

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA FERNANDA SOBRINHO

EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE O
CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA DIATOMÁCEA
Pseudo-nitzschia multiseries

PONTAL DO PARANÁ

2016

BRUNA FERNANDA SOBRINHO

EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DE FERRO SOBRE O
CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE TOXINAS PELA DIATOMÁCEA
Pseudo-nitzschia multiseriis

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção
do título de bacharel em Oceanografia pelo Centro de
Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Jr.

Pontal do Paraná

2016

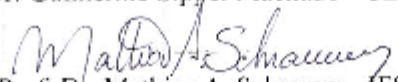
TERMO DE APROVAÇÃO

Bruna Fernanda Sobrinho


“Efeitos da disponibilidade de ferro sobre o crescimento e produção de toxinas pela diatomácea *Pseudo-nitzschia multiseries*”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Guilherme Sippel Machado - CEM/UFPR


Prof. Dr. Mathias A. Schramm - IFSC


Prof. Dr. Luciano Fernandes - UFPR


Prof. Dr. Luiz Laureno Majra Júnior
Presidente

Pontal do Paraná, 14 de dezembro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Dr. Luiz Mafra Jr., pela orientação, exemplo e amizade. Por todo incentivo e por todas as oportunidades e portas que me abriu nesses últimos 3 anos. Obrigada por fazer parte e, principalmente, por me ajudar a concluir esta etapa da minha vida.

Á todos que auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho. Em especial a Luana Mocelin pelo auxílio nos experimentos, ao Leonardo Sandrini pela ajuda com a estatística e ao Cristian Klemann pelas análises de toxina.

Aos meus colegas do Lamic, com os quais dividi laboratório, muitas risadas e pausas para o café. E a Vanessa, nossa técnica querida, por me ensinar a cuidar e amar tanto o fitoplâncton.

Á todos os funcionários e professores do CEM que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação e realização deste trabalho.

Ao meu GRR2011 amado, que fez os meus anos em Pontal, e principalmente as aulas e trabalhos em grupo, serem mais fáceis e (muito mais) engraçados. Aos grandes amigos que encontrei nesse lugar, principalmente a Nath, Ma, Gabi, Bryan, Alexandre, Ju Bilibiu e Carol Feber. As pessoas que dividiram lar comigo: Fabiola, Barbara, Amanda Albano, Dudu, Marco e principalmente Amanda Câmara, vocês foram minha família e dividiram muito mais do que casa comigo imensurável na minha vida.

Aos meus pais, por serem exemplos de vida, e ao meu irmão. Por todo amor, apoio e incentivo, e também pelo patrocínio, para a concretização dos meus planos e sonhos. Á toda a minha família, que se faz presente independente da distância. Por todo o amor e por todos os ensinamentos de vida. Tenho muito orgulho de ser parte dessa família. Sem a certeza de que tenho para onde voltar, não iria conseguir voar para longe.

E à Deus, pela vida.

Muito obrigada!

*“How inappropriate to call this planet Earth when it is quite clearly Ocean?”
Arthur C. Clarke*

RESUMO

O ácido domóico (AD) é um aminoácido tricarboxílico produzido pela diatomácea marinha *Pseudo-nitzschia* spp., que pode causar efeitos gastrointestinais e neurológicos em seres humanos ou outros consumidores secundários. Além disso, este composto é capaz de quelar metais traços, especialmente o micronutriente ferro (Fe). A fim de analisar os efeitos da limitação de Fe no crescimento de *P. multiseriis* e nas suas taxas de produção e liberação de AD, cultivos com diferentes concentrações (n=4) de Fe biodisponível foram mantidos por 30 dias em sistema estático. As taxas de crescimento ($\mu_{\max} = 0,45\text{--}0,73\text{ d}^{-1}$) foram similares em todos os tratamentos Fe-deficientes (D1=0 nmol.L⁻¹; D2=1,7 nmol.L⁻¹ e D3=10 nmol.L⁻¹) e Fe-suficiente (meio f/2; S=11.700 nmol.L⁻¹), sugerindo que *P. multiseriis* possui um mecanismo eficiente de aquisição e/ou estoque de Fe sob condições limitantes do micronutriente. As concentrações intracelulares de AD foram significativamente maiores (p<0,001) no tratamento S em comparação com os demais tratamentos, evidenciando que o Fe é necessário para a síntese da toxina. No entanto, as concentrações extracelulares variaram entre os tratamentos *Fe-suficiente* e *Fe-deficiente* ao longo dos dias experimentais, sugerindo que a liberação de AD das células pode estar relacionada com um aumento nas taxas de absorção do Fe, quanto este encontra-se escasso no interior das células. A fim de se comparar os resultados, uma diatomácea não-tóxica, *Bacillaria* sp., foi submetida às mesmas condições experimentais, com a adição da fração filtrada do meio de cultivo de *P. multiseriis* (contendo 67 ng. AD ml⁻¹) a um dos tratamentos *Fe-deficientes* (D4=1,7 nmol.L⁻¹ + filtr.). *Bacillaria* sp. alcançou taxas de crescimento ($\mu_{\max} = 0,36\text{--}0,73\text{ d}^{-1}$) similares às reportadas para *P. multiseriis*, exceto no tratamento contendo o filtrado ($\mu_{\max} = 0,21\text{ d}^{-1}$), sugerindo que o crescimento de *Bacillaria* sp. pode ter sido inibido pela redução da biodisponibilidade de Fe ou por um possível efeito alelopático do AD ou de algum outro composto liberado pela espécie tóxica na água.

Palavras-chave: microalgas nocivas; ficotoxinas; cultivo de microalgas; LC-UVD

ABSTRACT

Domoic acid (DA) is a tricarboxylic amino acid produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia* spp., which can cause gastrointestinal and neurological effects to humans or other secondary consumers. Furthermore, this compound is able to chelate trace metals, especially the micronutrient iron (Fe). In order to investigate the effects of Fe limitation on *P. multiseriis* growth and its rates of DA production and release, static cultures with different concentrations (n=4) of bioavailable Fe were maintained for 30 days. Growth rates ($\mu = 0.45\text{-}0.73\text{ d}^{-1}$) were similar in all *Fe-deficient* treatments (D1 = 0 nmol.L⁻¹, D2 = 1.7 nmol.L⁻¹ and D3 = 10 nmol.L⁻¹) and *Fe-sufficient* (f/2 medium; S = 11,700 nmol.L⁻¹), suggesting that *P. multiseriis* has an efficient Fe acquisition and/or stocking mechanism under limiting concentrations of this micronutrient. Intracellular DA concentrations were significantly higher ($p < 0.001$) in treatment S compared to the others, demonstrating that Fe is required for toxin synthesis. However, extracellular concentrations varied between *Fe-sufficient* and *Fe-deficient* treatments over the experimental duration, suggesting that release of DA might be related to an increase in Fe absorption, when it becomes scarce inside the cells. In order to compare the results, the non-toxic diatom *Bacillaria* sp. was subjected to the same experimental conditions, with the addition of the filtered fraction of *P. multiseriis* (containing 67 ng DA ml⁻¹) to one of the *Fe-deficient* treatments (D4 = 1.7 nmol.L⁻¹ + filtrate). *Bacillaria* sp. reached growth rates ($\mu = 0.36\text{-}0.73\text{ d}^{-1}$) comparable to those reported for *P. multiseriis*, except in the treatment containing filtrate ($\mu_{\text{max}} = 0.21\text{ d}^{-1}$). This suggests that growth of *Bacillaria* sp. may have been inhibited by either the reduction of Fe bioavailability or a possible allelopathic effect of DA or some other chemical compound released by *P. multiseriis* into the water.

Keywords: harmful microalgae; phycotoxins; microalgae culture, LC-UVD

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1 CÉLULAS FORMANDO CADEIAS DAS DIATOMÁCEAS *Pseudo-nitzschia spp.*
(A) *E Bacillaria sp.* (B)..... 16
- FIG. 2 ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO DOMÓICO E A LIGAÇÃO DO FERRO NO COMPLEXO HIPOTÉTICO AD-FE (BATES *et al.*, 2001).**Erro! Indicador não definido.**
- FIG. 3 DISPOSIÇÃO DOS FRASCOS QUE COMPUNHAM OS DIFERENTES TRATAMENTOS (N = 4×4) DO EXPERIMENTO COM *Pseudo-nitzschia multiseriis* NA INCUBADORA, (A) LOGO APÓS A INOCULAÇÃO E (B) APÓS 7 DIAS DE CULTIVO. A POSIÇÃO DOS FRASCOS FOI ALEATORIAMENTE MODIFICADA A CADA 24 HORAS DURANTE O TRANSCORRER DO EXPERIMENTO. 25
- FIG. 4 DENSIDADE CELULAR (CÉL.ml⁻¹) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO PARA AS CEPAS 164 E 168 DE *Pseudo-nitzschia multiseriis*. 28
- FIG. 5 DENSIDADE CELULAR (CÉL.ml⁻¹) DE *Pseudo-nitzschia multiseriis* AO LONGO DE UM CICLO DE CULTIVO ESTÁTICO DURANTE O EXPERIMENTO PARA ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS A SER USADA DURANTE A ACLIMATAÇÃO. MS= MEIO F/2; MD1 E MD2= 1/2 E 1/5 DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS DO MEIO F/2, RESPECTIVAMENTE..... 30
- FIG. 6 DENSIDADE CELULAR MÉDIA (CÉL.ml⁻¹) DE *Pseudo-nitzschia multiseriis* AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO, MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L⁻¹; D2=1,7 nmol.L⁻¹; D3=10 nmol.L⁻¹; S=11.700 nmol.L⁻¹)..... 31
- FIG. 7 PERCENTUAL DE CÉLULAS FORMANDO CADEIAS DE 2 A 8 CÉLULAS E DENSIDADE CELULAR TOTAL (CÉL.ml⁻¹) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO DE *Pseudo-nitzschia multiseriis* EM CULTIVO ESTÁTICO, MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L⁻¹; D2=1,7 nmol.L⁻¹; D3=10 nmol.L⁻¹; S=11.700 nmol.L⁻¹).
..... 32
- FIG. 8 DENSIDADE CELULAR (CÉL.ml⁻¹) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO DE *Bacillaria sp.*, EXPOSTA A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO (VALORES EM nmol.L⁻¹) E UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE P. MULTISERIES (FILT.) CONTENDO 67 NG AD.ml⁻¹..... 36
- FIG. 9 PERCENTUAL DE CÉLULAS FORMANDO CADEIAS E DENSIDADE CELULAR (CÉL.ml⁻¹) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO DE *Bacillaria sp.* EM CULTIVO ESTÁTICO MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L⁻¹; D2 e D4=1,7 nmol.L⁻¹; D3=10 nmol.L⁻¹; S=11.700 nmol.L⁻¹). AO TRATAMENTO D4 FOI ADICIONADA A FRAÇÃO DISSOLVIDA DE UM CULTIVO DE *P. multiseriis* CONTENDO 67 ng.ml⁻¹ DE ÁCIDO DOMÓICO. 39

FIG. 10. COMPARAÇÃO ENTRE AS DENSIDADES CELULARES AO LONGO DO TEMPO (DIAS DE CULTIVO) PARA *Pseudo-nitzschia multiseriis* E *Bacillaria* sp., EXPOSTAS A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO PARA *Bacillaria* sp., FOI ACRESCENTADO UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE *P. MULTISERIES* (FILT.) CONTENDO 67 ng AD.ml⁻¹.
..... 41

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE ÁCIDO DOMÓICO NOS CULTIVOS DE *Pseudo-nitzschia multiseries*, CEPAS 164 E 168. 29
- TABELA 2. RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DO TESTE SNK PARA AS CONCENTRAÇÕES INTRA- E EXTRACELULARES (pg.CÉL⁻¹) E DA TAXA DE LIBERAÇÃO DIÁRIA DE ÁCIDO DOMÓICO (AD), ENTRE OS TRATAMENTOS E TEMPO AMOSTRAL E A INTERAÇÃO ENTRE ELES..... 34
- TABELA 3. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (n=4) INTRACELULAR (pg.CÉL⁻¹), EXTRACELULAR (PG.CEL⁻¹), TOTAL (NG.ml⁻¹) E A TAXA DIÁRIA DE LIBERAÇÃO (PG.CEL⁻¹.D⁻¹) DE ÁCIDO DOMÓICO (AD) MEDIDA AO LONGO DO CULTIVO ESTÁTICO DE *Pseudo-nitzschia multiseries* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO. SOMENTE CÉLULAS VIVAS FORAM CONSIDERADAS PARA O CÁLCULO DA DENSIDADE CELULAR E DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE AD, E A SOMA DE CÉLULAS VIVAS E MORTAS PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR E DA TAXA DIÁRIA DE LIBERAÇÃO DE AD. 35
- TABELA 4. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (n=2) DE CLOROFILA-*a* (µg.L⁻¹) EM CÉLULAS DE *Bacillaria* sp. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Fe NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM VALORES DE DESVIO PADRÃO ENTRE PARÊNTESES. 37
- TABELA 5. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (n=3) DE CLOROFILA-*a* (pg.CÉL⁻¹) PARA *Bacillaria* sp. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FE NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM VALORES DE DESVIO PADRÃO ENTRE PARÊNTESES.37
- TABELA 6. RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DO TESTE SNK PARA AS CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA-*a* (µ.L⁻¹) E DA CLOROFILA-*a* POR CÉLULA (pg.CÉL⁻¹) ENTRE OS TRATAMENTOS E TEMPO AMOSTRAL E A INTERAÇÃO ENTRE ELES. 38
- TABELA 7. TAXA DE CRESCIMENTO ENTRE OS DIAS 0 E 8 DO CULTIVO (µ₀₋₈) E TAXA DE CRESCIMENTO MÁXIMO (µ) PARA *Pseudo-nitzschia multiseries* E *Bacillaria* sp., EXPOSTAS A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO PARA *Bacillaria* sp., FOI ACRESCENTADO UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE *P. MULTISERIES* (FILT.) CONTENDO 67 ng AD.ml⁻¹. 40
- TABELA 8. COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AD PARTICULADO (P), DISSOLVIDO (D) E TOTAL (pg.CÉL⁻¹) NOS TRATAMENTOS FE-SUFICIENTE E FE-DEFICIENTE NAS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO (EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E DECLÍNIO) ENTRE O PRESENTE ESTUDO E OUTROS ESTUDOS..... **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.	HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	22
3.1	Hipóteses	22
3.2	Objetivos	22
3.2.1	Objetivo geral	22
3.2.2	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Aquisição e manutenção dos cultivos	23
4.2	Aclimação dos cultivos Pseudo-nitzschia multiseriis	23
4.3	Experimentos de crescimento e produção de toxinas sob diferentes concentrações de Fe	24
4.3	Experimento de fotodegradação de AD	26
4.4	Tratamentos dos dados e análises estatísticas	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Escolha da cepa de P. multiseriis (PSN-164 ou -168).....	28
5.2	Aclimação de P. multiseriis	29
5.3	Experimentos de limitação por Fe.....	30
5.3.1	Pseudo-nitzschia multiseriis	30
5.3.2	Bacillaria sp.	35
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	51
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

O fitoplâncton é composto por um conjunto de algas microscópicas, conhecidas como microalgas, que vivem em suspensão na coluna d'água e constituem a base da cadeia trófica. São as principais produtoras primárias nos ambientes aquáticos e sustentam, de forma direta ou indireta, grande parte da vida nos oceanos, uma área que cobre aproximadamente 70% da superfície da Terra. Além disso, desempenham um importante papel na regulação do dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, sequestrando-o na zona eufótica dos oceanos durante o processo de fotossíntese e transportando-o para as águas mais profundas (GILBERT *et al.*, 2005).

Quando expostas a um conjunto de condições favoráveis, tais como disponibilidade de nutrientes, temperatura da água, salinidade e luminosidade adequada, determinadas espécies de microalgas podem atingir um elevado crescimento populacional (VAN DOLAH, 2000). Segundo Granéli e Johansson (2003), a disponibilidade de nutrientes é considerada um dos principais fatores que controlam o crescimento de microalgas marinhas. Sendo assim, a habilidade de competir por nutrientes limitantes se torna crucial para a proliferação de determinadas espécies.

As elevadas abundâncias celulares acumuladas na água durante os eventos conhecidos como florações ou *blooms* podem significar um aporte benéfico de biomassa para os consumidores primários, refletindo em um incremento na produtividade secundária e, ultimamente, na produção pesqueira e aquícola local. No entanto, em casos especiais, florações de algas nocivas (FAN's) podem causar efeitos deletérios ao ambiente e a saúde pública, a partir da produção de toxinas endógenas por algumas espécies de microalgas, ou pelo seu acúmulo em grandes biomassas (GILBERT *et al.*, 2005).

No ambiente marinho, as FAN's têm ocorrido ao longo da história da Terra e em todas as latitudes, sobretudo nas regiões costeiras. No entanto, ao longo dos últimos 30 anos o fenômeno parece ter aumentado, seja em extensão geográfica de espécies tóxicas ou em diversidade de espécies e compostos tóxicos (LASSUS *et al.*, 2016). As principais explicações incluem o aumento do conhecimento científico a respeito das espécies e compostos tóxicos; aumento da utilização das águas costeiras para a aquicultura; estímulo da floração de determinadas espécies fitoplanctônicas por

eutrofização e/ou condições climáticas incomuns; transporte de algas nocivas por correntes oceânicas ou água de lastro; impactos das mudanças climáticas, incluindo o aquecimento global, e da sobrepesca sobre a cadeia alimentar marinha (HALLEGRAEFF, 2003; LASSUS *et al.*, 2016).

Lassus e colaboradores (2016) categorizaram situações em que determinadas espécies tóxicas poderão proliferar de forma anômala, exibindo efeitos nocivos:

1. Espécies não-tóxicas, mas formadoras de grande biomassa, que podem matar organismos marinhos pela desoxigenação da água;
2. Espécies produtoras de toxinas causadoras de intoxicações alimentares em humanos consumidores de pescados contaminados. Nesta categoria encontram-se espécies tóxicas responsáveis pelo ASP, DSP, NSP e PSP (envenenamentos amnésico, diarreico, neurotóxico ou paralisante causado por consumo de mariscos, respectivamente), além do CFP (envenenamento por consumo de peixes – Ciguatera) e AZP (envenenamento por azaspirácidos);
3. Espécies que não causam danos aos seres humanos, mas são prejudiciais aos peixes e invertebrados marinhos por causarem efeitos mecânicos (lesão ou entupimento de brânquias) ou pela liberação de compostos hemolíticos;
4. Espécies produtoras de toxinas que afetam os seres humanos por meio do contato por via respiratória, principalmente aquelas transportadas para a praia por aerossóis;
5. Espécies não incluídas como tóxicas para o homem, mas para as quais verificou-se a toxicidade por meio de bioensaios, sendo, portanto, propensas a representar possíveis danos.

A principal via de intoxicação humana se dá pelo consumo de organismos filtradores que acumulam toxinas. Estas toxinas são termoestáveis, ou seja, o cozimento de frutos-do-mar contaminados não ameniza a toxicidade (VAN DOLAH, 2000). Até o momento, as toxinas causadoras de ASP, DSP e PSP já foram reportadas em microalgas e/ou em organismos consumidores presentes em diferentes pontos da costa brasileira (PROENÇA E MAFRA JR., 2005).

Como revisto por Castro e Moser (2012), ainda há uma grande discussão sobre o real valor adaptativo da produção de toxinas. Alguns autores (e.g. GRANÉLI & JOHANSSON, 2003; GRANÉLI *et al.*, 2008; PRINCE *et al.*, 2010) ressaltam que a

produção de toxinas representaria uma vantagem competitiva sobre outros organismos. A síntese de toxinas ou outras substâncias alelopáticas liberadas no meio poderia, assim, ser considerada uma estratégia para reduzir o consumo por herbívoros e/ou inibir o crescimento de espécies competidoras. Outros estudos indicam que a produção de toxinas pode ser uma resposta natural do organismo sintetizador em função das condições ambientais (e.g. GRANÉLI *et al.*, 2008). Por fim, a produção de toxinas pode ser interpretada como sendo o resultado de desvios metabólicos ou produto de interações indiretas com bactérias, como citado por Kodama *et al.* (2006) para *Pseudo-nitzschia* spp. (CASTRO & MOSER, 2012).

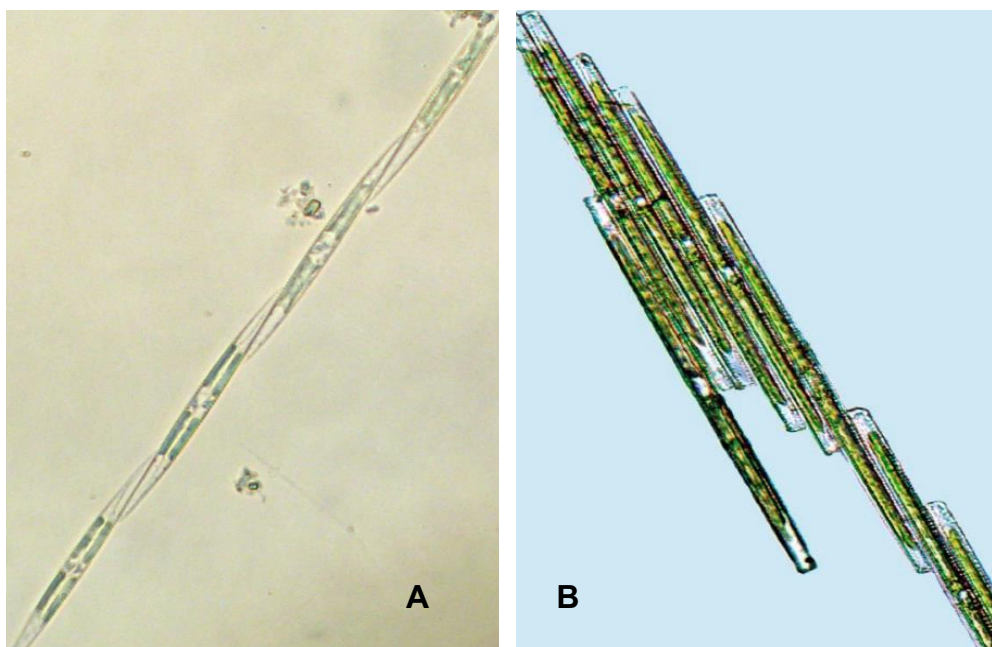
As regiões costeiras de todo o mundo estão sujeitas a uma variedade de espécies e impactos tóxicos ou nocivos. Considerando-se o aumento das FAN's nos últimos 30 anos, o conhecimento sobre as espécies tóxicas e toxinas que estas produzem se tornaram ferramentas essenciais na prevenção e mitigação dos impactos que as FAN's possam causar. Sendo assim, o cultivo monoclonal de microalgas nocivas é um procedimento importante na busca pelo esclarecimento da variabilidade na produção de toxinas entre diferentes espécies e por uma mesma espécie sob condições ambientais distintas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

As diatomáceas (classe Bacillariophyceae) estão entre as microalgas mais estudadas do fitoplâncton, uma vez que têm sido abundantes nos oceanos desde o Cretáceo, aproximadamente 66 milhões de anos atrás. Estes organismos unicelulares caracterizam-se por sua frústula de sílica, com tamanho celular que varia de 2 μm a 1000 μm , que possuem forma cêntrica ou alongada e podem formar longas cadeias ou agregados de células (LALLI & PARSONS, 1993).

A nomenclatura Bacillariophyceae é derivada do gênero *Bacillaria* Gmelin 1791 (TOMAS, 1997), que, conforme revisto por Schmid (2007), foi uma das primeiras diatomáceas a serem nomeadas e descritas em detalhes por O.F. Müller (1782). Assim como *Bacillaria*, o gênero *Pseudo-nitzschia* pertence à família Bacillariaceae, sendo caracterizada pela formação de cadeias de células sobrepostas, geradas através da divisão sequencial, sendo que em *Bacillaria* as colônias apresentam um notável movimento de expansão e retração (SCHMID, 2007) (Fig. 1).

FIG. 1 CÉLULAS FORMANDO CADEIAS DAS DIATOMÁCEAS *Pseudo-nitzschia* spp. (A) E *Bacillaria* sp. (B)



FONTE: (A) Luiz Mafra Jr. e (B) website diatomloir.eu

Como revisto por Armbrust (2009), aproximadamente um quinto da fotossíntese na Terra é realizada por diatomáceas, resultando numa quantidade de

carbono orgânico equivalente ao que é gerado por todas as florestas tropicais juntas. Além disso, as diatomáceas são responsáveis por sustentar grande parte da produtividade dos oceanos, especialmente nas zonas costeiras (SARTHOU, 2005).

O primeiro registro de uma diatomácea produtora de ficotoxinas nocivas aos organismos consumidores foi em 1987, nos estuários de Cardigan Bay, em Prince Edward Island, Canadá. Na ocasião, uma floração da diatomácea penada *Pseudo-nitzschia multiseriata* levou à hospitalização de 103 e morte de 3 consumidores de moluscos bivalves contaminados por uma neurotoxina identificada como ácido domóico (AD), produzida em abundância pela microalga (WRIGHT *et al.* 1989).

Antes disso, o AD havia sido reportado somente na macroalga *Chondria armata*, que era inclusive usada como vermífugo por populações tradicionais no Japão (DAIGO 1959¹, citado por MAFRA, 2005). A partir do episódio de 1987 no Canadá, responsável por associar pela primeira vez a produção desta ficotoxina a uma microalga planctônica, o composto passou a ser detectado no plâncton e em organismos consumidores em diferentes regiões ao redor do globo.

As diatomáceas *Pseudo-nitzschia* spp., principais produtoras do AD no plâncton, são cosmopolitas em águas costeiras, embora a distribuição de algumas poucas espécies seja restrita à área polar do Hemisfério Norte e de outras a regiões tropicais (HASLE, 2002). Bem adaptadas em climas quentes e frios, em ambientes temperados há geralmente uma variação sazonal na abundância celular, que geralmente aumenta na primavera em resposta à maior disponibilidade de nutrientes e luz (BATES *et al.*, 1989).

Pseudo-nitzschia spp. é considerada um gênero abundante em águas brasileiras, principalmente durante as estações de primavera e verão, quando podem atingir concentrações de milhões de células por litro (FERNANDES & BRANDINI, 2004; MAFRA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2013). No entanto, diferentes espécies tendem a ser dominantes conforme a região, podendo ser tóxicas em uma área, mas não em outra, provavelmente devido a diferenças genéticas entre populações distintas e/ou na composição bacteriana e fatores ambientais dominantes em cada local (BATES *et al.*, 1989; 1998).

O AD, produzido por essa diatomácea, é um aminoácido tricarboxílico (Fig. 2) que atua diretamente no sistema nervoso central de mamíferos, sobretudo na região do hipocampo, área do cérebro responsável por processos de memória e aprendizado, além de funções viscerais (ADAM *et al.*, 2009). Conhecido por ser o agente causador do envenenamento amnésico (ASP) em humanos, por meio do consumo de moluscos bivalves contaminados (RUE & BRULAND, 2001), a toxina causa sintomas que podem variar de disfunções gastrointestinais, vômitos, náuseas, diarreia, à desorientação, tontura e perda de memória de curto prazo, podendo levar indivíduos debilitados à morte em casos extremos (BATES *et al.*, 1989).

Essa molécula pode se acumular no sistema digestivo e, em menor proporção, em outros tecidos de organismos suspensívoros quando consumida em grande quantidade. Devido às altas taxas de acúmulo, as maiores concentrações de toxinas são especialmente encontradas em moluscos bivalves. Em um estudo comparativo entre as taxas de acúmulo de AD por ostras (*Crassostrea virginica*) e mexilhões (*Mytilus edulis*) mediante o consumo de *Pseudo-nitzschia multiseriata*, Mafra *et al.* (2010a) encontraram taxas 3,0–7,5 vezes menores para as ostras em comparação com os mexilhões (Mafra *et al.*, 2010a; 2010b).

Além do acúmulo em moluscos bivalves, o AD pode se acumular em outros organismos, como por exemplo em peixes (LEFEBVRE *et al.*, 2002) e ser, por meio do consumo de organismos contaminados, transferida para os níveis tróficos superiores, podendo provocar efeitos gastrointestinais e neurológicos em seres humanos ou outros consumidores secundários (ANDERSON, 2005; TRAINER *et al.*, 2012). Há registros de mortandades de mamíferos aquáticos e aves marinhas em regiões costeiras, provocadas por episódios de envenenamento por AD (BELTRAN *et al.*, 1997; SCHOLIN *et al.*, 2000; McCABE *et al.*, 2016).

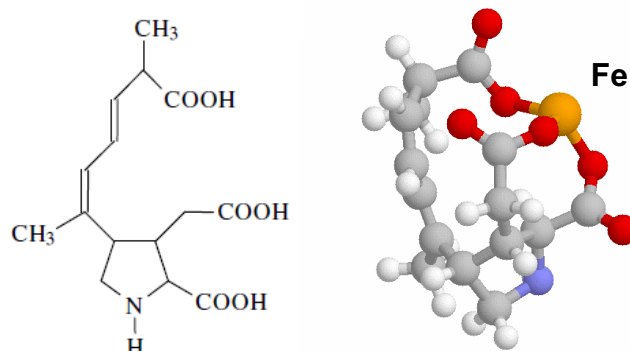
Recentemente, na primavera de 2015, McCabe e colaboradores (2016) reportaram ao longo da costa oeste da América do Norte o maior surto, inclusive em extensão geográfica, de intoxicação de organismos marinhos por AD já registrado globalmente. O impacto dessa floração massiva de *Pseudo-nitzschia* spp. se propagou ao longo da cadeia alimentar e o AD foi detectado em baleias, golfinhos, toninhas, focas, leões marinhos, anchovas, caranguejos, ostras e mexilhões. Além do impacto ambiental, houve também grande impacto social e econômico, devido à suspensão, durante meses, da comercialização de anchovas, caranguejos e bivalves.

No entanto, a simples presença de células de *Pseudo-nitzschia* na água não indica, impreterivelmente, que haverá quantidades suficientes de AD para contaminar organismos filtradores ao ponto de torna-los impróprios para o consumo. A produção de AD por *Pseudo-nitzschia* spp. é variável, dependendo da espécie, da cepa e da condição fisiológica da população (LELONG *et al.*, 2012; TRAINER *et al.*, 2012), o que torna o monitoramento desta toxina substancial e desafiador.

Há vários estudos tratando da influência de fatores ambientais no estímulo do crescimento e da produção de AD por estas diatomáceas (FUENTES *et al.*, 2013), incluindo alterações no fotoperíodo (CARUANA *et al.*, 2016; GODINHO *et al.*, 2016), pH (LUNDHOLM *et al.*, 2004), e a limitação na disponibilidade de macronutrientes, como silício (Si) e fósforo (P) (BATES *et al.*, 1991; PAN *et al.*, 1996), e de micronutrientes, como ferro (Fe) (RUE & BRULAND, 2001; WELLS *et al.*, 2005). Em geral, a toxina é produzida em maiores quantidades sob condições que causem uma redução no metabolismo primário, limitando, assim, o crescimento celular (PAN *et al.*, 1998).

Para a microalga, a produção de AD pode ser ecologicamente importante, uma vez que este composto apresenta a característica de funcionar como um ligante para metais traços. Tal característica supostamente aumentaria a biodisponibilidade de micronutrientes essenciais, como por exemplo, o ferro (Fe), para *Pseudo-nitzschia* spp. e diminuiria a disponibilidade de metais traços potencialmente tóxicos caso estejam em grandes quantidade, no caso, o cobre (Cu) (RUE & BRULAND, 2001; MALDONADO *et al.*, 2002). E esse possível processo de quelação do Fe ocorre, provavelmente, por meio dos três grupos carboxílicos presentes na molécula de AD (BATES *et al.*, 2001) (Fig. 2). Entretanto, vários aspectos relacionados ao mecanismo de síntese do AD por *Pseudo-nitzschia* spp., assim como o possível papel da toxina em conferir à microalga uma vantagem competitiva sob concentrações limitantes de micronutrientes, como o Fe, precisam ser melhor compreendidos para se avaliar a real importância ecológica do AD nas áreas costeiras onde as florações desta espécie tendem a ocorrer.

FIG. 2 ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO DOMÓICO E A LIGAÇÃO DO FERRO NO COMPLEXO HIPOTÉTICO AD-Fe (BATES *et al.*, 2001).



Experimentos de fertilização mediante à adição de ferro em regiões oceânicas conhecidas como HNLC (“High Nutrient, Low Chlorophyll”) comprovaram que a baixa disponibilidade do Fe pode limitar a produção primária (MARTIN *et al.*, 1994; COALE *et al.*, 1996) e que, aumentando as concentrações de Fe nessas regiões pode-se, conseqüentemente, aumentar a biomassa fitoplanctônica (COALE *et al.*, 2004). As florações que ocorrem nessas regiões HNLC, após a adição proposital de Fe, são tipicamente dominadas por espécies de diatomáceas de tamanho celular grande e com o crescimento rápido (MARCHETTI *et al.*, 2006). Na maioria desses experimentos, *Pseudo-nitzschia* spp. responderam mais favoravelmente e dominaram numericamente no período pós-enriquecimento (e.g. COALE *et al.*, 2004), sendo que várias espécies eram produtoras de AD, o que indica que *Pseudo-nitzschia* spp. possui uma elevada eficiência na aquisição de ferro, possivelmente relacionada com a produção de AD e sua liberação na água (RUE & BRULAND, 2001; MALDONADO *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2006).

O papel ecológico do AD em regiões costeiras e na plataforma adjacente, onde o aporte de macro e micronutrientes é usualmente maior, ainda não é totalmente compreendido. Se, por um lado, a toxina pode supostamente garantir uma vantagem competitiva à microalga, diminuindo a limitação por micronutrientes como o Fe e aumentando, assim, a produção primária em áreas onde o crescimento do fitoplâncton poderia estar limitado, por outro, as florações de *Pseudo-nitzschia* spp. podem causar eventos de mortalidade de animais marinhos (mamíferos, peixes e aves), além dos

impactos à economia e à saúde pública, caso ocorram na plataforma e costa adjacente.

Embora surtos de envenenamento humano por AD não sejam corriqueiros, é necessário reconhecer que muitos incidentes de envenenamento por consumo de frutos do mar contaminados não são devidamente relatados. A sintomatologia e a rápida eliminação de AD do corpo tornam difícil a verificação clínica da intoxicação (KUMAR *et al.*, 2009). No entanto, durante uma floração de *Pseudo-nitzschia australis* em 2014 na Galícia, Espanha, duas pessoas relataram sintomas de ASP (confusão e perda de memória) após o consumo de *paella* preparada com mexilhões congelados, adquiridos de canais ilegais de comercialização, apesar da proibição da colheita destes organismos que estava em curso (PAZOS *et al.*, 2016).

Após o evento de 1987 no Canadá, um limite seguro de 20 µg de AD por grama de carne foi instituído para a comercialização de moluscos bivalves naquele país e, posteriormente, em outras partes do mundo (JEFFERY *et al.*, 2004). No Brasil, Mafra Jr., Fernandes e Proença (2008) sugeriram um nível de alerta para o monitoramento de AD a partir de densidades celulares de *Pseudo-nitzschia* acima de 50.000 células/litro, e um nível de risco a partir de 100.000 células/litro. Após cerca de uma década de monitoramento, em janeiro de 2009 houve o primeiro caso de detecção de concentrações de AD superiores à 20 µg/kg em carne de mexilhões durante uma floração dominada por *P. pseudodelicatissima* (máx. $22,5 \times 10^6$ cél.L⁻¹) no litoral do estado de Santa Catarina, o que resultou no embargo da comercialização por um período de 31 dias em virtude do potencial risco à saúde humana (FERNANDES *et al.*, 2013).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

Foi delimitada a seguinte hipótese principal de trabalho: “Se o ferro é um limitante para o crescimento e a formação de cadeias de diatomáceas, então espera-se encontrar menores abundâncias, especialmente de células formando cadeias, em cultivos de *P. multiseriis* e *Bacillaria sp.* sob baixas concentrações de ferro”. Ainda, “se a neurotoxina ácido domóico tem um papel quelante para *Pseudo-nitzschia*, então espera-se haver um aumento na produção e/ou liberação da toxina sob limitação de Fe, e que o efeito de inibição no crescimento e formação de cadeias seja ausente ou menor na espécie tóxica (*P. multiseriis*) em relação à não-tóxica (*Bacillaria sp.*)”. Sendo assim, com a finalidade de testar estas hipóteses, foram definidos os seguintes objetivos:

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

- Analisar o efeito da limitação de ferro sobre o crescimento e a produção de toxinas pela diatomácea marinha *Pseudo-nitzschia multiseriis*

3.2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito das diferentes concentrações de ferro biodisponível nos cultivos estáticos de *P. multiseriis* por meio da determinação das taxas de crescimento, da formação de cadeias de células, da quantificação da produção e da liberação do aminoácido neurotóxico ácido domóico;
- Comparar as taxas de crescimento e formação de cadeias entre *P. multiseriis* e uma diatomácea não-tóxica (*Bacillaria sp.*) expostas às mesmas condições experimentais;
- Avaliar o papel do filtrado de *P. multiseriis* contendo ácido domóico dissolvido no meio de cultivo como quelante na aquisição de ferro pelas espécies de diatomáceas testadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aquisição e manutenção dos cultivos

Os cultivos de *Pseudo-nitzschia multiseriis* usados nesse estudo (cepas PSN-164 e PSN-168, isoladas no Oceano Pacífico, costa sul da Califórnia) foram gentilmente cedidos por Holly Bowers e Christopher Scholin, pesquisadores do Monterey Bay Aquarium Research Institute (MBARI), Califórnia, EUA. Os cultivos monoclonais, que foram mantidos em frascos do tipo erlenmeyer, contendo meio f/2 (GUILLARD, 1975), em incubadoras DBO, a 18-19°C, 30-32 salinidade, fotoperíodo de 12:12 hs (claro: escuro) e irradiância de $\sim 140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foram repicados a cada 15 dias numa proporção de 20% de inóculo e 80% de meio de cultivo estéril.

Inicialmente foi realizado um experimento piloto com as cepas PSN-164 e PSN-168, com a finalidade de escolher qual seria usada no experimento para investigação de crescimento e produção de toxina com limitação do micronutriente ferro. No experimento, com duração de 16 dias, os cultivos de ambas as cepas e suas duplicatas (n=2), foram mantidos em erlenmeyers contendo meio f/2 (GUILLARD, 1975) em incubadoras DBO, nas condições controladas mencionadas anteriormente. Amostras de 5 mL foram retiradas a cada 2 dias e preservadas em lugol (1%) para posterior determinação da densidade celular, por meio de contagens em lâminas de Sedgewick-Rafter sob microscópio ótico. O valor da densidade celular foi calculado pela média e desvio padrão da contagem em duplicatas, sendo expresso em células por mililitro (cel.mL^{-1}). Adicionalmente, alíquotas de 30 mL dos cultivos, nos dias 4, 8, 10 e 16, foram filtradas a vácuo em filtros de vidro (Whatman GF/C) para se determinar a concentração de ácido domóico intracelular.

4.2 Aclimação dos cultivos de *Pseudo-nitzschia multiseriis*

Após a escolha da cepa que seria utilizada para o experimento de crescimento e produção de toxinas sob condições limitantes de Fe, a cepa PSN-164 foi aclimatada sob diferentes concentrações de metais, sendo estas *Metais-suficiente*: MS = concentração de metais usada no meio f/2 (GUILLARD, 1975) – 1,0 ml da solução estoque por litro de meio de cultivo, e *Metais-deficientes*: MD1 = metade da

concentração de metais ($0,5 \text{ mL.L}^{-1}$) e MD2 = 1/5 da concentração de metais ($0,2 \text{ mL.L}^{-1}$). Os cultivos e suas duplicatas ($n=2$) foram mantidos sob estas condições por 21 dias em incubadoras DBO, nas condições controladas mencionadas anteriormente. Amostras de 5 ml foram coletadas a cada 2-3 dias e preservadas em lugol (1%) para determinação da concentração celular (cél.mL^{-1}).

4.3 Experimentos de crescimento e produção de toxinas sob diferentes concentrações de Fe

Culturas de *Pseudo-nitzschia multiseriis*, aclimatadas durante 4 meses por meio de repiques sucessivos sob condições limitantes de metais (1/5 da concentração presente no meio f/2; GUILLARD, 1975) e por duas gerações adicionais sem a adição de metais, e de *Bacillaria* sp., também aclimatada por duas gerações sem adição de metais, foram inoculadas em água marinha artificial enriquecida conforme procedimento descrito a seguir. O meio sintético foi preparado em água ultra-pura (Milli-Q®), inicialmente permeada em Resina Chelex 100, para retirada de resíduos de metais-traço (Price *et al.*, 1989) e esterilizada em forno de micro-ondas por três minutos (3x). Após o resfriamento, foram adicionadas concentrações de sais conforme composição do meio Aquil (PRINCE *et al.*, 1989), e de macronutrientes, vitaminas e metais traços de acordo com a formulação do meio f/2, com exceção do Fe-EDTA, cuja concentração foi manipulada para criar a condição *Fe-suficiente* e os distintos tratamentos experimentais *Fe-deficientes*.

Para o tratamento *Fe-suficiente* (S), a concentração de ferro padrão indicada no meio f/2 ($11.700 \text{ nmol.L}^{-1}$) foi adicionada ao meio. Nos demais tratamentos *Fe-deficiente*, o ferro foi adicionado nas seguintes concentrações finais: 0 nmol.L^{-1} (D1); $1,7 \text{ nmol.L}^{-1}$ (D2) e 10 nmol.L^{-1} (D3). Para cada tratamento, os cultivos foram distribuídos em frascos individuais contendo 400 ml do meio de cultivo experimental (quadruplicata por tratamento), sendo inoculados 80 ml do cultivo em fase estacionária de crescimento. Durante os 30 dias de cada experimento, os cultivos foram mantidos em estufa incubadora em condições adequadas e controladas de temperatura, irradiância e fotoperíodo, conforme mencionado anteriormente (Fig. 3).

FIG. 3 DISPOSIÇÃO DOS FRASCOS QUE COMPUNHAM OS DIFERENTES TRATAMENTOS (N = 4×4) DO EXPERIMENTO COM *Pseudo-nitzschia multiseriis* NA INCUBADORA, (A) LOGO APÓS A INOCULAÇÃO E (B) APÓS 7 DIAS DE CULTIVO. A POSIÇÃO DOS FRASCOS FOI ALEATORIAMENTE MODIFICADA A CADA 24 HORAS DURANTE O TRANSCORRER DO EXPERIMENTO.



FONTE: A autora (2016).

Em um novo experimento, os mesmos tratamentos experimentais foram repetidos para *Bacillaria* sp., com o acréscimo de um adicional (D4), onde além de uma concentração deficiente de ferro ($1,7 \text{ nmol.L}^{-1}$), foi adicionada a fração filtrada de um cultivo de *P. multiseriis* em fase estacionária, contendo 67 ng.mL^{-1} de ácido domóico dissolvido. Para este experimento, foram distribuídas duplicatas de cada tratamento em frascos individuais contendo 400 ml do meio do cultivo, inoculadas com 80 ml do cultivo aclimatado de *Bacillaria* sp. em fase estacionária.

Para ambos os experimentos, ao longo do ciclo de crescimento, foram coletadas amostras a cada 2-3 dias dos cultivos estáticos expostos aos diferentes tratamentos. As amostras (alíquotas de 10 mL), preservadas em solução de lugol neutro (1%), foram utilizadas para a determinação da densidade de células vivas e mortas (células/mL^{-1}), assim como o percentual de células formando cadeias lineares, através de contagens em lâminas de Sedgewick-Rafter sob microscópio ótico. Alíquotas adicionais de 30 mL dos cultivos foram coletadas após 4, 8, 17 e 30 dias em cultivo, e então filtradas a vácuo em filtros de vidro (Whatman G/C) para se determinar a concentração intra- e extra-celular de toxinas no material retido no filtro e no líquido filtrado, respectivamente, no caso de *P. multiseriis*, ou para quantificação do teor de

clorofila-*a* nas células de *Bacillaria* sp. As amostras foram estocadas em refrigerador até o momento das análises de toxinas por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (LC-UVD), de acordo com a metodologia descrita por Mafra *et al.* (2009), em parceria com o Instituto Federal de Santa Catarina (campus Itajaí). A concentração de clorofila-*a* foi determinada por fluorimetria, seguindo método de extração e análise descrito por Arar e Collins (1997).

4.3 Experimento de fotodegradação para a correção da taxa de liberação de AD

A taxa diária de liberação de AD, em pg.cél.dia⁻¹, foi inicialmente determinada da seguinte forma:

$$\left(\frac{\text{Concentração de AD extracelular}}{\text{Densidade celular}} \right) / \text{Dia} \quad (\text{Eq. 1})$$

Entretanto, como o AD é altamente fotodegradável (BOUILLON *et al.*, 2008), e os experimentos foram realizados na presença de luz, foi realizado um experimento adicional para se corrigir a taxa de liberação de AD.

Desta forma, amostras filtradas de cultivos de *Pseudo-nitzschia multiseriis* (n=2) foram mantidas em incubadoras DBO, sob condições similares às dos experimentos anteriores: 18-19°C, 30-32 salinidade, fotoperíodo de 12:12 hs (claro: escuro) e irradiância de ~140 μE m⁻² s⁻¹, durante seis dias, com a finalidade de mensurar a taxa diária de fotodegradação de AD. Foram mensuradas as concentrações iniciais e finais de AD por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (LC-UVD), de acordo com a metodologia descrita por Mafra *et al.* (2009), em parceria com o Instituto Federal de Santa Catarina (campus Itajaí). Após a análise de AD, foi calculada a taxa de degradação diária da seguinte forma:

$$(AD \text{ inicial} - AD \text{ final}) / (AD \text{ inicial} * \text{tempo do experimento, em dias}) \quad (\text{Eq. 2})$$

Assim, a média de degradação diária (0,012 pg.cél.dia⁻¹; Eq. 2) foi adicionada à taxa medida de liberação diária de AD (Eq. 1), para se calcular a taxa corrigida de liberação.

4.4 *Tratamentos dos dados e análises estatísticas*

A análise e tratamento dos dados foram realizados com o auxílio do programa R-Studio. Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativas nas concentrações de ácido domóico particulado e dissolvido (intra- e extra-celular, respectivamente) entre os tratamentos experimentais durante os dias amostrados. Quando a ANOVA evidenciou diferenças significativas, foi realizado o teste post-hoc SNK (Student-Newman-Keuls), para se determinar quais tratamentos e/ou datas se distinguiram significativamente dos demais. Para ambas as análises, foram testados a homogeneidade e a normalidade, pressupostos da ANOVA, através dos testes de Cochran e de Shapiro, respectivamente e, quando não atendidas, os dados foram transformados por $\log(x+1)$. Para a taxa de degradação, os pressupostos da ANOVA não foram atendidos mesmo após a transformação dos dados, no entanto, prosseguiu-se com as análises da mesma forma, uma vez que os dados estavam balanceados (UNDERWOOD, 1997)

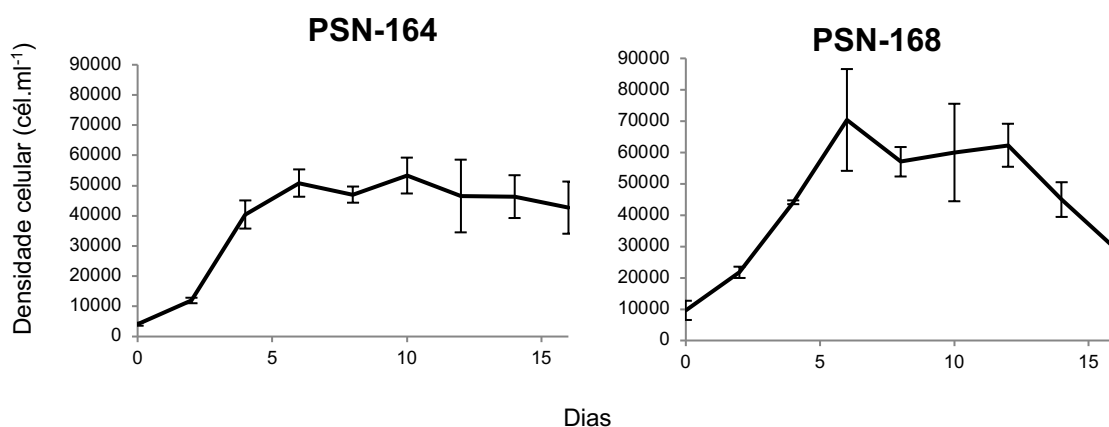
As taxas de crescimento exponencial máximo (μ , d^{-1}) foram determinadas por regressões lineares do logaritmo da concentração celular (cél ml^{-1}) pelo tempo (dias) durante o período da fase exponencial de crescimento em que o cultivo alcançou a maior taxa de multiplicação. Da mesma forma, foi calculada a taxa de crescimento exponencial entre os dias 0 e 8 (μ_{0-8}), que marcava, aproximadamente, o final da fase exponencial para todos os tratamentos.

5 RESULTADOS

5.1 Escolha da cepa de *P. multiseriis* (PSN-164 ou -168)

Entre as cepas de *P. multiseriis* testadas, PSN-164 apresentou maior taxa de crescimento exponencial máximo ($\mu = 0,57 \text{ d}^{-1}$), atingindo uma densidade máxima de $53.312 \text{ cél.mL}^{-1}$ no 6º dia de cultivo, enquanto PSN-168 cresceu exponencialmente a uma taxa máxima de $0,38 \text{ d}^{-1}$, atingindo $70.362 \text{ cél.mL}^{-1}$ no 10º dia de cultivo (Fig. 4).

FIG. 4 DENSIDADE CELULAR (CÉL.ml⁻¹) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO PARA AS CEPAS 164 E 168 DE *Pseudo-nitzschia multiseriis*.



FONTE: A autora (2016).

As maiores concentrações intracelulares de ácido domóico (AD) foram detectadas no cultivo da cepa PSN-164. Os valores variaram ao longo da curva de crescimento, sendo maiores ao final da fase exponencial, atingindo um valor máximo de $1,092 \text{ pg.cél}^{-1}$ no 16º dia de cultivo, enquanto que para a PSN-168 o maior valor de AD foi somente $0,009 \text{ pg.cél}^{-1}$, detectado no início da fase exponencial, no 4º dia de cultivo (Tabela 1).

TABELA 1. CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE ÁCIDO DOMÓICO NOS CULTIVOS DE *Pseudonitzschia multiseries*, CEPAS 164 E 168.

Dias	Ácido domóico (pg.cél ⁻¹)	
	PSN-164	PSN-168
0	<0,001	0,002
4	0,009	0,009
8	0,486	<0,001
10	1,070	0,001
16	1,092	<0,001

FONTE: A autora (2016).

Após a análise combinada desses resultados, concluiu-se que a cepa mais apropriada para o experimento de investigação de crescimento e produção de toxina sob limitação do micronutriente ferro seria a PSN-164.

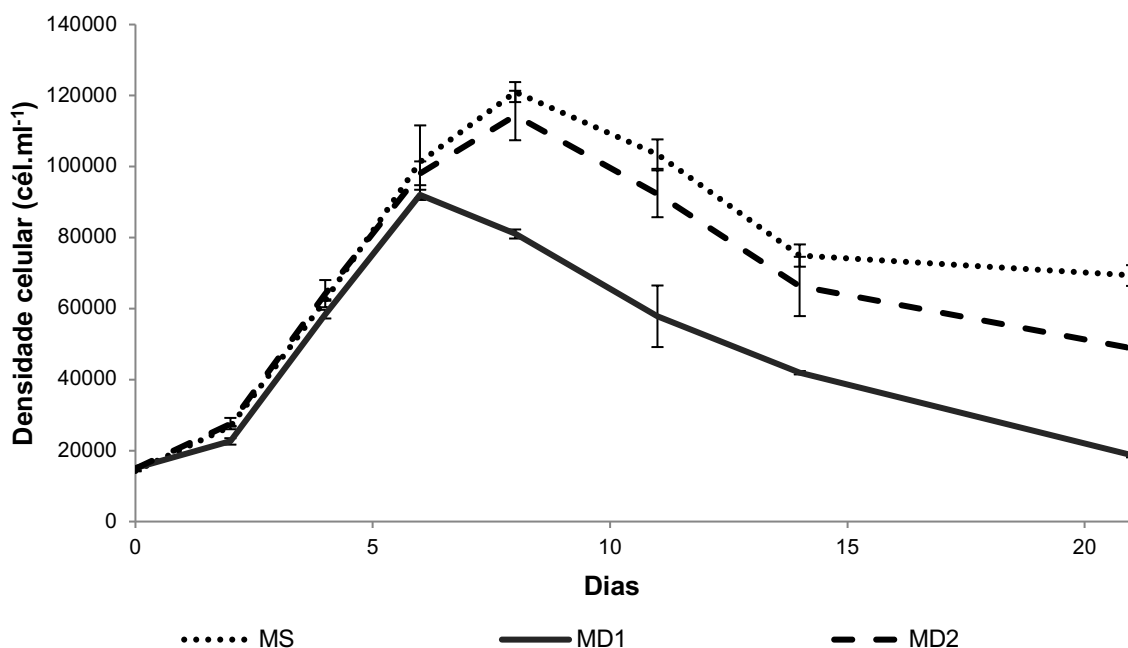
5.2 Aclimação de *P. multiseries*

Durante a fase de aclimação da cepa PSN-164 que antecedeu o experimento de limitação por Fe, os tratamentos experimentais MS (f/2) e MD2 (1/5 dos metais de f/2) renderam taxas de crescimento exponencial máxima (μ) semelhantes, 0,26 d⁻¹ e 0,25 d⁻¹ respectivamente. As densidades celulares máximas foram atingidas ao final da fase exponencial (dia 8), chegando a 120.975 cél.mL⁻¹ em MS e 114.375 cél.mL⁻¹ em MD2. Enquanto isso, o tratamento MD1 (1/2 dos metais de f/2) rendeu um valor ligeiramente maior de μ (0,30 d⁻¹), no entanto menores densidades celulares máximas, alcançando 92.025 cél.mL⁻¹ no dia 6.

Durante a fase exponencial dos cultivos de aclimação, todos os tratamentos cresceram de forma similar, no entanto o tratamento MD1 atingiu a fase estacionária antes que os demais e sua densidade celular foi diminuindo gradativamente após o dia 6, atingindo um mínimo de 18.675 cél.mL⁻¹ no dia 21. Enquanto isso, o crescimento celular do tratamento MD2 foi muito similar ao do tratamento MS, atingindo a fase estacionária no dia 8 e valor mínimo de 48.825 cél.mL⁻¹ (comparado a 69.300 cél.mL⁻¹) também no 8º dia de cultivo (Fig. 5). Assim, a concentração de metais utilizada em

MD2 (1/5 da concentração do meio f/2) foi a escolhida para o restante do período de aclimação.

FIG. 5 DENSIDADE CELULAR (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO; n=2) DE *Pseudo-nitzschia multiseries* AO LONGO DE UM CICLO DE CULTIVO ESTÁTICO DURANTE O EXPERIMENTO PARA ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS A SER USADA DURANTE A ACLIMATAÇÃO. MS= MEIO F/2; MD1 E MD2= 1/2 E 1/5 DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS DO MEIO F/2, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: A autora (2016).

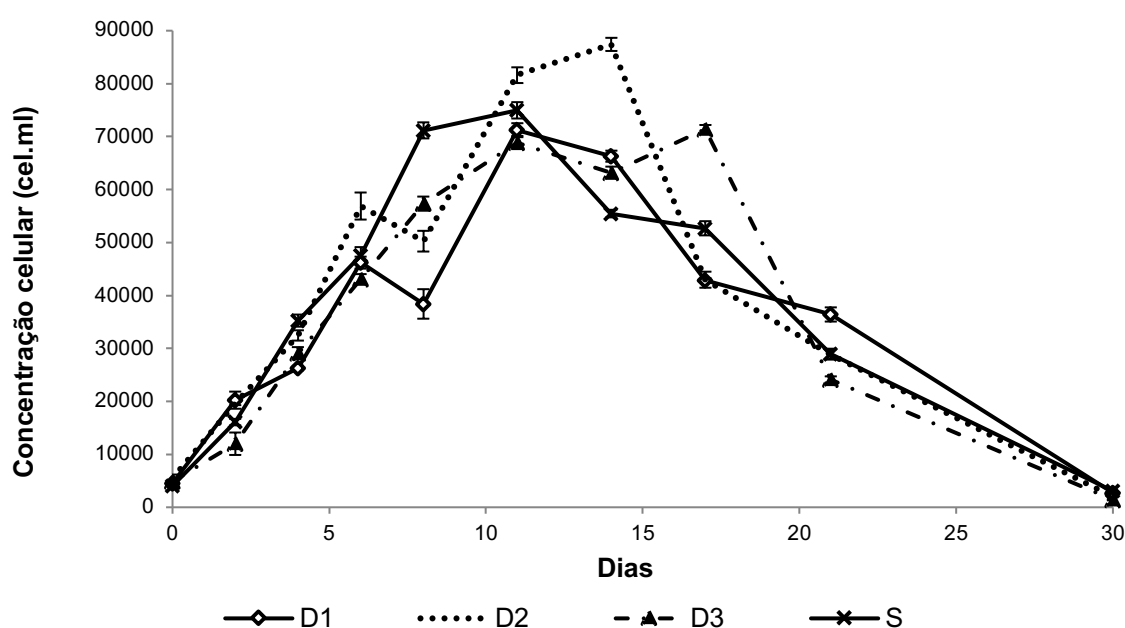
5.3 Experimentos de limitação por Fe

5.3.1 *Pseudo-nitzschia multiseries*

Os tratamentos experimentais a que *P. multiseries* foi exposta durante o experimento de limitação por Fe resultaram em densidades celulares semelhantes, não havendo diferenças significativas entre os cultivos expostos a condições *Fe-suficientes* (S) e *Fe-deficientes* (Fig. 6). A taxa de crescimento exponencial de *P. multiseries*, medida entre os dias 0 e 8 de cultivo (μ_{0-8}) foi mais elevada no tratamento *Fe-suficiente* ($\mu_{0-8} = 0,22 \text{ d}^{-1}$), que atingiu uma densidade máxima de $74.962 \text{ cél.mL}^{-1}$ no 11º dia de cultivo. Sob concentrações *Fe-deficientes* (D), as taxas de crescimento exponencial foram menores em todos os tratamentos ($\mu_{0-8} = 0,10-0,16$), assim como a densidade celular para D1 e D3 (71.212 e $68.887 \text{ cél.mL}^{-1}$, respectivamente),

enquanto que o tratamento D2 atingiu uma maior densidade celular ($87.412 \text{ cél.mL}^{-1}$) no 14º dia, em comparação com os demais tratamentos. As taxas de crescimento máximo (μ) também foram semelhantes para S e D1 ($0,70$ e $0,73 \text{ d}^{-1}$, respectivamente), enquanto que os tratamentos intermediários renderam taxas menores ($0,45 \text{ d}^{-1}$ para D2 e $0,53 \text{ d}^{-1}$ para D3) (Tabela 7).

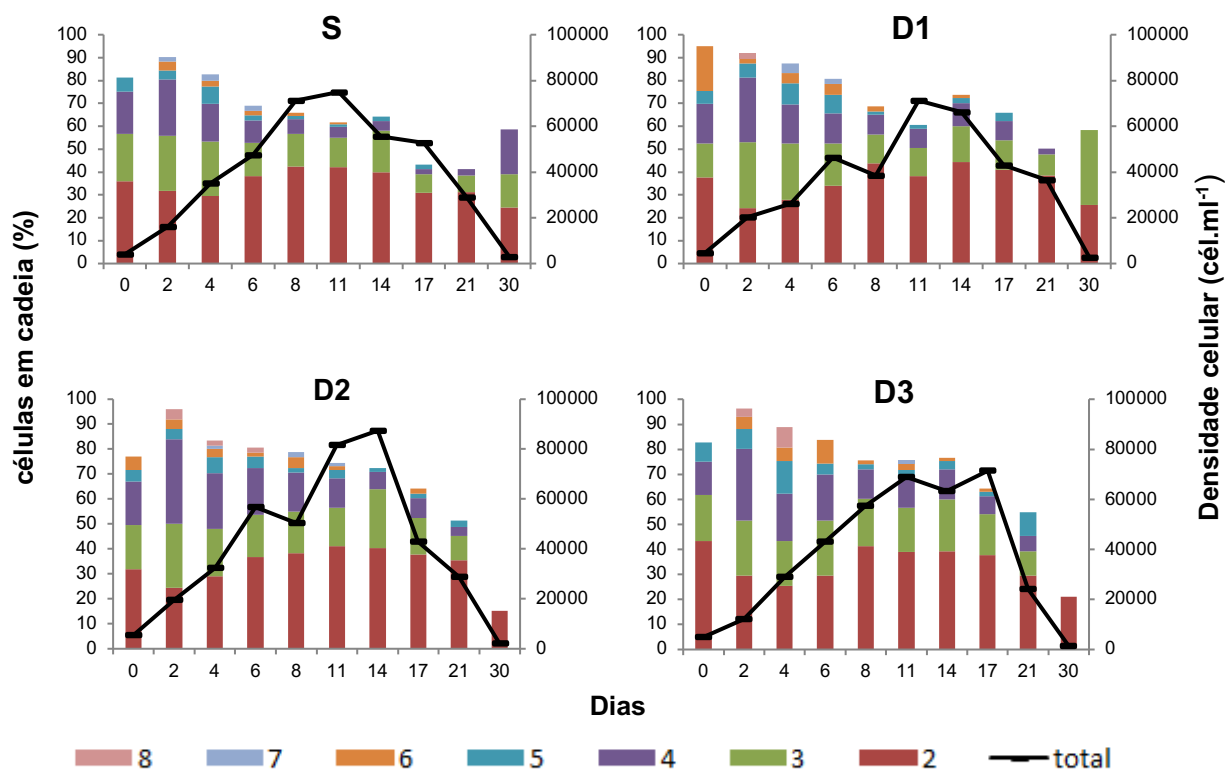
FIG. 6 DENSIDADE CELULAR (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO; $n=4$) DE *Pseudo-nitzschia multiseriata* AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO, MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L^{-1} ; D2=1,7 nmol.L^{-1} ; D3=10 nmol.L^{-1} ; S=11.700 nmol.L^{-1}).



FONTE: A autora (2016).

Em todos os cultivos expostos aos diferentes tratamentos, as células formaram cadeias com até oito células de comprimento, não sendo notada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos. Tanto o percentual de células formando cadeias quanto o número de células por cadeia diminuíram gradativamente ao longo do ciclo de cultivo estático. Em geral, predominaram as cadeias curtas, compostas por 2 a 4 células (Fig. 7).

FIG. 7 PERCENTUAL DE CÉLULAS FORMANDO CADEIAS DE 2 A 8 CÉLULAS E DENSIDADE CELULAR MÉDIA ($n=4$) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO DE *Pseudo-nitzschia multiseries* EM CULTIVO ESTÁTICO, MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L⁻¹; D2=1,7 nmol.L⁻¹; D3=10 nmol.L⁻¹; S=11.700 nmol.L⁻¹).



FONTE: A autora (2016).

As concentrações intracelulares de AD aumentaram significativamente em relação ao tempo ($p = 2,2 \times 10^{-16}$), assim como foram significativamente influenciadas pelos tratamentos experimentais ($p = 4,47 \times 10^{-4}$) (Tabela 2). De acordo com os resultados do teste SNK, o tratamento S foi o único que diferiu, estatisticamente, dos demais. Não houve diferença entre os tratamentos amostrais no dia 4, no entanto, nos dias 8 e 17, as maiores concentrações intracelulares foram encontradas no tratamento S (0,20 – 0,45 pg.cél⁻¹ respectivamente) em comparação com os outros tratamentos (0,03 – 0,27 pg.cél⁻¹). Similarmente, no dia 30, quando foram reportadas as maiores concentrações intracelulares entre os dias amostrados, os valores também foram superiores no tratamento S (2,07 pg.cél⁻¹) em comparação com os tratamentos Fe-deficientes (0,84 – 1,29 pg.cél⁻¹) (Tabela 3).

As concentrações extracelulares de AD também aumentaram significativamente ao longo da curva de crescimento ($p = 5,36 \times 10^{-9}$), mas não

diferiram, de modo geral, entre os tratamentos experimentais ($p = 0,39$). Dependendo da fase de cultivo, no entanto, houve uma variação marcada, mas não significativa ($p = 0,12$) entre os valores medidos nos diferentes tratamentos. Na fase exponencial de crescimento (dia 8), a maior concentração extracelular ($1,85 \text{ pg.cél}^{-1}$) foi reportada para o tratamento sem adição de Fe (D1) em comparação com os demais ($0,55 - 0,81 \text{ pg.cél}^{-1}$). Já na fase estacionária do crescimento (dia 17), as maiores concentrações foram medidas no tratamento S ($91,30 \text{ pg.cél}^{-1}$) em comparação com os outros tratamentos ($1,95 - 25,80 \text{ pg.cél}^{-1}$). Enquanto que no dia 30 (fase de declínio), as maiores concentrações foram novamente detectadas no tratamento D1 ($18,61 \text{ pg.cél}^{-1}$) quando comparadas aos demais tratamentos ($4,56 - 7,24 \text{ pg.cél}^{-1}$) (Tabela 3).

As taxas diárias (corrigidas) de liberação de AD aumentaram ao longo do tempo de experimento, acompanhando o padrão de variação das concentrações extracelulares da toxina: na fase exponencial, as maiores taxas de liberação foram calculadas para o tratamento D1 ($0,30 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) em comparação com os demais ($0,15 - 0,20 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$); já na fase estacionária as maiores taxas foram obtidas no tratamento S ($8,26 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), enquanto que as taxas dos tratamentos com limitação de Fe variaram de $0,28$ a $3,23 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ no mesmo período. E na fase de declínio (dia 30), as maiores taxas foram novamente reportadas para o tratamento D1 ($1,30 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) em comparação com os demais ($-7,04$ a $0,39 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). A ocorrência de eventuais taxas negativas, que denotam maiores concentrações extracelulares de AD no início do que ao final de um intervalo de tempo considerado, foram confirmadas após re-análise das amostras por HPLC e checagem dos cálculos.

TABELA 2. RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DO TESTE SNK PARA AS CONCENTRAÇÕES INTRA- E EXTRACELULARES (pg.CÉL⁻¹) E DA TAXA DE LIBERAÇÃO DIÁRIA DE ÁCIDO DOMÓICO (AD), ENTRE OS TRATAMENTOS E TEMPO AMOSTRAL, E A INTERAÇÃO ENTRE ELAS.

	AD (pg.cél ⁻¹)									Taxa de liberação AD (pg.cél ⁻¹ .d ⁻¹)			
	Df	Intracelular				Extracelular				MS	F	p	SNK
		MS	F	p	SNK	MS	F	p	SNK				
Tr	3	1,89	6,66	7,5×10⁻⁴	D3=D2=D1<S	1,91	1,009	0,39	N/A*	0,40	0,04	0,98	
Tm	3	33,1	116,6	2,2×10⁻¹⁶	4<8<17<30	41,08	21,60	5,4×10⁻⁹	8=4=17<30	91,2	9,32	5,7×10⁻⁵	
TrxTm	9	0,48	1,70	0,11	N/A*	3,18	1,67	0,12	N/A*	55,50	5,67	2,5×10⁻⁵	Dia 04: D1=D2=D3=S Dia 08: D1=D2=D3=S Dia 17: D1=D2=D3<S Dia 30: D1=D2=D3>S

FONTE: A autora (2016).

TABELA 3. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (n=4) INTRACELULAR (pg.CEL⁻¹), EXTRACELULAR (pg.CEL⁻¹), TOTAL (ng.ml⁻¹) E A TAXA DIÁRIA DE LIBERAÇÃO (pg.CEL⁻¹.d⁻¹) DE ÁCIDO DOMÓICO (AD) MEDIDA AO LONGO DO CULTIVO ESTÁTICO DE *Pseudo-nitzschia multiseriis* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO. SOMENTE CÉLULAS VIVAS FORAM CONSIDERADAS PARA O CÁLCULO DA DENSIDADE CELULAR E DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE AD, E A SOMA DE CÉLULAS VIVAS E MORTAS PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR E DA TAXA DIÁRIA DE LIBERAÇÃO DE AD.

Dias	Tratamentos	Concentração de AD			Taxa diária de liberação de AD (pg.cel ⁻¹ .d ⁻¹)
		Intracelular (pg.cel ⁻¹)	Extracelular (pg.cel ⁻¹)	Total (pg.mL ⁻¹)	
4	D1	0,04	0,44	0,01	0,16
	D2	0,03	0,54	0,02	0,18
	D3	0,04	0,72	0,02	0,22
	S	0,04	0,74	0,03	0,23
8	D1	0,06	1,85	0,05	0,39
	D2	0,06	0,81	0,03	0,21
	D3	0,03	0,74	0,04	0,22
	S	0,20	0,55	0,04	0,17
17	D1	0,26	1,95	0,10	0,31
	D2	0,27	25,80	1,15	1,20
	D3	0,14	2,15	0,18	0,43
	S	0,45	91,30	4,75	8,29
30	D1	0,84	18,61	0,66	1,35
	D2	1,21	4,56	0,20	-1,22
	D3	1,29	7,24	0,21	0,43
	S	2,07	6,83	0,28	-6,99

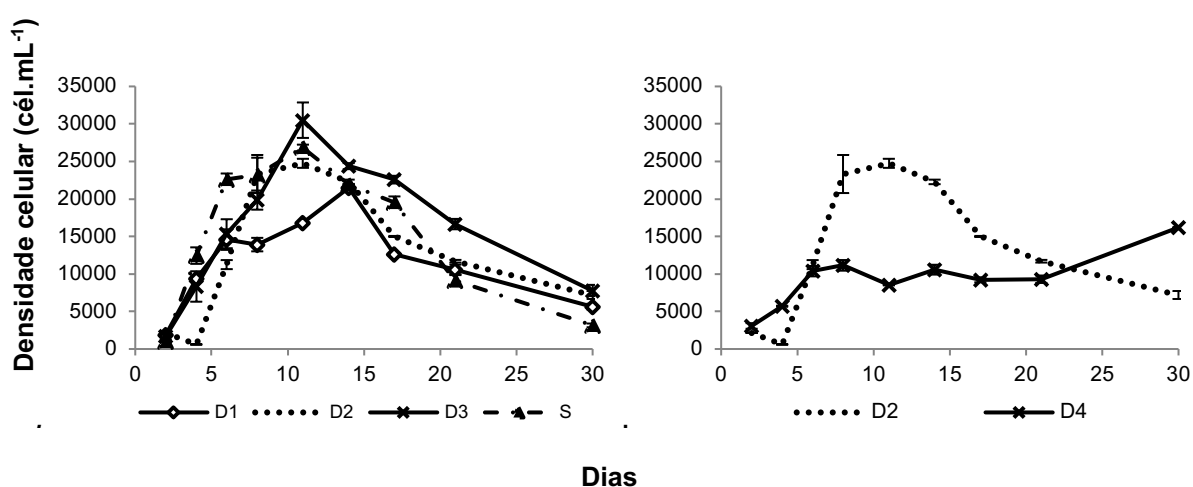
FONTE: A autora (2016).

5.2.2 *Bacillaria sp.*

Para *Bacillaria sp.*, a maior taxa de crescimento exponencial, medida entre os dias 0 e 8, foi observada no tratamento D3 ($\mu_{0-8} = 0,36 \text{ d}^{-1}$), onde densidades máximas de aproximadamente 30.500 cél.mL⁻¹ foram atingidas no 8º dia de cultivo. Para o tratamento S ($\mu_{0-8} = 0,27 \text{ d}^{-1}$), a densidade máxima foi de 26.850 cél.mL⁻¹ no 8º dia. Nos demais tratamentos *Fe-deficientes*, as taxas de crescimento exponencial e as densidades celulares foram menores, alcançando $\mu_{0-8} = 0,20 \text{ d}^{-1}$ e densidade máxima de 24.750 cél.mL⁻¹ no 8º dia no tratamento D2, e $\mu_{0-8} = 0,27 \text{ d}^{-1}$ e 21.500 cél.mL⁻¹ no 11º dia no tratamento D1. Para o tratamento D4, ao qual foi adicionada a fração filtrada de um cultivo de *P. multiseriis*, não se registrou um aumento na abundância de *Bacillaria sp.* durante a fase inicial do cultivo ($\mu_{0-8} = -0,007 \text{ d}^{-1}$)

e a densidade celular atingiu somente 16.200 cél.ml⁻¹ no 21º dia (Fig. 8). Em todos os tratamentos, as células de *Bacillaria* sp. formaram cadeias, algumas com mais de 8 células de comprimento, no entanto, houve predominância de cadeias curtas, com 2 a 4 células (Fig. 9).

FIG. 8 DENSIDADE CELULAR (MÉDIA ± ERRO PADRÃO; n=2) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO EM CULTIVO ESTÁTICO DE *Bacillaria* sp., EXPOSTA A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO (VALORES EM nmol.L⁻¹) E UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE *P. MULTISERIES* (FILT.) CONTENDO 67 ng AD.ml⁻¹.



FONTE: A autora (2016).

Surpreendentemente, as taxas de crescimento máximo de *Bacillaria* sp. ($\mu = 0,36\text{--}0,73\text{ d}^{-1}$) não diferiram significativamente entre os tratamentos *Fe-limitantes* e *Fe-suficiente*, e foram consistentemente maiores do que as de *P. multiseriis* exposta a concentrações equivalentes de ferro, exceto quando houve a adição da fração filtrada (dissolvida) do cultivo de *P. multiseriis*, no tratamento D4 ($\mu = 0,21\text{ d}^{-1}$) (Tabela 7).

As concentrações de clorofila-*a* (Chl-*a*) variaram de 0,35 a 341,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ao longo dos dias e entre os tratamentos experimentais (Tabela 4), a interação significativa ($p = 1,45 \times 10^{-8}$) entre eles (Tabela 6). As maiores concentrações foram encontradas no tratamento sem limitação de Fe (S), atingindo valores máximos de 341 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no dia 8, quando também foram encontradas as maiores densidades celulares para este tratamento, no entanto, no dia 30, a concentração de Chl-*a* desse tratamento foi menor (0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do que nos demais tratamentos (4,89 – 41,39 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

¹). O tratamento sem adição de Fe (D1) rendeu concentrações menores de Chl-a, variando de 4,89 a 50,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ao longo dos dias experimentais. Os tratamentos intermediários apresentaram concentrações medianas. No entanto, no tratamento com adição do filtrado de *P. multiseriis* (D4), as concentrações se mantiveram constantes ao longo do experimento (23,54 – 41,39 $\mu\text{g.L}^{-1}$), diferente do que foi visto para o tratamento D2 (5,61–102,66 $\mu\text{g.L}^{-1}$), onde havia a mesma concentração de Fe biodisponível.

TABELA 4. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (n=2) DE CLOROFILA-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) EM CÉLULAS DE *Bacillaria* sp. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Fe NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM VALORES DE DESVIO PADRÃO ENTRE PARÊNTESES.

Chl-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
Dia	D1	D2	D3	D4	S
4	32,47 (5,81)	67,90 (36,14)	56,19 (25,81)	23,54 (1,17)	291,75 (85,68)
8	50,15 (11,17)	102,66 (49,20)	120,67 (49,31)	29,47 (7,39)	341,17 (2,01)
17	42,60 (1,05)	54,92 (12,77)	66,05 (25,91)	33,36 (6,83)	34,99 (5,15)
30	4,89 (0,44)	5,61 (1,01)	38,82 (12,65)	41,39 (12,51)	0,355 (0,21)

FONTE: A autora (2016).

TABELA 5. CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR MÉDIA (n=2) DE CLOROFILA-a (pg.CÉL^{-1}) PARA *Bacillaria* sp. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Fe NOS DIFERENTES TRATAMENTOS, COM VALORES DE DESVIO PADRÃO ENTRE PARÊNTESES.

Chl-a (pg.cél^{-1})					
Dia	D1	D2	D3	D4	S
4	2,27 (0,78)	5,82 (2,77)	3,57 (1,30)	2,29 (0,32)	13,08 (4,38)
8	2,98 (0,63)	3,98 (1,57)	3,87 (1,22)	3,48 (0,98)	12,75 (0,85)
17	4,22 (1,42)	4,64 (0,79)	4,58 (2,84)	3,60 (0,07)	4,21 (1,02)
30	2,84 (0,86)	2,64 (1,03)	8,41 (3,56)	3,67 (1,11)	3,80 (0)

FONTE: A autora (2016).

Houve uma interação significativa entre os tratamentos e o tempo experimental ($p=5,47 \times 10^{-3}$), no entanto, não houve diferença significativa nas concentrações de Chl-a por célula em relação aos dias amostrados (Tabela 6). Nos dias 4 e 8 do experimento com *Bacillaria* sp., as maiores concentrações intracelulares de Chl-a (Tabela 5) foram detectadas no tratamento S (12,75 e 13,08 pg.cél^{-1} , respectivamente), onde não havia limitações de Fe. As concentrações de Chl-a por célula, assim como as densidades celulares, diminuíram a partir do dia 17, atingindo uma concentração mínima de 3,80

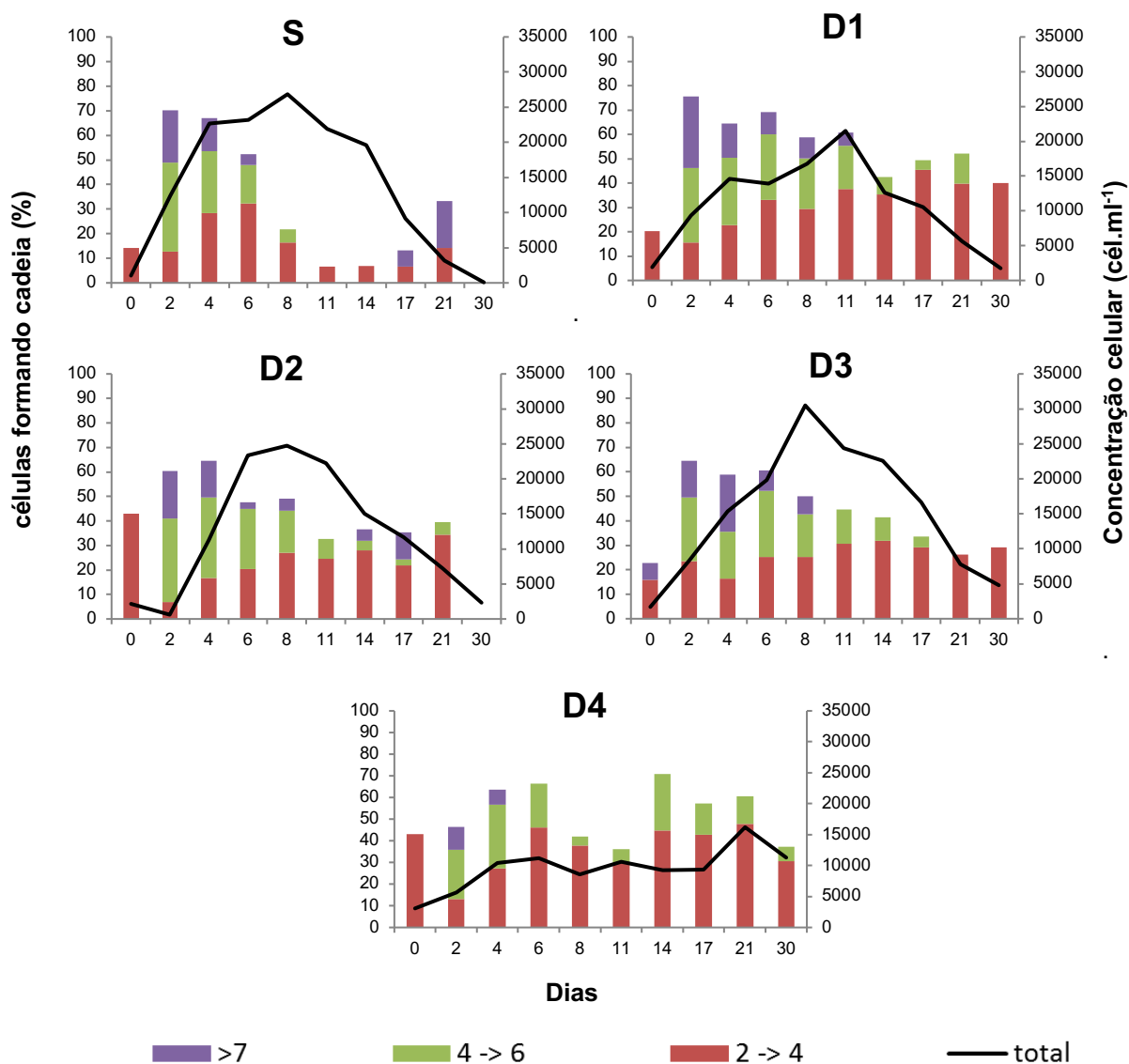
pg.cél⁻¹ no dia 30. Não houve diferenças significativas nas concentrações de Chl-a por célula entre os tratamentos amostrais que estavam limitados por Fe (Tabela 6), inclusive no tratamento D4, onde as densidades celulares e a concentração total de Chl-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) tinham se mostrado diferente daquelas detectadas nos demais tratamentos.

TABELA 6. RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) E DO TESTE SNK PARA AS CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) E DA CLOROFILA-a POR CÉLULA (pg.CÉL.⁻¹) ENTRE OS TRATAMENTOS E TEMPO AMOSTRAL E A INTERAÇÃO ENTRE ELES.

	Chl-a ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Chl-a (pg.cél ⁻¹)	
	P	SNK	P	SNK
Tr	0,0208	D1=D4=S=D2=D3	0,00178	D1=D4=D2=D3< S
Te	$6,04 \times 10^{-11}$	30<17=4<8	0,2377	30=17=4=8
Tr:Te	$1,45 \times 10^{-8}$		$5,47 \times 10^{-3}$	

FONTE: A autora (2016).

FIG. 9 PERCENTUAL DE CÉLULAS FORMANDO CADEIAS E DENSIDADE CELULAR MÉDIA (N=2) AO LONGO DO CICLO DE CRESCIMENTO DE *Bacillaria* sp. EM CULTIVO ESTÁTICO MEDIANTE A ADIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE FERRO NO MEIO DE CULTIVO (D1=0 nmol.L⁻¹; D2 e D4=1,7 nmol.L⁻¹; D3=10 nmol.L⁻¹; S=11.700 nmol.L⁻¹). AO TRATAMENTO D4 FOI ADICIONADA A FRAÇÃO DISSOLVIDA DE UM CULTIVO DE *P. multiseries* CONTENDO 67 ng.ml⁻¹ DE ÁCIDO DOMÓICO.



FONTE: A autora (2016).

TABELA 7. TAXA DE CRESCIMENTO ENTRE OS DIAS 0 E 8 DO CULTIVO (μ_{0-8}) E TAXA DE CRESCIMENTO MÁXIMO (μ) PARA *Pseudo-nitzschia multiseriis* E *Bacillaria* sp., EXPOSTAS A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO. PARA *Bacillaria* sp., FOI ACRESCENTADO UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE *P. MULTISERIES* (FILT.) CONTENDO 67 ng AD.ml⁻¹.

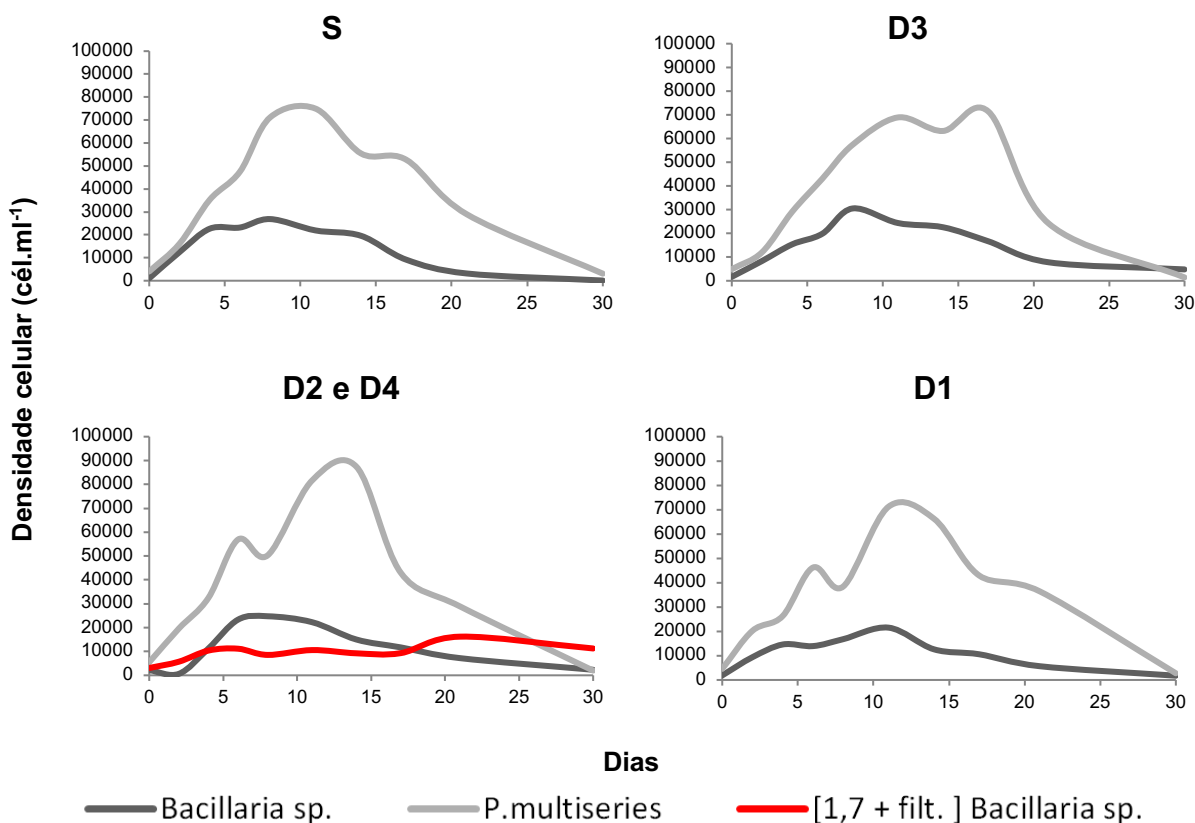
Tratamentos	<i>P. multiseriis</i>		<i>Bacillaria</i> sp.	
	μ_{0-8}	μ	μ_{0-8}	μ
D1	0,10	0,73	0,27	0,73
D2	0,13	0,45	0,20	0,63
D4	-	-	NA*	0,21
D3	0,16	0,53	0,36	0,36
S	0,22	0,70	0,27	0,66

*NA: não se aplica

FONTE: A autora (2016).

Em suma, as densidades celulares e as curvas de crescimento não diferiram entre os tratamentos experimentais, tanto para *P. multiseriis* quanto para *Bacillaria* sp. (Figura 10). Embora *P. multiseriis* tenha alcançado maiores densidades celulares durante a fase exponencial de crescimento (87.412 cél.ml⁻¹) quando comparada com *Bacillaria* sp. (30.500 cél.ml⁻¹), ambas as espécies apresentaram boa adaptação à limitação por Fe. A exceção foi o cultivo de *Bacillaria* sp. submetido ao tratamento com adição do filtrado de *P. multiseriis* (D4), que apresentou crescimento limitado e atingiu densidades celulares bastante reduzidas (Figura 10).

FIG. 10. COMPARAÇÃO ENTRE AS DENSIDADES CELULARES MÉDIAS AO LONGO DO TEMPO (DIAS DE CULTIVO) PARA *Pseudo-nitzschia multiseriis* E *Bacillaria* sp., EXPOSTAS A QUATRO CONCENTRAÇÕES DE FERRO. PARA *Bacillaria* sp., FOI ACRESCENTADO UM TRATAMENTO EXTRA COM ADIÇÃO DA FRAÇÃO FILTRADA DO CULTIVO DE *P. MULTISERIES* (FILT.) CONTENDO 67 ng AD.ml⁻¹.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o efeito de diferentes concentrações de Fe sobre o crescimento das diatomáceas penadas *Pseudo-nitzschia multiseriis* e *Bacillaria* sp., bem como sobre a produção de toxinas por *P. multiseriis*. Para microalgas, o micronutriente Fe é essencial para muitos processos metabólicos que requerem reações de transferência de elétrons, como por exemplo, fotossíntese, respiração e assimilação de nitrogênio e carbono. Tais processos são, portanto, diretamente afetadas pela limitação por Fe (SARTHOU *et al.*, 2005). Além disso, estima-se que 80% do Fe necessário para o fitoplâncton seja utilizado na transferência de elétrons fotossintéticos. Essa alta demanda por Fe no aparelho fotossintético é o que torna a fotossíntese o alvo principal da deficiência pelo micronutriente (RAVEN 1990).

No presente estudo, cultivos de *P. multiseriis* atingiram densidades celulares semelhantes em todos os tratamentos experimentais, não havendo diferenças significativas entre os cultivos expostos a condições *Fe-suficientes* e *Fe-deficientes*. Similarmente, as taxas de crescimento exponencial máximo (μ) também foram semelhantes entre os tratamentos. Bates e colaboradores (2001) encontraram resultados semelhantes em seu estudo, onde *P. multiseriis* também foi submetida a diferentes condições de Fe: *Fe-suficiente* (11.700 nmol.L⁻¹) e *Fe-deficiente* (0 nmol.L⁻¹ e 120 nmol.L⁻¹). As taxas de crescimento exponencial (aproximadamente 0,8 d⁻¹) também não diferiram entre os tratamentos usados no referido estudo e os cultivos que cresceram sem adição de Fe não apresentaram sinais de estresse por escassez de Fe (BATES *et al.*, 2001).

Em um estudo similar ao presente, Maldonado e colaboradores (2002) avaliaram a relação entre a disponibilidade de metais traços e a produção de AD por *P. multiseriis* e *P. australis*. Naquele experimento, foram testadas uma concentração experimental *Fe-suficiente* (150 nmol.L⁻¹) e uma *Fe-limitante* (1,7 nmol.L⁻¹). As taxas de crescimento de ambas as espécies foram reduzidas em 50% nas condições *Fe-limitantes* (0,50 d⁻¹) em comparação com a *Fe-suficiente* (1,0 d⁻¹). Esse resultado se aproxima do que foi encontrado na presente investigação para *P. multiseriis*, que, sob a mesma condição limitante (1,7 nmol.L⁻¹), teve o crescimento reduzido em 36% se comparado com a concentração suficiente de Fe, 11.700 nmol.L⁻¹, (0,45 vs. 0,70 d⁻¹, respectivamente).

O comprimento das cadeias, i.e. o número de células compondo a cadeia, varia de acordo com a espécie e pode estar relacionado com o grau de turbulência e com o estado nutricional das células. Segundo Lelong *et al.* (2012), para *P. multiseriis*, células em crescimento exponencial, repletas de nutrientes, formam cadeias mais longas, ao passo que, normalmente, separam-se em células solitárias e afundam quando os nutrientes se esgotam, geralmente durante a fase estacionária. Este padrão foi verificado no presente estudo, entretanto não se pode evidenciar diferenças na formação de cadeias entre os tratamentos experimentais, sugerindo, novamente, que as condições testadas não limitaram o crescimento da diatomácea.

A compilação dos presentes resultados evidenciou que não houve diferenças significativas na densidade celular, na taxa de crescimento e na formação de cadeia entre os tratamentos amostrais para *P. multiseriis*, sugerindo que esta espécie possui uma adaptação eficiente a condições limitantes de Fe, como já reportado por Wells *et al.* (2005) em um estudo similar ao presente. Naquela ocasião, cultivos de *P. multiseriis*, *P. australis* e *P. fraudulenta* foram submetidos a condições limitantes de Fe (2–150 nmol.L⁻¹) e condições estressantes (concentrações tóxicas) de Cu (0,001–0,1 nmol.L⁻¹). As taxas de crescimento de *P. multiseriis* e *P. australis* se mantiveram em níveis ótimos (~0,80 d⁻¹) sob concentrações reduzidas de Fe, enquanto que *P. fraudulenta* se mostrou mais sensível à limitação por escassez de Fe – sua taxa de crescimento foi 40% menor quando o micronutriente foi limitado. No entanto, em condições onde Fe e Cu estavam limitados simultaneamente, a taxa de crescimento foi reduzida de 40 a 70% em todas as espécies. Esses resultados evidenciaram uma sinergia entre Fe e Cu, além de indicar que Cu é um fator chave que facilita o sucesso das diatomáceas toxigênicas em águas onde Fe é limitado (WELLS *et al.*, 2005).

Para *Bacillaria* sp., as concentrações intracelulares de Chl-*a* (pg.cél.⁻¹) não diferiram dentre os tratamentos limitados por Fe durante a fase exponencial, no entanto, foram maiores para o tratamento sem limitação de Fe nessa mesma fase. Isso sugere que as células estavam mais saudáveis, sintetizando uma quantidade maior de Chl-*a* por unidade de biomassa, o que reflete uma maior capacidade fotossintética e explica as maiores concentrações de Chl-*a* medidas por unidade de volume de cultivo (ng.ml⁻¹). Apesar disso, surpreendentemente, tanto a densidade celular quanto as taxas de crescimento máximo e a formação de cadeias celulares de *Bacillaria* sp. não diferiram significativamente entre os tratamentos *Fe-limitantes* e *Fe-*

suficiente. Os resultados evidenciaram que, a exemplo de *P. multiseriis*, *Bacillaria* sp. se adaptou de forma efetiva às condições limitantes de Fe. Entretanto, quando houve a adição do filtrado de *P. multiseriis* ao tratamento D4, houve uma notável inibição do crescimento de *Bacillaria* sp., o que ficou evidente tanto nas densidades celulares quanto na concentração de Chl-*a* por litro. Tal limitação do crescimento ocorreu possivelmente devido a uma redução na disponibilidade de Fe, ou por um efeito alelopático da toxina ácido domóico ou de algum outro composto nocivo produzido e liberado por *P. multiseriis* no meio.

Assim como acontece com outras espécies do fitoplâncton, é razoável supor que *Pseudo-nitzschia* spp. podem causar efeitos alelopáticos (LELONG *et al.*, 2012). Apesar de alguns estudos, como o de Lundholm *et al.* (2005), afirmarem que a adição de AD ou a presença de *P. multiseriis* não causam efeito alelopático sobre o crescimento de outras microalgas em laboratório, estudos mais recentes mostram o contrário. Os resultados encontrados por Xu *et al.* (2015) sugerem que a alelopatia pode afetar a competição entre *Pseudo-nitzschia* spp. e outras espécies fitoplanctônicas, podendo desempenhar um papel importante na formação e persistência de florações naturais e, também, naquelas promovidas por fertilizações artificiais com ferro nas regiões HNLC. Além disso, os autores observaram efeitos alelopáticos mais potentes quando utilizaram filtrados (i.e. meio de cultura isento de células) em comparação com co-culturas de algas. O filtrado de *P. multiseriis*, na fase estacionária, causou redução de 30 a 50% na densidade celular do dinoflagelado *Akashiwo sanguinea*, em comparação com o controle (Xu *et al.*, 2015).

Resultados semelhantes ao de Xu *et al.* (2015) foram reportados neste estudo. Houve redução de aproximadamente 70% na densidade celular e de 90% na concentração de clorofila-*a* durante o início da fase estacionária (dia 8) no tratamento D4 em comparação com o S. Mesmo quando comparado com o tratamento D2, onde foi adicionado a mesma concentração de Fe, houve redução de aproximadamente 50% na densidade celular e de 70% na clorofila-*a* durante o mesmo período.

Meerssche *et al.* (2016) examinaram a resposta de outras espécies quando expostas ao AD, através da concentração de Chl-*a* e da densidade celular. Resultados mostraram um efeito negativo do AD sobre o crescimento de alguns grupos fitoplanctônicos, tais como cianobactérias, clorófitas e dinoflagelados. Curiosamente, AD teve um efeito positivo sobre o crescimento de criptófitas, diatomáceas e euglenófitas, sugerindo uma assimilação do AD e seu potencial uso como fonte de

nutriente por parte das microalgas testadas. O possível papel alelopático do AD e/ou de outros compostos supostamente produzidos por *Pseudo-nitzschia* spp. ainda necessita de estudos adicionais para uma melhor compreensão.

Da mesma forma, os mecanismos e estratégias responsáveis pela adaptação eficiente de *Pseudo-nitzschia* e *Bacillaria* spp. a concentrações limitantes de Fe ainda não são completamente conhecidos. Sarthou *et al.* (2005) citam em seu trabalho que a redução do tamanho celular pode conferir uma vantagem adaptativa às diatomáceas sob condições limitantes de Fe. A redução na demanda por Fe para o crescimento celular, reduzindo assim a razão Fe:C, pode ser outra estratégia. No entanto, o mecanismo para tanto é ainda desconhecido, podendo envolver a minimização das vias metabólicas que requerem grandes quantidades de Fe, a substituição de proteínas que utilizam Fe por outras que utilizam metais distintos em sua composição, ou uso mais eficiente das quotas intracelulares de Fe. Por outro lado, durante períodos de alta disponibilidade de Fe, algumas diatomáceas costeiras são capazes de acumular quantidades excedentes de Fe, estocando o micronutriente em proporções de Fe:C 20-30 vezes maiores do que as necessárias para o crescimento máximo (SARTHOU *et al.*, 2005).

Algumas diatomáceas penadas, incluindo espécies de *Pseudo-nitzschia*, contêm ferritina, uma proteína concentradora de Fe que lhes permite armazenar Fe se este recurso estiver disponível apenas intermitentemente (MARCHETTI *et al.*, 2006). Acredita-se que essa proteína esteja associada aos cloroplastos, com a função de controlar a distribuição e armazenamento do Fe, para o bom funcionamento do sistema fotossintético (MARCHETTI *et al.*, 2009). Além dessas estratégias adaptativas, muitas espécies de *Pseudo-nitzschia* supostamente usam o AD como um quelante de metais traços, liberando a toxina na água para permitir, por exemplo, a aquisição de Fe em baixas concentrações (LELONG *et al.*, 2012).

O aumento na produção de AD pode estar relacionado ao estresse ambiental, seguindo o padrão típico para metabólitos secundários sintetizados por outros protistas, fungos e bactérias. Em muitos organismos, a produção de metabólitos secundários é induzida a partir de mudanças na temperatura ou da privação de nutrientes. Desta forma, há um aumento na produção de AD quando o metabolismo primário é limitado pela diminuição dos nutrientes essenciais (PAN *et al.*, 1998).

Conforme estudos conduzidos por Maldonado *et al.* (2002), a produção de AD por *Pseudo-nitzschia* spp. pode ser uma resposta ao estresse causado pela escassez

ou excesso de metais. A presença de AD no meio de cultivo de espécies costeiras de *Pseudo-nitzschia* levou a um aumento nas taxas de absorção de Fe pela microalga, tanto nos cultivos com concentrações limitantes quanto suficientes de Fe. Naqueles experimentos, as espécies toxigênicas de *Pseudo-nitzschia* (*P. multiseriata* e *P. australis*) produziram AD em maiores taxas durante o crescimento exponencial em resposta a concentrações limitantes de Fe ou tóxicas de Cu, sendo que 95% do AD produzido foi expelido para o meio durante a fase exponencial de crescimento da microalga.

Um pouco mais tarde, Wells e colaboradores (2005) basearam-se nos resultados de Maldonado *et al.* (2002) para criar a hipótese de que a adaptação eficiente das células de *Pseudo-nitzschia* a condições limitantes de Fe está relacionada com a produção e excreção do AD, e que a limitação do Fe pode ser o primeiro gatilho para a produção da toxina. Os autores sustentaram que tanto o AD quanto o Cu podem aliviar a limitação do crescimento por Fe para espécies de *Pseudo-nitzschia*. Eles hipotetizaram que as células liberam AD sob baixas concentrações de Fe para, primeiramente, facilitar a aquisição de Cu. O Cu, por sua vez, favorece um sistema de transporte de alta afinidade, que permitiria acessar as moléculas de Fe que estivessem fortemente aderidas a sideróforos, diminuindo assim, a deficiência em Fe no interior das células. Segundo os autores, sob condições limitantes de Fe e Cu, as espécies de *Pseudo-nitzschia* se tornariam mais tóxicas pelo aumento na produção e a subsequente liberação de AD no meio, permitindo, assim, a aquisição das baixas quantidades disponíveis de metais traços (WELLS *et al.*, 2005).

Em suma, ambos os trabalhos, Maldonado *et al.* (2002) e Wells *et al.* (2005), ao interpretarem seus resultados, afirmaram que as células estressadas pela limitação do Fe aumentaram sua produção de AD com a finalidade de aliviar essa deficiência nutricional. No entanto, no trabalho de Bates e colaboradores (2001), a produção total de AD por *P. multiseriata* diminuiu mediante limitação de Fe durante a fase estacionária de crescimento. Os níveis de AD celular e as taxas de produção da toxina foram 10 vezes mais baixos em células limitadas por Fe do que em células com Fe suficientes naquela fase, o que foi atribuído a uma redução na capacidade das células limitadas por Fe em absorver nitrogênio. Como o nitrogênio é essencial para biosíntese de AD, qualquer fator que diminua sua aquisição e/ou assimilação, pode afetar a produção de AD (BATES *et al.*, 2001).

Em sua revisão sobre *Pseudo-nitzschia* spp. e AD, Lelong *et al.* (2012) argumentaram sobre a dificuldade em comparar os resultados dos estudos mencionados anteriormente, uma vez que Bates *et al.* (2001) analisaram a fase estacionária e os demais analisaram a fase exponencial de crescimento, o que pode ter influenciado no resultado. Neste sentido, o presente estudo permitiu que a comparação com ambos os trabalhos fosse possível (Tabela 8), uma vez que foram mensuradas as frações intra- e extracelular da toxina em ambas as fases de crescimento. Adicionalmente, o presente estudo se estendeu até a fase de declínio dos cultivos e calculou as taxas diárias de liberação de AD ao longo de toda a curva de crescimento, incorporando, inclusive a taxa de degradação diária no cálculo. Desta forma, a análise de tais variáveis ao longo de toda a curva de crescimento de uma cepa de *P. multiseriis* produtora de quantidades relativamente elevadas de AD, permitiu avaliar de um modo mais completo os efeitos da disponibilidade de Fe sobre o crescimento e a produção de toxina por esta importante diatomácea marinha.

Nossos resultados evidenciaram que, durante a fase exponencial (dia 8), a concentração extracelular e a taxa de liberação de AD foram maiores no tratamento sem adição de Fe (D1) em comparação com os demais tratamentos, mas principalmente com o tratamento Fe-suficiente (S). Isso corroborou os resultados encontrados por Maldonado *et al.* (2002) para *P. multiseriis* e *P. australis* na mesma fase de crescimento, sugerindo que, por meio da liberação de AD para o meio, e do mecanismo hipotético de quelação de metais traço, as células que estavam limitadas por Fe incorporaram o micronutriente eficientemente e puderam desenvolver regularmente suas funções fisiológicas básicas. Durante a fase estacionária (dia 17), as concentrações de AD intra- e extracelular, bem como as taxas de liberação da toxina medidas no presente estudo, foram maiores no tratamento S em comparação com os outros tratamentos, sobretudo com D1, o que corrobora os resultados reportados por Bates *et al.* (2001) para a mesma espécie nesta fase do crescimento. A taxa de liberação de AD por nossa cepa de *P. multiseriis*, por exemplo, foi aproximadamente 30 vezes maior em S relativo à D1, indicando que o AD foi produzido e liberado em maiores quantidades pelas células que não estavam sob estresse nutricional durante esta fase, sugerindo a necessidade de Fe na síntese de AD, conforme postulado por Bates *et al.* (2001).

TABELA 8. COMPARAÇÃO ENTRE O PRESENTE ESTUDO E OUTROS ESTUDOS QUANTO ÀS CONCENTRAÇÕES DE AD PARTICULADO (P), DISSOLVIDO (D) E TOTAL (pg.cél.⁻¹) NOS TRATAMENTOS FE-SUFICIENTE E FE-DEFICIENTE, NAS DIFERENTES FASES DA CURVA DE CRESCIMENTO (EXPONENCIAL, ESTACIONÁRIA E DECLÍNIO).

	Fe-deficiente			Fe-suficiente		
	(0 – 1,7 nmol.L⁻¹)			(120 – 11.700 nmol.L⁻¹)		
Fase exponencial	P	D	T	P	D	T
Maldonado <i>et al.</i> (2001)	0,07	1,8		0,03	0,21	
Presente estudo	0,06	0,81–1,8		0,20	0,55	
Fase estacionária						
Bates <i>et al.</i> (2002)	4,0		6×10 ³	14–18		18–22×10 ⁵
Presente estudo	0,26	1,95–25,8		0,45	91,3	
Fase de declínio						
Presente estudo	0,84–1,21	4,56–18,6		2,07	6,83	

As concentrações intra- e extracelulares de AD aumentaram a partir do dia 17 no presente experimento, quando as densidades celulares já estavam diminuindo. Estudos anteriores indicaram que há, para a maioria das espécies produtoras de AD, uma relação inversamente proporcional entre a síntese da toxina e a taxa de crescimento. Por exemplo, para *P. multiseriis*, os níveis intracelulares de AD aumentam à medida que o crescimento diminui, quando as células se aproximam da fase estacionária (PAN *et al.*, 1998; presente estudo). Assim, células em fase estacionária de crescimento produzem maiores quantidades de AD, independentemente da limitação por Fe, em comparação com células em fase exponencial de crescimento (LELONG *et al.*, 2012). Desta forma, os resultados do presente estudo suportaram de forma contundente um aumento significativo na produção ($p = 2,2 \times 10^{-16}$) e liberação ($p = 5,35 \times 10^{-9}$) de AD ao longo do tempo em cultivo estático.

Ao longo da fase de declínio no crescimento celular (dia 30), houve um aumento na concentração intracelular de AD em todos os tratamentos testados, sugerindo que

AD ainda estava sendo produzido neste período, apesar da limitação por Fe. No entanto, naquele momento, as concentrações extracelulares foram diferentes entre os tratamentos, mas principalmente para o tratamento D1, que apresentou concentrações aproximadamente 3 vezes maiores em comparação com o tratamento S. Esse resultado sugere, novamente, que o AD pode ter sido liberado ao meio com a finalidade de quelar Fe. Considerando o que foi observado durante as fases de crescimento exponencial, estacionário e de declínio, o mecanismo que leva a um aumento na produção e liberação de AD parece ser ativado no momento em que o Fe, que estava estocado dentro das células, se esgota. Dessa forma, *P. multiseriis* libera AD para absorver o Fe e, assim, consegue realizar suas funções fisiológicas basais.

Assim sendo, os resultados do presente estudo evidenciam, ao mesmo tempo, que o Fe é de suma importância para a síntese de AD e que a liberação deste composto pode estar relacionada com um aumento nas taxas de absorção do micronutriente quando este se encontra escasso no interior das células. As células estressadas pela limitação de Fe podem, então, aumentar a produção de AD com a finalidade de aliviar essa limitação (RUE & BRULAND, 2001; MALDONADO *et al.*, 2002; WELLS *et al.*, 2005; presente estudo). Acredita-se, ainda, que menores quantidades de AD são liberadas pelas células quando estas são capazes de satisfazer suas demandas por Fe por acessar o que havia sido quelado anteriormente ao AD.

Dentre as variadas teorias que buscam explicar o papel fisiológico do AD e os fatores ambientais que podem influenciar na sua produção pela diatomácea marinha *Pseudo-nitzschia* spp., neste trabalho conclui-se que o AD pode estar de fato envolvido em mais um mecanismo eficiente que possibilita essas espécies a sobrevivência sob condições limitantes de Fe.

Desde a caracterização inicial do AD como um potencial problema para a saúde humana, como agente causador da síndrome amnésica (ASP) em Price Edward Island, Canadá em 1987 (BATES *et al.*, 1989), até o presente estudo, aproximadamente 50 espécies de *Pseudo-nitzschia* foram descritas (LASSUS *et al.*, 2016). Muitos pesquisadores acreditam que todas as espécies de *Pseudo-nitzschia* se mostrarão toxigênicas sob condições ambientais específicas e mediante o emprego de ferramentas analíticas adequadas, mas talvez não em níveis suficientemente

grandes para gerar toxicidade a níveis tróficos mais elevados (WELLS *et al.*, 2005). Além do mais, grande parte das espécies potencialmente tóxicas apresentam uma distribuição cosmopolita, tais como *P. pungens*, *P. fraudulenta*, *P. australis* e *P. multiseriis* (HASLE, 2002) e, como revisado por Trainer e colaboradores (2012), eventos tóxicos associados com essas espécies têm sido observados em muitas áreas costeiras do mundo. Sendo assim, a compreensão dos fatores que possam influenciar no crescimento de espécies tóxicas e na produção de toxinas pelas mesmas é de suma importância para a prevenção e mitigação dos impactos, tanto sócio-econômicos quanto ecológicos, que essas microalgas possam causar durante eventuais eventos intensos de floração, como ocorrido recentemente na costa oeste dos EUA (MCCABE *et al.*, 2016).

CONCLUSÃO

- A densidade celular e a taxa de crescimento exponencial de *P. multiseriis* não variaram significativamente entre os tratamentos *Fe-suficiente* e *Fe-deficiente*, sugerindo que essa espécie possui uma adaptação eficiente à limitação por ferro;
- As concentrações intracelulares de AD foram sempre maiores no tratamento *Fe-suficiente* em comparação com os demais, provavelmente devido à baixa capacidade para produzir grandes quantidades de AD nas concentrações limitantes, uma vez que o Fe é necessário para a síntese da toxina;
- As concentrações extracelulares da toxina variaram entre os tratamentos *Fe-suficiente* e *Fe-deficiente* ao longo da duração do experimento. Tal oscilação evidencia que a liberação de AD no meio pode estar associada a um aumento nas taxas de absorção do Fe quando este encontra-se escasso no interior das células. Da mesma forma, uma diminuição nas taxas de liberação pode refletir períodos em que as células já teriam adquirido Fe suficiente, aliviando os efeitos de sua limitação;
- A diatomácea não-tóxica *Bacillaria* sp. atingiu taxas de crescimento similares às de *P. multiseriis*, exceto no tratamento com adição da fração dissolvida do cultivo de *P. multiseriis*, onde foram medidas as menores densidades celulares e concentrações de clorofila-a em comparação com os demais tratamentos. Isso indica que o crescimento de *Bacillaria* sp. pode ter sido inibido pela redução da biodisponibilidade de Fe ou por um efeito alelopático do AD e/ou de algum outro composto nocivo produzido por *P. multiseriis*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, A. L.; DOUCETTE, T. A.; JAMES, R.; RYAN, C. L. Persistent changes in learning and memory in rats following neonatal treatment with domoic acid. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 4-5, p. 505–12, 2009.

ANDERSON, D. M. The ecology and oceanography of harmful algal blooms multidisciplinary approaches to research and management. Paris: **UNESCO**, 2005.

ANDERSON, M. A.; MOREL, F. M. M. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Limnology and Oceanography**, v. 27, p. 789–813, 1982.

ARAR, E. J. & COLLINS G. B. Method 445.0 In Vitro Determination of Chlorophyll a and Pheophytin a in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence. U. S. Environmental Protection Agency. National Exposure Research Laboratory. Cincinnati, Ohio. 1997.

ARMBRUST, E. V. The life of diatoms in the world's oceans. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 185–192, 2009.

BATES, S.S.; BIRD, C.J.; DE FREITAS, A.S.W.; *et al.* Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.46, p. 1203– 1215, 1989.

BATES, S.S., BIRD, C.J., FREITAS, A.S.W., FOXALL, R., *et al.* Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 46: 1203-1215. 1989.

BATES, S. .; FREITAS, A. S. W. DE; MILLEY, J. E.; *et al.* Controls on Domoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia pungens f. multiseriis* in Culture: Nutrients and Irradiance. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, p. 1136–1144, 1991.

BATES, S.S., GARRISON, D.L., HORNER. R.A., Bloom Dynamics and Physiology of Domoic acid Producing *Pseudo-nitzschia* In: ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.M. (Eds.). **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. p. 266-292, 1998.

BATES, S. S.; LÉGER, C.; SATCHWELL, M.; BOYER, G. L. The effects of iron on Domoic Acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriis*. **Harmful Algal Blooms**, p. 320–323, 2001.

BELTRÁN, A. S.; PALAFOX-URIBE, M.; GRAJALES-MONTIEL, J.; CRUZ-VILLACORTA, A.; OCHOA, J. L. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 447–453, 1997.

BOUILLON, R.-C.; KIEBER, R. J.; SKRABAL, S. A.; WRIGHT, J. L. C. Photochemistry and identification of photodegradation products of the marine toxin domoic acid. **Marine Chemistry**, v. 110, n. 1-2, p. 18–27, 2008.

BRAND, E.; SUNDA, G.; CAROLINA, N.; ROBERT, R. L. G. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. **Limnology and Oceanography**, v. 28, n. 6, p. 1182–1198, 1983.

CARUANA, A.; HERVÉ, F.; RAIMBAULT, V.; AYACHA, N.; LHAUTE, K.; MÉLÉDER, V.; MARTIN-JÉZÉQUEL, Z. A. Experimental effects of changing photoperiod on the physiology and toxicity of *Pseudo-nitzschia*. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 17, 2016, Florianópolis, **Resumo**. p. 81. Disponível em: <<http://www.icha2016.com/program/>>. Acesso em: 9 nov.2016.

CASTRO, N. O. DE; MOSER, G. A. D. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 235–264, 2012.

CAVALCANTE, K. P. **Taxonomia da diatomácea potencialmente tóxica *Pseudo-nitzschia Peragallo* (Bacillariophyceae) em áreas de maricultura de Santa Catarina**. 71 f. Dissertação (Pós-Graduação em Botânica). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

CLAYDEN, J.; READ, B.; HEBDITCH, K. R. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. **Tetrahedron**, v. 61, n. 24, p. 5713–5724, 2005.

COALE, K. H.; JOHNSON, K. S.; FITZWATER, S. E.; GORDON, R. M.; AL., E. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. **Nature**, v. 383, p. 495–501, 1996.

COALE, K. H.; JOHNSON, K. S.; CHAVEZ, F. P.; *et al.* Southern Ocean iron enrichment experiment: carbon cycling in high- and low-Si waters. **Science**, v. 304, n. 5669, p. 408–414, 2004.

COPERNIC, P. N.; CANADA, O.; CENTRE, G. F. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. **Phycologia**, v. 51, n. March, p. 168–216, 2012.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; FAUSTMAN, E. M. Domoic acid as a developmental neurotoxin. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 409–23, 2010.

FERNANDES, L. F.; BRANDINI, F. P. Diatom associations in shelf waters off Paraná state. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 1, p. 19–34, 2004.

FERNANDES, L. F.; BRANDINI, F. P. The potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the Paraná and Santa Catarina States, Southern Brazil. **IHERINGIA, Série Botânica**, v. 65, p. 47–62, 2010.

FERNANDES, L. F.; CAVALCANTE, K. P.; PROENÇA, L. A. D. O.; SCHRAMM, M. A. Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *P. calliantha*, and associated

domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast. **Diatom Research**, v. 28, n. 4, p. 381–393, 2013.

FUENTES, M. S.; WIKFORS, G. H. Control of domoic acid toxin expression in *Pseudo-nitzschia* multiserries by copper and silica: Relevance to mussel aquaculture in New England (USA). **Marine Environmental Research**, v. 83, p. 23–28, 2013.

GARCIA, N. S.; FU, F.; SEDWICK, P. N.; HUTCHINS, D. A. Iron deficiency increases growth and nitrogen-fixation rates of phosphorus-deficient marine cyanobacteria. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.

GILBERT, P. M.; ANDERSON, D. M.; GENTIEN, P.; GRANÉLI, E.; SELLNER, K. G. The Global, Complex Phenomena of Harmful Algal Blooms. **Oceanography**, v. 18, n. 2, p. 136–147, 2005.

GODINHO, L; SILVA, A.; BRANCO, M.A.C; MARQUES, A.; COSTA, P.R. Characterization of growth, and intracellular and extracellular domoic acid content in cultures of *Pseudo-nitzschia multiserries*, *P. fraudulenta* and *P. pungens var. aveirensis*, at different light conditions. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 17, 2016, Florianópolis, **Resumo**. p. 140. Disponível em: <<http://www.icha2016.com/program/>>. Acesso em: 9 nov.2016.

GRANÉLI, E.; JOHANSSON, N. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. **Harmful Algae**, v. 2, n. 2, p. 135–145, 2003.

GRANÉLI, E.; WEBERG, M.; SALOMON, P. S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. **Harmful Algae**, v. 8, n. 1, p. 94–102, 2008.

GUILLARD, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum Press, p. 26-60.

GUIMARÃES, S. P.; RÖRIG, L. R. Dinoflagelados *Prorocentrum Micans Ehrenberg e Prorocentrum CF. Obtusum Ostenfeld* isolados da costa catarinense - Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n. 54, p. 29–36, 2004.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. Manual of harmful marine microalgae. No 33. ed.2 Nova Scotia, Canadá: **IOC Manual and Guides UNESCO**, 1995.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. **Manual of Harmful Marine Microalgae. UNESCO**, 2003.

HASLE, G. R. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, n. 30, p. 1036–1039, 1994.

HASLE, G. R. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? **Harmful Algae**, v. 1, n. 2, p. 137–146, 2002.

HU, W.; XU, J.; SINKKONEN, J.; WU, J. Polyketides from Marine Dinoflagellates of the Genus *Prorocentrum*, Biosynthetic Origin and Bioactivity of Their Okadaic Acid Analogues. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 51–61, 2010.

JEFFERY, B.; BARLOW, T.; MOIZER, K.; PAUL, S.; BOYLE, C. Amnesic shellfish poison. **Food and chemical toxicology**, v. 42, n. 4, p. 545–57, 2004.

KODAMA, M.; DOUCETTE, G. J. & GREEN, D. H. Relationship between bacteria and harmful algal. p. 243-255. In: GRANÉLI, E.; TURNER, J. T. **Ecology of Harmful Algae**. P. 243- 255 2007.

KUMAR, K. P.; KUMAR, S. .; NAIR, G. A. Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 3, p. 319–325, 2009.

LALLI, C. M.; PARSON, T. R. Biological Oceanography an Introduction. Second ed.1997.

LEFEBVRE, K. A.; SILVER, M. W.; COALE, S. L.; TJEERDEMA, R. S. Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 625–631, 2002.

LEFEBVRE, K. A; ROBERTSON, A. Domoic acid and human exposure risks: a review. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 2, p. 218–30, 2010. Elsevier Ltd.

LELONG, A.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P. Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-nitzschia multiseries*, a toxic diatom. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 969–981, 2011.

LELONG, A.; JOLLEY, D. F.; SOUDANT, P.; HÉGARET, H. Impact of copper exposure on *Pseudo-nitzschia* spp. physiology and domoic acid production. **Aquatic Toxicology**, v. 118-119, p. 37–47, 2012.

LÓPEZ-ROSALES, L.; GALLARDO-RODRÍGUEZ, J. J.; SÁNCHEZ-MIRÓN, A.; *et al.* Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 229–253, 2013.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa,. 606 pg. 2006.

LUNDHOLM, N.; HANSEN, P. J.; KOTAKI, Y. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 273, n. Bates 1998, p. 1–15, 2004.

LUNDHOLM, N.; LUNDHOLM, N.; HANSEN, P. J.; KOTAKI, Y. Lack of allelopathic effects of the domoic acid- producing marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 288, n. March, p. 21–33, 2005.

MCCABE, R. M.; HICKEY, B. M.; KUDELA, R. M.; *et al.* An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions. **Geophysical Research Letters**, p. 366–376, 2016.

MAFRA, L. L. Microalgas nocivas e ficotoxinas no complexo estuarino de Paranaguá, PR: Subsídios para o monitoramento. 171 f. **Dissertação** (Pós-Graduação em Botânica). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAFRA, L. L.; FERNANDES, L. F.; PROENÇA, L. A. O. Harmful algae and toxins in Paranaguá Bay, Brazil: bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, p. 107–121, 2006.

MAFRA, L. L.; LÉGER, C.; BATES, S. S.; QUILLIAM, M. A. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 32, p. 6003–11, 2009.

MAFRA, L. L.; BRICELJ, V. M.; FENNEL, K. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 100, n. 1, p. 17–29, 2010a.

MAFRA, L. L.; BRICELJ, V. M.; OUELLETTE, C.; BATES, S. S. Feeding mechanics as the basis for differential uptake of the neurotoxin domoic acid by oysters, *Crassostrea virginica*, and mussels, *Mytilus edulis*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 97, n. 2, p. 160–71, 2010b.

MALDONADO, M. T.; HUGHES, M. P.; RUE, E. L.; WELLS, M. L. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. **Limnology and Oceanography**, v. 47, n. 2, p. 515–526, 2002.

MARCHETTI, A.; MALDONADO, M. T.; LANE, E. S.; HARRISON, P. J. Iron requirements of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia*: Comparison of oceanic (high-nitrate, low-chlorophyll waters) and coastal species. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 5, p. 2092–2101, 2006.

MARCHETTI, A.; PARKER, M. S.; MOCCIA, L. P.; *et al.* Ferritin is used for iron storage in bloom-forming marine pennate diatoms. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 467–70, 2009.

MARTIN, J. H.; COALE, K. H.; JOHNSON, K. S.; *et al.* Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. **Nature**, v. 371, p. 123–129, 1994.

MEERSSCHE, E.V.; PINCKNEY, J.; GREENFIELD, D.; BENITEZ-NELSON, C. Initiation, maintenance and dissipation of a toxic bloom of *Dinophysis acuminata* and *Pseudo-nitzschia australis*: a comparison of the ria of Arousa and ria of Pontevedra. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 17, 2016, Florianópolis, **Resumo**. p. 100. Disponível em: <<http://www.icha2016.com/program/>>. Acesso em: 9 nov.2016.

MOS, L. Domoic acid: a fascinating marine toxin. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 79–85, 2001.

MURAKAMI, Y.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 48, n. 1, p. 69–72, 1982.

NAGAHAMA, Y.; MURRAY, S.; TOMARU, A.; FUKUYO, Y. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 1, p. 178–189, 2011.

NASCIMENTO, S. M.; SALGUEIRO, F.; MENEZES, M.; *et al.* *Prorocentrum lima* from the South Atlantic: Morphological, molecular and toxicological characterization. **Harmful Algae**, v. 57, p. 39–48, 2016.

PAN, Y.; SUBBA RAO, D. V.; MANN, K. H.; BROWN, R. G.; POCKLINGTON, R. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. **Marine Ecology Progress Series**, v. 131, n. 1991, p. 225–233, 1996.

PAN, Y.; BATES, S. S.; CEMBELLA, A. D. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. **Natural toxins**, v. 6, n. 3-4, p. 127–135, 1998.

PAZ, B.; VÁZQUEZ, J. A.; RIOBÓ, P.; FRANCO, J. M. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. 4, p. 286–300, 2006.

PAZOS, Y.; ARÉVALO, F.; CORREA, J.; SALGADO, C. The allelopathic effects of domoic acid on natural phytoplankton community composition In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 17, 2016, Florianópolis, **Resumo**. p. 16. Disponível em: <<http://www.icha2016.com/program/>>. Acesso em: 9 nov.2016.

PRICE, N. M.; HARRISON, G. I.; HERING, J. G.; *et al.* Preparation and Chemistry of the Artificial Algal Culture Medium Aquil. **Biological Oceanography**, v. 6, p. 443–461, 1989.

PRINCE, E. K.; POULSON, K. L.; MYERS, T. L.; SIEG, R. D.; KUBANEK, J. Characterization of allelopathic compounds from the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. **Harmful Algae**, v. 10, n. 1, p. 39–48, 2010.

PRINCE, E. K.; IRMER, F.; POHNERT, G. Domoic Acid Improves the Competitive Ability of *Pseudo-nitzschia delicatissima* against the Diatom *Skeletonema marinoi*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2398–2412, 2013.

PROENÇA, L. A. O.; SCHMITT, F.; GUIMARÃES, S. P.; RÖRIG, L. R. Análise de toxinas diarreicas em duas espécies de *Prorocentrum* (DINOPHYCEAE) isoladas em área de cultivo de moluscos. **Notas Técnicas da Facimar**, v. 3, p. 41–45, 1999.

PROENÇA, L. A. O. & MAFRA JR., L. L. Ocorrência de ficotoxinas na costa brasileira. In: **Reunião Brasileira de Ficologia, X. 2004**. Anais. (Série Livros do Museu Nacional; 10). Rio de Janeiro, Museu Nacional. p. 57-77, 2005.

RAVEN, J. A. Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway. **New Phytol.**, v. 116, p. 1–18, 1990.

RUE, E.; BRULAND, K. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. **Marine Chemistry**, v. 76, n. 1-2, p. 127–134, 2001.

SARTHOU, G.; TIMMERMANS, K. R.; BLAIN, S.; TRÉGUER, P. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review. **Journal of Sea Research**, v. 53, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 25–42, 2005.

SCHMID, A. M. M. The “paradox” diatom *Bacillaria paxillifer* (bacillariophyta) revisited. **Journal of Phycology**, v. 43, n. 1, p. 139–155, 2007.

SILVER, M. W.; BARGU, S.; COALE, S. L.; *et al.* Toxic diatoms and domoic acid in natural and iron enriched waters of the oceanic Pacific. **Proceedings of the National Academy of Sciences (pnas)**, v. 107, p. 20762–20767, 2010.

TRAINER, V. L.; BATES, S. S.; LUNDHOLM, N.; *et al.* *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. **Harmful Algae**, v. 14, p. 271–300, 2012.

VAN DOLAH, F. M. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 133–41, 2000.

XU, N.; TANG, Y. Z.; QIN, J.; DUAN, S.; GOBLER, C. J. Ability of the marine diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pungens* to inhibit the growth of co-occurring phytoplankton via allelopathy. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 74, n. 1, p. 29–41, 2015.

WELLS, M. L.; TRICK, C. G.; COCHLAN, W. P.; HUGHES, M. P.; TRAINER, V. L. Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 6, p. 1908–1917, 2005.

WRIGHT, J. L. C.; BOYD, R. K.; FREITAS, A. S. W. DE; *et al.* Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 481–490, 1989.