



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA

NARA DE AZEVEDO GARCIA

POTENCIAL TÓXICO DE *CHATTONELLA SUBSALSA* (RAPHIDOPHYCEAE)
ISOLADA DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, BRASIL

ARRAIAL DO CABO/RJ

2018

NARA DE AZEVEDO GARCIA

**POTENCIAL TÓXICO DE *CHATTONELLA SUBSALSA* (RAPHIDOPHYCEAE)
ISOLADA DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonzalez Rodriguez.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Salomon.

ARRAIAL DO CABO/RJ

2018

NARA DE AZEVEDO GARCIA

**POTENCIAL TÓXICO DE *CHATTONELLA SUBSALSA* (RAPHDOPHYCEAE)
ISOLADA DA BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Manildo Marcião de Oliveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense (IFF)

Dr. Lohengrin Dias de Almeida Fernandes
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)

Dra. Maria Helena Campos Baeta Neves
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)

Dra. Eliane Gonzalez Rodriguez
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)
Professora Orientadora – Presidente da Banca Examinadora

Arraial do Cabo, 29 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha orientadora Eliane Gonzalez Rodriguez e ao meu coorientador, Prof. Paulo Sérgio Salomon, pelo conhecimento e ensinamentos passados ao longo do período de produção desta dissertação, e ao CNPq pela bolsa a mim concedida.

À professora e, atualmente, coordenadora do Programa de Pós-graduação IEAPM/UFF, Maria Helena, pela ajuda e por todo o conhecimento passado.

Ao técnico do Laboratório de Cultivo de Microalgas do IEAPM, Luciano, pela ajuda com as microalgas e pelas boas conversas e, ao Márcio pela ajuda nas coletas.

Ao professor Lohengrin, por sempre ser tão solícito em ajudar no que fosse necessário.

Ao amigo e grande conhecedor da fauna e flora de Arraial do Cabo, Paulo Cordeiro e ao Alexandre Kassuga, por terem me ajudado com o cultivo de artêmias.

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-graduação, pela transmissão e troca de conhecimentos, encontros, conversas e experiências compartilhadas, que nos tornaram cada vez mais unidos. Um abraço repleto de gratidão, especialmente, para Wladimir, Isabel, Simone, Camila, Noreyni, Daniel, Isis e Dayse.

Ao meu marido, Yury, por estar ao meu lado, partilhando tanto de momentos bons, como de ruins, mas sempre me ajudando como podia e me dando a força necessária para não desistir.

À minha mãe, Rosa Maria, por todo o apoio dedicado em todos os momentos da minha vida. Com certeza, sem seu apoio e empenho esse sonho teria se realizado.

Ao meu padrasto, Ocleci, por todo o conhecimento, sabedoria e mimos, a mim transmitidos no decorrer desses 25 anos de convivência.

Aos amigos, em especial, Aline e Alenne, que sempre tentam se fazer presente, na medida do possível.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para conseguir”.

Dalai Lama

RESUMO

Alguns grupos de microalgas possuem espécies com capacidade de sintetizar substâncias tóxicas, produzir alta biomassa e/ou mucilagem formando assim, florações algais nocivas, que podem causar eventos de mortandade da fauna aquática e, em alguns casos, até problemas de saúde em humanos. Dentre essas microalgas, *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) possui diversas espécies causadoras de florações algais nocivas. No presente estudo, foi analisado o potencial tóxico de seis linhagens de *C. subsalsa* isoladas da Baía de Guanabara em náuplios de *Artemia* sp. Os testes toxicológicos mostraram que todas as linhagens de *C. subsalsa* foram altamente tóxicas aos náuplios de *Artemia* sp., principalmente na fase de crescimento exponencial, onde os níveis de mortalidade ultrapassaram 60%. Testes realizados com células coletadas na fase estacionária de cultivo (17 e 23 dias após o inóculo) apresentaram respostas distintas, sugerindo que a toxicidade das linhagens diminui com o passar do tempo, já que os valores de CL_{50} , de modo geral, foram menores para 17 dias de cultivo do que para 23 dias de cultivo. A diferença na toxicidade entre as seis linhagens estudadas, em alguns casos, foi de cerca de cinco vezes, indicando alta variabilidade intra-específica desta característica. As médias das taxas de crescimento específica das linhagens cultivadas com 20 de salinidade, temperatura de, aproximadamente, 26° C, 210 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e foto período 16:8h (claro:escuro) variaram entre 0,56 a 0,87 dia^{-1} , indicando alto potencial de crescimento de *C. subsalsa* da Baía de Guanabara. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a toxicidade e altas taxas de crescimento das células de *C. subsalsa* isoladas da Baía de Guanabara. Portanto, florações desta espécie de rafidofíceas apresentam um grande risco à ictiofauna da Baía de Guanabara, especialmente durante a fase de formação das florações onde a toxicidade das células foi maior. O papel de *C. subsalsa* nos frequentes casos de mortandade massiva de peixes neste sistema estuarino necessita de monitoramento intenso e contínuo para ser elucidado.

Palavras-chave: florações algais nocivas, *Chattonella subsalsa*, Baía de Guanabara.

ABSTRACT

Some groups of microalgae have species with the ability to synthesize toxic substances, produce high biomass and/or mucilage, thus forming harmful algal blooms, which can cause events ranging from aquatic fauna and some cases humans too. Among these microalgae, *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) has several species that cause harmful algal blooms. In the present study, the toxic potential of six strains of the *C. subsalsa* isolated from the Guanabara Bay was tested in nauplii of the *Artemia* sp. Toxicological tests showed that all strains of *C. subsalsa* were highly toxic to nauplii of the *Artemia* sp. mainly in the exponential growth phase, where mortality levels exceeded 60%. Tests performed with cells collected at the stationary phase of culture (17 and 23 days after inoculation) presented different responses, suggesting that the toxicity of the strains decreased over time, because the values of the LC₅₀, generally, were less in 17 days of culture than in 23 days of culture. The difference in toxicity among the six strains studied was about five times, indicating high intra-specific variability of this trait. The specific growth rates of cultivated strains with 20‰ of the salinity, 26° C, approximately, of the temperature, 210 μmol photons.m⁻².s⁻¹ of the light intensity, photo period 16:8h (light:dark) ranged from 0,57 to 0,86 day⁻¹, indicating high growth potential of *C. subsalsa* from Guanabara Bay. These high growth rates favor the appearance of blooms. The results evidenced a great toxicity and growth of the *C. subsalsa* cells isolated from the Guanabara Bay. Therefore, blooms of this species of raphidophytes present a great risk to the ichthyofauna of the Guanabara Bay, especially during the phase of formation of the blooms where the cells must be more toxic. The role of *C. subsalsa* in the frequent cases of massive fish mortality in this estuarine system requires intense and continuous monitoring to be elucidated.

Keywords: harmful algal bloom, *Chattonella subsalsa*, Guanabara Bay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ciclo de vida e fases do desenvolvimento do microcrustáceo, *Artemia* sp., utilizado nos testes toxicológicos do presente estudo.....19
- Figura 2 – Cultivos de *Chattonella subsalsa* nas instalações do Laboratório de Microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). As bandejas na parte inferior direita da imagem são as unidades experimentais dos ensaios de toxicidade com *Artemia* sp.....20
- Figura 3 – Câmara de *Malassez* utilizada para contagem de células das linhagens de *C. subsalsa*.....21
- Figura 4 – Conjunto de quinze unidades experimentais de 50 mL do teste de toxicidade para uma linhagem de *C. subsalsa*, realizado na fase exponencial. Cada unidade experimental contém 20 náuplios de *Artemia* sp. Cada coluna apresenta um volume de cultivo de *C. subsalsa*, em triplicata, em que os náuplios foram expostos. O volume do cultivo de *C. subsalsa* aumenta da esquerda para a direita. A coloração marrom observada nos frascos da direita da imagem é causada pela presença das células da rafidofíceia.....22
- Figura 5 – Células de *C. subsalsa* de uma das linhagens estudadas que foram fixadas com solução de Lugol para realização da contagem celular até $1,0 \times 10^2$ células.mL⁻¹ em câmara de *Malassez*. Escala de 25 μ m.....24
- Figura 6 – Curvas de crescimentos das seis linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos em um total de 23 dias de cultivo. CCRM0023 (○); CCRM0024 (□); CCRM0025 (▲); CCRM0026 (△); CCRM0027 (●) e; CCRM0028 (■)26
- Figura 7 – Taxas de crescimento específica das seis linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos. Os box-plots foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de taxas de crescimento de cada linhagem estudada. Cada box-plot apresenta a média (□), os valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o desvio padrão (⊥).....27
- Figura 8 – Percentual de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. expostos, por 24h, às células vivas das linhagens de *C. subsalsa*, nas concentrações de $1,0$ e $4,0 \times 10^3$

células.mL⁻¹, nas fases de crescimento: (a) exponencial; (b) primeiro momento da estacionária (17 dias de cultivo) e; (c) segundo momento da estacionária (23 dias de cultivo). Os box-plots foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de mortalidade de náuplios expostos às linhagens de *C. subsalsa*. Valor médio (\square), valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o erro da estimativa (\perp).....29

Figura 9 – Percentual de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. expostos, por 48h, às células vivas das linhagens de *C. subsalsa*, nas concentrações de 1,0 e 4,0 x 10³ células.mL⁻¹, nas fases de crescimento: (a) exponencial; (b) primeiro momento da estacionária (17 dias de cultivo) e; (c) segundo momento da estacionária (23 dias de cultivo). Os box-plots foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de mortalidade de náuplios expostos às linhagens de *C. subsalsa*. Valor médio (\square), valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o erro da estimativa (\perp).....30

Figura 10 –Valores de CL₅₀, obtidos com o método Probit, das linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos no primeiro momento da fase estacionária (17 dias de cultivo), para 24 (preto) e 48h (cinza) de exposição dos náuplios de *Artemia* sp. as linhagens.....32

Figura 11 –Valores de CL₅₀, obtidos com o método Probit, das linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos no segundo momento da fase estacionária (23 dias de cultivo), para 24 (preto) e 48h (cinza) de exposição dos náuplios de *Artemia* sp. as linhagens.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Volume e porcentagem do cultivo que foram utilizadas em cada unidade experimental nas diferentes fases de crescimento de <i>C. subsalsa</i>	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
RN	Rio Grande do Norte
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
CL ₅₀	Concentração letal mediana
TL ₅₀	Tempo letal mediano
U	teste de <i>Mann-Whitney</i>
ANOVA	Análise de Variância
W	teste <i>Shapiro-Wilk</i>
spp.	espécies
sp.	espécie
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
ppm	partes por milhão
HAB	<i>Harmful Algal Blooms</i>
STX	saxitoxina
GTX2-3	Goniautoxinas2-3

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	mililitro
h	hora
° C	graus Celsius
mm	milímetros
%	por cento
μm	micrômetro
>	maior que
μmol	micromolar
O ₂ ⁻	ânion superóxido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
OH ⁻	radical hidroxila
pCO ₂	pressão parcial de gás carbônico
pO ₂	pressão parcial de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 HIPÓTESES.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 ECLOSÃO DOS CISTOS DE <i>Artemia</i> sp.....	19
4.2 CULTIVO DE <i>Chattonella subsalsa</i>	20
4.3 TESTE DE TOXICIDADE.....	22
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4.4.1 Teste de normalidade.....	24
4.4.2 Teste de homocedasticidade.....	25
4.4.3 Comparação entre duas amostras independentes.....	25
4.4.4 Comparação entre várias amostras independentes.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	26
5.2 MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE <i>Artemia</i> sp.....	27
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
7.1 CONCLUSÕES.....	44
7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Microalgas (protistas fotossintetizantes e cianobactérias) desempenham um importante papel na teia trófica de ambientes aquáticos. Diversos fatores tanto bióticos, como abióticos, podem interferir na estrutura e na composição da comunidade formada pelas mesmas (CASTRO; MOSER, 2012; MARSHALL, 2016). Alguns grupos de microalgas, como, por exemplo, diatomáceas, dinoflagelados, cianobactérias e rafidofíceas, possuem espécies com capacidade de sintetizar ficotoxinas, produzir alta biomassa e/ou mucilagem, formando assim, florações algais nocivas (MASÓ; GARCÉS, 2006; CASTRO; MOSER, 2012; PETTERSSON; POZDNYAKOV, 2012). Essas florações algais nocivas, conhecidas pela sigla FANs (em inglês, HABs – *Harmful Algal Blooms*), podem intoxicar diversos organismos, como peixes e mariscos, e em alguns casos até seres humanos, sendo este último devido ao consumo de organismos contaminados (NÚÑEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2011; CASTRO; MOSER, 2012; SELLNER, 2016). Algumas intoxicações são nomeadas de acordo com os sintomas apresentados em humanos e podem causar problemas respiratórios e intestinais, irritações na pele e, em casos mais graves, até a morte (CASTRO; MOSER, 2012; PETTERSSON; POZDNYAKOV, 2012). Dentre as enfermidades mais conhecidas causadas pela ingestão de toxinas acumuladas em moluscos estão: 1) Envenenamento diarreico por moluscos (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* - DSP) causada pelo ácido ocadáico e análogos; 2) Envenenamento paralisante por moluscos (*Paralytic Shellfish Poisoning* - PSP) causada por saxitoxina e análogos; 3) Envenenamento amnésico por moluscos (*Amnesic Shellfish Poisoning* - ASP) causada pelo ácido domóico e análogos; 4) Envenenamento neurológico por moluscos (*Neurotoxic Shellfish Poisoning* - NSP) causada por brevetoxina e análogos (HALLEGRAEFF, 2003; CASTRO; MOSER, 2012; PETTERSSON; POZDNYAKOV, 2012).

Diversas espécies de microalgas nocivas são apontadas como potenciais produtoras de toxinas e em alguns casos estão associadas a prejuízos na aquicultura, por causarem massiva mortalidade de peixes nas áreas costeiras de todo o mundo (KEPPLER *et al.*, 2006; BASTI *et al.*, 2016; GLIBERT, 2016). Alguns exemplos de espécies potencialmente tóxicas são *Alexandrium tamarense* (NATSUIKE *et al.*, 2017), *Dinophysis acuminata* (MAFRA *et al.*, 2015), *Karenia brevis* (BROVEDANI *et*

al., 2016) *Pseudo-nitzschia* sp. (TASKER, 2016), *Microcystis aeruginosa* (SOARES *et al.*, 2006), *Chattonella marina* (PADMAKUMAR *et al.*, 2011) e *Fibrocapsa japonica* (de BOER *et al.*, 2012).

Os gêneros *Heterosigma*, *Chattonella* e *Fibrocapsa* pertencem ao grupo das rafidofíceas, flagelados, unicelulares, cosmopolitas, que contém clorofila *a* e *c₁* e/ou *c₂* e carotenóides, como, fucoxantina, diadinoxantina e violaxantina (IMAI; YAMAGUCHI, 2012; KLÖPPER *et al.*, 2013; BASTI *et al.*, 2016; Horiguchi, 2017). Os mecanismos de toxicidade desse grupo ainda não são muito bem conhecidos (BASTI, *et al.*, 2016; Horiguchi, 2017). Alguns dos efeitos causados pela toxicidade das rafidofíceas têm sido propostos, entre eles: entupimento das brânquias causando sufocamento (HISHIDA; ISHIMATSU; ODA, 1997); produção da neurotoxina brevetoxina (FUREY *et al.*, 2007); produção de citotoxina hemolítica resultando em lesão no tecido branquial e comprometendo o transporte de oxigênio (KURODA *et al.*, 2005). Alguns autores também propõem mecanismos que podem ocorrer separadamente ou em uma complexa sinergia, como é o caso de espécies reativas de oxigênio (ERO, sigla em inglês, ROS) resultando em estresse oxidativo e, consequente peroxidação lipídica, e em secreção de exsudatos bio-ativos e ácidos graxos (MARSHAL *et al.*, 2003; MARSHALL *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2010). Espécies oxigênio reativas são moléculas instáveis que podem modificar proteínas, DNA e lipídios e, são formadas pela redução de O₂, produzindo diversos compostos, dentre eles peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH⁻) e radical superóxido (O₂⁻) (SILVA; GONÇALVES, 2010; LUSHCHAK, 2011; RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

O gênero *Chattonella* possui diversas espécies que são causadoras de florações, como: *C. marina*, *C. antiqua*, *C. minima*, *C. ovata* e *C. subsalsa* (QIU *et al.*, 2010; BASTI *et al.*, 2016). Este gênero foi causador da mortandade de peixes em diversos países, como no Canadá (ESENKULOVA; HAIGH, 2014), Estados Unidos (GÁRATE-LIZÁRRAGA; GONZÁLEZ-ARMAS, 2014), Cuba (MOREIRA-GONZÁLEZ; COMAS-GONZÁLEZ, 2014), Japão (QIU *et al.*, 2010) e México (NÚÑEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2011; PÉREZ-MORALES; BAND-SCHMIDT; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2017). Na América do Sul, este gênero já foi registrado no sul do Brasil em 1995, na Lagoa dos Patos (RS) e nestas amostras também estavam presente *F. japonica* (ODEBRECHT; ABREU, 1995). No estado do Rio de Janeiro há registros da ocorrência de *Chattonella*

spp. na Baía de Sepetiba (TENENBAUM *et al.*, 2004) e desde 1979 há relatos na Baía de Guanabara (SEVRIN-REYSSAC *et al.*, 1979). Recentemente, foi observada a presença de células desse gênero em períodos de eventos de mortandade de peixes na Baía de Guanabara (FISTAROL *et al.*, 2015).

A Baía de Guanabara é um ambiente estuarino eutrofizado, com aproximadamente 384 Km², que recebe influência, principalmente, do regime de marés e do aporte de água doce, oriundo dos rios que desaguam em sua bacia de drenagem (KJERFVE, 1997; VALENTIN *et al.*, 1999). Este sistema também é altamente impactado pela descarga de efluentes antrópicos, muitas vezes sem tratamento, de milhões de habitantes e indústrias que residem na região metropolitana do Rio de Janeiro (KJERFVE, 1997; VILLAC; TENENBAUM, 2010; AGUIAR; NETO; RANGEL, 2011). Além de ser submetida a variações de maré, a Baía de Guanabara também é influenciada por variações sazonais, e ambas as variações criam gradientes espaciais de temperatura, salinidade, turbidez e concentração de nutrientes. Estes gradientes podem influenciar a comunidade planctônica local e, como resposta, favorecer naturalmente a proliferação de espécies oportunistas, incluindo microalgas formadoras de florações nocivas (MAYR *et al.*, 1989; VILLAC; TENENBAUM, 2010; FISTAROL *et al.*, 2015).

Espécies pertencentes a um mesmo grupo e linhagens de uma mesma espécie podem reagir de formas distintas a fatores ambientais como, disponibilidade de nutrientes e luz, mudança de salinidade e temperatura (ZHANG *et al.*, 2006; PETTERSSON; POZDNYAKOV, 2012). Essas diferenças inter e intra-específicas podem refletir em diferenças tanto morfológicas, como em níveis de toxicidade, taxa de crescimento, concentração de pigmentos e requerimentos nutricionais (ZHANG *et al.*, 2006; BAND-SCHMIDT *et al.*, 2012). Apesar dos padrões de ocorrência das florações não serem bem definidos, estes podem estar associados com os mecanismos de resposta de cada linhagem às condições ambientais (ONITSUKA; AOKI; SHIMIZU, 2015).

De acordo com Sissino & Oliveira-Filho (2013; p. 6), a toxicidade é: "...uma propriedade intrínseca que cada substância tem de produzir efeitos danosos a um determinado organismo quando este é exposto, durante um certo período de tempo,

a determinadas doses ou concentrações”. Os efeitos adversos causados pela exposição à agentes tóxicos podem ser caracterizados em agudo e crônico. O efeito agudo é uma resposta severa e rápida em relação ao ciclo de vida do organismo teste. Testes agudos normalmente consideram a letalidade como resposta, usando como estimador a concentração letal mediana (CL₅₀), ou seja, a concentração necessária de uma dada substância que provoca a morte de 50% da população de um organismo no tempo estipulado para o teste. Já o efeito crônico é uma resposta cumulativa de determinada substância, normalmente subletal, que é provocada em um período de tempo relativamente longo em relação ao ciclo de vida do organismo teste (COSTA *et al.*, 2008; SISSINO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

O organismo teste deve apresentar alta sensibilidade a uma variedade de substâncias para que ocorra uma boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados, além de possuir uma fácil manutenção e cultivo em laboratório. A espécie ideal também deve ser de pequeno porte e ter um ciclo de vida curto (COSTA *et al.*, 2008; IHARA; PINHO; FILLMANN, 2010).

Um bom exemplo de organismo teste é o microcrustáceo *Artemia* sp., encontrado naturalmente em água salgada (COSTA *et al.*, 2008). O gênero *Artemia* é utilizado em testes de toxicidade de uma grande variedade de substâncias, devido a facilidade em obtenção de seus cistos, além do baixo custo, e sua manutenção em laboratório (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; COSTA *et al.*, 2008; PIMENTEL *et al.*, 2011). Além disso, a resposta biológica a letalidade desses organismos, inclui apenas a variável morte ou vida (PIMENTEL *et al.*, 2011). Por estas e outras razões o gênero *Artemia* é largamente utilizado como modelo biológico para acessar a toxicidade de microalgas marinhas (YUNES *et al.*, 1996; AYLAGAS *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2017).

Assim, para melhor avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas no organismo escolhido, é necessário a elaboração de testes de toxicidade, utilizando a substância desejada (SISSINO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Diante do exposto acima, o presente estudo utilizou a espécie *Artemia* sp. como organismo teste para avaliar o potencial toxicológico de seis linhagens de *Chattonella subsalsa* isoladas da Baía de Guanabara (RJ).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade de seis linhagens de *Chattonella subsalsa* isoladas da Baía de Guanabara utilizando o microcrustáceo *Artemia* sp. como organismo teste.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a variabilidade intra-específica na toxicidade de *Chattonella subsalsa*;
- b) avaliar o efeito da fase de crescimento (exponencial ou estacionária) na toxicidade de *C. subsalsa*.

3 HIPÓTESES

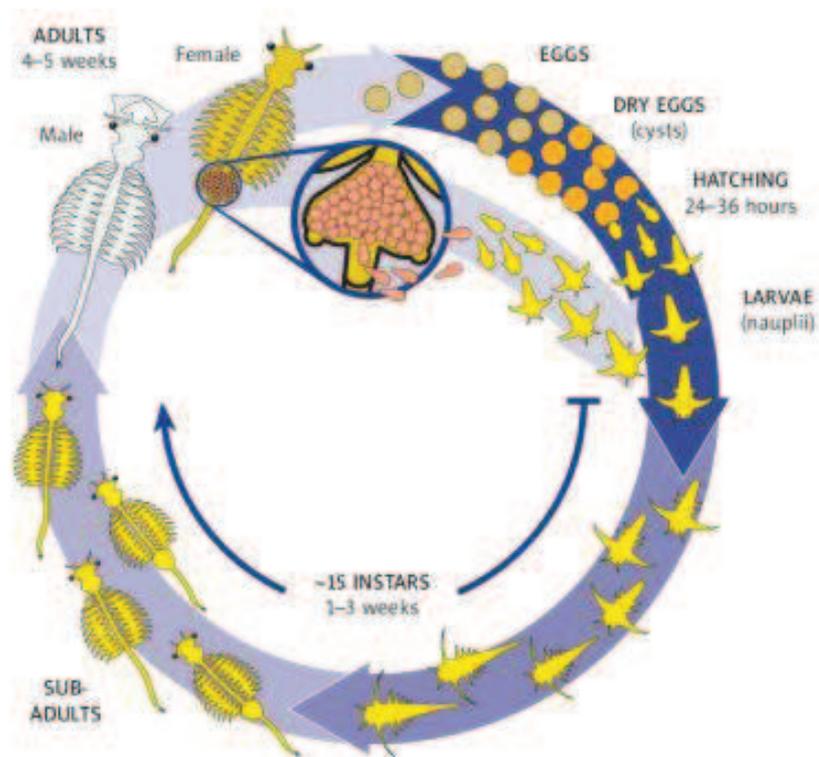
- a) a fase de crescimento *C. subsalsa*, que ocorre na Baía de Guanabara, não influencia na toxicidade;
- b) *C. subsalsa* apresenta toxicidade aguda para náuplios de *Artemia* sp.;
- c) não existe variabilidade intra-específica na toxicidade de *C. subsalsa*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ECLOSÃO DOS CISTOS DE *Artemia* sp.

Os cistos de *Artemia* sp. (fabricados por Artêmia Salina do RN) foram colocados em água do mar filtrada com 20 de salinidade, aeração e luz constantes por 48h, para eclosão dos cistos. Após a eclosão, os náuplios foram separados dos cistos e aclimatados em água do mar, por no máximo, 24h, antes do início dos testes. O esquema abaixo (**figura 1**) mostra as fases de desenvolvimento e o ciclo de vida de *Artemia* sp.

Figura 1 – Ciclo de vida e fases do desenvolvimento do microcrustáceo, *Artemia* sp., utilizado nos testes toxicológicos do presente estudo.



Fonte: Ogello *et al.*, 2014 (modificado)

4.2 CULTIVO DE *Chattonella subsalsa*

Cepas de seis linhagens de *C. subsalsa* (códigos de coleção CCMR0023 à CCMR0028) pertencentes a Coleção de Cultivo de Microalgas da UFRJ (Departamento de Biologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)) foram isoladas da Baía de Guanabara através da citometria de fluxo (FISTAROL *et al.*, 2018). As cepas foram cultivadas em modo batelada, que consiste em apenas uma inoculação das células em um recipiente com meio de cultivo (COUTTEAU, 1996). Os cultivos foram realizados no Laboratório de Microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), em frascos *Erlenmeyer* de 1 e 2 L (**figura 2**).

Figura 2 – Cultivos de *Chattonella subsalsa* nas instalações do Laboratório de Microalgas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). As bandejas na parte inferior direita da imagem são as unidades experimentais dos ensaios de toxicidade com *Artemia* sp.

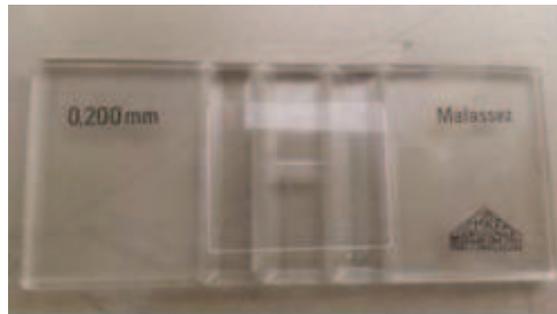


Nos frascos *Erlenmeyer* foram adicionados 30 mL proveniente do inóculo e 470 mL de meio de cultivo F/2 (GUILLARD, 1975), totalizando 500 mL de cultura. Os cultivos cresceram a temperatura de, aproximadamente, 26° C, 20 de salinidade, intensidade luminosa de 210 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e foto período 16:8h (claro:escuro).

O crescimento do cultivo foi constantemente acompanhado através da contagem de células em câmara de *Malassez* de 0,2 mm de profundidade (**figura 3**), utilizando microscópio óptico *Ernst Leitz Wetzlar Germany* com o aumento de 450x.

Após três dias de cultivo, quando um dos frascos atingiu, aproximadamente, $3,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, o teste de toxicidade foi iniciado.

Figura 3 – Câmara de *Malassez* utilizada para contagem de células das linhagens de *C. subsalsa*.



As taxas de crescimento específica (μ) das linhagens de *C. subsalsa* foram obtidas com base no cálculo do crescimento exponencial (r), proposto por Guillard (1973 *apud* WOOD; EVERROAD; WINGARD, 2005), seguindo a **equação 1**:

$$dn/dt=rN \quad (1)$$

na qual a solução é dada pela **equação 2**,

$$N_t=N_0e^{rt} \quad (2)$$

onde N_0 é o tamanho da população no início do intervalo de tempo e N_t é o tamanho da população no final do intervalo de tempo. Resolvendo a equação anterior para r , que é expresso por unidade de tempo (t^{-1}), obtém-se a **equação 3**:

$$r = \frac{\ln(N_t - N_0)}{\Delta t} \quad (3)$$

onde Δt é o intervalo de tempo ($t_t - t_0$) e t_t é referente ao tempo final do intervalo e t_0 é referente ao tempo inicial. A **equação 1** é equivalente a equação clássica de crescimento quando (**equação 4**)

$$r = \mu - m \quad (4)$$

no qual m , a mortalidade, foi considerada igual a 0 (zero), para que a taxa de crescimento específica (μ) seja igual a r .

4.3 TESTE DE TOXICIDADE

Os testes de toxicidade foram realizados através da exposição de náuplios de *Artemia* sp. a diferentes concentrações de células vivas de cada uma das seis linhagens de *C. subsalsa* em duas fases de crescimento, exponencial e estacionária. Ocorreram três testes, o primeiro na fase exponencial com três dias de cultivo e os outros dois testes ocorreram com 17 dias e 23 dias de cultivo das linhagens de *C. subsalsa*.

Os testes foram realizados em triplicata em recipientes plásticos descartáveis de 50 mL (**figura 4**). Cada unidade experimental ou recipiente recebeu 20 náuplios de *Artemia* sp. e diferentes volumes de cultivo (mL) e de água do mar com 20 de salinidade, que totalizavam 40 mL, conforme **tabela 1**. No controle negativo foi utilizado apenas água do mar com 20 de salinidade.

Figura 4 – Conjunto de quinze unidades experimentais de 50 mL do teste de toxicidade para uma linhagem de *C. subsalsa*, realizado na fase exponencial. Cada unidade experimental contém 20 náuplios de *Artemia* sp. Cada coluna apresenta um volume de cultivo de *C. subsalsa*, em triplicata, em que os náuplios foram expostos. O volume do cultivo de *C. subsalsa* aumenta da esquerda para a direita. A coloração marrom observada nos frascos da direita da imagem é causada pela presença das células da rafigofíceia.

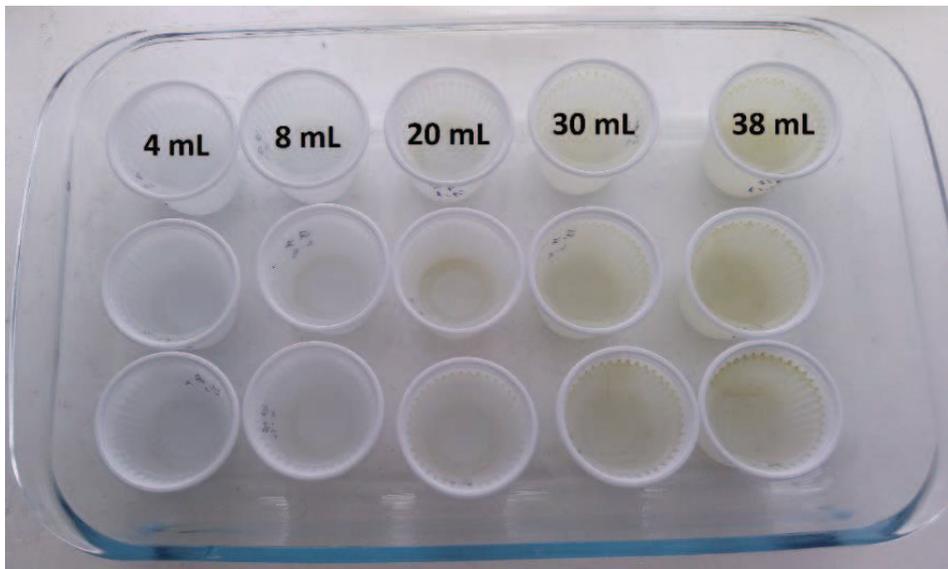


Tabela 1 – Volume (mL) e porcentagem do cultivo que foram utilizadas em cada unidade experimental nas diferentes fases de crescimento de *C. subsalsa*, sendo o volume total de cada unidade experimental de 40 mL.

Exponencial		Estacionária	
Volume (mL) do cultivo de <i>C. subsalsa</i>	% do cultivo de <i>C. subsalsa</i>	Volume (mL) do cultivo de <i>C. subsalsa</i>	% do cultivo de <i>C. subsalsa</i>
4	10	0,4	1
8	20	2	5
20	50	4	10
30	75	8	20
38	95	10	25
-	-	20	50

A letalidade dos indivíduos foi observada em cada unidade experimental, após o período de 24 e 48h. Com base nestes dados, foi possível determinar a CL₅₀ através do método não paramétrico, Probit, utilizando o programa Excel. Este método transforma os dados da curva dose-resposta obtidos nos testes em uma função matemática esperada ou conhecida antes de estimar os valores de CL₅₀ (COSTA *et al.*, 2008).

Uma câmara *Malassez* foi utilizada para a contagem celular, que ocorreu diariamente, até o sexto dia de cultivo, e após, de dois em dois dias, até a densidade celular atingir $1,0 \times 10^2$ células.mL⁻¹. A contagem foi feita imediatamente após a fixação de uma alíquota do cultivo com solução de Lugol (concentração final 1%) (**figura 5**).

Figura 5 – Células de *C. subsalsa* de uma das linhagens estudadas que foram fixadas com solução de Lugol para realização da contagem celular até $1,0 \times 10^2$ células.mL⁻¹ em câmara de *Malassez*. Escala de 25 μ m.



4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises estatísticas detalhadas a seguir foi utilizado o programa STATISTICA® 7.

4.4.1 Teste de normalidade

Para verificar se os dados deste estudo apresentavam distribuição normal, foi aplicado para cada grupo o teste *Shapiro-Wilk*, no qual é calculado o valor de *W*. O poder deste teste é considerado maior, quando comparado com outros testes de normalidade. Neste teste, a condição para que a distribuição dos dados seja considerada normal é $p > 0,05$ (ZAR, 2013).

4.4.2 Teste de homocedasticidade

Para testar a premissa da homocedasticidade entre as variâncias, foi aplicado o teste de *Levene*. Neste teste, a condição para que a distribuição dos dados seja considerada normal é $p > 0,05$ (ZAR, 2013).

4.4.3 Comparação entre duas amostras independentes

Para comparar dois grupos independentes, foi escolhido o teste *t-Student* para amostras independentes, que é um teste paramétrico, quando os dados apresentavam distribuição normal. Já quando os grupos não apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste de *Mann-Whitney* (U), que é um teste não paramétrico. A condição para que a diferença entre os grupos seja considerada significativa é $p < 0,05$ (ZAR, 2013).

4.4.4 Comparação entre várias amostras independentes

Para comparação de vários grupos foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e *Kruskal-Wallis*. A ANOVA é um teste paramétrico e foi utilizada para os grupos que atenderam a premissa da normalidade e homocedasticidade. Já *Kruskal-Wallis* é um teste não paramétrico e foi utilizado para os grupos que atenderam ou não a premissa da normalidade, mas não atenderam a premissa da homocedasticidade. Em ambos os testes, a condição para que a diferença entre os grupos seja considerada significativa é $p < 0,05$ (ZAR, 2013).

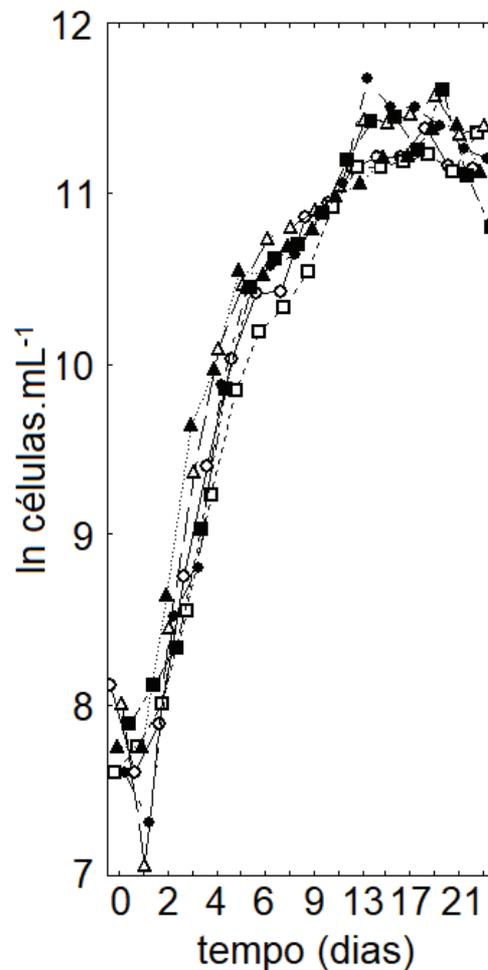
Múltiplas comparações foram realizadas com o desenho experimental da ANOVA unifatorial, utilizando o teste *Tukey HSD*, que compara todos os grupos entre si (ZAR, 2013).

5 RESULTADOS

5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Chattonella subsalsa*

As seis linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos apresentaram curvas de crescimento similares e não foi constatada diferença significativa entre elas ($p=0,86$). Em geral, a fase *lag* foi curta, durando apenas dois dias. A fase exponencial durou, aproximadamente, seis dias (**figura 6**).

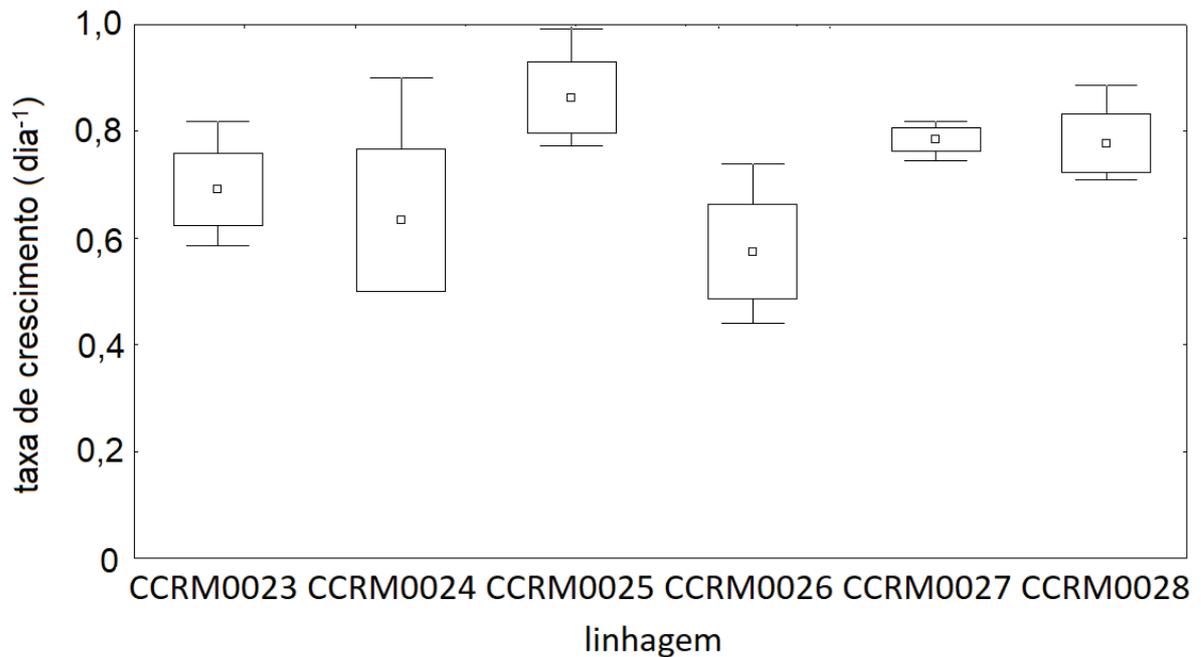
Figura 6 – Curvas de crescimentos das seis linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos em um total de 23 dias de cultivo. CCRM0023 (○); CCRM0024 (□); CCRM0025 (▲); CCRM0026 (△); CCRM0027 (●) e; CCRM0028 (■).



A concentração máxima de células por mL variou entre $8,5 \times 10^4$ a $11,7 \times 10^4$ células.mL⁻¹, referente as linhagens CCRM0024 e CCRM0027, respectivamente, mas não houve diferenças significativas entre as linhagens ($p=0,45$).

As médias das taxas de crescimento específica das linhagens de *C. subsalsa* variaram entre 0,57 e 0,86 dia⁻¹ (**figura 7**), sendo a menor taxa encontrada para a linhagem CCRM0026 (0,43 dia⁻¹) e a maior para a linhagem CCRM0025 (1,0 dia⁻¹). Apesar disso, não foi encontrada diferença significativa entre as linhagens ($p=0,18$).

Figura 7 – Taxas de crescimento específica das seis linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos. Os box-plots foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de taxas de crescimento de cada linhagem estudada. Cada box-plot apresenta a média (□), os valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o desvio padrão (┌┐).



5.2 MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE *Artemia* sp.

Todos os testes toxicológicos apresentaram mortandade de náuplios, independente da fase de crescimento do cultivo de *C. subsalsa*, concentração de células e linhagem da rafidofícea estudada. Células coletadas na fase de crescimento exponencial apresentaram os maiores percentuais de mortalidade, com valores

superiores a 50% e próximos a 100% nas concentrações de $1,0$ e $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, respectivamente (**figura 8-a; 9-a**). Na fase exponencial, as linhagens apresentaram diferença significativa na porcentagem de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. nas concentrações de $1,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, em 24 ($p=0,00$) e 48h ($p=0,01$) de exposição. A linhagem CCRM0025 diferiu das linhagens CCRM0023 ($p=0,01$) e CCRM0024 ($p=0,00$) e a linhagem CCRM0024 diferiu da CCRM0028 ($p=0,02$), em 24h de exposição. Na concentração de $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ ocorreu diferença significativa apenas em 48 h de exposição ($p=0,03$).

Na fase estacionária, independente do momento em que as células foram coletadas (17 dias ou 23 dias de cultivo), a mortalidade de náuplios foi próxima ou menor que 30%, em 24h de exposição (**figura 8-b; c**), e menor que 70%, em 48h de exposição (**figura 9-b; c**). No primeiro momento desta fase, a diferença entre as linhagens foi significativa, independentemente do tempo de exposição e da concentração de células.mL⁻¹, com valores de p igual a 0,00 e 0,01 para $1,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, em 24 e 48h, respectivamente e, 0,04 e 0,00 para $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, em 24h e 48h, respectivamente. As linhagens CCRM0026 e CCRM0028 diferiram uma da outra e, a primeira diferiu também de CCRM0023 e, a segunda de CCRM0024, em $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ em 48h de exposição. Já no segundo momento, a diferença entre as linhagens só foi significativa em $1,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, em 48h de exposição ($p=0,00$).

A mortalidade de náuplios, considerando apenas a concentração de células.mL⁻¹, apresentou diferença significativa entre $1,0$ e $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ ($p<0,05$). A porcentagem de mortalidade foi maior com o aumento da concentração de células.

Figura 8 – Percentual de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. expostos, por 24h, às células vivas das linhagens de *C. subsalsa*, nas concentrações de $1,0$ e $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, nas fases de crescimento: (a) exponencial; (b) primeiro momento da estacionária (17 dias de cultivo) e; (c) segundo momento da estacionária (23 dias de cultivo). Os *box-plots* foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de mortalidade de náuplios expostos às linhagens de *C. subsalsa*. Valor médio (□), valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o erro da estimativa (I).

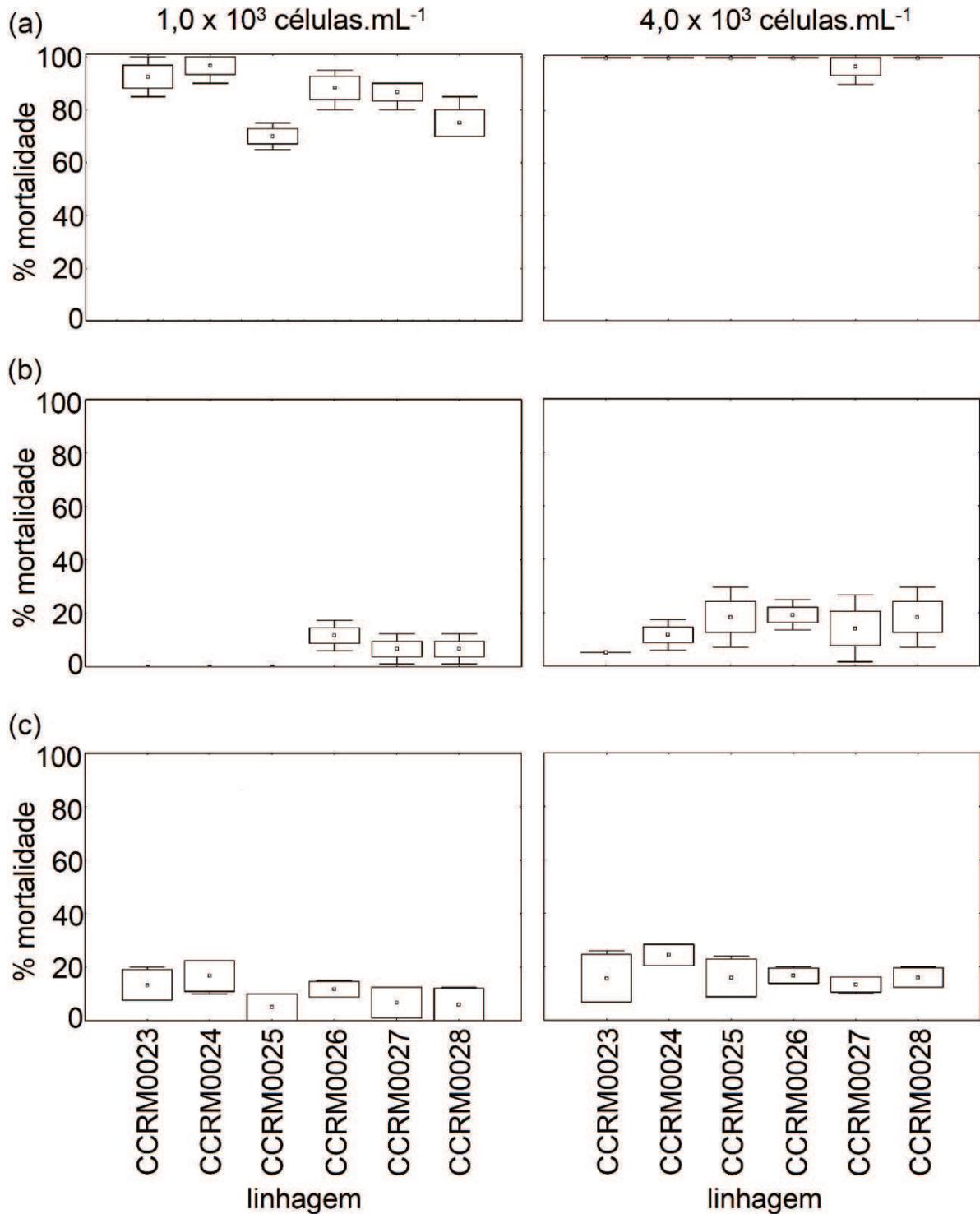
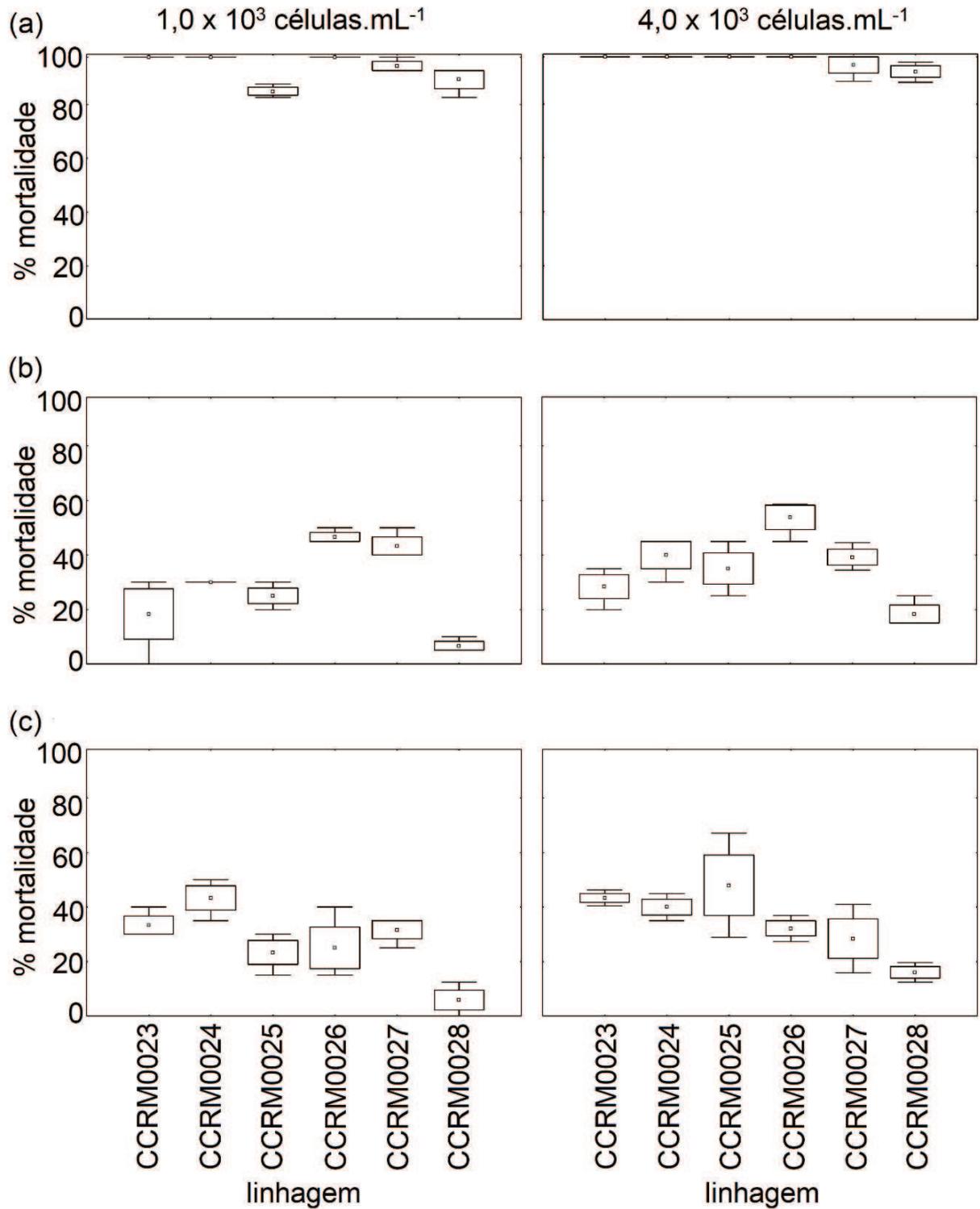


Figura 9 – Percentual de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. expostos, por 48h, às células vivas das linhagens de *C. subsalsa*, nas concentrações de $1,0$ e $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, nas fases de crescimento: (a) exponencial; (b) primeiro momento da estacionária (17 dias de cultivo) e; (c) segundo momento da estacionária (23 dias de cultivo). Os *box-plots* foram obtidos com base nos dados, em triplicata, de mortalidade de náuplios expostos às linhagens de *C. subsalsa*. Valor médio (□), valores extremos (parte superior representa o valor máximo e inferior, o valor mínimo) e o erro da estimativa (I).



Devido os valores de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp., na fase exponencial, terem sido muito elevados (>50%), tanto nas concentrações de $1,0 \times 10^3$, quanto na de $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹, nas diferentes linhagens de *C. subsalsa*, não foi possível calcular a CL₅₀ para cada linhagem nesta fase.

Já na fase estacionária o cálculo da CL₅₀ foi realizado para 24 e 48h de exposição dos náuplios de *Artemia* sp. para todas as linhagens. No teste realizado no primeiro momento da fase estacionária, a diferença entre as linhagens foi significativa em 24h (p=0,00), mas não foi em 48h (p=0,13). Em 24h de exposição a linhagem CCRM0023 diferiu de praticamente todas as outras, exceto CCRM0024 e CCRM0027. As linhagens que obtiveram os menores valores de CL₅₀ em 24h, e conseqüentemente maior toxicidade, foram CCRM0025 ($11,9 \times 10^3$ células.mL⁻¹) e CCRM0026 ($10,8 \times 10^3$ células.mL⁻¹), e as que apresentaram menor toxicidade foram, CCRM0023 ($25,9 \times 10^3$ células.mL⁻¹) e CCRM0024 ($19,9 \times 10^3$ células.mL⁻¹). Em 48h, a linhagem CCRM0023 ($9,4 \times 10^3$ células.mL⁻¹) continuou sendo a menos tóxica e as linhagens CCRM0026 ($2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹) e CCRM0028 ($2,3 \times 10^3$ células.mL⁻¹) foram as mais tóxicas (**figura 10**). Já no teste realizado no segundo momento não ocorreu diferença significativa em 24 e 48h de exposição. A linhagem que apresentou o maior valor de CL₅₀, em 24h, foi CCRM0027 ($14,3 \times 10^4$ células.mL⁻¹) e as que apresentaram os menores valores, sendo assim mais tóxicas, foram CCRM0028 ($31,2 \times 10^3$ células.mL⁻¹) e CCRM0026 ($34,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹). Em 48h, a linhagem CCRM0026 ($7,4 \times 10^3$ células.mL⁻¹) apresentou o maior valor e a CCRM0028 ($2,1 \times 10^3$ células.mL⁻¹) apresentou o menor valor (**figura 11**).

Figura 10 – Valores de CL_{50} , obtidos com o método Probit, das linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos no primeiro momento da fase estacionária (17 dias de cultivo), para 24 (preto) e 48h (cinza) de exposição dos náuplios de *Artemia* sp. as linhagens.

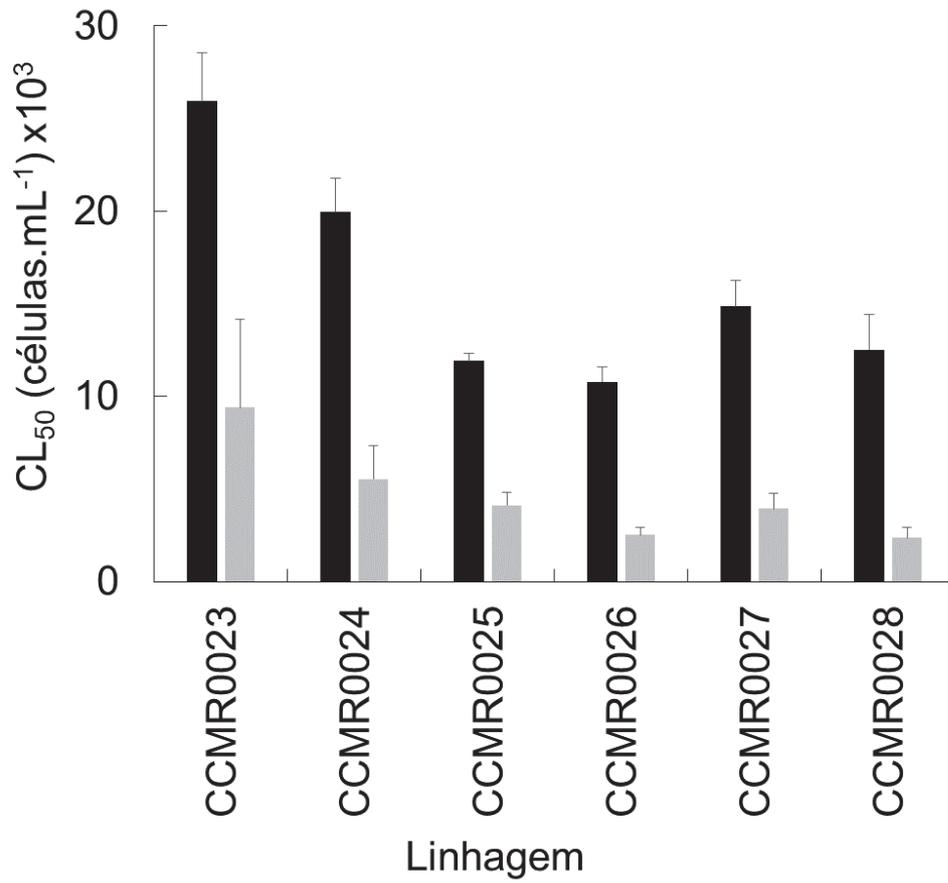
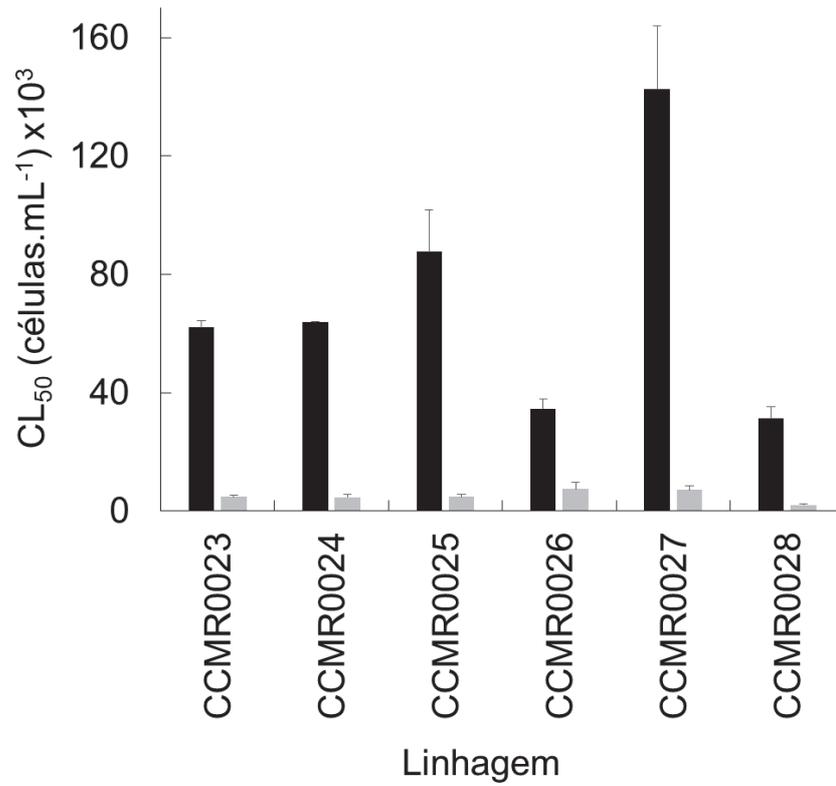


Figura 11 – Valores de CL_{50} , obtidos com o método Probit, das linhagens de *C. subsalsa* utilizadas nos testes toxicológicos no segundo momento da fase estacionária (23 dias de cultivo), para 24 (preto) e 48h (cinza) de exposição dos náuplios de *Artemia* sp. as linhagens.



6 DISCUSSÃO

Os mecanismos de toxicidade em rafidofíceas não são muito bem conhecidos (KEPPLER *et al.*, 2006; BASTI, *et al.*, 2016; HORIGUCHI, 2017). Diversos estudos têm associado efeitos negativos no desenvolvimento do início do ciclo de vida de diversos organismos, como invertebrados e peixes, devido a exposição destes a espécies potencialmente nocivas deste grupo (BASTI *et al.*, 2016; PÉREZ-MORALES; BAND-SCHMIDT; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2017).

Alguns autores também indicam que a toxicidade de *Chattonella* spp. é maior na fase de crescimento exponencial e diminui na fase estacionária e que não há uma correlação positiva entre o aumento do número de células e a toxicidade (SHEN *et al.*, 2010; PÉREZ-MORALES; BAND-SCHMIDT; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2017). O presente estudo constatou efeito altamente tóxico de todas as linhagens de *C. subsalsa* testadas em náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos, principalmente na fase de crescimento exponencial, que apresentou o maior percentual de mortalidade dos náuplios. De maneira geral, foi verificada uma correlação positiva entre a toxicidade e o aumento da concentração de células quando há um aumento de $1,0 \times 10^3$ para $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ em cada teste realizado. Pérez-Morales, Band-Schmidt e Martínez-Díaz (2017) também observaram a toxicidade em linhagens de *Chattonella* spp. (sete linhagens), em diferentes concentrações de células ($0,5$, $3,0$, $6,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹) sobre larvas do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Neste estudo, no entanto, não foi constatado efeito tóxico de nenhuma das linhagens na fase de náuplios do crustáceo usado como organismo teste, mas houve um efeito marcado no início da fase zoea, que é a fase em que as larvas começaram a depender da alimentação exógena. Os valores de TL₅₀ encontrados para estas linhagens variaram entre, aproximadamente, 20h e 2 dias.

Basti *et al.* (2016) realizaram um experimento com larvas na fase pós embrionária da ostra japonesa *Pinctada fucata martensii* e três espécies de rafidofíceas, *C. marina*, *C. antiqua* e *H. akashiwo*, e observaram que todas as espécies de microalgas afetaram as fases trocófora, larva D e de pré-assentamento da ostra, mas não afetaram a fertilização e o desenvolvimento embrionário. A metamorfose da larva trocófora foi completamente inibida ou diminuiu sob exposição à *C. marina*, *C.*

antiqua e foi apenas inibida quando exposta a *H. akashiwo*. A mortalidade de larva D, quando expostas a *H. akashiwo* e *C. marina*, foi dependente da densidade celular e, quando expostas a *C. antiqua*, foi dependente do tempo de exposição. A densidade celular e o tempo de exposição tiveram efeitos significativos na mortalidade de larvas de pré-assentamento expostas a *C. marina* e *C. antiqua*, sendo que nesta última foi apresentado um efeito sinérgico, mas a mortalidade das larvas expostas a *H. akashiwo* foram dependentes apenas do tempo de exposição.

Pérez-Morales *et al.* (2014) observaram a toxicidade de diferentes linhagens de *C. marina* e *C. subsalsa*, em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (embrião em segmentação, embrião e eleuteroembrião) de *Paralabrax maculatofasciatus*. Os autores observaram alta mortalidade das larvas expostas a curtos períodos a linhagens de *Chattonella* spp. As larvas expostas a *C. subsalsa* apresentaram mortalidade significativa em diferentes fases do desenvolvimento, sendo que a fase de embrião em segmentação foi a mais sensível com 98% de mortalidade, enquanto as outras apresentaram apenas 50%. A CL₅₀ de *C. subsalsa*, através do modelo Probit, foi menor para o embrião em segmentação ($3,2 \times 10^3$ células.mL⁻¹) do que para os estágios embrião e eleuteroembrião ($> 8,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹). Mas outras linhagens de *Chattonella* spp., na fase do embrião em segmentação apresentaram valores de CL₅₀ menores que a *C. subsalsa*, como a *C. marina* var. *ovata* e *C. marina* var. *marina*, com $1,73 \times 10^3$ células.mL⁻¹ e $3,06 \times 10^3$ células.mL⁻¹, respectivamente.

Diversos trabalhos também já relataram os efeitos tóxicos de *Chattonella* em peixes, tanto na fase embrionária, quanto na fase adulta (MARSHALL *et al.*, 2003; SHEN *et al.*, 2011a; 2011b; PÉREZ-MORALES, *et al.*, 2014; OVERSTREET; HAWKINS, 2017). A suscetibilidade de algumas espécies de peixes a *Chattonella* spp. é determinada pela suscetibilidade a hipóxia. No entanto, os mecanismos utilizados por *Chattonella* spp. para ocasionar a mortandade de peixes e os mecanismos de resposta utilizados pelos peixes que sobrevivem, ainda permanecem obscuros (SHEN *et al.*, 2011a).

Várias hipóteses sobre estes mecanismos já foram propostas para *Chattonella* spp. Dentre elas, investiga-se a produção de muco, neurotoxinas,

citotoxina hemolítica, espécies oxigênio reativas e ácidos graxos (MARSHALL *et al.*, 2003; KURODA *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2011b; BAND-SCHMIDT *et al.*, 2012). Espécies reativas de oxigênio podem alterar a estrutura e função das brânquias nos peixes e acabar levando a morte por asfixia (HIROISHI *et al.*, 2005; BAND-SCHMIDT *et al.*, 2012). Os ácidos graxos são geralmente considerados nutrientes essenciais, mas alguns são associados a efeitos tóxicos, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e a sinergia entre ERO e ácidos graxos livres pode ser um dos mecanismos de mortandade de peixes por *Chattonella* spp. (MARSHALL *et al.*, 2003). Ishimatsu *et al.* (1997) compararam mudanças na fisiologia de peixes da espécie *Seriola quinqueratiata*, que morreram por diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido com aqueles que foram expostos a *C. marina*. Este estudo levantou a hipótese de que a queda de pO₂ no sangue dos peixes expostos aos mecanismos de *C. marina* desempenhou um papel crucial na mortandade de peixes, pelo menos sob as condições experimentais a que foram expostos. Também foi observado que a maioria dos outros distúrbios fisiológicos, como acidemia, bradicardia e elevação de íons de plasma, foram provocados secundariamente pela queda de pO₂. Hishida, Ishimatsu e Oda (1997) expuseram brânquias de peixes a $4,0 \times 10^3$ células.mL⁻¹ de *C. marina* durante 24h e observaram a formação de uma fina camada de muco por essa microalga. Não foi observado o bloqueio dos espaços interfilamentares, mas isto pode ter ocorrido devido ao produto que foi utilizado para fixação da amostra que foi processada e assim, parte do muco pode ter sido perdido. Um estudo realizado por Kuroda *et al.* (2005) observaram a presença de citotoxina hemolítica em células rompidas de *C. marina*, mas não observaram o agente hemolítico em células intactas em suspensão e na cultura sobrenadante de células livres, sugerindo que os agentes estão presentes em compartimentos intracelulares. Além disso, testes com extrato bruto de *C. marina* mostraram atividade hemolítica quando havia luz, mas nenhuma foi observada no escuro. Cho *et al.* (2017) também não observaram significativa atividade hemolítica em células em suspensão e na cultura sobrenadante de células livres de *C. marina* e *C. antiqua*, mas verificaram alta produção de ERO por estas rafdofíceas.

No presente estudo, apesar das linhagens de *C. subsalsa* estudadas apresentaram alguns perfis, de modo geral, similares, ocorreram diferenças

significativas em alguns casos, que podem ser atribuídas a diferenças intra-específicas (ZHANG *et al.*, 2006; BAND-SCHMIDT *et al.*, 2012). Band-Schmidt *et al.* (2012) identificaram e descreveram bioquimicamente oito linhagens de *Chattonella* spp., sendo sete de *C. marina* e uma de *C. subsalsa* de diferentes regiões do Golfo da Califórnia, no México. As linhagens apresentaram variações morfológicas (de 19,7 a 90,0 μm de comprimento e 18,5 a 41,7 μm de largura), nas taxas de crescimento (0,209 a 0,354 dia^{-1}) e máxima densidade celular (3,17 a 4,6 $\times 10^3$ células. mL^{-1}). Com relação ao perfil pigmentar, todas as linhagens foram similares, sendo o principal pigmento a clorofila *a* (0,184 a 0,495 pmol.células^{-1}), seguido por fucoxantina (0,096 a 0,17 pmol.células^{-1}). As linhagens também foram testadas para brevetoxina, mas nenhuma apresentou a toxina em questão. Todas as linhagens foram capazes de produzir o radical superóxido (O_2^-), que variou entre 0,009 a 0,056 $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína, já a peroxidação lipídica variou entre 2,99 a 138,1 nmol mg^{-1} de proteína. A composição de ácidos graxos também foi analisada e de modo geral, os altamente insaturados (três ou mais ligações duplas) foram os mais abundantes em todas as linhagens e o EPA também está inserido neste grupo.

Os elevados valores de mortalidade de náuplios de *Artemia* sp. na fase de crescimento exponencial das linhagens de *C. subsalsa*, impossibilitaram o cálculo da CL_{50} , e devido a isto, o volume de cultivo utilizado nos testes foi revisto e reduzido, a fim do cálculo ser realizado para a fase estacionária. Os dois testes realizados em momentos distintos da fase estacionária (17 e 23 dias de cultivo das linhagens) apresentaram respostas distintas, apesar de pertencerem a mesma fase de crescimento. No primeiro momento, a variação dos valores de CL_{50} foi menor (de 10,8 a 25,9 $\times 10^3$ células. mL^{-1}) em relação ao segundo momento (de 31,2 $\times 10^3$ a 14,3 $\times 10^4$ células. mL^{-1}), mostrando assim que a toxicidade no primeiro momento foi maior que no segundo e sugerindo que, quanto mais antigo o cultivo, menor é a toxicidade do mesmo. Outro aspecto a ser comparado é a toxicidade da linhagem com relação ao tempo de exposição (24 e 48h). No primeiro momento da fase estacionária, em 24h, as linhagens mais tóxicas, foram CCRM0025 e CCRM0026, e em 48h, CCRM0026 e CCRM0028, sendo que apenas a linhagem CCRM0026 continuou sendo tóxica ao longo do tempo de exposição. O mesmo não ocorreu com a linhagem CCRM0025, que passou a ser, em 48h, a quarta linhagem mais tóxica de um total de

seis linhagens, enquanto a linhagem CCRM0028, que era a terceira mais tóxica, passou a ser a mais tóxica. Já no segundo momento da fase estacionária, em 24h, as linhagens mais tóxicas foram CCRM0026 e CCRM0028, e em 48h, a linhagem CCRM0028, com um adendo de que CCRM0026 passou a ser a linhagem menos tóxica. Apenas a linhagem CCRM0023, em 24h, no primeiro momento da fase estacionária, apresentou diferença significativa com as outras linhagens, exceto a CCRM0024 e CCRM0027.

O exposto acima, mostra que, provavelmente, a diferença de toxicidade entre as linhagens não foi aleatória, já que todas as linhagens foram cultivadas ao mesmo tempo e sob as mesmas condições de luminosidade, temperatura e salinidade. Além disso, foi possível observar um padrão de comportamento, já que todas as linhagens apresentaram maior toxicidade na fase exponencial, seguida da fase estacionária. Com relação a toxicidade na fase estacionária, que foi dividida em dois momentos, também foi possível observar um padrão, já que, de maneira geral, as linhagens no primeiro momento, foram mais tóxicas do que no segundo. Obviamente, os testes devem ser repetidos mais vezes nas mesmas condições e em condições distintas do cultivo, mas certamente o padrão de comportamento com relação a toxicidade de *C. subsalsa* encontrado, que até então era desconhecido, mostra a importância desses estudos de variabilidade intra-específica.

A variabilidade fenotípica das linhagens pode estar ligada aos diferentes mecanismos de resposta que uma mesma espécie pode apresentar a condições ambientais distintas (CALBET *et al.*, 2011; KREMP *et al.*, 2012; GÓMEZ *et al.*, 2015). Mudanças de temperatura, disponibilidade de CO₂ na atmosfera e alimentação, por exemplo, podem influenciar a taxa de crescimento, tamanho das células, além da composição bioquímica das microalgas, induzindo ou inibindo a produção de toxinas, pigmentos, lipídios, entre outros compostos (CALBET *et al.*, 2011; SAYEGH; MONTAGNES, 2011; GÓMEZ *et al.*, 2015). Assim, dentro de uma mesma espécie de microalga tóxica, algumas linhagens podem adotar diferentes estratégias de crescimento e toxicidade, por exemplo (CALBET *et al.*, 2011; KREMP *et al.*, 2012). Por isso, as condições de cultivo utilizadas neste trabalho não foram escolhidas ao acaso. Como todas as linhagens de *C. subsalsa* foram isoladas da Baía de Guanabara, os valores de temperatura (aproximadamente, 26° C) e salinidade (20) foram definidos

com base em valores já reportados para a Baía de Guanabara (KJERFVE *et al.*, 1997) e para ocorrência de *Chattonella* spp. (MARSHALL *et al.*, 2003; KEPPLER *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2011a).

Kremp *et al.* (2012) estudaram os efeitos do aumento da temperatura e disponibilidade de CO₂, como consequência da mudança global, em 16 isolados da diatomácea *Skeletonema marinoi*, do mar Adriático (oito linhagens) e de Skagerrak (oito linhagens), no mar do Norte e, e em oito isolados do dinoflagelado formador de florações nocivas, *Alexandrium ostenfeldii*, do mar Báltico. Para o estudo foram utilizados quatro tratamentos: controle (20° C, 385 ppm); aumento da temperatura (24° C, 385 ppm); aumento de pCO₂ (20° C, 750 ppm); aumento da temperatura e de pCO₂ (24° C e 750 ppm). As oito linhagens de *S. marinoi* do mar Adriático apresentaram uma diferença considerável na taxa de crescimento, que variou de 0,43 a 1,26 dia⁻¹ e as respostas aos diferentes tratamentos de temperatura e pCO₂ foram altamente variáveis. Duas linhagens não foram afetadas significativamente por nenhum dos tratamentos e as outras foram afetadas por um ou mais tratamentos. Já as oito linhagens de *S. marinoi* de Skagerrak obtiveram uma taxa de crescimento de 0,63 a 1,04 dia⁻¹. Quatro destas linhagens não foram afetadas por nenhum tratamento, três linhagens foram afetadas pelo aumento da temperatura e uma linhagem foi afetada pelo aumento da temperatura e aumento de pCO₂, separadamente. Não foi realizado o a tratamento de aumento de temperatura e pCO₂ juntos para estas linhagens devido a disponibilidade limitada da mistura de pCO₂ enriquecido. A taxa de crescimento das oito linhagens de *A. ostenfeldii* foi muito menor que a de *S. marinoi*, com uma média de 0,33 dia⁻¹. Os tratamentos afetaram as linhagens de forma pouco significativa. Três linhagens não foram afetadas pelos tratamentos, duas foram afetadas pelo aumento da temperatura, uma pelo aumento de pCO₂ e uma pelo aumento de pCO₂ e também pelo aumento da temperatura juntamente com pCO₂. Com relação a produção de toxinas em *A. ostenfeldii* foram analisadas o conteúdo total de toxina parolítica e diferentes derivados (STX, GTX2 e GTX3). Apenas duas linhagens apresentaram respostas muito significativas e foram em relação ao conteúdo total de toxinas. Uma linhagem apresentou resposta ao tratamento de aumento de temperatura e de pCO₂ e outra apenas ao tratamento de aumento de pCO₂. Os tratamentos foram mais pronunciados nos derivados. Três tratamentos, adição de pCO₂, aumento da

temperatura e a combinação de ambos promoveram a produção de STX em todas as linhagens de *A. ostenfeldii*.

Calbet *et al.* (2011) isolaram 11 linhagens do dinoflagelado formador de florações nocivas, *Karlodinium veneficum* durante um evento de floração que ocorreu no noroeste da costa do Mediterrâneo e estudaram a variabilidade entre as linhagens em vários traços fisiológicos e bioquímicos. Neste trabalho, os autores avaliaram parâmetros de crescimento autotrófico, capacidade de alimentação (mixotrofia), composição lipídica e, em alguns casos, respostas a fatores bióticos e abióticos. As linhagens apresentaram diferenças na taxa de crescimento, que variou entre 0,27 a 0,53 dia⁻¹, na concentração máxima de células durante a fase estacionária com variação de 6,1 x 10⁴ a 8,6 x 10⁴ células.mL⁻¹. Também foi investigada a ingestão de *Rhodomonas salina*, quando esta foi oferecida como presa às linhagens de *K. veneficum*, e o resultado foi diverso. A ingestão de células variou entre 0,22 a 1,3 células por *K. veneficum* por dia. Os autores também verificaram que apenas duas linhagens sobreviveram durante dois meses a condições de estrita heterotrofia. As linhagens também apresentaram diferenças na composição de ácidos graxos, com poucos contendo ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.

Sayegh e Montagnes (2011) examinaram como um isolado de *Nannochloropsis* spp. (N) e quatro de *Isochrysis galbana* (D e T isolados de locais distintos e M e G são do mesmo local, mas ficaram separados por 10 anos) responderam a condições de nutriente repleto e diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30° C). Os autores, após a análise dos dados de taxa de crescimento, peso seco e volume, verificaram que os isolados de *I. galbana*, M e G, eram mais parecidos entre si do que D e T. Surpreendentemente, as linhagens D e T eram mais parecidas com a linhagem de *Nannochloropsis* spp. do que com M e G. Neste estudo também foram analisadas composição lipídica, carboidratos, proteínas e produção, onde novamente ficou destacada a semelhança entre M e G, mas apesar de também ter havido uma diferença destes com relação aos outros isolados, esta não foi muito pronunciada.

Algumas indústrias das áreas de aquicultura, farmácia e alimentos, inclusive, submetem linhagens de espécies biotecnologicamente interessantes a fatores estressantes, a fim de encontrar linhagens mais rentáveis economicamente. Este

estudo da variabilidade intra-específica permite que aja uma seleção das linhagens, sem o uso da manipulação genética, o que acaba viabilizando a produção natural de determinado composto, que em alguns casos é mais cara do que a produção sintetizada quimicamente (FUJII *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2012; GÓMEZ *et al.*, 2015). Gómez *et al.* (2015) isolaram 13 linhagens de *Haematococcus pluvialis* das cidades de Concepción (três linhagens), Valdivia (duas linhagens), Osorno (quatro linhagens), Puerto Varas (uma linhagem) e Castro (três linhagens), localizadas no Chile, para compararam o potencial de produção de astaxantina entre elas e uma linhagem isolada em Nevada (EUA). As taxas de crescimento variaram entre 0,68 e 1,91 divisões por dia e a densidade máxima de células entre $84,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Os parâmetros de pigmentos diferiram significativamente entre as linhagens. O volume de clorofila variou entre 3,40 a 8,55 mg.L⁻¹, enquanto o volume de carotenóides variou entre 5,49 a 9,44 mg.L⁻¹. Com relação a astaxantina, todas as linhagens do Chile apresentaram mais astaxantina do que a linhagem de Nevada. A linhagem de Nevada acumulou apenas 32,5% de astaxantina do total de carotenóides, com cerca de 2,6 mg de astaxantina por litro de cultura. As linhagens de Castro combinaram um alto acúmulo de carotenóides, 8,67, 9,29 e 9,44 mg.L⁻¹, com alto percentual de astaxantina, com 74,5, 80,4 e 75,0%, respectivamente, produzindo cerca de 7 mg de astaxantina por litro de cultura, sendo o valor mais alto encontrado neste estudo.

Diferenças genéticas podem levar a variações fenotípicas que fornecem características fisiológicas e ecológicas a uma determinada espécie. Assim, uma espécie com alta diversidade genética pode ser capaz de se adaptar e responder rapidamente as mudanças ambientais (LEBRET *et al.*, 2012). Isso pode ser observado com as linhagens de *C. subsalsa* que apresentaram diferentes níveis de toxicidade, mostrando a variabilidade existente entre elas. No primeiro momento da fase estacionária, em 24h, foi possível observar uma diferença de toxicidade entre as linhagens de até três vezes, aproximadamente, enquanto que em 48h, a diferença chegou a mais de quatro vezes. Já no segundo momento em 24h, a diferença alcançou quase cinco vezes, enquanto que em 48h a diferença foi de mais de três vezes. De forma análoga, estas estratégias também nos remetem aos seres humanos, já que os indivíduos, de maneira geral, apresentam uma grande variabilidade

fenotípica, e essa variabilidade fornece a cada um, vantagens e/ou desvantagens na vida cotidiana.

Stolte e Garcés (2006) ranquearam diversas espécies fitoplanctônicas de acordo com os valores de taxa de crescimento, que foram observadas *in situ*. Os maiores valores médios encontrados (aproximadamente 0,8 a 1,0 dia⁻¹) foram registrados para criptófitas, crisófitas, diatomáceas e primnesiófitas. Já cianobactérias e dinoflagelados apresentaram taxas de crescimento menores (0,35 a 0,65 dia⁻¹). Apesar disso, altas taxas de crescimento já foram reportadas para espécies formadoras de alta biomassa e que causam mortandade de peixes (SOLTE; GARCÉS, 2006; QIU *et al.*, 2010; IMAI; YAMAGUCHI, 2012). Com relação apenas a toxicidade, em geral, as espécies potencialmente tóxicas apresentam as menores médias (aproximadamente, 0,5 dia⁻¹), enquanto as não tóxicas as maiores, com aproximadamente, 0,7 dia⁻¹ (SOLTE; GARCÉS, 2006). As linhagens de *C. subsalsa* testadas neste trabalho apresentaram médias de taxa de crescimento que variam de 0,57 a 0,86 dia⁻¹, o que é comparado com as médias dos grupos de microalgas que possuem um crescimento rápido de acordo com Solte e Garcés (2006). Este fato é preocupante, pois uma espécie potencialmente nocivamente com altas médias de taxa de crescimento pode rapidamente formar uma FAN. Estas linhagens também apresentaram valores maiores do que reportados por Marshall e Hallegraef (1999) e Band-Schmidt *et al.* (2012), mas similar ao valor reportado pelo trabalho de Zhang *et al.* (2006) para *C. subsalsa*. Vale ressaltar que nos trabalhos realizados por Marshall e Hallegraef (1999), Band-Schmidt *et al.* (2012) e Zhang *et al.* (2006) o foto período utilizado para o cultivo das linhagens foi 12:12h (claro:escuro), mas no presente estudo foi utilizado 16:8h. Assim, apesar de maiores, não é possível afirmar se os valores de taxa de crescimento reportados neste estudo foram maiores ou similares devido a diferença entre estas e as outras linhagens citadas ou pelo maior período que as linhagens de *C. subsalsa* da Baía de Guanabara ficaram com luz durante o cultivo.

Portanto, o uso de múltiplas linhagens de uma mesma microalga é fundamental para um entendimento abrangente do potencial tóxico da espécie e também permite extrapolações mais confiáveis dos resultados dos ensaios toxicológicos para o meio ambiente. Isto fará com que os resultados obtidos para as

seis linhagens de *Chattonella subsalsa* da Baía de Guanabara, em três momentos da fase de crescimento, sejam mais consistentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 CONCLUSÕES

As seis linhagens de *C. subsalsa* foram altamente tóxicas para náuplios de *Artemia* sp. Células na fase de crescimento exponencial apresentaram toxicidade bem mais elevada do que células em momentos distintos da fase estacionária de crescimento populacional. Este resultado da elevada toxicidade das linhagens isoladas da Baía de Guanabara era até então desconhecido, apesar da suspeita do mesmo, devido à ocorrência de florações dessas microalgas em períodos onde foram relatados episódios de mortandade massiva de peixes na região. Portanto, os maiores riscos a biota se dão durante a fase de formação das florações, quando o número de células ainda não atingiu os níveis máximos, e não quando as florações já estão estabelecidas. Esta característica deve ser levada em consideração durante programas de monitoramento que visem entender possíveis relações de causa e efeito entre densidade de *C. subsalsa* e eventos de mortandade de peixes.

As diferenças na toxicidade observadas entre as seis linhagens testadas são representativas de variações entre células de populações naturais de *Chattonella subsalsa*. Os efeitos nocivos desta microalga no ambiente resultam, portanto, de um mosaico de interações de células com potenciais tóxicos variados. Um melhor entendimento da importância desta diversidade fenotípica no ambiente necessita estudos abrangentes de variabilidade intra-específica dentro da mesma população. Cultivos isolados do ambiente, como os utilizados no presente estudo, bem como ferramentas de biologia molecular para estudos de diversidade genética (taxonômica e funcional) são técnicas que podem ajudar a elucidar a real variabilidade de populações naturais de *Chattonella subsalsa*.

Certamente, mais testes toxicológicos devem ser realizados, mas trabalhos como este contribuem na busca da compreensão dos efeitos e mecanismos de toxicidade de espécies potencialmente tóxicas e formadoras de florações, como *C. subsalsa*, que em casos mais graves, podem causar mortandade da biota aquática, especialmente de peixes.

7.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos, mais testes devem ser feitos utilizando não apenas artêmias, como organismo teste, mas também outros invertebrados e peixes, em diferentes fases de desenvolvimento. Testes, principalmente, com peixes são imprescindíveis para que seja observada a susceptibilidade dos mesmos a espécies de *Chattonella* spp., já que essa susceptibilidade ainda é pouco entendida. Além disso, mais estudos voltados para o isolamento de microalgas potencialmente nocivas devem ser realizados, para que os mecanismos de toxicidade e desenvolvimento de florações possam ser melhores entendidos.

Apenas através do entendimento das diferenças inter e intra-específicas das microalgas formadoras de florações e as relativas interações destas com os fatores bióticos e abióticos do ambiente em que elas ocorrem, é que será possível identificar as adaptações de cada linhagem e as condições que favorecem o seu desenvolvimento. A partir disso, medidas mitigatórias poderão ser testadas e posteriormente implementadas para combater essas florações que podem ser altamente nocivas tanto para nós, seres humanos, quanto para flora e fauna aquática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, V. M. C.; NETO, J. A. B.; RANGEL, C. M. Eutrophication and hypoxia in four streams discharging in Guanabara Bay, RJ, Brazil, a case study. *Marine pollution bulletin*, v. 62, n. 8, p. 1915-1919, 2011.
- AYLAGAS, E. *et al.* Evaluation of marine phytoplankton toxicity by application of marine invertebrate bioassays. *Scientia Marina*, v. 78, n. 2, p. 173-183, 2014.
- BAND-SCHMIDT, C. J. *et al.* Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia*, v. 693, n. 1, p. 81-97, 2012.
- BASTI, L. *et al.* Lethal effects of ichthyotoxic raphidophytes, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, and *Heterosigma akashiwo*, on post-embryonic stages of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Harmful algae*, v. 59, p. 112-122, 2016.
- BROVEDANI, V. *et al.* Brevetoxins: Toxicological Profile. In: Gopalakrishnakone P., Haddad Jr. V., Tubaro A., Kim E., Kem W. (eds.), *Marine and Freshwater Toxins*. Toxinology. Springer, Dordrecht, p. 113-127, 2016.
- CALBET, A. *et al.* Intraspecific variability in *Karlodinium veneficum*: growth rates, mixotrophy, and lipid composition. *Harmful Algae*, v. 10, n. 6, p. 654-667, 2011.
- CASTRO, N. O.; MOSER, G. A. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. *Oecologia Australis*, v. 16, n. 2, p. 235-264, 2012.
- CHO, K. *et al.* Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. *European Journal of Phycology*, v. 52, n. 3, p. 311-319, 2017.
- COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- COUTTEAU, P. Micro-algae. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P (eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361. Rome, FAO. p. 7-48, 1996.
- de BOER, M. K. *et al.* The toxic effect of the marine raphidophyte *Fibrocapsa japonica* on larvae of the common flatfish sole (*Solea solea*). *Harmful Algae*, v. 17, p. 92-101, 2012.
- ESENKULOVA, S.; HAIGH, N. Germinating cysts of *Heterosigma akashiwo* from marine sediments of British Columbia, Canada. *Harmful algae news*, n.48, p. 4-5, 2014.
- FISTAROL, G. O. *et al.* Environmental and sanitary conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1-17, 2015.

- FISTAROL, G. O. *et al.* Rapid isolation of culturable microalgae from a tropical shallow lake system. *Journal of Applied Phycology*, p. 1-13, 2018.
- FUJII, K. *et al.* Isolation of the non-fastidious microalga with astaxanthin-accumulating property and its potential for application to aquaculture. *Aquaculture*, v. 261, n. 1, p. 285-293, 2006.
- FUREY, A *et al.* Brevetoxins: structure, toxicology, and origin. *In: Botana L. M. (ed.), Phycotoxins: chemistry and biochemistry*, 2007, p. 19-46, 2007.
- GÁRATE-LIZÁRRAGA, I.; GONZÁLEZ-ARMAS, R. Fish die-offs along southern coast of Baja California. *Harmful algae news*, n.48, p. 8-9, 2014.
- GLIBERT, P. M. Algal blooms. *In: Kennish, M. J. (ed.), Encyclopedia of Estuaries*. Springer Netherlands, 2016, p. 7-16, 2016.
- GÓMEZ, P. I. *et al.* Intraspecific variability among Chilean strains of the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta): an opportunity for its genetic improvement by simple selection. *Journal of applied phycology*, v. 28, n. 4, p. 2115-2122, 2015.
- GUILLARD, R. R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In: Smith, W. L. e Chanley, M. H. (eds.), Culture of marine invertebrate animals*, Springer US, p. 29-60, 1975.
- GUTIERREZ, C. L. *et al.* Chloroplast genetic tool for the green microalgae *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Journal of phycology*, v. 48, n. 4, p. 976-983, 2012.
- HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: a global overview. *In: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, 2003. p. 25-49, 2003.
- HIROISHI, S. *et al.* High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful algae*, v. 4, n. 4, p. 783-787, 2005.
- HISHIDA, Y.; ISHIMATSU, A.; ODA, T. Mucus blockade of lamellar water channels in yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fisheries science*, v. 63, n. 2, p. 315-316, 1997.
- HORIGUCHI, T. Raphidophyceae (Raphidophyta). *In: Archibald, J. M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C. H. (eds.), Handbook of the Protists*. Springer International Publishing, 2017, p. 1-26, 2017.
- IHARA, P. M.; PINHO, G. L. L.; FILLMANN, G. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2010.

IMAI, I.; YAMAGUCHI, M. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae*, v. 14, p. 46-70, 2012.

ISHIMATSU, A. *et al.* A comparison of physiological responses in yellowtail to fatal environmental hypoxia and exposure to *Chattonella marina*. *Fisheries science*, v. 63, n. 4, p. 557-562, 1997.

KEPPLER, C. J. *et al.* Sublethal cellular effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, v. 312, p. 141-147, 2006.

KJERFVE, B. *et al.* Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental shelf research*, v. 17, n. 13, p. 1609-1643, 1997.

KLÖPPER, S. *et al.* Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*?. *European journal of phycology*, v. 48, n. 1, p. 79-92, 2013.

KREMP, A. *et al.* Intraspecific variability in the response of bloom-forming marine microalgae to changed climate conditions. *Ecology and evolution*, v. 2, n. 6, p. 1195-1207, 2012.

KURODA, A. *et al.* Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology; Pharmacology*, v. 141, n. 3, p. 297-305, 2005.

LEBRET, K. *et al.* Genetic diversity within and genetic differentiation between blooms of a microalgal species. *Environmental Microbiology*, v. 14, n. 9, p. 2395-2404, 2012.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 158-163, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MAFRA, L. L. *et al.* Differential okadaic acid accumulation and detoxification by oysters and mussels during natural and simulated *Dinophysis* blooms. *Fisheries science*, v. 81, n. 4, p. 749-762, 2015.

MARSHALL, H. G. Phytoplankton. In: Kennish, M. J. (ed.), *Encyclopedia of Estuaries*. Springer Netherlands, 2016, p. 491-493, 2016.

MARSHALL, J. A. *et al.* Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycaanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, v. 2, n. 4, p. 273-281, 2003.

_____. Superoxide Production by Marine Microalgae. II Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Marine biology*, v. 147, n. 2, p. 541-549, 2005.

MASÓ, M.; GARCÉS, E. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*, v. 53, p. 620-630, 2006.

MAYR, L. M. *et al.* Hydrobiological characterization of Guanabara bay. *In*: Magoon, O.; Neves, C. (eds.), *Coastlines of Brazil*. ASCE. p. 124-138, 1989.

MOREIRA-GONZÁLEZ, A.; COMAS-GONZÁLEZ, A. Blooms of a *Chattonella* species (Raphidohyceae) in La Redonda Lagoon, Northeastern Cuba. *Harmful algae news*, n. 48, p. 12-13, 2014.

NATSUIKE, M. *et al.* Evidence of increased toxic *Alexandrium tamarense* dinoflagellate blooms in the eastern Bering Sea in the summers of 2004 and 2005. *PloS one*, v. 12, n. 11, p. 1-13, 2017.

NEVES, R. A. F. *et al.* 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.

NÚÑEZ-VÁZQUEZ, E. J. *et al.* Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology*, v. 32, n. 4, p. 413, 2011.

ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Raphidophycean in southern Brazil. *Harmful Algae News*, v. 12, n. 13, p. 4, 1995.

OGELLO, E. O. *et al.* The occurrence of the brine shrimp, *Artemia franciscana* (Kellogg 1906) in Kenya and the potential economic impacts among Kenyan coastal communities. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, v. 1, n. 5, p. 151-156, 2014.

ONITSUKA, G.; AOKI, K.; SHIMIZU, M. Meteorological conditions preceding *Chattonella* bloom events in the Yatsushiro Sea, Japan, and possible links with the East Asian monsoon. *Fisheries science*, v. 81, n. 1, p. 123-130, 2015.

OVERSTREET, R. M.; HAWKINS, W. E. Diseases and Mortalities of Fishes and Other Animals in The Gulf of Mexico. *In*: Ward, C.H. (ed.), *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill*. Springer, New York, NY, 2017. p. 1589-1738, 2017.

PADMAKUMAR, K. B. *et al.* Monospecific bloom of noxious raphidophyte *Chattonella marina* in coastal waters of south west coast of India. *Int J Biosci*, v. 1, n. 1, p. 57-69, 2011.

PÉREZ-MORALES, A. *et al.* Mortality in the initial ontogeny of *Paralabrax maculatofasciatus* (Actinopterygii, Perciformes, Serranidae) caused by *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). *Hydrobiologia*, v. 722, n. 1, p. 247-261, 2014.

PÉREZ-MORALES, A.; BAND-SCHMIDT, C. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F. Mortality on zoea stage of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* caused by *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) and *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). *Marine Biology*, v. 164, n. 3, p. 57, 2017.

PETTERSSON, L. H.; POZDNYAKOV, D. Qualification, species variety, and consequences of harmful algal blooms (HABs). *Monitoring of harmful algal blooms*. Springer/Praxis, Heidelberg, Chichester, UK. p. 1-24, 2012.

PIMENTEL, M. F. *et al.* O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.

QIU, X. *et al.* Growth interactions between raphidophytes *Chattonella antiqua* and *Heterosigma akashiwo*. *Thalassas*, v. 27, n. 1, p. 33-45, 2010.

RAY, P. D.; HUANG, B.W.; TSUJI, T. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

SAYEGH, F. A. Q.; MONTAGNES, D. J. S. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource technology*, v. 102, n. 3, p. 3007-3013, 2011.

SELLNER, K. G. Toxic bloom. *In*: Kennish, M. J. (ed.), *Encyclopedia of Estuaries*. Springer Dordrecht, Heidelberg, New York, London, p. 714-716, 2016.

SEVRIN-REYSSAC, J. *et al.* Biomasse et production du phytoplancton de la baie de Guanabara (État de Rio de Janeiro, Brésil) et du secteur océanique adjacent. Variations de mai à juillet 1978. *Bull. Mus. natn. hist. nat.*, Paris, s. 4, v. 1, seção B, n.4, p. 329-354, 1979.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, v.40, n.4, p. 994-1002, 2010.

SHEN, M. *et al.* Toxicity comparison between *Chattonella marina* and *Karenia brevis* using marine medaka (*Oryzias melastigma*): evidence against the suspected ichthyotoxins of *Chattonella marina*. *Chemosphere*, v. 80, n. 5, p. 585-591, 2010.

_____. Susceptibility of fish to *Chattonella marina* is determined by its tolerance to hypoxia. *Marine pollution bulletin*, v. 63, n. 5-12, p. 189-194, 2011a.

_____. Unravelling the pathway of respiratory toxicity in goldlined seabream (*Rhabdosargus sarba*) induced by the harmful alga *Chattonella marina*. *Aquatic toxicology*, v. 104, n. 3-4, p. 185-191, 2011b.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Histórico, Evolução e Conceitos Básicos da Toxicologia *Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações*. Interciência, Rio de Janeiro. p. 3-16, 2013.

SOARES, R. M. *et al.* Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental toxicology*, v. 21, n. 2, p. 95-103, 2006.

STOLTE, W.; GARCÉS, E. Ecological aspects of harmful algal in situ population growth rates. *In: Granéli, E., Turner, J. T. (eds.), Ecology of harmful algae*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. p. 139-152, 2006.

TASKER R. A. Domoic Acid and Other Amnesic Toxins: Toxicological Profile. *In: Gopalakrishnakone P., Haddad Jr. V., Tubaro A., Kim E., Kem W. (eds.), Marine and Freshwater Toxins*. Toxinology. Springer, Dordrecht, p. 93-112, 2016.

TENENBAUM, D. R. *et al.* O fitoplâncton. *In: Villac, M. C., da Costa Fernandes, F., Jablonski, S., Neto, A. D. C. L., Coutinho, B. H. (eds.), A Biota da Área sob Influência do Porto de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil: Levantamento de Dados Pretéritos*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente/Brasil, p. 13-22, 2004.

VALENTIN, J. L. *et al.* O sistema planctônico da Baía de Guanabara: síntese do conhecimento. *Oecologia Brasiliensis*, v. 7, n. 1, p. 2, 1999.

VILLAC, M. C.; TENENBAUM, D. R. The phytoplankton of Guanabara Bay, Brazil: I. historical account of its biodiversity. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 2, p. 271-293, 2010.

WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. *In: Andersen, R. A. (ed.), Algal culturing techniques*, p. 269-288, 2005.

YUNES, J. S. *et al.* Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, v. 5, n. 4, p. 223-229, 1996.

ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River. New Jersey, 5ª edição. 946p, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Bottom-up controls on a mixed-species HAB assemblage: A comparison of sympatric *Chattonella subsalsa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland Bays, USA. *Harmful Algae*, v. 5, n. 3, p. 310-320, 2006.