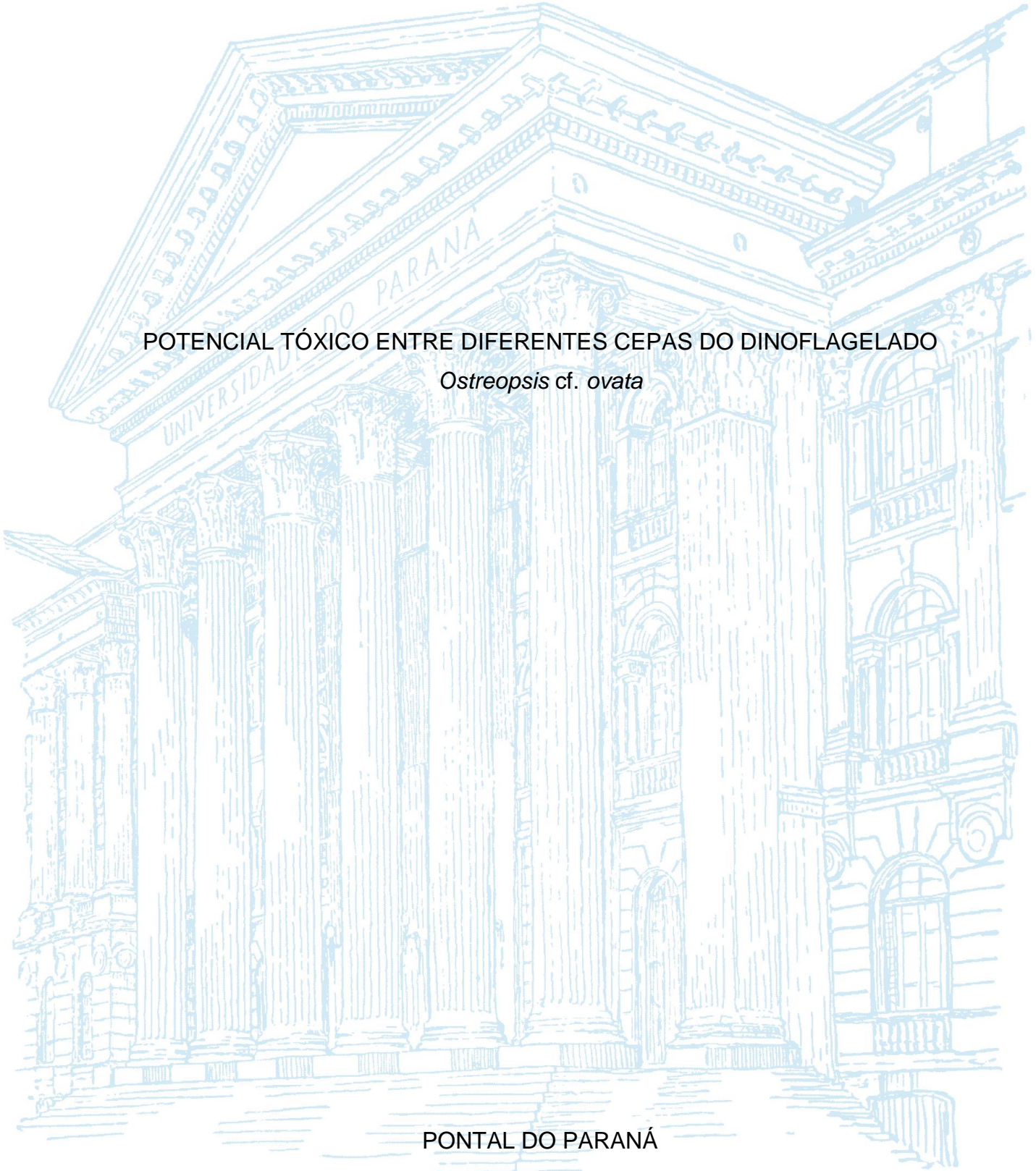


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO COSTA MAGRO

POTENCIAL TÓXICO ENTRE DIFERENTES CEPAS DO DINOFLAGELADO

Ostreopsis cf. ovata



PONTAL DO PARANÁ

2021

LEONARDO COSTA MAGRO

POTENCIAL TÓXICO ENTRE DIFERENTES CEPAS DO DINOFLAGELADO

Ostreopsis cf. ovata

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel no curso de graduação em Oceanografia, Campus Pontal do Paraná, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior.

PONTAL DO PARANÁ

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Leonardo Costa Magro

“POTENCIAL TÓXICO ENTRE DIFERENTES CEPAS DO DINOFLAGELADO *Ostreopsis cf. ovata*”

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

Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior
Prof. Orientador - Centro de Estudos do Mar - UFPR

Profa. Dra. Silvia Pedroso Melegari
Centro de Estudos do Mar - UFPR

MSc. Estela Pires
Doutoranda PGSISCO - Centro de Estudos do Mar - UFPR

Pontal do Paraná, 17 de dezembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **ESTELA PIRES, Usuário Externo**, em 21/12/2021, às 14:04, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/12/2021, às 15:18, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/12/2021, às 17:17, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4120415** e o código CRC **D84B260E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR) e ao Laboratório de Microalgas (LAMIC) por compartilharem a infraestrutura e oportunidades de vivências acadêmicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Laurenço Mafra Jr., por compartilhar seu conhecimento e sua paixão pelas microalgas. Além disso agradeço pela oportunidade de fazer parte do time LAMIC e por me orientar com paciência e maestria nos últimos anos.

Agradeço ao amigo e Dr. Carlos Tibiriçá por ter me dado a oportunidade de aprender sobre os cultivos de microalgas, por confiar os cultivos a mim enquanto estive na França e por ter me apoiado diretamente no trabalho e na criação do protocolo com artêmias.

Agradeço a Dona Isis e a Claudia da secretária que sempre foram solícitas e prestativas ao longo destes anos.

Agradeço também aos meus pais Fátima e Léo por tornarem este sonho possível mesmo distantes.

Por fim agradeço principalmente aos meus companheiros de república Diego Nogueira e Thomaz Boschetto pelas risadas, perrengues, surfes inesquecíveis, remadas e velejadas para Ilha do Mel.

Tenho esperança de que um maior conhecimento do mar, que há milênios dá sabedoria ao homem, inspire mais uma vez os pensamentos e as ações daqueles que preservarão o equilíbrio da natureza e permitirão a conservação da própria vida.

JACQUES COUSTEAU

RESUMO

Florações nocivas de dinoflagelados são eventos recorrentes no ambiente marinho. São caracterizadas pela proliferação rápida destas microalgas, associadas a efeitos prejudiciais ao ambiente e aos organismos que nele vivem. Dentre os dinoflagelados bênticos que produzem compostos neurotóxicos, destacam-se os pertencentes ao gênero *Ostreopsis*, capazes de produzir a palitoxina isobárica (p-PLTX) e substâncias análogas, ovatoxinas (OvTX). Quando presentes em grandes quantidades durante florações, essas toxinas podem ser assimiladas na cadeia trófica, representando riscos para a intoxicação de organismos marinhos, como ouriços-do-mar, e de seres humanos por via respiratória ou alimentar. Os sintomas causados em humanos podem incluir febre, dificuldade respiratória e conjuntivite, no caso de exposição aérea, até distúrbios neurológicos. A espécie *O. cf. ovata* está presente em regiões tropicais e subtropicais do globo, incluindo a costa brasileira. Entretanto, o potencial tóxico da espécie pode variar com a dominância local de subclados genéticos com maior ou menor capacidade de produzir toxinas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico de cepas (i.e. cultivos monoclonais) isoladas de diferentes pontos da costa brasileira e representativas de distintos subclados genéticos do dinoflagelado *Ostreopsis cf. ovata*, conforme determinado em estudo anterior, por meio da exposição de curto prazo ao microcrustáceo *Artemia* sp. em bioensaios controlados em laboratório. O protocolo de exposição foi otimizado seguindo uma série de testes-piloto. A toxicidade de cinco cepas foi avaliada por meio do monitoramento da mortalidade e sobrevivência das artêmias após 1, 3, 6 e 12 horas de exposição a 8 densidades celulares crescentes de cada cepa, comparada a um controle com microalgas não-tóxicas. A cada intervalo de tempo, os valores da concentração de efeito não observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO) e concentração letal a 50% da população (CL₅₀) foram calculados e comparados. A forma e as dimensões celulares não variaram significativamente entre as cepas, cujas células mediram, em média, 36,5-46,9 µm de comprimento por 26,6-36,4 µm de largura (n ≅ 20 células por cepa). As cepas LM-129 (isolada do Paraná) e LM-65 (Rio de Janeiro) foram as mais tóxicas dentre as cinco comparadas, com valores de CENO e CEO idênticos: 28,1 e 56,2 células mL⁻¹ após 6 h, e CEO de 7,0 células mL⁻¹ após 12 h de exposição. Para a cepa LM-129, uma CL₅₀ de 230 células mL⁻¹ foi determinada após 6 h e de 3,3 células mL⁻¹ após 12 h. Para LM-65, os valores estimados de CL₅₀ foram de 215 células mL⁻¹ (6 h) e 4,7 células mL⁻¹ (12 h). A cepa LM-110 (Alagoas) demonstrou baixa toxicidade, causando a mortalidade de um único indivíduo na maior densidade celular testada após 12 horas, enquanto que as cepas LM-106 (Alagoas) e LM-111 (Pernambuco) não provocaram letalidade durante o período de exposição avaliado. O presente estudo demonstra a existência de populações de células morfológicamente similares, mas com potencial tóxico altamente contrastante no litoral brasileiro. Além disso, contribui com a descrição de um protocolo simples e barato para avaliar o risco associado à toxicidade de populações deste dinoflagelado em locais onde ferramentas analíticas mais sofisticadas não estão disponíveis.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Ficotoxinas, *Artemia* sp., Palytoxinas, Ovatoxinas.

ABSTRACT

Harmful blooms of dinoflagellates are recurrent events in marine environments. They are characterized by the rapid proliferation of microalgal cells, associated with a harmful effect to the environment and/or to marine organisms. Among the benthic dinoflagellates that produce potent neurotoxic compounds, those belonging to the genus *Ostreopsis* are capable of producing isobaric palytoxin (p-PLTX) and ovatoxin analogues (OvTX). When available in large quantities during blooms, these toxins can be assimilated by the organisms and enter the trophic chain, representing risks for the intoxication of marine organisms, such as sea urchins, and of human beings via the respiratory or alimentary route. Symptoms caused in humans may include fever, difficulty of breathing and conjunctivitis, in the case of air exposure, or even neurological disorders. The species *O. cf. ovata* is present in tropical and subtropical regions of the globe, including the Brazilian coast. However, the toxic potential of the species vary substantially according to the local dominance of genetic subclades exhibiting greater or lesser capacity to produce toxins. Therefore, the objective of this study was to evaluate the toxic potential of strains (i.e. monoclonal cultures) isolated from different sites along the Brazilian coast and representative of distinct genetic subclades of the dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*, as determined in a previous study, through short-term exposure to the microcrustacean *Artemia* sp. in laboratory-controlled bioassays. The exposure protocol was optimized following a series of pilot tests. The toxicity of five strains was evaluated by monitoring the mortality and survival of brine shrimps after 1, 3, 6 and 12 hours of exposure to 8 increasing cell densities of each strain, compared to a control composed of non-toxic microalgae. At each time interval, the values of non-observed effect concentration (CENO), observed effect concentration (CEO) and lethal concentration to 50% of the population (CL₅₀) were calculated and compared. Cell shape and dimensions did not vary significantly between strains, whose cells measured, on average 36.5-46.9 µm in length by 26.6-36.4 µm in width (n ≅ 20 cells per strain). The strains LM-129 (isolated from Paraná) and LM-65 (Rio de Janeiro) were the most toxic among the five tested, yielding identical CENO and CEO values: 28.1 and 56.2 cells mL⁻¹ after 6 h, and a CEO of 7.0 cells mL⁻¹ after 12-h exposure. Strain LM-129 resulted in a CL₅₀ of 230 cells mL⁻¹ after 6 h and 3.3 cells mL⁻¹ after 12 h. For LM-65, the estimated CL₅₀ values were 215 cells mL⁻¹ (6 h) and 4.7 cells mL⁻¹ (12 h). Strain LM-110 (Alagoas) caused low toxicity, leading to the death of a single individual at the highest cell density tested after 12 hours, while strains LM-106 (Alagoas) and LM-111 (Pernambuco) did not cause any lethality during the evaluated exposure period. The present study demonstrates the existence of morphologically similar cell populations with highly contrasting toxic potential along the Brazilian coast. Furthermore, it contributes with the description of a simple and inexpensive protocol to assess the risk associated with the toxicity of populations of this dinoflagellate in places where more sophisticated analytical tools are not available.

Keywords: Ecotoxicology, Phycotoxins, *Artemia* sp., Palytoxins, Ovatoxins.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – DENSIDADE CELULAR X PERCENTUAL DE ORGANISMOS AFETADOS DURANTE 6 HORAS DE EXPOSIÇÃO À CEPA LM-101 DURANTE O TESTE PRELIMINAR 1.....	29
GRÁFICO 2 – PERCENTUAL DE MORTALIDADE DE <i>Artemia</i> sp. EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (CEPA LM-65).....	31
GRÁFICO 3 – PERCENTUAL DE MORTALIDADE DE <i>Artemia</i> sp. EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (CEPA LM-129). PERCENTUAL DE MORTALIDADE POR TRATAMENTO EM 3H, 6H e 12H.....	32
GRÁFICO 4 – CURVAS DE MORTALIDADE DE <i>Artemia</i> sp. EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (CEPA LM-65). PERCENTUAL DE MORTALIDADE EM 3H, 6H e 12H.....	33
GRÁFICO 5 – CURVAS DE MORTALIDADE DE <i>Artemia</i> sp. EXPOSTA POR 3, 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (CEPA LM-129).	34

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – CULTIVOS MONOCLONAIS DE *Ostreopsis cf. ovata*.....20
- FIGURA 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE VÁRIAS CEPAS DE *Ostreopsis cf. ovata*, JUNTAMENTE COM DADOS DE TOXINA. AS BARRAS HORIZONTAIS EXPRESSAM OS NIVEIS DE OVATOXINA (OvTX) EM PG CELL⁻¹ E AS CEPAS COM TEORES DE TOXINA ABAIXO DO LIMITE DE DETECÇÃO ANALÍTICA FORAM INDICADOS POR “<LOD”21
- FIGURA 3 – CULTIVO MONOCLONAL *Tetraselmis sp.* MANTIDO EM MEIO F/2 EM GARRAFA DE 2 L.....22
- FIGURA 4 – PLACA DE CULTIVO CÉLULAR 12 POÇOS COM INDIVÍDUOS ADULTOS DISPOSTOS EM CADA UNIDADE EXPERIMENTAL.....23
- FIGURA 5 – MENSURAÇÃO DAS DIMENSÕES DAS CEPAS DE *Ostreopsis cf. ovata* SOB MICROSCOPIO ÓPTICO A 100x DE AUMENTO.....26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COORDENADAS GEOGRÁFICAS DOS LOCAIS DE ORIGEM DAS CEPAS UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	22
TABELA 2 – TAXAS DE MORTALIDADE (%) x TEMPO DE EXPOSIÇÃO PARA INDIVÍDUOS DE <i>Artemia</i> sp. EXPOSTOS A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (CEPA LM-129) NO TESTE- PILOTO 2.....	30
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO (CENO) E CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO (CEO) PARA <i>Artemia</i> sp. EXPOSTA POR 3, 6 OU 12 HORAS A DIFERENTES CEPAS DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i> . CONCENTRAÇÃO DO EFEITO NÃO OBSERVADO EM 6 E 12 H.....	32
TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO LETAL PARA 50% DA POPULAÇÃO (CL50) APÓS 3, 6 OU 12 HORAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CEPAS DE <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 CULTIVOS DE MICROALGAS.....	20
2.2 CULTIVO DE <i>ARTEMIA SP.</i>	22
2.3 TESTES DE TOXICIDADE.....	23
2.3.1 Testes – Piloto.....	24
2.3.1.1 <i>Protocolo 1</i>	24
2.3.1.2 <i>Protocolo 2</i>	24
2.3.2 Aplicação do protocolo experimental otimizado	24
2.3.2.1 <i>Preparação dos testes</i>	24
2.3.2.2 <i>Aclimação</i>	25
2.3.2.3 <i>Avaliação da toxicidade de diferentes cepas de <i>Ostreopsis cf. ovata</i></i>	25
2.3.3 Análise dos dados	27
3 RESULTADOS	28
3.1 BATERIA DE TESTES-PILOTO.....	28
3.1.1 <i>Protocolo 1</i>	28
3.1.2 <i>Protocolo 2</i>	29
3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CEPAS DE <i>OSTREOPSIS CF. OVATA</i>	30
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÕES	40
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO 1 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	45

1 INTRODUÇÃO

As florações de dinoflagelados (Chromista, Dinophyceae) bênticos têm representado um fenômeno global recorrente nas últimas décadas. O aumento da temperatura em águas oligotróficas favorece o crescimento destes organismos, que se tornam dominantes em temperaturas acima de 25°C e em água rasas bem iluminadas (MORTON;NORRIS;BOMBER, 1992). Essas temperaturas são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais, principalmente no verão (PARSONS *et. al.*, 2012), quando a abundância de determinadas espécies pode aumentar abruptamente, formando as chamadas florações. Tal fenômeno pode se tornar visualmente perceptível por meio do acúmulo de células e mucilagem sobre os substratos, ou ainda causar descoloração da água quando grandes quantidades de células se desprendem e se mantêm em suspensão na coluna d'água (PARSONS *et. al.*, 2012).

Muitas espécies de dinoflagelados bênticos que formam florações são capazes de produzir compostos, sobretudo neurotoxinas, com potencial extremamente tóxico (FAUST; GULLEDGE, 2002). Quando as espécies tóxicas atingem elevadas abundâncias celulares, a assimilação da toxina na cadeia trófica pode ser muito rápida. Os organismos consumidores podem acumular níveis elevados de toxinas, representando sérios riscos para os organismos marinhos e para a saúde humana, e podendo gerar imensos prejuízos econômicos. Ao consumir pescados contaminados com toxinas de dinoflagelados, os seres humanos podem apresentar desde problemas gastrointestinais até distúrbios neurológicos permanentes (FAUST; GULLEDGE, 2002). Além disso, alguns compostos potentes podem também ser transportados pelo aerossol marinho, gerando intoxicação por via aérea manifestada principalmente sob a forma de desconforto respiratório, como no caso de florações tóxicas do gênero *Ostreopsis* (SANSONI *et. al.*, 2003). Estes eventos prejudicam direta ou indiretamente os organismos marinhos e podem afetar a saúde humana pelo contato com o aerossol marinho ou, potencialmente, pela ingestão de organismos contaminados (MOORE; PAUL, 1971; BRISSARD *et. al.*, 2014).

Um evento de floração massiva de *Ostreopsis cf. ovata* foi detectado na costa italiana em 2005, levando centenas de pessoas a procurarem atendimento médico, sendo que vinte dos casos necessitaram de internação. Os pacientes

apresentavam febre, dificuldades respiratórias e em alguns casos conjuntivite (CIMINIELLO, *et. al.*, 2006). À medida que os métodos de extração e determinação analítica das toxinas foram sendo aperfeiçoados, permitiram a identificação de um novo composto análogo à palitoxina a partir de células de *O. cf. ovata* oriundas do Mediterrâneo, que foi chamado de ovatoxina-a (OvTX-a) (CIMINIELLO *et. al.*, 2008). Em 2012, novos estudos descreveram mais quatro tipos moleculares de ovatoxinas em cepas (i.e., cultivos monoclonais) de *O. cf. ovata* provenientes do Mediterrâneo, sendo denominadas OvTX-b, -c, -d e -e. A OvTX-a tem sido o composto mais abundante em todas as cepas examinadas de *O. cf. ovata*, enquanto a concentração das demais OvTX pode variar bastante ou ser indetectável em algumas cepas (CIMINIELLO, *et. al.*, 2012; TIBIRIÇÁ *et. al.*, 2019).

No Brasil, as florações de *Ostreopsis cf. ovata* têm ocorrido desde 1998 no estado do Rio de Janeiro (FERREIRA, 2006). Em períodos de alta densidade celular, registrou-se a mortalidade massiva de ouriços-do-mar (FERREIRA, 2006), assim como foi reportado na Nova Zelândia mais tarde (SHEARS; ROSS, 2009). Além disso, em 2008, na Bahia, foram registrados casos de intoxicação em seres humanos muito parecidos com aqueles descritos durante florações de *Ostreopsis cf. ovata* no Mar Mediterrâneo (PROENÇA *et. al.*, 2010). Em 2017 e 2018, no litoral do Paraná, foi reportada a presença de *Ostreopsis cf. ovata* em elevada abundância celular, bem como de ovatoxinas acumuladas em organismos marinhos (TIBIRIÇÁ *et. al.*, 2019). Entretanto, a composição molecular e o potencial tóxico de *Ostreopsis cf. ovata* podem variar bastante geograficamente, de modo que cepas isoladas do Mar Mediterrâneo e do Oceano Atlântico parecem ter, em geral, um potencial tóxico mais elevado do que aquelas originárias do Índico e do Pacífico (PENNA *et. al.*, 2010). Embora a presença de *O. cf. ovata* tenha sido detectada na maior parte da costa brasileira, as populações locais representam dois subclados genéticos distintos, com perfis de toxinas bastante contrastantes. Como resultado, células morfológicamente idênticas podem conter níveis elevados de toxinas, ou em outros casos, níveis baixíssimos ou virtualmente nulos (TIBIRIÇÁ, 2020).

Este estudo avaliou o potencial tóxico de cepas (i. e., cultivos monoclonais) pertencentes a distintos subclados genéticos do dinoflagelado *O. cf. ovata*, coletadas ao longo da costa brasileira, mediante à exposição de curto prazo ao microcrustáceo *Artemia* sp. em bioensaios controlados em laboratório. Por meio do monitoramento da mortalidade e sobrevivência usando um protocolo laboratorial otimizado no

presente estudo, os valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observado (CEO) e Concentração Letal a 50% da população (CL₅₀) foram calculados e comparados. Desta forma, a relação entre a toxicidade da alga e a concentração de p-PLTX e OvTX podê ser estabelecida, e o risco potencial associado a cepas isoladas de diferentes regiões do litoral brasileiro pode ser avaliado.

1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores desenvolvido no Laboratório de Microalgas (LAMIC) do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná (CEM/UFPR) empregaram a técnica analítica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para revelar diferenças substanciais no perfil (composição) e concentração de toxinas produzidas por diferentes cepas de *O. cf ovata* coletadas ao longo da costa brasileira. Além disso, usando-se sequenciamento genético e análises filogenéticas, demonstrou-se que tal variação é consistente com o agrupamento das cepas em distintos subclados genéticos (TIBIRIÇÁ, 2020).

Portanto, uma vez que as células de cepas pouco ou muito tóxicas podem ser morfológicamente similares, a simples presença de *O. cf. ovata* – ou mesmo sua abundância – não serve como embasamento para caracterizar o risco potencial associado em uma região, em um dado momento. Neste caso, o desenvolvimento de um protocolo mais rápido e barato para se avaliar diretamente o potencial tóxico de diferentes cepas/populações torna-se necessário, sobretudo em situações em que técnicas analíticas mais complexas e caras (como sequenciamento genético e LC-MS/MS) não estão disponíveis. Para tanto, é necessário um protocolo sensível, confiável e reproduzível, que permita a comparação e a diferenciação dos subclados genéticos através dos seus efeitos letais e sub letais sobre modelos biológicos, incluindo organismos-teste, mensurando-se diretamente a manifestação dos efeitos tóxicos ao longo do tempo.

Dentre os organismos testes utilizados em testes de toxicidade com microalgas tóxicas, os microcústáceos da espécie *Artemia salina* se destacam em experimentos de toxicidade por terem um baixo custo financeiro, ciclo de vida curto e por serem herbívoros não seletivos com sensibilidade relativamente alta a toxinas algais (FAIMALI *et. al.*, 2012). Quando saudáveis, indivíduos de *A. salina* são nadadores ativos, de forma que eventuais alterações no padrão de nataçãõ desses organismos

podem indicar efeitos sub letais de algum composto tóxico (GARAVENTA *et. al.*, 2010). *A. salina* tem sido utilizada com sucesso para se avaliar o potencial tóxico de *O. cf ovata* em comparação a outros gêneros de dinoflagelados (NEVES *et. al.*, 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda de *Ostreopsis cf. ovata* sobre indivíduos adultos de *Artemia* sp. sob condições controladas de laboratório.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar e padronizar o protocolo laboratorial, permitindo que os efeitos sejam detectáveis, quantificáveis e que os resultados de múltiplos ensaios sejam comparáveis;
- Aplicar o protocolo laboratorial otimizado para comparar a toxicidade de cepas de *Ostreopsis cf. ovata* pertencentes a diferentes subclados genéticos, provenientes de diferentes regiões do litoral brasileiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

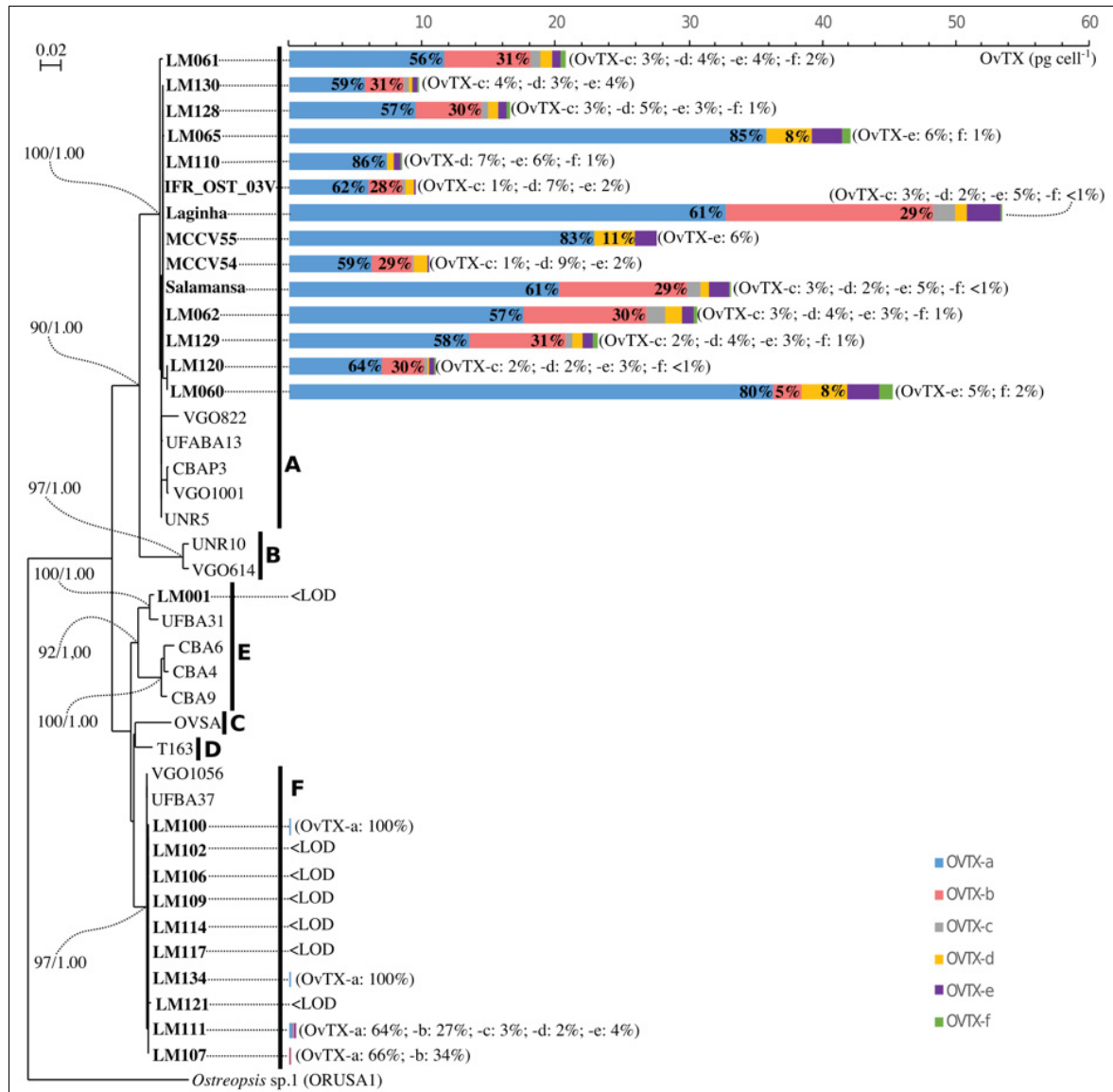
2.1 CULTIVOS DE MICROALGAS

As cepas de *Ostreopsis cf. ovata* utilizadas foram isoladas a partir de material coletado em águas brasileiras. Os cultivos monoclonais foram inoculados em meio de cultura F/2 diluído duas vezes (F/4) em água do mar filtrada e autoclavada (GUILLARD;MORTON, 2004), com salinidade 30-32. Para os experimentos, os cultivos foram mantidos em frascos de vidro tipo Erlenmeyer, com volume de 250 mL (FIGURA 1), em incubadoras de D.B.O. com fotoperíodo ajustado para 12:12h claro: escuro, irradiância entre 50 e 80 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 ± 1 °C. Os cultivos foram inoculados 15 dias antes de cada teste, permitindo que as células fossem utilizadas no início na fase estacionária de crescimento – período com as maiores concentrações de toxinas. Ao todo foram mantidas e utilizadas sete cepas de *O. cf. ovata* (TABELA 1), sendo quatro cepas pertencentes ao subclado com nível mais elevado de toxina (FIGURA 2)(LM-65, LM-101, LM-110 e LM-129) e três cepas pertencentes ao subclado com nível de toxina baixo ou nulo (LM-106, LM-111 e LM-114) (TIBIRIÇÁ *et. al.*, 2019). As cepas LM-129, LM-101 e LM-114 foram utilizadas nos testes preliminares, e as cepas LM-65, LM-129, LM-110, LM-106 e LM-111 foram testadas e comparadas utilizando-se o protocolo otimizado.

FIGURA 1 – CULTIVOS MONOCLONAIS DE *Ostreopsis cf. ovata*.



FIGURA 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE VÁRIAS CEPAS DE *Ostreopsis cf. ovata*, JUNTAMENTE COM DADOS DE TOXINA. AS BARRAS HORIZONTAIS EXPRESSAM OS NÍVEIS DE OVATOXINA (OvTX) EM PG CELL⁻¹ E AS CEPAS COM TEORES DE TOXINA ABAIXO DO LIMITE DE DETECÇÃO ANALÍTICA FORAM INDICADOS POR! “<LOD”.



FONTE: TIBIRIÇÁ, C. E. J. A. **Dinoflagelados bêmicos em áreas de costões rochosos e recifes: Distribuição, toxinas e impactos potenciais.** 2020. Dissertação (Doutorado em em Sistemas Costeiros e Oceânicos) – Setor Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná (PR), 2020. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/69250>. Acesso em: 01 dez. 2021.

TABELA 1 – COORDENADAS GEOGRÁFICAS DOS LOCAIS DE ORIGEM DAS CEPAS UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO

COD. CEPA	Latitude(S)	Longitude (O)	Estado (UF)
LM-111	08° 44' 26,90"	35° 05' 11,20"	Pernambuco
LM-106	09° 16' 55,10"	35° 09' 53,20"	Alagoas
LM-101	09° 16' 55,10"	35° 22' 19,90"	Alagoas
LM-110	09° 16' 55,10"	35° 22' 19,90"	Alagoas
LM-114	18° 02' 00,00"	18° 02' 00,00"	Bahia
LM-65	23° 01' 16, 20"	44° 19' 47,52"	Rio de Janeiro
LM-129	25° 44' 06,75"	48° 22' 01,89"	Paraná

Além de *O. cf. ovata*, um cultivo monoclonal da microalga não-tóxica *Tetraselmis* sp. foi mantido em meio F/2, em garrafas de vidro com volume de 2 L (FIGURA 3), sob aeração constante. Esta microalga serviu de alimento para os organismos antes e durante os testes.

FIGURA 3- CULTIVO MONOCLONAL *Tetraselmis* sp. MANTIDO EM MEIO F/2 EM GARRAFA DE 2 L



2.2 CULTIVO DE ARTEMIA sp.

Cistos de *Artemia* sp. foram eclodidos quatro semanas antes de cada teste. Uma quantidade de 0,3 mg de cistos foi adicionada a uma garrafa com 2 L de água do mar autoclavada (salinidade: 30-32), sob aeração constante. A garrafa foi levada a incubadora com temperatura (25 ± 1 °C) com fotoperíodo 12:12 h. Após 24 horas os

organismos que eclodiram migraram para a coluna d'água, enquanto as cascas de cistos (córion) flutuaram para a superfície, permitindo a coleta das larvas (náuplios). Depois de eclodidos, foram sifonados 250 mL de água do mar contendo os náuplios de artemias da garrafa em que foram eclodidas para 4 garrafas com água do mar autoclavada (salinidade: 30-32) e volume 1,75 L.

As garrafas com as artêmias foram mantidas em bancada iluminada (fotoperíodo 12:12 h), sob aeração constante, iluminadas indiretamente e alimentadas a cada 24-48 h com *Tetraselmis* sp. Após 15 dias, foi trocada a água das garradas utilizando uma peneira de 300 µm para reter as artêmias, em estágio de juvenil. Depois de mais 10 dias, foi trocada novamente a água, onde os indivíduos em estágio adulto, permaneceram até a realização do teste.

2.3 TESTES DE TOXICIDADE

Em preparação para os bioensaios, foram utilizadas 25 microplacas de cultivo celular com 12 poços (FIGURA 4), cada poço foi preenchido com um volume de 6 mL. Então foram adicionados 3 mL de água do mar autoclavada (salinidade: 30-32) em cada poço, e em seguida foi adicionado uma artêmia por poço, somando um total de 300 artêmias por experimento. O restante do volume foi preenchido com a dieta de aclimatação (1 mL) e a dieta do experimento (2 mL).

FIGURA 4 – PLACA DE CULTIVO CÉLULAR 12 POÇOS COM INDIVÍDUOS ADULTOS DISPOSTOS EM CADA UNIDADE EXPERIMENTAL.



2.3.1 Testes – Piloto

2.3.1.1 *Protocolo 1*

No primeiro teste, foram utilizados de 3 a 4 indivíduos adultos de *Artemia* sp. por poço em triplicatas. Cada microplaca contém 6 poços, 4 microplacas foram utilizadas. Foram expostos (n=12 organismos para cada densidade) a 6 densidades celulares de *Ostreopsis* cf. *ovata* diferentes, equivalentes a 15,5, 30,9, 61,9, 123,7, 247,5 e 495 células mL⁻¹ da cepa tóxica LM-101, resultantes de sucessivas diluições do cultivo de *O. cf. ovata* em dieta não tóxica para manter proporcional a dieta de carbono por indivíduo (10 mL por unidade experimental). As cepas foram contadas com as câmaras de contagem *Sedgewick Rafter*. O controle livre de células tóxicas foi exposto em triplicatas (n=3 organismos por unidade experimental) e o tempo de exposição foi de 48 horas.

2.3.1.2 *Protocolo 2*

No segundo teste, foram usadas placas de cultivos de 12 poços (6 mL) como unidade experimental. Neste modelo, os organismos foram dispostos individualmente em cada poço, e foram testadas 8 concentrações equivalentes a 33, 65, 130, 260, 521, 1042, 2084 e 4168 células mL⁻¹ com 3 réplicas; cada réplica contendo um indivíduo (3 indivíduos por concentração). Neste caso, foram realizados testes tanto com uma cepa pertencente ao subclado menos tóxico (LM-114) quanto com uma cepa do subclado tóxico (LM-129).

2.3.2 Aplicação do protocolo experimental otimizado

2.3.2.1 *Preparação dos testes*

Como resultado da otimização do protocolo experimental, conforme descrito na Seção Resultados mais adiante, em preparação para cada bioensaio, foram utilizadas 25 placas de cultivo celular com 12 poços cada. Cada poço foi preenchido com um volume total de 6 mL, sendo 3 mL de água de mar autoclavada (salinidade: 30-32), 1 mL da dieta de aclimatação (ver item 2.3.2.2 a seguir) e 2 mL contendo as dietas experimentais (descritas em 2.3.2.3). A cada poço, foi adicionada uma

artêmia adulta, somando um total de 300 indivíduos por experimento para compor os diferentes tratamentos e réplicas, conforme descrito no item 2.3.2.3 abaixo.

2.3.2.2 *Aclimação*

As placas contendo os indivíduos de *Artemia* sp. foram mantidas em aclimação por 24h e os organismos foram alimentados com *Tetraselmis* sp. em uma quantidade equivalente a $150 \text{ ng C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$. No período de aclimação, as placas foram mantidas no fluxo laminar sob temperatura controlada de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12 h. Os testes de toxicidade foram iniciados imediatamente após a adição de densidades celulares crescentes de *Ostreopsis* cf. *ovata* às unidades experimentais, conforme descrito a seguir.

2.3.2.3 *Avaliação da toxicidade de diferentes cepas de Ostreopsis cf. ovata*

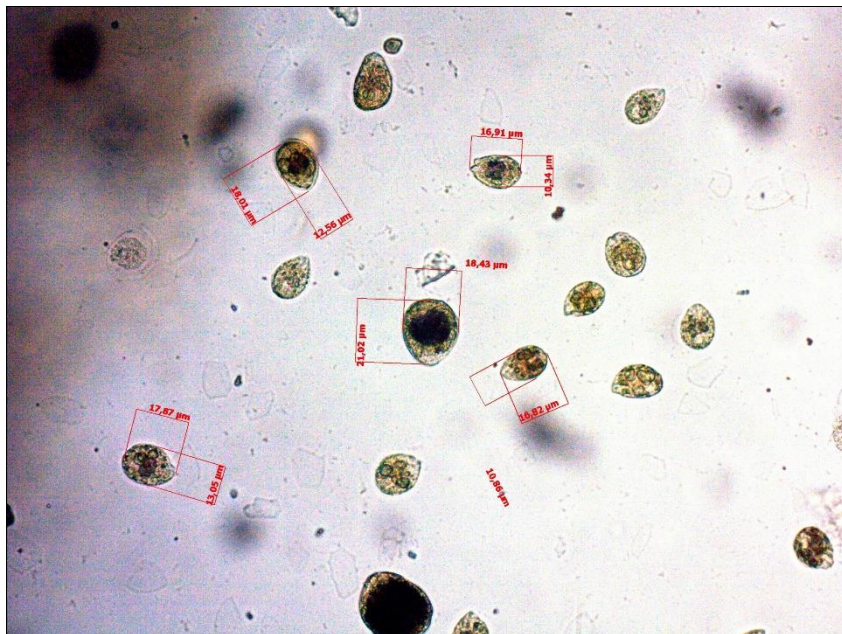
Os testes de toxicidade consistiram na exposição de indivíduos de *Artemia* sp. a diferentes densidades de células de *O. cf. ovata* equivalentes a 1,2; 2,3; 4,7; 9,4; 18,8; 37,5; 75; $150 \text{ ng C.ind}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A biomassa restante para completar os $150 \text{ ng C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ requeridos foi adicionada em quantidades decrescentes de *Tetraselmis* sp. Por fim, um grupo de indivíduos foi exposto a uma condição controle, composta exclusivamente de células de *Tetraselmis* sp. em quantidade equivalente a $150 \text{ ng C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Todos os tratamentos foram dispostos em triplicatas (3 placas) e o controle composto somente de *Tetraselmis* sp. foi exposto em 4 réplicas. Cada placa foi ocupada com 12 artêmias (uma por poço), sendo dois dos poços com indivíduos utilizados para monitorar como controle experimental e 10 monitorados para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos agudos. Além disso, foi usado uma placa adicional com 12 artêmias e como um controle experimental.

As cepas de *O. cf. ovata* eram pertencentes a dois subclados genéticos distintos, sendo um produtor de grandes quantidades de toxinas ($n = 3$ cepas) e outro não ($n = 2$ cepas). A toxicidade das cepas foi avaliada em bioensaios individuais. O número exato de células tóxicas e/ou não-tóxicas por mililitro de água

do mar (densidade celular) em cada tratamento foi definido em função do biovolume celular da microalga, obtido por meio das dimensões médias (FIGURA 5) de ~20 células por cepa medidas em microscópio óptico a 100x de aumento, convertido em concentração intracelular de carbono por meio da fórmula: $\text{ngC cell}^{-1} = \log a + b \times \log V(\mu\text{m}^3)$ (MENDEN-DEUER; LESSARD, 2000). Desta forma, cepas de tamanhos celulares ligeiramente distintos foram ofertadas aos microcrustáceos em quantidades equivalentes.

FIGURA 5 – MENSURAÇÃO DAS DIMENSÕES DAS CEPAS DE *Ostreopsis cf. ovata* SOB MICROSCOPIO ÓPTICO A 100x DE AUMENTO.



Durante as 12 horas de duração dos bioensaios, as unidades experimentais foram mantidas no escuro, para minimizar a multiplicação das microalgas por fotossíntese, e sob temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A sobrevivência e o padrão de movimentação (natação ativa ou irregular), dos microcrustáceos foram monitorados por observação a olho nu em intervalos de tempo pré-determinados: após 1, 3, 6 e 12 horas do início da exposição, sendo as mortes confirmadas sob observação em microscópio estereoscópico. Os indivíduos foram considerados mortos quando totalmente parados junto ao fundo. Após cada morte os indivíduos eram retirados das unidades experimentais e fixados com Lugol diluído (10%). Encerrado cada experimento, 30 indivíduos de *Artemia* sp. foram mensurados (comprimento) utilizando uma régua milimétrica. Os testes foram realizados com as

cepas com nível mais elevado de toxina (LM-65, LM-129, LM-110) e com nível de toxina baixo ou nulo (LM-106 e LM-111). Todas foram testadas quando os cultivos atingiram o início da fase estacionária de crescimento, ou seja, aproximadamente 15 dias após o inóculo.

2.3.3 Análise dos dados

Em cada teste, o valor de toxicidade aguda foi expresso como a concentração (densidade celular) mediante a qual 50% dos indivíduos expostos sofreram mortalidade (CL_{50}), sendo calculado por meio do método probabilístico (PROBIT), após ajuste dos dados para correção de eventuais efeitos no controle por meio da fórmula de Abbott: $Ea = [(Eo - Ec) / (100 - Ec)] \times 100$, onde Ea é o efeito ajustado, Eo o efeito observado para um dado tratamento experimental, e Ec o efeito observado no controle. Ainda foram determinadas, em cada caso, a concentração de efeito observada (CEO), caracterizada como a menor concentração testada capaz de exercer um efeito significativo, e a concentração de efeito não-observado (CENO), que corresponde à maior concentração testada que não causa um efeito significativo. O efeito era considerado como significativo quando estatisticamente distinto ($p < 0,05$) do que aquele observado no tratamento controle, conforme determinado em testes-t de Student.

Os níveis de efeitos considerados foram: natação normal de *Artemia* sp. – sem efeito (0); e a morte confirmada do indivíduo (1). Por fim, os valores dos parâmetros ecotoxicológicos foi comparado entre as diferentes cepas *O. cf. ovata*.

3 RESULTADOS

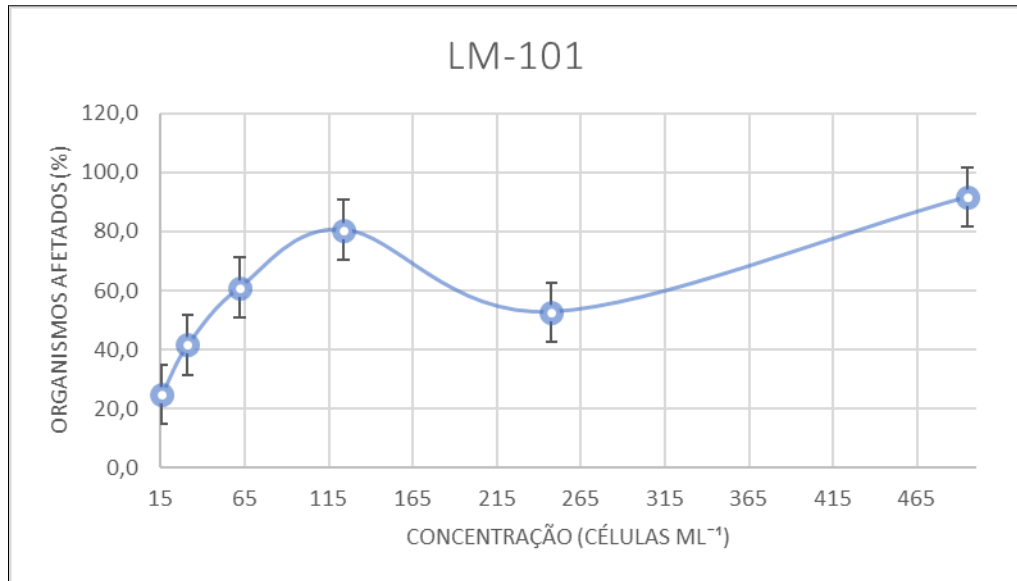
3.1 BATERIA DE TESTES-PILOTO.

3.1.1 Protocolo 1

O primeiro teste preliminar foi encerrado após 24 horas, quando alguns indivíduos do controle e das concentrações mais baixas ainda se encontravam vivos e nadando. Ao longo do tempo de exposição, pode-se observar uma variação do efeito letal em relação às concentrações crescentes de exposição (GRÁFICO 1). Após 6 horas de exposição das artêmias às células da cepa LM-101, a CL_{50} foi calculada em 63,4 células mL^{-1} . Entretanto, em virtude da elevada mortalidade observada no controle (33%), este valor foi muito próximo ao valor de CENO (61,9 células mL^{-1} ; $p = 0,17$), e inferior ao valor de CEO, correspondente ao tratamento com 123,7 células mL^{-1} ($p = 0,006$), o que comprometeu os resultados do teste.

Neste teste-piloto, a presença de múltiplos organismos adultos em um mesmo poço influenciou negativamente a análise, principalmente quando os sexos opostos ocupavam a mesma unidade experimental. Os machos, de porte menor, copulavam com as fêmeas e por muitas vezes eram os primeiros a morrer, forçando as fêmeas a carregarem seus cadáveres durante o transcorrer do experimento. Isso dificultou a retirada dos indivíduos mortos após cada período de observação e, mais importante, deve ter prejudicado o desempenho das fêmeas acasaladas. Desta forma, optou-se por alocar somente um indivíduo por poço no experimento seguinte. Além disso, o tempo de duração de 48 horas não se mostrou necessário, pois todos os organismos vieram a óbito após 24 horas de exposição, sendo este o período de duração total adotado para os testes seguintes.

GRÁFICO 1 - DENSIDADE CELULAR X PERCENTUAL DE ORGANISMOS AFETADOS DURANTE 6 HORAS DE EXPOSIÇÃO À CEPA LM-101 DURANTE O TESTE PRELIMINAR 1.



3.1.2 Protocolo 2

Neste protocolo, os indivíduos de *Artemia* sp. foram separados individualmente em cada poço. O teste de exposição à cepa LM-129 foi encerrado após 24 horas com todos os organismos de todos os tratamentos mortos, incluindo no controle. Na primeira hora, nenhuma concentração de exposição resultou em mortalidade. A partir de 3 horas de exposição, já houve óbitos nas menores concentrações e a taxa de letalidade ultrapassou 50% nos organismos expostos às três maiores concentrações, correspondentes a 1042, 2084 e 4168 células mL⁻¹ (6 mL por unidade amostral) (TABELA 2). Após 6 horas de exposição, a mortalidade atingiu 100% das artêmias expostas às três maiores concentrações e, após 12 horas de exposição, havia sobreviventes somente no controle e na concentração correspondente a 260 células mL⁻¹, o volume total da unidade amostral era de 6 mL (TABELA 2).

A elevada mortalidade no controle a partir de 3 horas de exposição (TABELA 2) prejudicou as análises dos dados, impossibilitando o cálculo de CL₅₀, bem como a determinação de CENO e CEO nesse caso. Assim como no primeiro teste preliminar (Protocolo 1), esse protocolo contou com poucos indivíduos no controle (n = 3) e qualquer morte já representaria 33%. Da mesma forma, o controle no teste adicional realizado com a cepa LM-114 teve todos os organismos mortos ao final do tempo de

exposição. Segundo Artoxkit (1990), o controle em testes agudos de letalidade desejavelmente devem causar efeito $\leq 10\%$, do contrário a análise deve ser invalidada. Assim, o protocolo definitivo foi otimizado com a adoção de 10 indivíduos em cada réplica do controle, dispostos em poços individuais, além do uso de quatro réplicas para o controle, uma a mais do que nos tratamentos com dietas tóxicas. As observações e dificuldades encontradas nos testes preliminares levaram ao desenvolvimento de um Procedimento Operacional Padrão (POP) para descrever o protocolo laboratorial (ANEXO 1).

TABELA 2- TAXAS DE MORTALIDADE (%) x TEMPO DE EXPOSIÇÃO PARA INDIVÍDUOS DE *Artemia* sp. EXPOSTOS A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE *Ostreopsis* cf. *ovata* (CEPA LM-129) NO TESTE-PILOTO 2

Densidade celular (Células mL ⁻¹)	TEMPO					
	0	1	3	6	12	24
0	0%	0%	33%	33%	33%	100%
33	0%	0%	0%	0%	100%	100%
65	0%	0%	33%	33%	100%	100%
130	0%	0%	33%	0%	100%	100%
260	0%	0%	33%	67%	67%	100%
521	0%	0%	33%	33%	100%	100%
1042	0%	0%	100%	100%	100%	100%
2084	0%	0%	67%	100%	100%	100%
4168	0%	0%	67%	100%	100%	100%

3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES CEPAS DE *Ostreopsis* cf. *ovata*

Os organismos adultos de *Artemia* sp. usados nos experimentos tinham um comprimento médio (n=150 organismos) de 8,96 mm ($\pm 1,64$) e as células de *O. cf. ovata*, em média, 36,5-46,9 μm de comprimento por 26,6-36,4 μm de largura (n \cong 20 células por cepa). Após calcular o biovolume, foi possível estimar o conteúdo intracelular de carbono das cepas LM-65, LM-129, LM-110, LM-111 e LM-106 em 3,20, 3,41, 3,29, 3,24 e 3,05 ng C célula⁻¹, respectivamente.

As cepas do subclado de menor potencial tóxico (LM-111 e LM-106) não causaram mudanças no padrão de natação das artêmias adultas, nem tampouco causaram a morte destas. Uma exceção foi para o tratamento correspondente à

densidade celular mais elevada, no qual a mucilagem produzida abundantemente pelas células de *O. cf. ovata* se fixava nos apêndices dos microcrustáceos, dificultando sua natação. Apesar disso, os experimentos com as cepas do subclado com potencial menos tóxico foram encerrados com todos os organismos vivos, tanto aqueles expostos ao controle quanto às dietas com *O. cf. ovata*.

Dentre as cepas pertencentes ao subclado potencialmente mais tóxico (LM-110, LM-65 e LM-129), a exposição a células da cepa LM-110 causou a mortalidade de um único organismo na maior concentração ($6.120 \text{ células mL}^{-1}$), após 12 horas de exposição. A taxa de mortalidade dos indivíduos expostos a esta densidade celular não foi significativamente distinta ($p = 0.229$) do efeito observado no controle (zero mortalidade). Para essa cepa seria interessante se avaliar o efeito letal aos organismos-teste durante um tempo maior de exposição.

A cepa LM-65, por sua vez, passou a apresentar toxicidade aguda às artêmias após 6 horas de exposição (GRÁFICO 2). Neste momento, os valores de CENO e CEO foram correspondentes aos tratamentos de $28,1 \text{ células mL}^{-1}$ ($p = 0,5$) e $56,2 \text{ células mL}^{-1}$ ($p = 0.00027$), respectivamente. Após 12 horas de exposição, a menor das densidades celulares testadas já causou um efeito significativamente distinto do controle ($\text{CEO} = 7,0 \text{ células mL}^{-1}$; $p = 0$), sendo impossível se determinar o valor de CENO neste caso (TABELA 3).

GRÁFICO 2- PERCENTUAL DE MORTALIDADE DE *Artemia sp.* EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE *Ostreopsis cf. ovata* (CEPA LM-65)

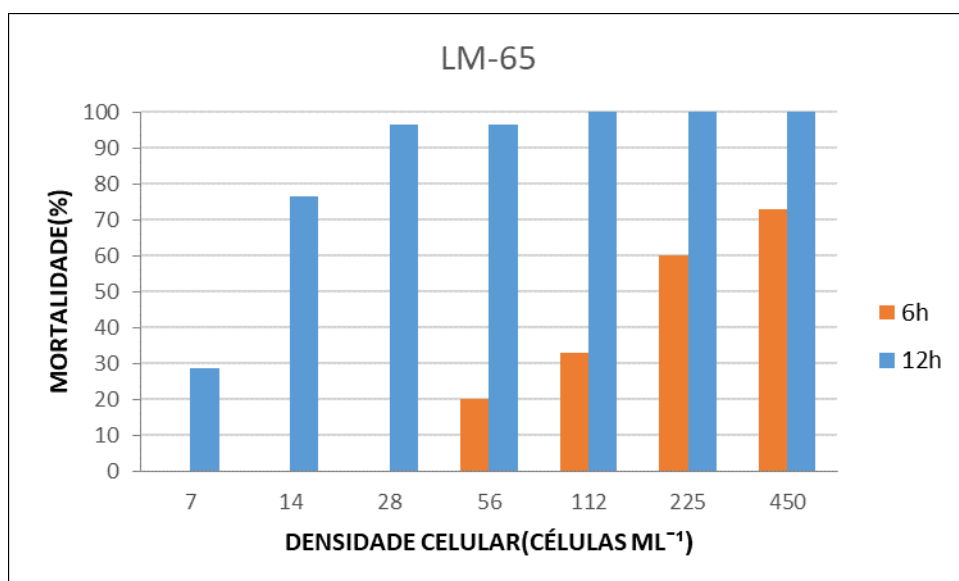
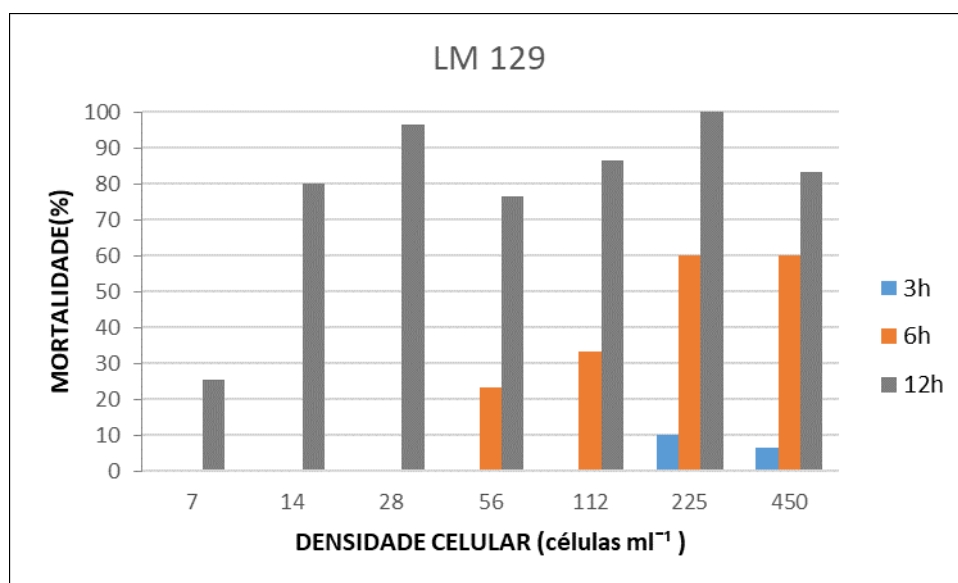


TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO (CENO) E CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO (CEO) PARA *Artemia* sp. EXPOSTA POR 3, 6 OU 12 HORAS A DIFERENTES CEPAS DE *Ostreopsis* cf. *ovata*.

Cepas	CENO(3h) Células mL ⁻¹	CENO(6h) Células mL ⁻¹	CENO(12h) Células mL ⁻¹	CEO(3h) Células mL ⁻¹	CEO(6h) Células mL ⁻¹	CEO(12h) Células mL ⁻¹
LM-65	n/a	28,1	n/a	n/a	56,2	7,0
LM-129	112,5	28,1	n/a	225	56,2	7,0
LM-110	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
LM-106	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
LM-111	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

As maiores densidades celulares testadas da cepa LM-129 já causaram efeito letal significativo às artêmias nas primeiras 3 horas de exposição (GRÁFICO 3), resultando em um valor de CEO de 225 células mL⁻¹ ($p = 0.04$) e CENO de 112,5 células mL⁻¹ ($p = 0.5$). Após 6 horas de exposição os valores de CENO e CEO corresponderam, respectivamente, aos tratamentos de 28,1 células mL⁻¹ ($p = 0,5$) e 56,2 células mL⁻¹ ($p = 0.001$) (TABELA 3). Após 12 horas, da mesma forma que para a cepa LM-65, a menor densidade celular testada para LM-129 já causou mortalidade significativamente maior do que no controle ($p = 0,001$), correspondendo a um valor de CEO de 7,0 células mL⁻¹ (GRÁFICO 3, TABELA 3).

GRÁFICO 3- PERCENTUAL DE MORTALIDADE DE *Artemia* sp. EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE *Ostreopsis* cf. *ovata* (CEPA LM-129).



As curvas de mortalidade por concentração evidenciaram o quando o tempo de exposição influencia na toxicidade das cepas. Enquanto que cerca de 50% dos indivíduos expostos às maiores abundâncias de LM-65 (GRÁFICO 4) e LM-129 (GRÁFICO 5) morreram durante as primeiras 6 horas de exposição, a taxa de mortalidade atingiu a totalidade dos indivíduos após 12 horas de exposição. Dentro deste intervalo de tempo, a cepa LM-65 causou a mortalidade de todos os organismos entre as densidades de 112 e 450 células mL⁻¹ (GRÁFICO 4), enquanto a taxa de 100% de mortalidade foi atingida no tratamento com 225 células mL⁻¹ da cepa LM-129 no mesmo período (GRÁFICO 5). O valor de CL₅₀ para a cepa LM-129 foi estimado em 230 células mL⁻¹ após 6 horas e somente 3,3 células mL⁻¹ após 12 horas de exposição. Similarmente, a exposição à cepa LM-65 resultou em valores de CL₅₀ de 215 células mL⁻¹ (6 h) e 4,7 células mL⁻¹ (12 h) (TABELA 4).

GRÁFICO 4 – CURVAS DE MORTALIDADE DE *Artemia* sp. EXPOSTA POR 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE *Ostreopsis* cf. *ovata* (CEPA LM-65).

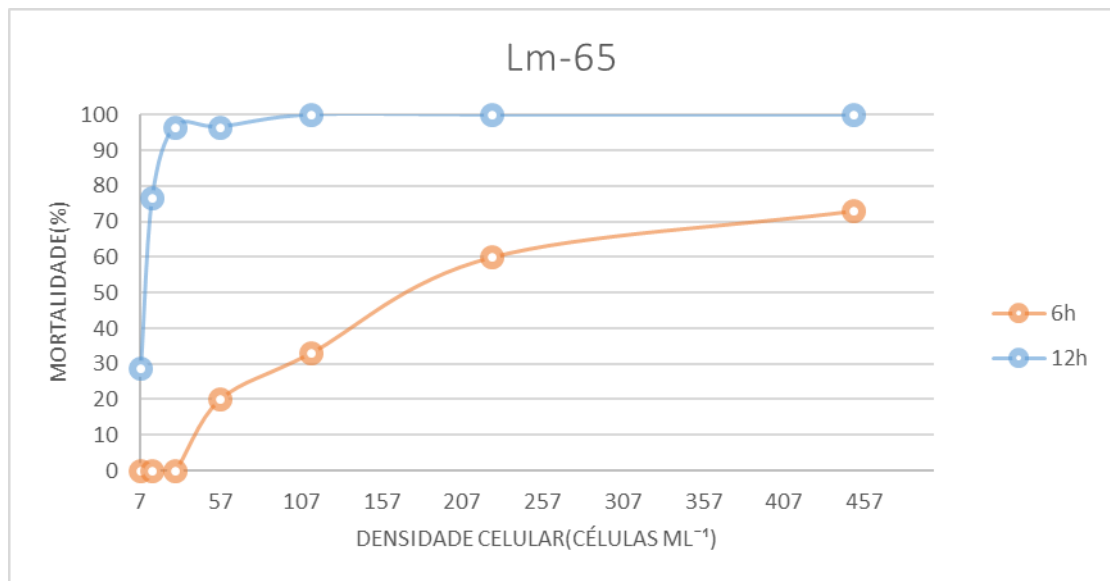


GRÁFICO 5 – CURVAS DE MORTALIDADE DE *Artemia* sp. EXPOSTA POR 3, 6 OU 12 HORAS A DENSIDADES CELULARES CRESCENTES DE *Ostreopsis cf. ovata* (CEPA LM-129).

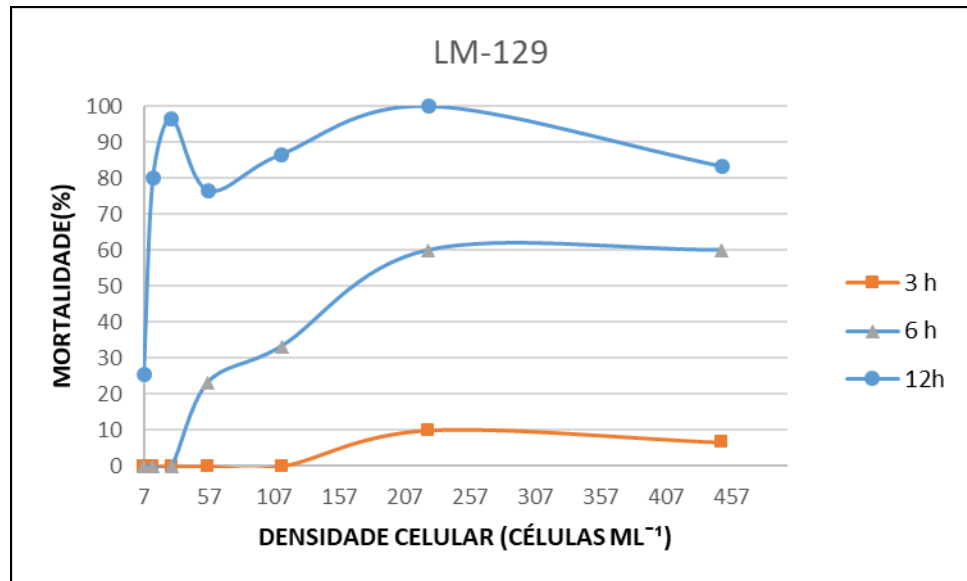


TABELA 4- CONCENTRAÇÃO LETAL PARA 50% DA POPULAÇÃO (CL₅₀) APÓS 3, 6 OU 12 HORAS DE EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CEPAS DE *Ostreopsis cf. ovata*.

Cepas	CL ₅₀ (3h) Células mL ⁻¹	CL ₅₀ (6h) Células mL ⁻¹	CL ₅₀ (12h) Células mL ⁻¹
Lm-65	n/a	215	4,7
Lm-129	n/a	230	3,3
Lm-110	n/a	n/a	n/a
Lm-106	n/a	n/a	n/a
Lm-111	n/a	n/a	n/a

4 DISCUSSÃO

As cepas de *Ostreopsis cf. ovata* são quase impossíveis de serem distintas entre si utilizando microscopia, pois as células são morfológicamente muito similares. Ao mesmo tempo, existe uma variabilidade nas dimensões das células de uma mesma cepa, de modo que os tamanhos mínimos e máximos das células de diferentes cepas se sobrepõem, conforme verificado no presente estudo. Assim, torna-se impraticável a distinção por análise microscópica de diferentes cepas com o objetivo de se separar aquelas pertencentes a subclados mais ou menos tóxicos, para fins de monitoramento e análise de risco. O potencial tóxico, portanto, precisa ser avaliado diretamente por técnicas analíticas como a LC-MS/MS, que é capaz de identificar e quantificar as diferentes toxinas produzidas pelas células presentes em uma região. Contudo, essa metodologia depende de equipamentos técnicos muito caros e requer profissionais de alta qualificação (PAVAUX.; BERDALET; LEMÉE, 2020). Uma alternativa mais simples e barata seria o uso de ensaios biológicos, cuja relevância para a avaliação das florações tóxicas que prejudicam a saúde humana é reconhecida por inúmeros autores (BOTANA, 2014). Além de rápidos e baratos, os bioensaios para monitoramento de florações de microalgas tóxicas devem ser éticos, precisos, empregar organismos ecologicamente relevantes e demonstrar elevada reprodutibilidade.

Os microcrustáceos do gênero *Artemia* têm se mostrado sensíveis quando expostos a cepas de *Ostreopsis cf. ovata* e outros dinoflagelados tóxicos (PAVAUX, *et. al.*, 2020; NEVES *et. al.*, 2017; presente estudo). As glândulas de sal e o intestino são os principais órgãos de transporte transepitelial em *A. salina* (CORTAS *et. al.*, 1989). Em condições hipersalinas, os organismos excretam NaCl através de glândulas salinas especializadas (náuplios) ou através das guelras (adultos) (CROGHAN, 1958). A bomba de ATPase pode estar mais presente ou ser mais ativa nas artêmias do que em outros organismos, o que talvez explique sua elevada sensibilidade a células tóxicas de *Ostreopsis cf. ovata* (LUCU; TOWLE, 2003). Portanto a uma ligação direta entre a bomba ATPase e o efeito das toxinas de *O. cf. ovata*.

Metanáuplios da espécie *Artemia franciscana* se mostraram excelentes organismos-teste para analisar a toxicidade de diferentes cepas de *Ostreopsis cf. ovata* com um baixo custo, gerando resultados rápidos e robustos (PAVAUX *et. al.*,

2020). Da mesma forma, indivíduos adultos de *Artemia salina* se mostraram viáveis para se monitorar os efeitos subletais e letais de dinoflagelados, dentre os quais *O. cf. ovata* (NEVES *et. al.*, 2017).

Os testes de Pavaux *et. al.*, (2020) com metanúplios de *A. franciscana* tiveram um período maior de exposição quando comparado aos testes com adultos de *Artemia* sp. no presente estudo e de *A. salina* no estudo de Neves *et. al.* (2017), dificultando a comparação direta da toxicidade entre as cepas testadas e demonstrando a importância de se usar um protocolo padronizado. Os valores de CL_{50} variaram entre 0,25 e 81 células mL^{-1} quando as artêmias foram expostas por 24 horas a cepas de *O. cf. ovata* isoladas do Mediterrâneo (PAVAUX *et. al.*, 2020), 3,4 células mL^{-1} quando expostas por 4 horas a uma cepa isolada do Rio de Janeiro (NEVES *et. al.*, 2017) e entre 215 e 230 células mL^{-1} após 6 horas, ou 3,3 a 4,7 células mL^{-1} , após 12 horas para as cepas LM-65 e LM-129, isoladas do Paraná e Rio de Janeiro, respectivamente (presente estudo).

Além da forte influência do tempo de exposição nos valores de toxicidade, como evidenciado acima, diferenças nas condições de cultivo, temperatura, salinidade, protocolos de exposição, idade e saúde dos organismos-teste também podem afetar os resultados e dificultar as comparações entre diferentes estudos. Por exemplo, Neves *et. al.* (2017) testou um número menor de organismos, dispostos em um mesmo poço ao longo de um período de exposição mais curto (7h) sob uma única densidade (200 células mL^{-1}) de *O. cf. ovata*. Pavaux *et. al.* (2020) testou densidades celulares (0,4, 4, 40, 400 e 4000 células mL^{-1}) mais próximas das usadas no presente estudo (7, 14, 28, 56, 112, 225, 450, 6.120 células mL^{-1}). Entretanto, o presente estudo testou a exposição a oito diferentes densidades, ao invés de cinco, o que permite observar melhor as variações das curvas de mortalidade entre as concentrações de exposição e leva a um cálculo mais preciso dos valores de CL_{50} , CENO e CEO. Além disso, o número de organismos expostos no presente estudo foi de 10 indivíduos adultos de *Artemia* sp. por concentração (em triplicata), totalizando 240 organismos expostos, além do controle. Neves *et. al.* (2017), por exemplo, testou somente três indivíduos adultos de *A. salina*, em triplicata, em uma única concentração, e Pavaux *et. al.* (2020) usou cinco metanúplios de *A. franciscana* por concentração, em triplicatas. Assim como um maior número de concentrações, um maior número de indivíduos testados aumenta a precisão dos resultados. Ademais, o protocolo de exposição descrito aqui

minimizou o acréscimo de trabalho e a dificuldade operacional e analítica potencialmente associada ao uso de um número maior de indivíduos. A alocação de indivíduos em poços separados em múltiplas placas de cultivo celular de 12 poços que se encaixam umas sobre as outras possibilitou uma rápida detecção dos efeitos tóxicos agudos, facilitando a remoção de indivíduos mortos, ao mesmo tempo em que permitiu a montagem do teste em um espaço compacto. Sendo assim, sugere-se que o presente protocolo seja adotado em futuros estudos que investiguem o potencial tóxico de células de microalgas tóxicas a *Artemia* spp. Para espécies/cepas de toxicidade baixa a moderada, recomenda-se elevar o tempo de exposição para um período de 24-72 horas.

Os testes com os indivíduos adultos de *Artemia* spp. neste trabalho evidenciaram claramente a distinção do potencial tóxico entre dois subclados genéticos de *Ostreopsis* cf. *ovata* presentes na costa do Brasil, que possuem células com morfologia bastante semelhante. Células pertencentes ao subclado de menor potencial tóxico, representado aqui pelas cepas LM-106 e LM-111, não causaram mortalidade à *Artemia* sp. após 12 horas de exposição mesmo sob concentrações tão elevadas como 6120 células mL⁻¹. Em contraste, duas cepas do subclado de maior potencial tóxico (LM-65 e LM-129) provocaram mortalidade significativa em 7 das concentrações testadas (7, 14, 28, 56, 112, 225 e 450 células mL⁻¹) durante 12 horas de exposição, resultando em valores similarmente elevados de CL₅₀, CENO e CEO (TABELAS 3 e 4). A terceira cepa do subclado genético associado a um maior potencial tóxico (conforme TIBIRIÇÁ *et. al.*, 2019) – LM-110 – provocou somente efeito subletal em um organismo exposto a 112 células mL⁻¹ e a morte de um outro indivíduo exposto a 6120 células mL⁻¹ após 12 horas de exposição. As cepas LM-129 e LM-65 continham maiores concentrações intracelulares de OvTX (24 e 41 pg PLTX eq. célula⁻¹, respectivamente) quando comparadas a LM-110 (9 PLTX eq. célula⁻¹; TIBIRIÇÁ *et. al.*, 2019), o que demonstra a implicação destas toxinas no efeito letal de *O. cf. ovata* sobre *Artemia* sp.

Embora o protocolo otimizado neste estudo tenha sido aplicado a somente cinco cepas de *O. cf. ovata*, registrou-se um contraste interessante entre os resultados obtidos para as cepas isoladas a partir de material proveniente de diferentes regiões do Brasil. Enquanto que as cepas isoladas da região Sul-Sudeste – LM-65 do Paraná e LM-129 do Rio de Janeiro – foram altamente tóxicas aos microcrustáceos adultos, as demais cepas isoladas a partir de material coletado na

região Nordeste do país – Pernambuco (LM-111) e Alagoas (LM-106 e LM-110) foram pouco (LM-110) ou não-tóxicas (LM-111, LM-106). O predomínio de células pertencentes ao subclado genético pouco ou não tóxico de *O. cf. ovata* no Nordeste e daquelas representantes do subclado tóxico no sul-sudeste foi confirmado por Tibiriçá *et. al.* (2019). Contudo, em alguns estados do Nordeste, populações representantes de ambos os subclados genéticos podem co-existir (TIBIRIÇÁ *et. al.* 2019).

Na costa sul da França, onde florações de *O. cf. ovata* são eventos recorrentes, testes *in situ* com larvas de *A. franciscana* foram realizados com o intuito de se detectar precocemente as florações de *O. cf. ovata*, revelando uma maior toxicidade 10 dias após o início da floração, correspondendo ao início da fase estacionária de crescimento, decrescendo a partir daí até o final do evento (PAVAUX *et. al.*, 2020). No Brasil, diversas florações vêm ocorrendo na última década como relatado por Nascimento (2008) no Rio de Janeiro. Essas florações vêm causando mortalidade de ouriços e outros organismos em períodos de eventos tóxicos (FERREIRA, 2006). Recentemente, foi descrito uma floração na região Sul do Brasil, no Arquipélago de Currais (Paraná), causando a contaminação da fauna no local (TIBIRIÇÁ, 2020).

Como a técnica de LC-MS/MS voltada à determinação de toxinas algais está restrita a pouquíssimos centros de pesquisa no Brasil, sendo a maioria concentrado nas regiões sul e sudeste, e considerando que a análise demanda insumos caros e mão de obra especializada, propõe-se que o protocolo descrito no presente estudo seja replicado em diferentes locais e aplicado ao maior número possível de cepas das mais variadas regiões do Brasil. Desta forma, o risco associado a florações de *O. cf. ovata* em diferentes locais poderá ser melhor avaliado. Do mesmo modo, a exemplo da França, o presente protocolo também poderia ser usado para se detectar precocemente a presença de florações tóxicas de *O. cf. ovata* a partir de amostras naturais coletadas ao longo da costa brasileira. Neste caso, enquanto que na região subtropical do país o monitoramento poderia se restringir ao período em que se registram as maiores temperaturas da água do mar no verão, quando as florações desta espécie parecem estar restritas (TIBIRIÇÁ, 2020), na região tropical as florações potencialmente tóxicas parecem ocorrer ao longo de todo o ano. Além de auxiliar redução dos impactos potenciais destes eventos a atividades econômicas e à saúde humana, o amplo emprego deste protocolo ajudaria a entender qual a

frequência e duração dos eventos nocivos, e como os organismos locais se comportam durante as florações do dinoflagelado bêntico *Ostreopsis* cf. *ovata*.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra a existência de populações de células morfológicamente similares, mas com potencial tóxico altamente contrastante no litoral brasileiro. Cepas da região sul e sudeste foram mais tóxicas a *Artemia* sp. do que as cepas provenientes da região nordeste. De forma mais ampla, o trabalho contribui com a descrição de um protocolo simples e barato para avaliar o risco associado à toxicidade de populações deste dinoflagelado em locais onde ferramentas analíticas mais sofisticadas não estão disponíveis.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em estudos futuros, o aprimoramento deste protocolo utilizando organismos adultos de *Artemia* sp. para testes *in situ*, afim de monitorar as florações precoces de *Ostreopsis* cf. *ovata* no Brasil assim como Pavaux *et. al.* (2020) realizou na França, seria uma maneira de prevenir intoxicações de seres humanos, emitindo-se alertas durante os períodos de alta densidade celular e níveis perigosos de toxicidade. Quando os testes *in situ* forem realizados, será necessário amostrar a água e avaliar a assembleia de organismos presentes, para garantir que não sejam outros gêneros de microalgas nocivas os responsáveis pela mortalidade dos organismos.

Além dos testes com *Ostreopsis* cf. *ovata*, este protocolo poderá ser ajustado e aplicado a outros dinoflagelados potencialmente tóxicos, afim de se comparar a toxicidade entre distintos gêneros assim como fez Neves *et. al.* (2017) com *Gambierdiscus excentricus* e *Prorocentrum lima*. Por fim, a comparação dos resultados dos bioensaios com técnicas analíticas permitirá avaliar sua aplicabilidade e robustez.

REFERÊNCIAS

- ARTOXKIT, M. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. **Standard operational procedure**, Belgium, 1990.
- BOTANA, L. M. The mouse bioassay as a universal detector. In *Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, **CRC Press**, USA, ed. 3, p. 149-161, 2014.
- BRISSARD C.; HERRENKNECHT C.; SÉCHET V.; HERVÉ F.; PISAPIA F.; HARCOUET J.; LÉMÉE R.; CHOMÉRAT N.; HESS P.; AMZIL Z. ZouherComplex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2851–2876, 2014. Disponível em: DOI: 10.3390/md12052851. Acesso em: 5 abr. 2020.
- CIMINIELLO, P.; DELL'AVERSANO C.; FATTORUSSO E.; FORINO M.; MAGNO G. S.; TARTAGLIONE L.; GRILLO C.; MELCHIORRE N. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. **Anal. Chem**, v.78, p. 6153-6159, 2006. Disponível em: DOI: 10.1021/ac060250j. Acesso em: 2 abr. 2020.
- CIMINIELLO, P.; DELL'AVERSANO C.; FATTORUSSO E.; FORINO M.; TARTAGLIONE L.; GRILLO C.; MELCHIORRE N. Putative Palytoxin and its new analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian Coasts during the 2006 toxic outbreak. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, p. 111–120, 2008. Disponível em: DOI: 10.1016/j.jasms.2007.11.001. Acesso em: 2 abr. 2020.
- CIMINIELLO, P.; DELL'AVERSANO C.; IACOVO E. D.; FATTORUSSO E.; FORINO M.; GRAUSO L.; TARTAGLIONE L. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. **J. Am. Chem. Soc**, v. 134, p. 1869-1875, 2012. Disponível em: DOI: 10.1021/ja210784u. Acesso em: 2 abr. 2020.
- CORTAS, N.; ARNAOUT M., SALON J.; EDELMAN I. S. Isoforms of Na,K-ATPase in *Artemia salina*: II. Tissue Distribution and Kinetic Characterization. **J. Membrane Biol.** V. 108, p.187-195, 1989.

- CROGHAN, P. C. The mechanism of osmotic regulation in *Artemia salina* (L.): The physiology of the branchiae. **J. Exp. Biol.** v. 35, p. 234–242, 1958.
- FAIMALI, M.; GIUSSANI V.; Piazza V. , GARAVENTA F.; CORRÀ C.; ASNAGHI V., PRIVITERA D.; GALLUS L.; CATTANEO-VIETTI R., MANGIALAJO L.; CHIANTORE M. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. **Mar Environ Res.**v.76 p.97–107, 2012. Disponível em: DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.09.010. Acesso: 2 Abr. 2020.
- FAUST, M.; GULLEDGE, R. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. **Journal of Applied Phycology** v. 42, n. 1,p.1–144,2002.Disponível em: DOI: 10.1023/b:japh.0000019147.40273.1b. Acesso em: 2 abr. 2020.
- FERREIRA, C. E. L. Sea urchins killed by toxic algae. **JMBA Global Marine Environment**, v.81, p. 22–23, 2006.
- GARAVENTA, F.; GAMBARDELLA C.; FINO A. D.; PITTORE M.; FAIMAILI M. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. **Ecotoxicology** v. 19, p.512–519, 2010. Disponível em: DOI 10.1007/s10646-010-0461-8. Acesso em: 07/07/20.
- GEOHAB. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, **GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. IOC of UNESCO and SCOR**, Paris and Newark, pp. 64, 2012.
- GUILLARD, R.; MORTON, S. Culture methods. **Manual on Harmful Marine Microalgae**.Paris: p. 77–97, UNESCO, 2004.
- PAVAUX, A. S.; TERNON, E.; DUFOUR, L.; MARRO, S.; GÉMIN, M. P.; THOMAS, O. P.; LEMÉE, R. Efficient, fast and inexpensive bioassay to monitor benthic microalgae toxicity: Application to *Ostreopsis* species, **Aquatic Toxicology**. v. 223, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105485>. Acesso em :30/11/21.
- LUCU, C.; TOWLE, D. W. Na⁺ + K⁺ -ATPase in gills of aquatic crustácea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.135 p. 195–214, 2003.

- MENDEN-DEUER, S.; LESSARD, E. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. **Limnology and Oceanography**, v.45, p. 569–579, 2000.
- MORTON, S. L.; NORRIS, D. R.; BOMBER, J. W. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 157, n. 1, p. 79–90, 1992.. Disponível em: DOI: 10.1016/0022-0981(92)90076-M. Acesso em: 02 abr. 2020.
- MOORE R.; PAUL J. Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate. **Science**, vol.172, p.495-498, 1971. Disponível em: DOI: 10.1126/science.172.3982.495. Acesso em: 05 abr. 2020.
- NEVES, R. A. F.; FERNANDES T.; NEVES L. D. S.; NASCIMENTO M. S. Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175168>. Acesso em 2 abr. 2020.
- NASCIMENTO, S.M.; CORRÊA E. V.; MENEZES M.; VARELA D.; PAREDES J.; MORRIS S. Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. **Harmful Algae** v. 13, p.1 – 9, 2008.
- PARSONS, M. L.; ALIGIZAKI K.; BOTTEIN M. D.; FRAGA S.; MORTON S. L., PENNA A.; RHODES L. Gambierdiscus and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. **Harmful Algae**, v. 14, p. 107–129, 2012. Disponível em: DOI: 10.1016/j.hal.2011.10.017. Acesso em: 2 abr. 2020.
- PAVAUX, A. S.; BERDALET, E.; LEMÉE, R. Chemical ecology of the benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis*: review of progress and future directions. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 498, 2020.. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00498>. Acesso em 30 nov. 2021.
- PENNA, A.; FRAGA S.; BATTOCCHI C.; CASABIANCA S.; GIACOBBE M.G.; RIOBO P.; VERNESI C. Department *et. al.* A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. **Journal of biogeography** v.37 p.830-841, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2009.02265.x. Acesso em 5 abr. 2020.

- PROENÇA, L. A. O.; BOEMER G. L.; DIAS J. P.; HATHERLY M.M.; MENDES I.L.; MENDES L. A. M.; MENDES M. C. Q.; ROSSI W. C.; TAMANHA M.S.; TENENBAUM D. R.; SCHRAMMET M. A. Can the cases of airborne intoxication of beach users in south coast of Bahia(16°24'S – 39°.02'W) be related to microalgae? **Open Science Meeting on HABs in Benthic Systems**, Honolulu, 2010.
- SANSONI, G.; BORGHINI B.; CAMICI G.; CASOTTI M.; RIGHINI P.; RUSTIGHI C. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. **Biologia Ambientale** p.17–23, 2003.
- SHEARS, N. T.; ROSS P. M. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. **Harmful algae**, v.8, p. 916-925, 2009. Disponível em: DOI: 10.1016/j.hal.2009.05.003. Acesso em: 2 abr. 2020.
- TIBIRIÇÁ, C. E. J. A.; LEITE I. P.; BATISTA T. V. V.; FERNANDES L. F.; CHOMÉRAT N.; HERVE F.; HESS P.; MAFRA L.L.J. *Ostreopsis cf. ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin Profile and Contamination of Mussels and Marine Plastic Litter. **Toxins**, v.11, p.446, 2019. Disponível em: DOI:10.3390/toxins11080446. Acesso em:05 abr. 2020.
- TIBIRIÇÁ, C. E. J. A. **Dinoflagelados bênticos em areas de costões rochosos e recifes: Distribuição, toxinas e impactos potenciais**.2020. Dissertação (Doutorado em em Sistemas Costeiros e Oceânicos) – Setor Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná (PR), 2020. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/69250>. Acesso em: 01 dez. 2021.

ANEXO 1 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE ESTUDOS DO MAR
Laboratório de Microalgas



Teste de toxicidade com *Ostreopsis cf. ovata* sobre *Artemia* sp.

1. Protocolo de eclosão dos cistos de artêmia.

1.1 Material:

3 garrafas Eppendorf de 2 Litros com tampas

Aerador e mangueiras para conectar as garrafas

Água do mar filtrada e autoclavada

Câmara incubadora D.B.O com temperatura controlada a 25 ± 2 °C

Becker 50 ml

Balança de precisão

2. Procedimentos analítico para eclosão

Passo 1: Pesagem dos cistos

Adicionar 0.3g de cistos em um Becker, pesar na balança de precisão.

Passo 2 : Hidratação dos Cistos

Adicionar os cistos pesados a garrafa eppendorff com dois litros de água do mar filtrada e esterilizada (salinidade: 30-32).

Passo 3: Eclosão dos Cistos

Levar a garrafa com os cistos para incubadora D.B.O com temperatura controlada 25 ± 2 °C fotoperíodo 12:12 (claro: escuro) e conectar o aerador as tampas da garrada eppendorff. Deixar de 24 a 48h até a eclosão de todos os cistos.

Passo 4: Separação córion dos náuplius de artêmia

Agora é hora de retirar a garrafa com os cistos eclodidos da incubadora e separar as cascas (córion) dos náuplius já eclodidos. Para isso será necessário mais duas garradas eppendorf com 0.8 L de água do mar filtrada e autoclavada e uma mangueira. Colocar a mangueira no fundo da garrafa utilizada para eclosão e posicionar está em um nível mais alto que as outras duas garrafas e com ajuda de uma seringa iniciar o fluxo de agua (sifonamento) de uma garrafa para outra. O volume da garrada de eclosão será dividido entre as duas novas garradas, onde cada uma ficara com volume final de 1,8 litros com os náuplius eclodidos. Os cistos

quando são de boa qualidade flutuam por isso manter sempre a mangueira no fundo da garrafa afim de minimizar o transporte das cascas que estarão flutuando.

Passo 5: Alimentação

Alimentar os organismos com *Tetraselmis* sp. Neste momento muitos dos náuplius ainda estão se alimentando das reservas energéticas que o cistos forneceram a elas, então deve se colocar pouco alimento para prevenir que os primeiros organismos eclodidos não passem fome, mantendo também a qualidade da água.

Passo 6: Alimentação

A quantidade de alimento varia de acordo com a concentração dos cultivos de *T. suecica*. Deve se colocar alimento até a água ficar levemente esverdeada, após dois dias a água estará praticamente transparente então deve se dar mais alimento e assim por diante. Caso a garrafa chegue ao seu máximo volume, retirar um pouco do volume. Para retirar um pouco do volume utilizamos uma mangueira com um tecido de 200 μm em sua ponta com o auxílio de uma seringa puxamos o volume desejado sem que os organismos venham junto.

Passo 7: Limpeza da água e mudança de recipiente

A cada 10 dias deve ser substituída as garrafas para manter um ambiente de qualidade para os indivíduos crescerem saudáveis. Uma peneira de 200 μm é utilizada para concentrar os indivíduos. Depois de concentrado passar para a nova garrafa com água fresca com o auxílio de um funil as artêmias são transportadas para uma nova garrafa. Alimentar elas conforme o passo 6.

Após 30 dias as artêmias já devem estar na fase adulta e estão prontas para o experimento.

3. Experimento com Artêmias

3.1 Materiais

25 placas de cultivo com 12 poços cada

4 litros de água do mar filtrada e esterilizada

Micropipeta e ponteiras

Lugol (diluído 10%)

Tubos de ensaio dois para cada concentração e 4 para controle

Contador

Microscópio com câmera acoplada

Câmaras de contagem Sedgewick Rafter
 Cultivos de artêmias adulto
 Cultivos de *Ostreopsis cf. ovata*
 Cultivo de *Tetraselmis* sp.
 Pipetas de plástico (ponta cortada)
 Pipetador e pipetas
 Bandejas
 Saco Plástico escuro
 Medidor pH e Medidor de OD
 Termômetro
 Régua
 Pinça
 Microondas
 Fluxo laminar
 Autoclave

4. Procedimentos Analíticos

4.1 Aclimação

Passo 1: Esterilizar ambiente em que ocorrerá o experimento.

Ligar a luz ultravioleta por 3 minutos no fluxo laminar para esterilizar o fluxo.

Em seguida ligar as luzes e a exaustão do fluxo laminar.

Passo 2: Preparação da dieta de aclimação

Retirar uma alíquota do cultivo, fixar com lugol diluído em 10% e colocar em uma câmara de contagem Sedgewick Rafter. Em seguida com o auxílio de microscópio e de um contador, quantificar o número de células mL⁻¹ do cultivo. No caso da *Tetraselmis* sp. pode se diluir a alíquota do cultivo para facilitar a contagem.

A dieta de aclimação deve atender a 150 ngC.ind⁻¹.h⁻¹ durante 12 horas de aclimação:

$$\begin{array}{lcl}
 \text{Alimento (ngC.ind}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)} & \rightarrow & \frac{150}{(0,1 * 12)} = 18000 \text{ células mL}^{-1} \\
 \text{Concentração do Alimento (ngC)} & \rightarrow & \leftarrow \text{ duração (horas)}
 \end{array}$$

Preparar 500 ml de dieta de aclimação:

$$\begin{array}{l} \text{Exemplo:} \quad \text{células mL}^{-1} \rightarrow \frac{18000}{(411.600 * 500)} = 21,8 \text{ ml de cultivo} \\ \text{Concentração cultivo células mL}^{-1} \rightarrow \quad \quad \quad \leftarrow \text{Volume da dieta} \\ \text{(ml)} \end{array}$$

Então, 21,8 ml de cultivo são diluídos em 478,2 mL de água do mar filtrada e autoclavada. Separar a dieta de aclimação em um local abrigado de luz até os próximos passos serem concluídos.

Passo 3: Disposição das placas de cultivo

As placas de cultivos autoclavadas são dispostas em 8 colunas (concentrações) por 3 linhas (Réplicas) dentro do fluxo laminar. Em seguida devemos adicionar 2 ml de água do mar filtrada e autoclavada em cada poço com o auxílio de um pipetador.

Passo 4: Hora de pescar as artêmias

Pegar uma pipeta plástica nova e cortar sua ponta a fim de que as artêmias passem por ela sem que sejam espremidas. Em seguida dispor as artêmias em bandejas limpas e esterilizadas. Agora sim colocar uma artêmia por poço em cada placa. Tomar cuidado para não estressar as artêmias nesse momento.

Passo 5: Dieta de aclimação

Adicionar 1 ml da dieta de aclimação (Passo 2) em cada poço utilizando o pipetador. Após a adição da dieta, tampar as placas com as suas respectivas tampas e cobrir com um saco plástico escuro, para evitar que as microalgas realizem a fotossíntese. Está iniciada a aclimação que terá duração de 12 horas.

Passo 6: Preparação da dieta tóxica

No dia de encerramento da aclimação, chegar algumas horas antes para preparar a dieta tóxica.

Homogeneizar o cultivo de *Ostreopsis cf. ovata* por alguns segundos, pois os grumos deixam as células muito agregadas. Em seguida retirar uma pequena alíquota no máximo 5 ml, ela deve ser fixada com lugol (diluído em 10%) parte dela será para contagem das células utilizando a câmara de contagem. A outra parte será utilizada para fotografar as células aleatoriamente e retirar medidas (comprimento, largura e altura das células), utilizando um microscópio com câmera acoplada e um

software que de para realizar essas medidas. No mínimo 30 células devem ser medidas para fazer as médias e calcular o biovolume das cepas tóxicas e não tóxicas.

Calculo Biovolume

$$V = \pi/6 * w * l * h$$

V= volume

$\pi/6$ = Aproximação do formato geométrico das células de *Ostreopsis* sp.

W= comprimento média das células

l = Largura média das células

h = Altura média das células

Esse cálculo determina o peso das células em ngC/Célula.

Para se saber a concentração das células que será usado no controle e na dieta tóxica basta dividir a concentração de alimento por indivíduo por hora pelo biovolume das células toxicas e não tóxicas e multiplicar esse valor pelo tempo de duração do experimento.

Por exemplo:

$$\begin{aligned} \text{ngC.ind}^{-1}.\text{h}^{-1} &\rightarrow \frac{150}{\text{Biovolume célula}} * 48 \leftarrow \text{Duração experimento(horas)}. \\ \text{Biovolume célula}(\text{ngC/célula}) &\rightarrow 0,1 \\ &= 72000 \text{ células} \end{aligned}$$

Tendo esse resultado basta dividir o número de células pelo volume de dieta que será adicionado em cada poço. Neste exemplo a Dieta tóxica terá volume máximo de 2 ml.

$72000 \text{ Células}/2 \text{ ml} = 36000 \text{ células mL}^{-1}$. Está é a Concentração de células que deverá ter em cada poço na dieta controle.

Basta fazer o mesmo com a células não tóxicas

$$\begin{aligned} \text{ngC.ind}^{-1}.\text{h}^{-1} &\rightarrow \frac{150}{\text{Biovolume célula}} * 48 \leftarrow \text{Duração experimento(horas)} \\ \text{Biovolume célula}(\text{ngC/célula}) &\rightarrow 3,2 = 2250 \text{ células} \\ [\text{C tóxica da dieta}] &= 2250 \text{ células}/2 \text{ mL} = 1125 \text{ células mL}^{-1} \end{aligned}$$

O volume total dos poços é de 6 ml, porém utilizamos apenas 5 ml do volume por tanto devemos considerar a diluição total das dietas tóxicas e não tóxicas em 5 ml.

Sendo assim:

$$[\text{C controle}] = 72000/5 = 14\ 400 \text{ células mL}^{-1}$$

$$[\text{C tóxica}] = 2250/5 = 450 \text{ células mL}^{-1}$$

Sabendo que o cultivo não tóxico tem uma concentração 1.591.667 células mL⁻¹ e que precisamos diluir essa concentração até chegar a 14 400 células mL⁻¹ sendo necessário 125 ml de dieta controle. Basta diluir 2,8 ml do cultivo em 122,2 ml de água do mar filtrada e autoclavada.

Já para a dieta tóxica que tem uma concentração máxima de 15 300 células mL⁻¹ e precisamos diluir até chegar a 450 células mL⁻¹. Será necessário um volume de 125 ml para preparar o tratamento T7. Basta diluir 9,2 ml do cultivo tóxico em 115,8 ml de água do mar filtrada e autoclavada.

As demais concentrações da dieta tóxica passam por sucessivas diluições:

Para preparar o T6 basta retirar 62,5 ml de T7 e diluir em 62,5 ml de água do mar e assim sucessivamente até chegar ao T1.

O T8 é a concentração máxima do cultivo então basta apenas 60 ml do cultivo bruto.

Passo 7: Final da aclimação

Após 12 horas, verificar se todos organismos estão vivos, caso ocorra alguma morte os organismos devem ser retirados e armazenados em um tubo eppendorf e fixado com lugol. Caso algum organismo esteja com comportamento estranho deve ser anotado. No final da aclimação é muito importante realizar as medidas dos parâmetros (pH, Oxigênio Dissolvido e temperatura).

4.2 Início do Experimento

Passo 1: Adição das Dietas

Com a dieta tóxica e controle já calculadas no passo 6 basta adicionar 2 ml da dieta não tóxica em cada tratamento de acordo com suas respectivas concentrações. Com o auxílio de um pipetador as dietas devem ser aplicadas em ordem crescente de concentração iniciando com controle e em seguida as concentrações tóxicas de T1 a T8. Após a aplicação das dietas deve se tampar as placas e cobrir com um saco escuro afim de evitar a multiplicação das células. Está iniciado o experimento.

Passo 2: Observações

O experimento é observado 1, 3 ,6 e 12 horas após o seu início. Em cada observação deve se ver como estão os organismos e classificar como nadando, no fundo, morrendo ou morto. Em caso de morte os organismos devem ser retirados,

fixados e armazenados de acordo com seu tratamento e réplica para serem medidos posteriormente.

Passo 3: Final do experimento

O experimento é encerrado após 12 horas de exposição todos os organismos no final do experimento devem ser fixados vivos ou mortos e armazenados de acordo com suas respectivas concentrações. Os parâmetros devem ser medidos novamente no final do experimento para garantir que os organismos não sofreram com desequilíbrio de pH, temperatura e OD.

Passo 4: Medição das artêmias

As artêmias são dispostas em uma placa de Petri e medidas uma a uma com o auxílio de uma pinça para manipular os indivíduos e uma régua para medir seus comprimentos.

5. Considerações Finais

5.1 Limpeza

As placas de cultivos utilizadas durante o experimento devem ser lavadas com água e sabão neutro e esterilizadas no microondas. Os resquícios das dietas que estiverem nas placas devem ser descartados em uma garrafa e clorado.

As garrafas e suas tampas utilizadas no cultivo de artêmia e *T.suecica* devem ser lavadas com água e sabão neutro depois são levadas ao ácido (HCL). Retirar do ácido somente após 24 horas, as garrafas devem ser enxaguadas com água doce e água destilada.

As pipetas utilizadas no pipetador, as bandejas, as mangueiras e o funil utilizados devem ser lavadas e esterilizadas com cloro, depois de enxaguadas e secas estão prontas para o uso novamente.

