	P. natural	IN	ı	ı		Rio de Janeiro (Brasil)		Branco et al. não pub.
Chattonella marina	sim	IN	P. natural	NI	ı	I	IN	Suo-Nada (Japão)	jul-84	Imai <i>et al.</i> 1998
var. <i>antigua</i>	sim	IN	Isolado	sim	T		2100	Yatsushiro Sea (Japão)	1984	Haque e Onoue 2001

NI = dado não informado

⁶³