Karoline Magalhães Ferreira Lubiana

Culturas como alternativa para elucidação de biodiversidade críptica do fitoplâncton: o caso das águas costeiras do estado de São Paulo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título em Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientadora: Dra. Sônia Maria Flores Giancesella

São Paulo

2013

Universidade de São Paulo

Instituto Oceanográfico

Culturas como alternativa para elucidação de biodiversidade críptica do fitoplâncton: o caso das águas costeiras do estado de São Paulo

Karoline Magalhães Ferreira Lubiana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título em Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em: ____/ ____/ ____

Prof.(a) Dr.(a)

Conceito

Prof.(a) Dr.(a)

Conceito

Prof.(a) Dr.(a)

Conceito

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”

(Theodosius Dobzhansky)

Aos meus avós maternos, Arentino e Maria Helena
(*in memorian*), pelo exemplo de vida, força e amor!

Sumário

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas.....	x
1. Introdução	1
1.1. Sistemática do Fitoplâncton Marinho: um desafio para a ciência	4
1.2. Biodiversidade do Fitoplâncton Marinho: panorama global, nacional e estadual.....	8
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. Material e Métodos.....	13
3.1. Área de amostragem.....	13
3.2. Infraestrutura de cultivo e meios de cultura	15
3.3. Técnicas de isolamento	19
3.3.1. Cultura mista: enriquecimento da água do mar	19
3.3.2. Isolamento por diluição em série.....	20
3.3.3. Isolamento por micropipetagem e diluições sucessivas	22
3.3.4. Isolamento por plaqueamento em meio sólido	26
3.3.5. Isolamento em meio semissólido associado à diluição em série	28
3.4. Produção, coleta e armazenamento de biomassa.....	31
3.5. Reconhecimento morfológico	32
3.6. Extração e análise dos pigmentos fotossintéticos.....	33
3.6.1. Pigmentos lipossolúveis	33
3.6.2. Pigmentos hidrossolúveis	33
4. Resultados e Discussão	35
4.1. Culturas mistas: relações interespecíficas	35
4.2. Organismos isolados: métodos empregados e reconhecimento taxonômico.....	37
4.2.1. Cyanobacteria Stanier ex. T Cavalier- Smith 2002	37

4.2.2.	Chlorophyta A. Pascher 1914.....	42
4.2.3.	Ochrophyta T. Cavalier-Smith	52
4.2.4.	Cryptophyta Cavalier-Smith 1986.....	62
4.3.	Pigmentos fotossintéticos.....	72
5.	Considerações Finais.....	81
6.	Referências Bibliográficas	84
7.	Anexos.....	91

Agradecimentos

Confesso que esta de longe foi a parte que me deu mais prazer em escrever, pois me fez lembrar de vários momentos compartilhados com pessoas que ajudaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha amada família, que me deu todo suporte, que aceitou minhas ausências prolongadas, e acreditou no meu sonho. Amo muito vocês por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Agradeço imensamente à professora Dra Sônia Maria Flores Giancesella, minha orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório e por todos os ensinamentos ao longo deste tempo que compartilhamos juntas.

À Dra Flávia Marisa Prado Saldanha- Corrêa, por todo suporte técnico e intelectual. Pelas conversas nos lanches da tarde, pela grande paciência em me ensinar e aturar os meus defeitos, pela grande amizade adquirida neste tempo de convivência. É muito bom encontrar pessoas tão queridas ao longo da nossa jornada pela vida.

Ao professor Dr. Frederico Pereira Brandini, pela amizade e confiança, por todos os momentos de boas discussões científicas e pela imensa ajuda na revisão deste documento. Sou muitíssimo grata pela força!

Ao meu amado, meu anjo da guarda, Fernando Takashi Kanemoto, por todos os bons momentos vividos juntos, pela imensa calma e paciência, pelas boas conversas de trabalho, pela ajuda com este documento... Agradeço por ter você na minha vida!

Aos técnicos do DOB, Tomás, Dona Cida, Ruthe, Cidinha, Davi e André, por todas as ajudas ao longo desse tempo e também pela amizade.

À MSc. Maysa Pompeu e os alunos João Felipe Cardoso dos Santos (Johnny), Pedro Paulo Paulo Guy Martins dos Santos (Malú), Vadim Harmalov (Russo), Mateus Gustavo Chuqui (Boça), Welder Rafael Araújo (Marujo) pelas coletas realizadas em Ubatuba e pelas boas horas de café e almoços juntos.

À professora Dra. Mariana Cabral de Oliveira do Instituto de Biociências da USP, por me acolhido em seu laboratório, por todos os ensinamentos em biologia molecular e a sua equipe do LAM (Laboratório de Algas Marinhas) pela paciência em ensinar e pelas boas conversas.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto Oceanográfico “Gelso Vazzoler”, por todo o suporte técnico, pelo bom humor, paciência e boas sugestões.

Ao Instituto Oceanográfico, a casa que me acolheu por este tempo e permitiu a realização deste trabalho.

À professora Dra. Mariângela Menezes pela ajuda técnica com as Cryptophyceae e pelo estímulo para seguir trilhando o rumo da taxonomia.

À Dra. Célia Villac pelas boas conversas, sugestões e materiais bibliográficos compartilhados de sua biblioteca pessoal.

À toda equipe do PROFITO, em especial à Hannah Hadassa Fernandes Galvão Leite, pela ajuda com alguns experimentos realizados e bela boa companhia de sempre. Obrigada!

Quero agradecer à minha família em São Paulo, meus amigos, Mariana Oliveira Silva, Heliane Bevervanso Ferrarese, Luciana Yokoyama Xavier, Talhi Cesar Zuppardo, Caio César Freire, Octávio Coelho de Oliveira, Hélio dos Santos, André Andrade Baceti. Peço desculpas caso tenha esquecido o nome de alguém. Agradeço enormemente por todos os momentos juntos, pelas conversas de boteco, os desabafos, as risadas, os conselhos... Vocês moram no meu coração!

À FAPESP pelo financiamento do projeto temático (processo 2010/50187-1) e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (processo 148951/2011-2).

Resumo

O fitoplâncton é composto por uma gama de organismos fotossintetizantes de diversas origens evolutivas. São os principais produtores primários dos oceanos embora sua biodiversidade seja muito pouco estudada, principalmente as frações do nano e picoplâncton. A composição florística dessas duas frações do fitoplâncton marinho é praticamente desconhecida nas águas brasileiras, entretanto diversos trabalhos ecológicos e oceanográficos relatam sua importância, pois são os mais abundantes nas regiões marinhas. O presente estudo teve como objetivo isolar espécies de microalgas, com ênfase nos “fitoflagelados”, a partir de amostras coletadas de Cananéia, Ubatuba e Santos, a fim de aumentar o conhecimento acerca da composição taxonômica desses organismos e permitir estudos futuros, envolvendo análises moleculares, ultraestruturais e fisiológicas. Para isso, foram usadas várias técnicas tradicionais de isolamento, como cultura mista, micropipetagem e diluições sucessivas, plaqueamento em ágar e diluição seriada. Foram isolados 49 cepas das classes Cyanophyceae, Trebouxiophyceae, Cryptophyceae, Bacillariophyceae, Prasinophyceae, Nephroselmidophyceae, Chrysophyceae e outros não identificados. Análises pigmentares foram realizadas em especial para o grupo das Cryptophyceae para confirmar a identificação em nível genérico. Vários dos táxons isolados representam novos registros para o estado de São Paulo e para a costa do Brasil. Os resultados do presente estudo são uma boa partida para a inclusão filogenética dos organismos isolados na costa do Brasil no contexto mundial, auxiliando a desvendar a biodiversidade críptica de espécies até o momento desconhecidas para as regiões estudadas.

Palavras chave: biodiversidade críptica, picofitoplâncton, nanofitoplâncton, técnicas de isolamento, ficobilinas, costa do estado de São Paulo.

Abstract

Phytoplankton comprises a range of photosynthetic organisms with different evolutionary origins. They are the main primary producers in the oceans but its biodiversity is poorly studied, especially on the nano and picoplankton fractions. Although the floristic composition of these two fractions of the marine phytoplankton is virtually unknown in Brazilian waters, several studies have reported the oceanographic and ecological importance of these groups, which are the most abundant in marine environment. This study aimed to isolate microalgae species with emphasis on "phytoflagellates" from samples collected in Cananéia, Ubatuba and Santos in order to increase the knowledge about their taxonomic composition and allow future studies involving molecular, ultrastructural and physiological analysis. For this, several traditional single-cell isolation techniques were used such as enrichment culture, micropipette, agar plating and serial dilutions. There were isolated 49 strains of Cyanophyceae, Trebouxiophyceae, Cryptophyceae, Bacillariophyceae, Prasinophyceae, Nephroselmidophyceae, Chrysophyceae classes and others unidentified. Pigment analyzes were performed specially on Cryptophyceae group in order to confirm their identification at generic level. Several of the isolated taxa are new records for the state of São Paulo and the coast of Brazil. The findings of this study enable the phylogenetic inclusion of organisms isolated from the Brazilian coast in a world context, helping to unravel the cryptic biodiversity of organisms hitherto unknown for the studied regions.

Keywords: cryptic biodiversity; picophytoplankton, nanophytoplankton, isolation techniques, phycobilins, São Paulo state coast

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema de aquisição do cloroplasto via endossimbiose pelos os diversos tipos de organismos fotossintetizantes. Traduzido de Falkowisk <i>et al.</i> (2004).	3
Figura 2: Árvore filogenética consenso dos maiores grupos de eucariontes baseados em dados de filogenia molecular e ultraestruturais. (Baldauf, 2008).	5
Figura 3: I) Composição percentual do número de espécies descritas mundialmente do fitoplâncton marinho. Outros representam 12 classes (Chlorarachniophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cyanophyceae, Dictyochophyceae, Euglenophyceae, Eustigmatophyceae, Prasinophyceae, Raphidophyceae, Rhodophyceae e Tribophyceae) (SOURNIA <i>et al.</i> , 1991); II) Composição percentual do número de espécie de fitoplâncton descritas na costa do estado de São Paulo. “Outros” representam as classes Dictyochophyceae, Prymnesiophyceae e Cyanophyceae (VILLAC <i>et al.</i> , 2008).	10
Figura 4: Mapa da região amostral na costa do estado de São Paulo, Brasil.	14
Figura 5: Culturas mistas mantidas no BMA&K. Foto Flávia M. P. Saldanha-Corrêa.	20
Figura 6: Organização dos tubos para realização da diluição seriada.	21
Figura 7: Exemplificação do procedimento de diluição seriada.	22
Figura 8: Exemplificação da técnica de micropipetagem e diluições sucessivas (ANDERSEN & KAWACHI, 2005).	23
Figura 9: Execução do método de isolamento por micropipetagem e os materiais usados.	24
Figura 10: Processo de preparação das pipetas Pasteur.	25
Figura 11: Placas inoculadas	27
Figura 12: Exemplificação do processo de inoculação do processo de plaqueamento em meio semissólido.	30
Figura 13: Cultivos para produção de biomassa dos experimentos de biologia molecular e ficobilinas: (I) Cultivos antes da coleta da biomassa; (II) Biomassa sedimentada após centrifugação.	31
Figura 14: Extração das ficobilinas: (I) Uso de vórtex com a biomassa e tampão fosfato; (II) Biomassa com tampão fosfato antes da centrifugação; (III) Ficobilinas extraída em tampão fosfato (após a centrifugação).	34
Figura 15: Interação interespecífica em cultura mista: (I) Dinoflagelado do gênero <i>Protoperidinium</i> ; (II) Diatomácea tipo <i>Cylindrotheca closterium</i> predada pelo dinoflagelado.	36
Figura 16: Cepas de <i>Chroococcus</i> sp. isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio f/2): (I) Can1; (II) Can 2; (III) Can 3; (IV) Can 3; (V) Can 5; (VI) Can 6. Todas as microfotografias foram tiradas em aumento de 1000 vezes.	39

Figura 17: Cepas de <i>Chroococcus</i> sp. isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio <i>f/2</i>): (VII) Can 7; (VIII) Can 8; (IX) Can 9; (X) Can 10; (XI) Can 11; (XIII) Can 28. Todas as microfotografias foram obtidas com uso de objetiva de 100X.	40
Figura 18: Cepas da Cyanobacteria <i>Pseudoanabanaceae</i> isoladas de Santos por meio sólido (meio <i>f/2</i>): (I) Can 22- aumento de 1000 vezes; (II) Can 24- aumento de 1000 vezes; (III) Can 25- aumento de 400 vezes; (IV) Can 25- aumento de 1000 vezes; (V) e (VI) Can 26- aumento de 1000 vezes.	41
Figura 19: Cepas de <i>Chlamydomonas</i> sp. identificadas do BMA&K provenientes de Cananéia e Ubatuba (meio <i>f/2</i>): (I) e (II) Cepa 44 (Flag-C1); (III) e (IV) Cepa 122 (Flag- Ub1). Microfotografias em 1000 vezes.	45
Figura 20: Cepa de <i>Prasinophyceae</i> isolada de Cananéia por diluição em série (meio <i>f/2</i>): (I), (II), (III) e (IV) são microfotografias da cepa Can19, um organismo cocóide.	47
Figura 21: <i>Nephroselmis</i> sp. isolada de Ubatuba por micropipetagem (meio <i>f/2</i>). Diferentes estágios do ciclo celular. (I) Fase vegetativa; (II) e (III) Iniciando o processo de divisão celular- fusão binária; (IV) Finalização da divisão celular (cepa uba1/1).	49
Figura 22: Cepas de <i>Chlorella</i> sp isoladas de Ubatuba por plaqueamento em meio semissólido (meio <i>Erd- Shreiber</i>). (I) ubá 02/10; (II) uba02/11; (III) uba02/ 13; (IV) uba02/ 14. Microfotografias em 1000 vezes.	51
Figura 23: Cepas de <i>Ochromonas</i> sp. isoladas de Ubatuba por micropipetagem (meio <i>f/2</i>): (I) e (II) Uba 1/12; (III) Uba 1/13; (IV)Uba 1/16; (V) Uba 1/17; (VI) Uba 1/18. Microfotografias em 1000 vezes.	56
Figura 24: Cepas de <i>Ochromonas</i> sp. isoladas de Ubatuba por micropipetagem (meio <i>f/2</i>): (VII) Uba 1/19; (VIII) Uba 1/20; (IX)Uba 1/21; (X) Uba 1/22; (XI) Uba 1/22; (XII) Uba 1/23. Microfotografias em 1000 vezes.	57
Figura 25: Cepas de <i>Bacillariophyceae</i> isoladas de Ubatuba e Cananéia (meio <i>f/2</i>): (I) <i>Nitzschia</i> cf. <i>longissima</i> (cepa uba 1/ 4); (II) <i>Skeletonema</i> sp. (cepa uba 1/8); (III) e (IV) <i>Thalassiosira</i> sp. (cepas uba 1/6; uba 1/9; (V) e (VI) <i>Odontela</i> sp. (cepa can 16). Microfotografias em 1000 vezes de aumento.	60
Figura 26: Cepas de organismos não identificados de Ochrophyta isolados de Ubatuba por meio sólido (meio <i>f/2</i>): (I) Cepa uba 1/24; (II) Cepa uba 1/26; (III) e (IV) Cepa uba 1/35. Microfotografias em 1000 vezes.	61
Figura 27: Endossimbiosse nas Cryptophyta e organização celular dos representantes autótrofos do grupo. Adaptado de Douglas <i>et. al.</i> (2001).	64
Figura 28: Cepas de <i>Pyrenomonadaceae</i> (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio <i>f/2</i>): (I) Cepa can 17; (II) Cepa can 17; (III) Cepa can 17; (IV) Cepa can 18; (V) Cepa can 18 (contraste de fase); (VI) Cepa can 18 (fixado com formaldeído). Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.	68
Figura 29: Cepas de <i>Pyrenomonadaceae</i> (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio <i>f/2</i>): (VII) Cepa can 29; (VIII) Cepa can 30; (IX) Cepa can 31; (X) Cepa can 32; (XI) Cepa	

can 33; (XII) Cepa can 33 (célula em duplicação). Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.	69
Figura 30: Cepas de Pyrenomonadaceae (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio <i>f</i> /2): (XIII) Cepa can 33 (contraste de fase); (XIV), Cepa can 33 (fixado com formol); (XV) Cepa can 33 (fixado com lugol); (XVI) Cepa can 34; (XVII) Cepa can 34 (contraste de fase); (XVIII) Cepa can 35. Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.	70
Figura 31: <i>Hemiselmis</i> sp. (Cryptophyceae) isolada de Ubatuba por micropipetagem (meio <i>Erd-Shreiber</i>): cepa uba2/5 em diferentes vistas e focos.	71
Figura 32: Pigmentos fotossintéticos: cepas <i>Nephroselmis</i> sp. (UBA01/01), <i>Ochromonas</i> sp. (UBA01/21) e <i>Hemiselmis</i> sp. (UBA02/05).	76
Figura 33: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae (Can17, Can 18 e Can29)	77
Figura 34: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae (Can 30, Can 31 e Can 32)	78
Figura 35: Pigmentos fotossintéticos das cepas de Pyrenomonadaceae (Can 33, Can 34 e Can 35).79	
Figura 36: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae do BMA&K (<i>Rhodomonas</i> RJ e BMA&K 39- Cypto-C2)	80

Lista de Tabelas

Tabela 1: Amostragens realizadas para o procedimento de isolamento de organismos fitoplanctônicos.....	13
Tabela 2: Meio de cultura indefinido <i>Erd-Shreiber</i> modificado.....	18
Tabela 3: Meio de cultura semi-definido <i>Guillard f/2</i>	18

1. Introdução

O termo fitoplâncton (do grego *phyton* ou planta e *planktos* ou errante), criado em 1897, se refere a organismos bastante diversos, de origem polifilética, composto majoritariamente por seres unicelulares autótrofos oxigênicos que não são capazes de vencer as correntes (FALKOVISK & RAVEN, 1997). A maior parte dos organismos que compõe o fitoplâncton é constituída por autótrofos, capazes de construir a matéria orgânica a partir de energia luminosa, usando o CO₂ como fonte de carbono para a síntese desses compostos. Além do carbono, os organismos do fitoplâncton demandam vários nutrientes inorgânicos, sendo os principais o nitrogênio inorgânico, compostos de fósforo e outros elementos requeridos em pequenas quantidades (Na, K, Mg, Ca, Si, Fe, Mn, B, Cl, Cu, Zn, Mo, Co, entre outros). Há organismos que necessitam de uma ou mais vitaminas (HUTCHINSON, 1961).

Embora os organismos fitoplanctônicos representem menos de 1% da biomassa fotossintética do planeta, são responsáveis por mais de 48% da produção primária anual da Terra (FIELD *et al.*, 1998). No ambiente marinho a camada iluminada da coluna de água é extremamente pequena quando comparada com a porção não iluminada, o que limita a vida desses organismos a no máximo 200 metros de profundidade nas águas mais claras.

A fotossíntese oxigênica parece ter surgido apenas uma vez na história evolutiva, e subsequentemente foi espalhada via endossimbiose, por transferência lateral do cloroplasto, para uma grande variedade de organismos eucariontes (FALKOWSKI *et al.*, 2004; DELWICHE, 2007). Cedo na escala de evolução dos eucariontes um organismo heterotrófico primitivo englobou e reteve uma cianobactéria primitiva, transformando o organismo englobado em uma organela, o cloroplasto. A endossimbiose primária provavelmente ocorreu em um único evento e deu origem ao grupo das existentes Archaeplastida, que inclui Glaucophyta, Rhodophyta (algas vermelhas) e Chloroplastida (algas verdes e plantas terrestres) (FIGURA 1) (BALDAUF, 2008). Os membros de Archaeplastida foram englobados por outros protistas heterotróficos, possivelmente em eventos de endossimbiose diferentes. Euglenophyta, Chlorarachniophyta e alguns dinoflagelados foram originados pelo processo de endossimbiose secundária envolvendo

uma alga verde. Eventos de endossimbiose secundária envolvendo uma alga vermelha deram origem às Cryptophyceae, Haptophyceae, Stramenopilos (ou Ochrophyta). Os dinoflagelados que contém fucoxantina e peridinina provavelmente surgiram de eventos de endossimbiose terciária, envolvendo haptofíceas (YOON *et al.*, 2002). Todos os processos de endossimbiose causaram perdas massivas dos genes do genoma do hospedado, muitos deles foram transferidos para o genoma da célula hospedeira. O processo de transferência de gene endossimbionte contribuiu enormemente para a evolução das algas (TIRICHINE & BOWLER, 2011).

O início da evolução dos autótrofos fotossintetizantes marinhos começou com a origem da fotossíntese nas bactérias, aproximadamente 3,5 a 3,2 bilhões de anos atrás (DES MARAIS, 2000). Dados de estudos geológicos supõem que procariontes governaram o ecossistema marinho durante o Proteozóico (SIMON *et al.*, 2009). A capacidade fotossintética foi adquirida por um eucarionte há aproximadamente 1,8 bilhões de anos, no início do Proterozóico (TIRICHINE & BOWLER, 2011). Há evidências de que as algas verdes ganharam espaço na produção primária dos oceanos no Proteozóico tardio e no Cambriano. A população primitiva do fitoplâncton permaneceu durante o Mesozóico, até a radiação das algas que contém clorofila *a* e *c*, como diatomáceas, dinoflagelados e haptofíceas. Registros fósseis sugerem que esses grupos se tornaram dominantes durante o Mesozóico e continuam a prosperar (FALKOWSKI *et al.*, 2004). As cianobactérias e algas verdes, que parecem ser menos importantes no plâncton costeiro, ainda codominam ou dominam em águas oligotróficas dos giros centrais e dominam na classe dos picoplanctônicos modernos (SIMON *et al.*, 2009).

É possível dizer, tendo como premissa a teoria da endossimbiose, que a aquisição de um cloroplasto pode se dar por transferência lateral, sendo assim, qualquer organismo, que consiga reter o endossimbionte, pode se tornar autotrófico. Partindo deste ponto, podemos entender como e por que os organismos fotossintéticos estão dispersos em tantas linhagens, com diferentes relações evolutivas.

Figura 1: Esquema de aquisição do cloroplasto via endossimbiose pelos os diversos tipos de organismos fotossintetizantes. Traduzido de Falkowisk *et al.* (2004).

1.1. Sistemática do Fitoplâncton Marinho: um desafio para a ciência

O conhecimento da biodiversidade parece caminhar lado a lado com o homem, como o próprio conhecimento da espécie humana. A sistemática é uma ciência que surgiu para tentar padronizar e uniformizar o nosso conhecimento sobre a biodiversidade das espécies. Para isso, a sistemática tem o papel de descrever as espécies, encontrar certo tipo de organização nessa diversidade (se houver), entender os processos que culminaram na diversidade encontrada e apresentar um sistema único de referência sobre a biodiversidade (AMORIM, 2002). Por meio do sistema de classificação dos seres vivos, a sistemática expressa a ordem encontrada em um sistema nominal, chamado de classificação biológica.

A sistemática, como qualquer outra ciência, passa por conflitos de ideias entre as diferentes escolas que foram surgindo ao longo do tempo. A parte da sistemática que lida com a descrição das espécies é pouco discutida, mas é essencial para fazer qualquer inferência. Entretanto, a relação entre as espécies é alvo de muitas discussões. Há, basicamente, três tipos de escolas dentro da sistemática que disputam o método de relacionamento entre as espécies, o filogenético (ou cladista), o gradismo e a taxonomia numérica. O método filogenético é baseado na premissa que as classificações devem representar as relações de parentesco entre as espécies e táxons. O gradismo defende que os táxons devem representar etapas da história evolutiva entre os grupos. Já a taxonomia numérica parte do pressuposto de que quanto mais características morfológicas existem entre os táxons, mais relacionados eles estão entre si (AMORIM, 2002).

A escola da taxonomia numérica vai contra os preceitos da teoria da evolução, pois na busca apenas por características morfológicas para estabelecer as relações entre os táxons não há a preocupação com a história evolutiva entre os táxons. As comparações morfológicas podem levar a interpretações equivocadas, uma vez que semelhanças morfológicas nem sempre são resultado de descendência em comum (homologia), mas podem ser fruto de convergência evolutiva (homoplasia ou analogia).

Historicamente, as algas unicelulares vêm sendo classificadas com outras formas de vida unicelulares, dentro de um grande reino primeiramente definido por Ernst Haeckel como Protista (Haeckel apud TIRICHINE & BOWLER, 2011). Esse reino,

convenientemente, agrupava tudo o que não podia ser classificado como fungo, animal ou planta. Entretanto, tornou-se claro que esse agrupamento é insuficiente para incorporar organismos sem relacionamento filogenético. A classificação biológica dos organismos tem sofrido mudanças drásticas nas últimas décadas devido ao melhoramento da fonte de base de dados com melhores técnicas de microscopia e a filogenia molecular. Na classificação proposta por Baldauf (2008), baseada em dados ultraestruturais e moleculares, os autótrofos estão distribuídos em seis dos nove grupos propostos (FIGURA 2).

Figura 2: Árvore filogenética consenso dos maiores grupos de eucariontes baseados em dados de filogenia molecular e ultraestruturais. (Baldauf, 2008).

As discussões sobre os táxons e suas relações permeiam até mesmo os conceitos usados para classificar as espécies. Há uma grande variedade de conceitos de espécie, uma vez que nenhum dos conceitos existentes pode ser aplicado a todos os organismos vivos. A descrição precisa das espécies é um requerimento essencial para o acesso à biodiversidade, assim como o próprio entendimento de sua ecologia e história evolutiva. Apesar de longos debates, ainda não existe consenso e vários conceitos de espécie têm sido adotados. Enquanto o tradicional conceito morfológico de espécie domina o campo da taxonomia, muitos autores têm declarado a necessidade de uma clara definição, que incluiria a definição genética e elucidação do ciclo de vida, pois a morfologia é muito influenciada por condições externas e pode mudar de acordo com a etapa do ciclo de vida (SIMON *et al.*, 2009). A elucidação do acasalamento permitiria a definição de espécie biológica como descrita por Mayr (1969), que conceituou espécies biológicas como grupos de populações naturais que se acasalam e são isolados reprodutivamente de outros grupos. O conceito biológico de espécie é especialmente problemático para organismos do fitoplâncton, pois as características morfológicas não são sempre fáceis de perceber e a reprodução sexuada é completamente desconhecida em muitos grupos do fitoplâncton.

Ao longo das últimas décadas, a diversidade genética em táxons morfológicamente definidos de fitoplâncton tem sido explorada por diversos pesquisadores no mundo, revelando grande diversidade críptica em espécies bem definidas (SIMON *et al.*, 2009). Um exemplo pode ser dado por meio do trabalho de Slapeta *et al.* (2006), no qual foi realizado estudo filogenético envolvendo várias linhagens isoladas ao longo dos oceanos do mundo da microalga *Micromonas pusilla*, um picoeucarionte (~2µm). As análises filogenéticas revelaram que a morfoespécie tradicional compreende várias linhagens independentes, algumas das quais parecem ser cosmopolitas. Algumas linhagens são proximamente relacionadas, entretanto, outras formam grupos distantes, revelando a existência de diversidade críptica (SLAPETA *et al.*, 2006). Os resultados encontrados pelos autores ilustram que a dispersão global dos picoeucariontes é possível nos oceanos, entretanto, essa capacidade não implica em redução no número de espécies, mas sim revela que o conceito morfológico de espécie é inadequado.

Novos estudos combinando análises genéticas em vários genes, análises morfológicas, fisiológicas e biogeográficas devem ser realizados para elucidar o status taxonômico de muitas espécies do fitoplâncton. Esses estudos também poderão ajudar na formulação de um novo conceito de espécie que em contrapartida permitirão um acesso e monitoramento da biodiversidade mais satisfatório, avanços no conhecimento de ecologia, fisiologia e genética do fitoplâncton permitirão o melhor entendimento dos processos evolutivos que prevaleceram no oceano (SIMON *et al.*, 2009).

1.2. Biodiversidade do Fitoplâncton Marinho: panorama global, nacional e estadual.

A diversidade específica do fitoplâncton marinho é comparativamente baixa quando levada em consideração a diversidade nos altos níveis taxonômicos (divisões, classes), especialmente quando comparamos a alta diversidade de espécies encontrada nas plantas terrestres, que ultrapassa o valor de 300.000 (SIMON *et al.*, 2009). Para o fitoplâncton marinho, menos de 4.500 espécies foram descritas até a década de 80 (SOURNIA *et al.*, 1991) (FIGURA 3- I).

Considerando pesquisas já realizadas no Brasil e no estado de São Paulo, o número de trabalhos enfocando a identificação de espécies do fitoplâncton marinho é relativamente pequeno. Além disso, a grande maioria desses trabalhos é de divulgação restrita, como teses, dissertações, ou mesmo relatórios, cuja maior parte é de difícil acesso. Merece atenção, pelo enfoque sobre o levantamento da biodiversidade do fitoplâncton para o estado de São Paulo, o trabalho realizado por Villac *et al.* (2008). As autoras apresentam uma lista de 572 táxons, cuja maioria é representada por diatomáceas (82%), seguida pelos dinoflagelados (16%), restando apenas 2% para os demais grupos, que são representados apenas por cianobactérias, silicoflagelados, cocolitoforídeos e ebrídeos (FIGURA 3- II). Estes dados refletem a tradição do Brasil ter taxonomistas em diatomáceas e a carência de especialistas em outros grupos do fitoplâncton marinho. Infelizmente, os dados sobre biodiversidade se encontram dispersos, e muitas vezes é difícil fazer uma aproximação dos números, pois é necessário conferir sinônimos e demanda bastante tempo de trabalho.

A deficiência de informações sobre espécies de fitoplâncton pode também estar relacionada às limitações de amostragem, à insuficiência de características morfológicas distintas entre alguns grupos, e à escassez de taxonomistas. Segundo Simon *et al.* (2009) a maioria das espécies do fitoplâncton ainda não foi descrita, enquanto que as listas de mamíferos e plantas terrestres devem refletir com maiores detalhes a diversidade real. Várias linhagens, totalmente diferentes dos táxons já descritos em literatura foram identificadas nas últimas décadas, especialmente para os organismos picoplactônicos (CHRÉTIENNOT-DINET *et al.*, 1995; GUILLOU *et al.*, 1999; VIPREY *et al.*, 2008).

Estudos a partir de amostragens ambientais juntamente com análises moleculares evidenciam que ainda existem muitas espécies do picoplâncton a serem descobertas (MOON-VAN DER STAAY *et al.*, 2000; VIPREY *et al.*, 2008).

A identificação das algas e cianobactérias que compõem o picoplâncton e a menor fração do nanoplâncton é complexa, uma vez que compreende vários grupos de organismos distintos, de tamanho muito pequeno e formas muito semelhantes (MOON-VAN DER STAAY *et al.*, 2000). Aparentemente a vida no oceano é mais favorável para formas diminutas cocóides, que resultou em evolução convergente de alguns grupos de microalgas para essa morfologia (POTTER *et al.*, 1997). Segundo Not *et al.* (2004) aproximadamente 40 espécies foram descritas para organismos do picoplâncton, distribuídos em nove classes, e estudos com sondas moleculares sugerem que existam muitas espécies ainda não descritas.

Por muitos anos, a microscopia ótica foi o único meio de observação e descrição das células do fitoplâncton. No Brasil, para a grande maioria dos centros de ensino e pesquisa, a microscopia ótica continua sendo a principal e única ferramenta utilizada, embora seu uso seja muito limitado para observação da diversidade em campo de organismos do picoplâncton e as menores frações do nanoplâncton (VAULOT *et al.*, 2008). Poucos trabalhos fizeram uso de ultraestrutura e/ou biologia molecular para identificação de algum grupo. Para o Brasil, são destaques os trabalhos de recentemente publicados por Bergesch *et al.* (2008) e Menezes *et al.* (2010), que vão além do uso da microscopia ótica, usando microscopia eletrônica e/ou marcadores moleculares para identificação de organismos do fitoplâncton.

Diversos trabalhos de caráter ecológico/oceanográfico para a costa do estado de São Paulo, que utilizaram o método de Uthermöl para estimativa de número de células (ZILLMANN, 1990; AIDAR *et al.*, 1993; SALDANHA, 1993; ABE, 1993; GIANESELLA *et al.*, 1999; GIANESELLA & SALDANHA-CORRÊA, 2003; SALDANHA-CORRÊA & GIANESELLA, 2003; ANCONA, 2007; BARRERA-ALBA *et al.*, 2008; SALDANHA-CORRÊA & GIANESELLA, 2008), mostram que grande parte da biomassa fitoplanctônica é representada pelos organismos não identificados, grosseiramente classificados como

“fitoflagelados”. A identificação dos organismos que compõem o grupo dos “fitoflagelados” autótrofos marinhos ainda é uma lacuna a ser preenchida, não apenas na biota do estado de São Paulo, mas no oceano como um todo (MOESTRUP, 1979; BERGESCH & ODEBRECHT, 2001; THRONDSSEN, 1997).

Entretanto, o uso de microscopia ótica aplicada a organismos isolados em culturas garante a observação de informações valiosas sobre o tamanho e forma das células, o número de cloroplastos, ou a forma do nado, possibilitando a identificação da espécie (VAULOT *et al.*, 2008). Embora as culturas possam permitir essas observações, as interpretações dos dados devem levar em consideração que essas técnicas favorecem espécies de crescimento rápido, chamadas comumente de “ervas daninhas” (ANDERSEN & KAWACHI, 2005; VAULOT *et al.*, 2008).

Diante do panorama encontrado nacionalmente, o presente trabalho visa empregar outro método de estudo para as frações do nano e picoplâncton, realizando isolamento de espécies de regiões distintas da costa do estado de São Paulo, a fim de aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade destas frações pouco estudadas do fitoplâncton marinho, praticamente desconhecidas para todo Brasil.

Figura 3: I) Composição percentual do número de espécies descritas mundialmente do fitoplâncton marinho. (Outros representam 12 classes (Chlorarachniophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cyanophyceae, Dictyochophyceae, Euglenophyceae, Eustigmatophyceae, Prasinophyceae, Raphidophyceae, Rhodophyceae e Tribophyceae) (SOURNIA *et al.*, 1991); II) Composição percentual do número de espécies de fitoplâncton descritas na costa do estado de São Paulo. “Outros” representam as classes Dictyochophyceae, Prymnesiophyceae e Cyanophyceae (VILLAC *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Os organismos do nano e picofitoplâncton, devido ao tamanho diminuto e difícil reconhecimento, são praticamente desconhecidos, em termos de identificação taxonômica. Por isso, há uma grande lacuna no conhecimento da biodiversidade desses grupos do fitoplâncton marinho, não somente para o estado de São Paulo, mas para a costa do Brasil como um todo. Entretanto, estes organismos são os principais produtores primários, principalmente nas regiões oligotróficas tropicais e subtropicais. Diante desse panorama, o presente estudo teve como objetivo principal ampliar o conhecimento da biodiversidade de fitoplâncton costeiro de São Paulo através da aplicação de técnicas de isolamentos e identificação de novas linhagens, principalmente desses organismos do nano e picofitoplâncton para o Banco de Micro-organismos “Aidar & Kutner” (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), a partir de amostras coletadas nas regiões costeiras norte, centro e sul do estado de São Paulo.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Isolar e identificar principalmente organismos constituintes do nanoplâncton (2-20 μ m);
- Ampliar o acervo de cepas do Banco de Micro-organismos “Aidar & Kutner” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em relação a organismos do pico e nano plâncton da costa do estado de São Paulo possibilitando novas oportunidades de estudo para pesquisadores;
- Realizar caracterização fisiológica de algumas cepas recém- isoladas e outras pertencentes ao BMA&K do IOUSP;
- Comparar os diferentes métodos tradicionais de isolamento de microalgas, considerando os principais grupos favorecidos por cada técnica;

- Comparar a resposta de meios de cultura distintos em relação às espécies que conseguem ser mantidas pelos mesmos;
- Identificar as linhagens até o menor nível taxonômico possível por meio de microscopia ótica (caracterização morfológica);
- Testar diferentes agentes fixadores para grupos sem parede celular do fitoplâncton marinho para verificar qual o mais adequado na preservação de caracteres taxonômicos;
- Verificar se as cepas isoladas e os organismos disponíveis no BMA&K já tiveram ocorrência documentada na costa do Brasil /ou no estado de São Paulo.

3. Material e Métodos

3.1. Área de amostragem

Para a realização deste trabalho foram realizadas amostragens de água do mar nas regiões do litoral paulista de Cananéia, Santos e Ubatuba (FIGURA 4). As amostragens ocorreram irregularmente ao longo do ano de 2011 (TABELA 1), em função do andamento do processo de isolamento, que era iniciado assim que a água chegava às dependências do BMA&K. As amostragens foram realizadas em superfície com uso de uma garrafa de água comum tipo “pet”. As regiões costeiras onde foram realizadas as amostragens são bem distintas entre si pela condição geomorfológica. A região de Ubatuba (23° 26'S; 45°4'O) é oligotrófica e possui pouco aporte de água doce, ao contrário de Cananéia (25°1' S; 47° 55' O), onde é encontrado complexo estuarino, sendo local naturalmente mais eutrofizado. Já a região de Santos (23°58'S; 46° 20' O) possui semelhanças com Cananéia, embora seja muito mais impactada pelas atividades humanas, em função da intensidade de lançamento de resíduos domésticos e industriais.

Tabela 1: Amostragens realizadas para o procedimento de isolamento de organismos fitoplancctônicos.

LOCAL	Cananéia (Barra)	Santos (Canal do Porto)	Ubatuba	Ubatuba	Ubatuba
DATA	16/04/11	02/05/2011	05/06/2011	15/08/2011	28/11/2011

O procedimento de coleta é decisivo para o sucesso no isolamento das espécies, pois células danificadas ou mortas aumentam a probabilidade do fracasso. Como o foco do presente estudo são os organismos pertencentes ao nanoplâncton e picoplâncton, optou-se por realizar as coletas com uma garrafa. Tal decisão foi baseada no tamanho e abundância dos organismos de interesse. O nanoplâncton e picoplâncton são os menores organismos do fitoplâncton, sendo assim, a grande maioria deles atravessa os poros da rede. Como são os organismos mais abundantes no ambiente aquático, não é necessário concentrá-los. A coleta de material com uso de rede é mais indicada para obter organismos do microfitoplâncton, pois a rede concentra os organismos que são maiores que os poros de

sua malha. Uma desvantagem da coleta em rede é o dano causado pelo processo de filtração exercido sobre os organismos, diminuindo o número de células viáveis na amostra. As condições ambientais, como salinidade e temperatura, nem sempre foram obtidas para todas as amostragens do estudo.

Figura 4: Mapa da região amostral na costa do estado de São Paulo, Brasil.

3.2. Infraestrutura de cultivo e meios de cultura

Alguns procedimentos são necessários para se obter êxito no processo de isolamento. É importante tentar reproduzir o ambiente natural de onde a amostra foi coletada e protegê-la de variações de temperatura, luminosidade e agitação violenta. Segundo Andersen & Kawachi (2005), as variáveis ambientais mais importantes para espécies provenientes de ambientes costeiros são temperatura e salinidade. Sendo assim, as condições de salinidade e temperatura foram padronizadas de acordo com o reportado em literatura para a área. Neste sentido, foi feita a tentativa de alterar o mínimo possível as condições dessas variáveis sobre a amostra coletada até o momento de inoculação. O meio de cultura é sempre feito com água do mar proveniente do ambiente de onde as espécies foram isoladas para se evitar estresse nos organismos cultivados.

Os inóculos que serviram para isolamento e as linhagens isoladas foram dispostos inicialmente em câmaras incubadoras tipo BOD e na sala climatizada do Banco de Micro-organismos Aidar & Kutner (BMA&K), estilo *walk in*, com controle de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminação média de $300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro. Os cultivos foram mantidos nessas condições até que a reforma do BMA&K se iniciasse. Durante um período de três meses a temperatura foi alterada para $18 \pm 1^\circ\text{C}$, por motivo de reforma na sala climatizada. Após a reforma, as culturas foram transferidas para a sala climatizada de cultivo do BMA&K com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, luminosidade de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, onde são mantidas até o momento.

Todos os materiais utilizados para o cultivo e isolamento, com exceção da água do mar utilizada para inóculo foram previamente esterilizados antes de serem utilizados para a disposição e manuseio dos organismos. Utensílios de vidro, exceto os volumétricos, assim como a água do mar usada para fazer o meio de cultura e os materiais de plástico (resistentes a altas temperaturas), foram esterilizados por calor úmido em autoclave vertical (503 Eletrolab) à temperatura de 120°C e pressão de $1 \text{ kgf} / \text{cm}^2$. O tempo de autoclavagem das vidrarias e utensílios de plástico foi de aproximadamente 20 minutos, enquanto que a água do mar foi submetida por no mínimo uma hora. O tempo de esterilização por autoclavagem varia de acordo com o volume que está sendo submetido ao processo,

entretanto, os volumes utilizados não ultrapassaram o limite de esterilização com o tempo empregado de acordo com o sugerido por Lourenço (2006).

Após o período de autoclavagem, as frascarias foram transferidas para estufas (~60°C) e lá mantidas até completa evaporação da água que penetra nos utensílios durante a autoclavagem. Com relação à água do mar, esta foi retirada da autoclave após o processo e deixada resfriar em temperatura ambiente. Após completamente fria, os nutrientes foram adicionados para o preparo dos meios de cultura.

Os utensílios volumétricos, como provetas e balões volumétricos, foram esterilizados somente por radiação ultravioleta por cerca de uma hora. Todos os demais utensílios, mesmo após autoclavados e secos em estufa, também foram submetidos à esterilização em ultravioleta. O manuseio das culturas e o preparo do meio de cultura foram inicialmente feitos em bancada previamente desinfetada com álcool 70% e/ou hipoclorito de sódio a 3% junto ao bico de Bunsen. Posteriormente, todos os procedimentos acima descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical (Pachane 420).

As culturas originadas dos processos de isolamentos descritos no tópico 3.3 foram mantidas em tubos de ensaio sob as condições descritas acima. As repicagens iniciais foram feitas a cada 15 dias. Após seis meses, a repicagem das cepas isoladas passou a ser mensal. Os organismos isolados estão sendo mantidos nos meios de cultura *Guillard* (f/2) (GUILLARD & RYTHER, 1962; GUILLARD, 1975) e *Erd-Shreiber* (THRONDSSEN, 1978). As concentrações dos meios de cultura estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

A escolha de um meio de cultura adequando para o crescimento da espécie em interesse é crucial para um isolamento bem sucedido. As diatomáceas requerem adição de sílica ao meio de cultura, especialmente as espécies de tecas mais truncadas. Espécies mixotróficas, como dinoflagelados e Chrysophyceae, geralmente não conseguem sobreviver em culturas axênicas. Sendo assim, para aumentar o êxito dos isolamentos, foram empregados os dois tipos de meios de cultura. Entretanto, o meio *Erd-Schreiber* só foi utilizado para os cultivos de Ubatuba.

A água do mar utilizada para confecção do meio de cultura foi coletada das regiões de Cananéia e Ubatuba, nas proximidades das bases de pesquisa do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Dessa forma, as espécies isoladas foram cultivadas com a água proveniente do local de isolamento. A salinidade do meio de cultura feito a partir da água de Cananéia foi ajustada para 25 e o meio feito a partir da água de Ubatuba foi ajustada para 35. A salinidade final do meio foi checada com um refratômetro manual (211 Biobrix).

A maioria das soluções estoque necessárias para a preparação dos meios de cultura foram feitas adicionando-se o sal de base a uma porção de água destilada, previamente autoclavada, em condições assépticas, dentro da câmara de fluxo laminar ou junto ao bico de Bunsen. Posteriormente, a solução foi submetida à filtração a vácuo (filtro de 0,22 μ m) e disposta em frasco âmbar autoclavado e mantida em refrigeração (aproximadamente 12°C). A solução de extrato de solo foi feita seguindo as recomendações descritas em Lourenço (2006) e Throndsen (1997). A solução de silicato foi a única mantida em frascos de plástico e as demais em vidro âmbar. As soluções de extrato de solo e vitaminas foram mantidas congeladas em alíquotas menores, para evitar a contaminação.

Tabela 2: Meio de cultura indefinido *Erd-Shreiber* modificado.

Componentes do meio de cultura	Reagente	Concentração solução estoque	Quantidade adicionada para a cultura	Concentração final meio de cultura
Água do mar	-	-	1000mL	-
Extrato de solo	-	1000g/L	1mLl	1200mg/L
Nitrato	NaNO ₃	50g/L	1mL	50mg/L
Fosfato	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	10g/L	1mL	10mg/L
NaFeEDTA	Na ₂ EDTA	87mg/L	0.mL	87µg/L
	FeCl ₃	63mg/L		63µg/L
	Tiamina (B1)	200mg/L	2mL	200µg/L
Vitaminas	Biotina	1mg/L		1µg/L
	Cianocobalamina (B12)	1mg/L		1µg/L

Tabela 3: Meio de cultura semi-definido *Guillard f/2*

Componentes do meio de cultura	Reagente	Concentração solução estoque	Quantidade adicionada da solução	Concentração final meio de cultura
Água do mar			1000mL	1000mL
Nitrato	NaNO ₃	75g/L	1mL	75mg/L
Fosfato	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5g/L	1mL	5mg/L
Silicato	NaSiO ₃ .9H ₂ O	30g/L	1mL	30mg/L
	CuSO ₄ .5H ₂ O	9.8mg/L	1mL	9.8µg/L
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22mg/L		22µg/L
Metais- traço	CoCl ₂ .6H ₂ O	10mg/L		10µg/L
	MnCl ₂ .4H ₂ O	180mg/L		180µg/L
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6.3mg/L		6.3µg/L
	Na ₂ EDTA	43.6mg/L		43.6µg/L
	FeCl ₃ .3H ₂ O	31.5mg/L		31.5µg/L
	Tiamina (B1)	100mg/L	1mL	100µg/L
Vitaminas	Biotina	0.5mg/L		0.5µg/L
	Cianocobalamina (B12)	0.5mg/L		0.5µg/L

3.3. Técnicas de isolamento

3.3.1. Cultura mista: enriquecimento da água do mar

A água do mar natural é frequentemente deficiente em um ou mais nutrientes. Na natureza as algas sobrevivem a partir dos nutrientes reciclados pela ação bacteriana, predação e morte dos organismos. Uma vez que a água do mar é coletada, a reciclagem deve a ser reduzida ou alterada, e o estresse de nutrientes pode levar a morte das espécies de interesse. Dessa forma, para algumas espécies, um pequeno enriquecimento das amostras de água do mar natural pode estender a vida das células saudáveis necessárias para o isolamento.

As culturas mistas são importantes para a manutenção dos organismos vivos, aumentando a densidade celular, e consequentemente, facilitando seu isolamento. Para isso, deve-se conhecer a requisição nutricional das espécies de interesse e adicionar nutrientes selecionados que favoreçam seu crescimento e diminuam a concentração dos competidores. Outra vantagem deste procedimento é que, com o passar de alguns meses, poucas espécies são capazes de sobreviver à depleção dos nutrientes do meio de cultura. Comumente restam poucas espécies ou apenas uma.

A uma parte da amostra de água do mar natural coletada das regiões estudadas foi adicionada ao meio de cultura para obtenção de culturas mistas. Em todas as culturas mistas estabelecidas, adotou-se a proporção de três partes de água natural para uma parte de meio de cultura, ou de uma parte de água do mar e uma parte de meio de cultura. Tais culturas foram mantidas no BMA&K sob as condições de cultivo descritas no tópico 3.2 (FIGURA 5).

As culturas mistas foram analisadas em geral a cada dois dias. Para o isolamento das espécies de interesse nas culturas mistas foram utilizados os métodos de diluição em série, micropipetagem e diluições sucessivas, plaqueamento em meio sólido e semissólido, conforme descritos nos tópicos a seguir.

Figura 5: Culturas mistas mantidas no BMA&K. Foto: Flávia M. P. Saldanha-Corrêa.

3.3.2. Isolamento por diluição em série

A técnica de diluição em série é bastante empregada para isolamento dos organismos mais abundantes no ambiente. Essa técnica permite o isolar um único indivíduo sem a manipulação direta de uma célula. A diluição em série é um método empregado tanto para o isolamento de células quanto para a estimativa do número de células original na água do mar. Segundo Throndsen (1995), se a diluição em série for realizada mantendo-se o controle da diluição realizada, pode-se estimar o número original de células isoladas, com uma margem de erro entre 20-50%. Os trabalhos de Throndsen (1978) e Throndsen (1995) explicam os detalhes para realização da diluição em série e cálculo do número mais provável (NMP).

Para fazer a diluição da amostra de água do mar original, os tubos de ensaio foram previamente preparados, adicionando-se meio de cultura não diluído a cada um deles. Estes foram dispostos em suportes e organizados em cinco séries de cinco tubos. Todos os tubos foram numerados de acordo com a série em que estava e o número dentro da série (ex: Ia, Ib, Ic..., Iia, Iib, ..., Va, Vb, Vc, Vd, Ve; onde os números romanos representam a série de diluição e as letras marcam o tudo dentro de cada série), conforme exemplificado na Figura

6. As células foram inoculadas usando-se uma seringa graduada (10mL), devido à praticidade de manuseio.

Figura 6: Organização dos tubos para realização da diluição seriada.

Para a inoculação da primeira série de tubos de ensaio, a seringa foi preenchida com 10mL de água do mar natural. Em cada tubo de ensaio da primeira série foi adicionado 1mL do conteúdo da seringa (Ia, Ib, ..., Ie). Nessa série de tubos não foi feita diluição da amostra natural da água do mar. Para inocular a segunda série de tubos de ensaio, o conteúdo da seringa foi dispensado até restar apenas 1mL da água do mar natural, e, posteriormente, se adicionou 9 mL de meio de cultura estéril à seringa. O próximo passo foi adicionar 1mL do conteúdo da seringa aos cinco tubos da segunda série (IIa, IIb, ..., IIe). O processo foi repetido da forma descrita acima até a quinta série da diluição. Realizando sucessivamente a diluição como descrito acima, a cada série a água do mar é diluída em dez vezes (FIGURA 7). As cinco séries resultantes desse processo de diluição contém a água do mar natural nas concentrações de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000.

Figura 7: Exemplificação do procedimento de diluição seriada.

O produto das diluições em série foi incubado nas condições descritas no tópico 3.2. As culturas foram incubadas por aproximadamente 20 dias e posteriormente analisadas em microscopia ótica para verificação do sucesso de isolamento de culturas unialgais. As culturas unialgais resultantes foram mantidas, e as demais foram purificadas pelo processo de isolamento por micropipetagem e diluições sucessivas.

3.3.3. Isolamento por micropipetagem e diluições sucessivas

Segundo Andersen & Kawachi (2005), o método de isolamento por micropipetagem é o mais comum no isolamento de uma única célula. O isolamento por micropipetagem e diluições sucessivas é utilizado especialmente para espécies do microfitoplâncton e a porção maior do nanoplâncton (superior a 10µm). A técnica é limitada pelo tamanho dos organismos, uma vez que se utiliza um microscópio estereoscópico ou um microscópio ótico para a visualização do material a ser isolado. As células muito pequenas são difíceis de serem observadas, distinguidas e capturadas por esse método.

O objetivo dessa técnica é localizar a microalga de interesse em uma gota de água do mar coletada e em seguida realizar sua transferência para outras gotas de água do mar filtrada ou meio de cultura estéril, com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta afinada. À medida que a célula de interesse vai sendo transferida de uma gota a outra, vão sendo eliminadas as demais espécies indesejadas que estavam presentes na água do mar coletada. A cada transferência menos células de outras espécies estão presentes junto com a espécie de interesse a ser isolada, até o ponto que se atinge a condição de apenas o organismo de interesse estará presente na gota (FIGURA 8).

Figura 8: Exemplificação da técnica de micropipetagem e diluições sucessivas (ANDERSEN & KAWACHI, 2005).

Para cada transferência do organismo de interesse a uma nova gota, foi sempre utilizada uma pipeta Pasteur limpa, para diminuir o número de células indesejadas que poderiam ser transportados para a nova gota. Quando apenas um organismo foi encontrado na última gotícula, essa célula foi transferida para tubo de ensaio ou para um poço de placa de poliestireno com 24 poços, contendo uma pequena quantidade de meio de cultura na formulação original (1-3 mL).

Foram usadas lâminas de microscopia comum junto a um microscópio ótico para a realização dessa técnica (FIGURA 9). Esse método de isolamento requer certa habilidade para o êxito, uma vez que os movimentos são bem sutis com a pipeta e é necessário realizar de todo o procedimento com certa rapidez, pois quanto mais tempo se leva, mais a água do

mar evapora, culminando no aumento da salinidade. O aumento da salinidade gerado pela evaporação inviabiliza o isolamento de muitas células. Além disso, a luz proveniente do microscópio gera um estresse tanto por alta luminosidade quanto pelo aumento da temperatura. Para células monadais, o processo deve ser o mais rápido possível, pois muitas células ficam rapidamente estressadas pela alta incidência luminosa e podem, posteriormente, não conseguir reproduzir-se e estabelecer o cultivo.

Figura 9: Execução do método de isolamento por micropipetagem e os materiais usados.

As pipetas Pasteur necessitam ser preparadas para recolher apenas uma pequena alíquota de água na gota submetida à micropipetagem. O capilar das pipetas, que geralmente se adquire no mercado, é demasiado longo para esse procedimento, necessitando de uma adaptação para essa técnica. Para isso, se aqueceu a parte fina da pipeta em uma lamparina ou bico de Bunsen e, quando o vidro começou a derreter, a pipeta foi retirada da chama e puxada com uma pinça delicadamente (FIGURA 10). Depois se segurou o capilar com a pinça na porção mais frágil para quebrá-lo. Para evitar que o capilar fique com formato irregular na ponta, ele foi passado rapidamente na chama da lamparina após a quebra.

As pipetas Pasteur após o processo de afinamento de sua ponta foram autoclavadas e secadas em estufa por dois dias antes do processo de isolamento. Imediatamente antes de

iniciar a micropipetagem, gotas de meio de cultura foram dispostas paralelamente em lamínas de microscopia. Posteriormente, uma gota de água do mar natural ou cultura mista também adicionada à lâmina para iniciar o processo de transferência de células. É necessário bastante cuidado e delicadeza com essa manipulação, uma vez que qualquer movimento brusco pode misturar as gotículas de água na lâmina. A busca pela célula de interesse iniciou-se na primeira gotícula. Quando o organismo de interesse foi encontrado, a pipeta foi posicionada próxima à célula e por capilaridade esta foi sugada. Essa porção de água sugada pela pipeta foi transferida para a próxima gota, correspondente ao meio de cultura estéril, com o auxílio de uma tetina. Na nova gota, a célula de interesse foi localizada, e quando encontrada, uma nova pipeta estéril foi posicionada próximo à célula de interesse até que essa foi sugada. Novamente, se transferiu o conteúdo da pipeta para a próxima gota limpa de meio de cultura estéril. O processo de transferência da célula de interesse para uma nova gota de meio de cultura estéril foi feito até o ponto que se encontrou apenas a célula de interesse na gota.

Figura 10: Processo de preparação das pipetas Pasteur.

Após aproximadamente duas semanas de incubação, os clones isolados em pequenos volumes (1-2 mL) foram transferidos para volumes maiores (10mL) contendo

meio de cultura. Esse tipo de procedimento de transferência gradual para volumes maiores foi realizado, pois a diluição excessiva pode ser inadequada para muitas espécies.

3.3.4. Isolamento por plaqueamento em meio sólido

O isolamento por plaqueamento em meio sólido também é uma técnica amplamente empregada principalmente por sua facilidade de execução e eficiência. Tal técnica é recomendada em especial para o isolamento de espécies pertencentes ao nanoplâncton e picoplâncton, pois são difíceis de manipular pelo método de micropipetagem, devido ao seu pequeno tamanho. Uma grande vantagem é que o meio sólido pode estabelecer culturas axênicas diretamente sem o uso de outras técnicas. Geralmente, as células que têm estruturas rígidas (p.ex. parede celular), como clorofíceas e prasinofíceas, conseguem facilmente ser isoladas por esse método (LAKEMAN & CATTOLICO 2007).

O meio de cultura utilizado para isolamento em meio sólido seguiu a formulação sugerida por Ukeles (1976), com os meios de cultura especificados no tópico 3.2, associados ao ágar. A escolha deste método se deu por causa da facilidade de adicionar qualquer meio de cultura a formulação do meio sólido, o que diminui o estresse gerado na transferência do meio sólido para o líquido. Para o preparo do meio sólido, uma porção de ágar foi autoclavada com um pouco de água destilada, durante aproximadamente 20min. Após a autoclavagem, a solução com ágar foi deixada em uma estufa (aproximadamente 40°C) até o momento do preparo do meio sólido. Os meios de cultura foram preparados com o dobro das concentrações de nutrientes estipuladas para serem adicionados ao ágar, conforme sugerido por Lourenço (2006). A concentração final do ágar no meio de cultura sólido foi de 0,8%. Em grande parte dos casos, a concentração final do ágar não é tão importante, desde que as concentrações estejam entre 0,8% a 2% (ANDERSEN & KAWACHI, 2005; LOURENÇO 2006).

Os meios foram dispostos em estufa a uma temperatura semelhante à que o ágar se encontrava para que o este não se solidificasse no momento da mistura. No momento da preparação do meio sólido, as soluções foram misturadas em um recipiente e o produto foi

imediatamente vertido em placas de Petri. Após a solidificação, foi realizado o esfregão de amostra de água do mar ou de cultura mista com o uso de uma alça bacteriológica. O esfregão foi realizado traçando-se riscos aproximadamente paralelos entre si, em movimentos de zigue-zague. O processo foi repetido três vezes para cada placa em ângulos diferentes, para melhor distribuição das células pela superfície do ágar. A alça bacteriológica foi esterilizada antes do esfregão de cada placa na chama do bico de Bunsen e posteriormente resfriada, submergindo-a no meio sólido.

Após o esfregão, as placas de Petri foram vedadas com parafilme, para evitar a contaminação e ressecamento do meio sólido. Essas foram dispostas na posição invertida, diminuindo a deposição de vapores de água sobre as colônias, e protegendo contra o excesso de luz. As placas foram mantidas em laboratório, sob iluminação de lâmpada fluorescente ($80\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro, a temperatura ambiente (FIGURA 11). Após cerca de 20 dias de incubação, as placas apresentaram manchas de “colônias” de microalgas e cianobactérias. As colônias que cresceram em meio sólido foram checadas com auxílio de um microscópio estereoscópico e transferidas para meio líquido de cultura com uso de pipetas Pasteur esterilizadas.

Figura 11: Placas inoculadas

O meio sólido é também um bom meio para o crescimento de bactérias e fungos. As placas de Petri contaminadas com fungos podem inviabilizar esse método de isolamento, uma vez que os fungos em geral crescem bem mais rápido que as algas. Em alguns casos, a placa foi totalmente perdida. Por este motivo, várias placas foram preparadas. Ao contrário dos fungos, o crescimento das colônias de bactérias nas culturas não inviabiliza o processo de isolamento, pois as colônias de bactérias não se espalham muito pelo meio sólido.

3.3.5. Isolamento em meio semissólido associado à diluição em série

O plaqueamento em meio sólido, assim como a diluição em série, são técnicas de simples execução, entretanto, ambos os métodos têm falhas e limitações. No isolamento por diluição em série nem todas as células conseguem estabelecer culturas quando apenas uma célula é inoculada. Outro problema é que maior parte das culturas originadas são mistas. O isolamento por plaqueamento na superfície do meio sólido é problemático para muitas espécies do fitoplâncton. Segundo Lakeman & Cattolico (2007), um grande problema do plaqueamento em meio sólido é que as células sem parede celular são mais sensíveis ao crescimento em superfície. Tal contratempo pode ser vencido se o plaqueamento for integrado, adicionando-se o inóculo ao meio de cultura antes de sua solidificação. O plaqueamento integrado em meio semissólido, a uma concentração final do ágar entre 0,1 a 0,2% foi empregado no presente estudo, associando-se a diluições em série de água do mar natural ou culturas enriquecidas (cultura mista). Essa concentração de ágar para o meio semissólido já foi documentada em literatura por permitir o crescimento de um amplo espectro de organismos frágeis do fitoplâncton, como: *Heterosigma akashiwo*, *Olisthodiscus luteus*, *Synura petersenii*, *Pyrocistis lunula*, *Gymnodinium* sp. e *Cruciplacolithus neohelis* (LAKEMAN & CATTOLICO 2007).

O preparo do meio é semelhante ao do item anterior. O meio semissólido deve ser mantido em estufa a uma temperatura próxima a 40°C, para evitar sua solidificação. Entretanto, temperaturas superiores não podem ser empregadas, pois diminuem o sucesso do método. O inóculo foi adicionado ao meio semissólido ainda quente e homogeneizado. Controlou-se a diluição final do inóculo em todas as séries de placas. Nas placas da

primeira série de diluição, a concentração do inóculo foi ajustada em 1/10 partes de meio semissólido. As próximas diluições foram feitas nas proporções de 1/100, 1/1000 e 1/10000 (FIGURA 12). É possível realizar a diluição com valores intermediários aos feitos acima caso se julgue mais adequado ao ambiente que se está trabalhando. Para regiões oligotróficas não é necessário realizar mais diluições, entretanto para áreas amostras de ambientes eutrofizadas ou culturas mistas, é aconselhado realizar mais etapas de diluição.

Este método resulta no crescimento de colônias de cianobactérias e algas isoladas, principalmente nas séries mais diluídas, que podem ser facilmente pipetadas e transferidas para o meio de cultura líquido. A escolha das colônias puras foi feita após observação em um estereomicroscópio.

Assim como a diluição em série, o plaqueamento integrado em meio semissólido de água do mar natural (ou cultura mista) resulta no crescimento de microalgas que são mais abundantes no ambiente. A vantagem desse método quando comparado à diluição em série é que no plaqueamento em meio semissólido as microalgas crescem separadas uma das outras, sendo assim muito mais fácil a obtenção de uma cultura unialgal. Na diluição em série, a maior parte dos tubos inoculados resultam em culturas mistas. Ao se comparar o plaqueamento integrado em meio semissólido ao plaqueamento em superfície do meio sólido, o primeiro leva vantagem por possibilitar o crescimento de organismos que não possuem parede celular e não conseguem crescer em contato com o ar. Dessa forma, observa-se que a integração dos métodos de plaqueamento em meio sólido e a diluição em série é complementar aos demais métodos, pois garante resultados diferentes.

Figura 12: Exemplificação do processo de inoculação do processo de plaqueamento em meio semissólido.

3.4. Produção, coleta e armazenamento de biomassa

Algumas cepas isoladas foram selecionadas para realização de análises moleculares e dos pigmentos hidrossolúveis. Para isso, esses organismos foram cultivados em balões de 3L por 15 dias (FIGURA 13- I) para obtenção de biomassa suficiente. Os cultivos foram escalonados (100mL; 500mL) para depois serem inoculados em 3L. As condições que os cultivos foram mantidos estão descritos no item 3.2.

Posteriormente, a biomassa dos cultivos foi coletada por centrifugação a 5.000 RPM, por 30min a 15°C (centrífuga SORVAL RC 6+) (FIGURA 13-II). O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado por sucção a vácuo e imediatamente a biomassa foi congelada em nitrogênio líquido, onde ficou armazenada até o momento das análises.

Figura 13: Cultivos para produção de biomassa dos experimentos de biologia molecular e ficobilinas: **(I)** Cultivos antes da coleta da biomassa; **(II)** Biomassa sedimentada após centrifugação.

3.5. Reconhecimento morfológico

A identificação morfológica dos organismos isolados no presente estudo e de algumas cepas não identificadas do BMA&K foi realizada em microscópio ótico (OLYMPUS CBA), equipado com ocular de medição e equipamento de microfotografia acoplado ao computador. Todos os organismos estudados foram fotografados e medidos para auxiliar na identificação taxonômica, até o nível em que esse equipamento nos permite. Para a evidenciação de possíveis bainhas de mucilagem, foi adicionada uma gota de tinta nanquim às lâminas de cianobactérias.

3.6. Extração e análise dos pigmentos fotossintéticos

3.6.1. Pigmentos lipossolúveis

As cepas selecionadas para essa análise foram cultivadas em frascos de 100mL por cerca de cinco dias, nas mesmas condições descritas no item 3.2. Em seguida as culturas foram filtradas por um kit de filtração à vácuo em filtro AP-40 Millipore. O volume de cultura filtrado variou entre 40 a 150mL, de acordo com a concentração da cultura. Os valores e volumes não serão minuciosamente descritos, pois o objetivo não é quantificar os pigmentos, mas sim observar a curva de absorvância (picos e vales).

O filtro contendo a biomassa de algas foi colocado no interior de um tubo de centrifuga, juntamente com 10mL de solução de acetona a 90%. Em seguida, o filtro foi desmanchado com auxílio de um bastão de vidro e deixado no interior do congelador (-4°C) por aproximadamente 20h para que a clorofila e os carotenoides fossem extraídos. Passado o tempo, os tubos foram submetidos à centrifugação por 15 min. a aproximadamente 1500rpm. Então, a curva de absorvância do sobrenadante, de 400 a 750nm, foi obtida após ser disposto em uma cubeta de quartzo (1 ou 5cm) e submetido à leitura em espectrofotômetro (HITACH U2900).

3.6.2. Pigmentos hidrossolúveis

Para a análise das ficobiliproteínas, as culturas foram produzidas de acordo com o item 3.4. Para a extração dos pigmentos hidrossolúveis, a biomassa de células foi submetida a congelamento e descongelamento, por no mínimo três vezes. Posteriormente, essa biomassa foi submergida em 10mL de tampão fosfato (pH 6,8), e submetida a um vótex (FIGURA 14- I) por cerca de dois minutos para homogeneizar a solução e auxiliar na lise das células. Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação em alta velocidade (9.500RPM/ 16.880g) por 40min. Esse procedimento foi adaptado ao descrito em Hill & Rowan (1989), pois os autores submetem a biomassa com o tampão fosfato a uma velocidade de 39.000g a 20min. O sobrenadante formado após a centrifugação (FIGURA 14- III) foi disposto em cubetas de um ou cinco centímetros de caminho ótico e submetido à

varredura entre 400 a 750nm em espectrofotômetro (HITACH U2900) para a observação do espectro de absorção dos pigmentos.

Figura 14: Extração das ficobilinas: (I) Uso de vórtex com a biomassa e tampão fosfato; (II) Biomassa com tampão fosfato antes da centrifugação; (III) Ficobilinas extraída em tampão fosfato (após a centrifugação).

4. Resultados e Discussão

4.1. Culturas mistas: relações interespecíficas

Culturas mistas foram obtidas pelo enriquecimento da água do mar com meio de cultura e são úteis para manter por mais tempo as células do fitoplâncton viáveis para o isolamento. Além disso, as culturas mistas são úteis para observação de organismos vivos e a interação entre eles, possibilitando, uma abordagem mais abrangente em relação aos estudos de campo.

As diatomáceas tiveram um desenvolvimento muito mais pronunciado quando a cultura mista foi enriquecida com meio *Guillard* comparado ao meio *Erd- Shreiber*. As diatomáceas que se desenvolveram no meio *Guillard* eram maiores, com carapaças mais truncadas e ornamentadas. Essa resposta dos organismos já era esperada, uma vez que o meio *Erd- Shreiber* não leva adição de silicato, e a concentração inicial de silicato no meio *f/2* é alta (800µM; 30mg/L). Embora o meio *Erd- Shreiber* não seja enriquecido com silicato, observou-se o crescimento de diatomáceas pequenas e hialinas. Isso ocorreu pela contribuição do silicato da água do mar usada para fazer o meio de cultura e pelos frascos de boro-silicato utilizados.

Com o passar do tempo que as culturas mistas foram enriquecidas, independentemente do meio de cultura empregado para o enriquecimento, foi observado uma diminuição gradual da composição dos organismos. À medida que os nutrientes vão sendo consumidos pelos organismos, as bactérias podem reciclar parcialmente os nutrientes, mas não em taxas de regeneração suficientes para manter o crescimento das microalgas, levando à exclusão de vários organismos. As células menores, mais eficientes na captura de nutrientes e com maior taxa de reprodução em relação às espécies maiores, tornam-se mais abundantes durante o cultivo misto não alimentado, como o observado no presente estudo.

Nos ensaios com culturas mistas foi observado um dinoflagelado do gênero *Protoperidinium* (FIGURA 15- I) predando uma diatomácea do tipo *Cylindrotheca closterium* (FIGURA 15- II). O dinoflagelado prende a diatomácea junto ao seu sulco ventral e nada com ela aderida. A velocidade de natação do dinoflagelado foi tão grande

que impediu o registro do seu comportamento em microfotografia. O gênero *Protoperidinium* já foi documentado em vários estudos como predador de diatomáceas e está associado a florações do grupo (JEONG *et al.*, 2004; SHERR & SHERR, 2007), podendo, inclusive, ser canibalista (LATZ & JEONG, 1994). O consumo de diatomáceas pelos dinoflagelados heterotróficos têm implicações nos ciclos biogeoquímicos, visto que dinoflagelados tecados descartam as frústulas de sílica vazias. Além disso, a predação exercida pelos dinoflagelados contribui com a reciclagem do nitrogênio e fósforo inorgânico por meio da excreção de matéria orgânica dissolvida e particulada (SHERR & SHERR, 2007).

Figura 15: Interação interespecífica em cultura mista: (I) Dinoflagelado do gênero *Protoperidinium*; (II) Diatomácea tipo *Cylindrotheca closterium* predada pelo dinoflagelado.

4.2. Organismos isolados: métodos empregados e reconhecimento taxonômico

4.2.1. Cyanobacteria Stanier ex. T Cavalier- Smith 2002

As cianobactérias são organismos procariontes que desenvolveram os mecanismos bioquímicos- moleculares para a realização da fotossíntese. As cianobactérias possuem clorofilas *a*, algumas também possuem clorofilas *b* ou *d*, ficobiliproteínas, glicogênio como produto de reserva e paredes celulares contendo peptidoglicanos e aminoácidos (LEE, 2008).

Cianobactérias foram isoladas das regiões de Cananéia e Santos a partir de culturas mistas aplicando-se as técnicas de micropipetagem e plaqueamento em meio sólido. As cianobactérias são bem reportadas em literatura por sua capacidade de serem isoladas e purificadas por meio sólido (WATANABE *et al.*, 1998; ANDERSEN & KAWACHI, 2005).

As cianobactérias isoladas são de duas espécies, uma delas é colonial, da ordem Chroococcales, gênero *Chroococcus* (FIGURAS 16 e 17). Segundo Sant'Anna *et al.* (2006) o gênero *Chroococcus* Nageli 1849 é comumente colonial, ocorrendo no plâncton e metafiton. As colônias são esféricas ou compostas por outras subcolonias, podendo conter duas, quatro ou várias células. O envelope mucilaginoso pode ser branco ou castanho, difluente ou firme, amplo ou acompanhando o contorno das células e lamelado ou homogêneo. As células podem ser ovais, hemisféricas ou esféricas, com o conteúdo, em geral, granuloso, e às vezes, pode apresentar aerótopos. A divisão celular ocorre por fissão binária em um, dois, três ou mais planos.

As células das cepas isoladas têm aproximadamente 2µm de diâmetro, são esféricas e cobertas por bainha de mucilagem translúcida em microscopia ótica, sendo evidenciada pelo uso da tinta nanquim. Esta bainha é firme ao redor das células e difluente nas próximas camadas, sendo, então lamelada. A cor das culturas é verde claro azulado, semelhante à cor das células observadas em microscopia.

As demais cepas de cianobactérias foram obtidas das amostras de água de Santos (FIGURA 18). Os organismos são organizados em tricomas, pois não há envoltório

mucilaginoso. As células que compõem os tricomas são retangulares e têm de 3 a 5µm de largura. As células apicais têm as pontas arredondadas. Os tricomas são bastante finos, exibindo cerca de 2µm de largura, são homocitados e não atenuados em direção ao ápice. Em algumas cepas foram observados grânulos nos ápices das células. A extensão do tricoma varia bastante e estes podem ser retos ou flexuosos. Em geral, os tricomas estão emaranhados uns aos outros, formando verdadeiros biofilmes. Esses biofilmes podem ser observados nas culturas, uma vez que essas cepas crescem majoritariamente aderidas às paredes dos tubos de ensaio. Os tricomas exibem movimento deslizante. A reprodução ocorre por formação de hormogônios, mas não foram observados necrídeos.

Pela chave taxonômica proposta em Sant'Anna *et al.*, (2006), as cepas isoladas com essa morfologia se enquadram no gênero *Pseudoanabaena* Lauterborn 1915, entretanto, as células não são constrictas ao nível dos septos celulares, o que não permite fechar a classificação do gênero para essas cepas.

Figura 16: Cepas de *Chroococcus* sp. isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio *f*/2): (I) Can1; (II) Can 2; (III) Can 3; (IV) Can 3; (V) Can 5; (VI) Can 6. Todas as microfotografias foram tiradas em aumento de 1000 vezes.

Figura 17: Cepas de *Chroococcus* sp. isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio *f*2): **(VII)** Can 7; **(VIII)** Can 8; **(IX)** Can 9; **(X)** Can 10; **(XI)** Can 11; **(XIII)** Can 28. Todas as microfotografias foram obtidas com uso de objetiva de 100X.

Figura 18: Cepas da Cyanobacteria Pseudoanabanaceae isoladas de Santos por meio sólido (meio *f/2*): (I) Can 22- aumento de 1000 vezes; (II) Can 24- aumento de 1000 vezes; (III) Can 25- aumento de 400 vezes; (IV) Can 25- aumento de 1000 vezes; (V) e (VI) Can 26- aumento de 1000 vezes.

4.2.2. Chlorophyta A. Pascher 1914

As Chlorophyta, ou algas verdes, são organismos eucariontes resultantes da endossimbiose primária entre uma cianobactéria e um eucarionte primitivo heterotrófico (LEE, 2008; PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007). Consequentemente, o plastídio desses organismos é revestido por somente duas membranas. A membrana formada para a fagocitose da cianobactéria no hospedeiro se tornou a membrana externa do envelope nuclear (LEE, 2008). Os organismos dessa linhagem têm clorofilas *a* e *b*, formam amido no cloroplasto, geralmente associado ao pirenóide, e a célula é revestida por celulose (PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007).

O grupo Chlorophyta é majoritariamente de água doce e cerca de apenas 10% de sua biodiversidade é marinha (LEE, 2008). É um dos grupos mais diversos de eucariontes, cujos indivíduos têm grande variedade morfológica, que vão de células monadais, cocóides, filamentos ramificados ou não, a espécies multinucleadas formando talos macroscópicos. As algas verdes são encontradas em quase todos os habitat, do polo norte ao polo sul, em águas continentais e marinhas, assim como também em solos de áreas temperadas a ambientes áridos (PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007). É estimado que existam no mínimo 600 gêneros, com cerca de 10.000 espécies (NORTON *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, as algas verdes eram separadas entre ordens e classes de acordo com o conceito morfológico de espécie. A classificação morfológica se baseia na lógica de que os flagelados unicelulares são primitivos dentro das algas verdes, e que eles evoluíram inicialmente em formas cocóides e sarcinóides, e depois em algas coloniais, filamentosas, formas coanócitas e sifonáceas. Este conceito usa a morfologia das células em estado vegetativo para a classificação.

Uma nova classificação foi proposta baseada em características ultraestruturais dos corpos basais do aparato flagelar e na divisão celular foi proposta por Mattox & Stewart em 1984 (PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007). Tal conceito toma como base o princípio de seu esquema de classificação de que a primeira irradiação das algas verdes ocorreu com organismos monadais, resultando em múltiplas linhagens anciãs de flagelados, alguns dos quais evoluíram para formas cocóides, sarcinóides, filamentosas e sifonáceas.

A partir dos anos 90 outro tipo de classificação foi proposto, baseado em marcadores moleculares que inferem a filogenia molecular das espécies. Análises moleculares do SSU rDNA têm dado suporte para a classificação baseada na ultraestrutura de divisão das algas verdes em duas grandes linhagens. Streptophyta *sensu* Bremer 1985 suporta as carófitas e plantas terrestres, enquanto Chlorophyta *sensu* Bremer 1985 agrupa as demais algas verdes.

Ainda há muitas contradições e dúvidas entre os diferentes conceitos de espécie empregados, o que gera bastante discussão no campo da sistemática das algas. Dependendo do tipo de classificação adotado, uma mesma espécie pode pertencer a classes diferentes. Nem todas as classes publicadas para Chlorophyta são reconhecidas e validadas pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN).

A divisão Chlorophyta, atualmente, suporta nove classes de algas (GUIRY & GUIRY, 2013). No presente estudo foram isolados organismos pertencentes a três das nove classes de Chlorophyta, são elas: Prasinophyceae, Nephroselmidophyceae e Trebouxiophyceae. Entretanto, a classe Chlorophyceae também será abordada, pois cepas não identificadas do BMA&K foram reconhecidas para essa classe.

4.2.2.1. Chlorophyceae Wille ex Warming

A classe Chlorophyceae é suportada tanto pela abordagem molecular quanto pela morfológica. Essa classe inicialmente agrupava todas as algas verdes, mas com o tempo foi segmentada em outras classes. Mesmo com a subdivisão a classe ainda não é suportada por uma origem monofilética.

Duas cepas do acervo do BMA&K, antes reconhecidas apenas como flagelados, foram identificadas morfológicamente como *Chlamydomonas* Ehrenberg 1835 (FIGURA 19) de acordo com a descrição do gênero proposta em Bicudo & Menezes (2006). A cepa Flag- C1 foi isolada em meio sólido, no ano 1990, da região estuarina de Cananéia, São

Paulo. A cepa Flag- Ub1 foi isolada em 1987 da região de Ubatuba e não há registro no BMA&K sobre o meio de isolamento empregado.

As duas cepas têm as mesmas características: são organismos monadais, livres, unicelulares, verdes, com flagelos homodinâmicos de mesmo tamanho, estigma conspícuo, parede celular evidente, papila anterior pouco evidente, forma ovóide e cloroplasto único em forma de taça com apenas um pirenóide. As células têm entre 5-8µm de largura e 5-8µm de comprimento. Não há registro para a classe para o fitoplâncton do estado de São Paulo (VILLAC *et al.*, 2008)

Análises filogenéticas envolvendo espécies morfológicas de *Chlamydomonas* demonstraram oito linhagens monofiléticas com Chlorophyceae. Cepas pertencendo a outros gêneros parecem formar mesma linhagem como essas “*Chlamydomonas*” (PRÖSCHOLD *et al.*, 2001). Tais trabalhos ilustram como o conceito morfológico de espécie é artificial e não reflete relacionamento evolutivo das espécies, o que indica que os gêneros devem ser revistos.

Dessa forma, essas linhagens do gênero morfológico de *Chlamydomonas* disponíveis no BMA&K permitem o aumento do conhecimento genético dessas morfoespécies, e representam um importante material para a inclusão das linhagens que ocorrem na costa do Brasil com as demais existentes no mundo.

Figura 19: Cepas de *Chlamydomonas* sp. identificadas do BMA&K provenientes de Cananéia e Ubatuba (meio *f*/2): (I) e (II) Cepa 44 (Flag-C1); (III) e (IV) Cepa 122 (Flag- Ub1). Microfotografias em 1000 vezes.

4.2.2.2. Prasinophyceae Moestrup et Throndsen

As prasinofíceas são as algas flageladas verdes mais primitivas, não monofiléticas, cujas paredes e flagelos são revestidos por escamas orgânicas. A classe é suportada pelos conceitos morfológico, ultraestrutural e filogenético (PRÖSCHOLD & LELIAERT, 2007).

Esse grupo é bastante comum e abundante no picoplâncton de todos os oceanos, embora sua contribuição para a comunidade seja muito pouco estudada no mundo, e praticamente desconhecida para a costa do Brasil. Um estudo realizado por Not *et al.* (2004) mostrou que uma única espécie, *Micromonas pusilla*, dominou o picoplâncton eucarionte no canal oeste da Inglaterra por dois anos.

Como mencionado anteriormente, diversos trabalhos oceanográficos que realizaram contagem de células pelo método de Utermöhl na costa do Brasil mostram que maior parte dos autótrofos fotossintetizantes são organismos do pico e nanoplâncton, grosseiramente identificados como “fitoflagelados” nas contagens de estudos de rotina

Poucas espécies de Prasinophyceae foram documentadas para a costa do Brasil. Apenas nove espécies de três gêneros foram documentados no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul, *Micromonas*, *Tetraselmis*, *Pseudoscurfieldia* e *Pyramimonas* (MENEZES, 2013c). Há uma imensa lacuna sobre a composição dos picoeucariontes para a costa do Brasil, embora se espera que eles tenham uma grande contribuição para a produção primária, devido às características oligotróficas da corrente do Brasil. Não há registros de Prasinophyceae para a costa do estado de São Paulo (Villac *et al.*, 2008)

No presente estudo uma cepa da classe Prasinophyceae foi isolada pelo método de diluições em série da água proveniente do estuário de Cananéia. Entretanto, a concentração inicial do organismo na água do mar não foi estipulada. Tal resultado corrobora, para o afirmado acima, que esses organismos são abundantes nas regiões salobras e marinhas, visto que o isolamento por diluição em série favorece apenas as espécies mais abundantes no meio.

A prasinofíceia isolada é unicelular, tem forma esférica ou elipsoide (dependendo da fase observada), possui um cloroplasto por célula de cor verde. As células têm entre 2-2,5µm de tamanho (FIGURA 20).

Figura 20: Cepa de Prasinophyceae isolada de Cananéia por diluição em série (meio $f/2$): (I), (II), (III) e (IV) são microfotografias da cepa Can19, um organismo cocóide.

4.2.2.3. Nephroselmidophyceae T.Cavalier-Smith, 1993

Até pouco tempo atrás, o gênero *Nephroselmis* Stein, 1878 era classificado dentro da classe Prasinophyceae, visto que os organismos pertencentes a esse gênero possuem a célula com formato irregular e escamas orgânicas cobrindo a célula e flagelos (NAKAYAMA *et al.*, 2007).

A definição de uma nova classe para o gênero *Nephroselmis* foi proposta por Cavalier-Smith e confirmada por análises do SSU rDNA por Nakayama *et al.* (2007). Os

autores propuseram uma nova ordem para o gênero, *Nephroselmidales* Nakayama, Suda, Kawachi & Inouye. Os autores afirmam que tal gênero é proximamente relacionado com os principais grupos de algas verdes, sendo, portanto, uma boa fonte para o estudo da evolução de Chlorophyta. Atualmente há 28 espécies descritas para o gênero segundo Guiry & Guiry (2013). Para o Brasil há registro de ocorrência de três espécies na costa do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul (MENEZES, 2013b). O registro de *Nephroselmis* é inédito para a costa do estado de São Paulo, pois na revisão das espécies do fitoplâncton realizada por Villac *et al.* (2008) não há registro do gênero. Esses achados corroboram a afirmação de Butcher (1959), de que o gênero *Nephroselmis* é amplamente distribuído e, provavelmente, não tão raro como os registros sugerem. A falta de registros é decorrente do tamanho diminuto das células e dificuldade de identificação com microscopia ótica. Além disso, o formaldeído, agente fixador comumente usado nos estudos do fitoplâncton marinho, não é adequado para conservar as características taxonômicas, pois os organismos comumente perdem os flagelos.

Uma estirpe do gênero *Nephroselmis* foi isolada à partir de uma cultura mista estabelecida com meio *Guillard* inoculada com água proveniente de Ubatuba. A técnica de isolamento utilizada foi micropipetagem e diluições sucessivas, explicado no item 3.3.3. A cepa isolada é unicelular, com dois flagelos diferentes entre si (um deles é duas vezes maior que o outro), estigma evidente, célula circular na vista ventral e achatada dorso-ventralmente (FIGURA 21). O cloroplasto ocupa quase toda a célula, tem forma de u, e possui um pirenóide central, de cor verde. As células têm entre 8-12µm de tamanho. A cultura tem uma cor verde oliva, e observou-se por microscopia ótica reprodução assexuada por fissão binária (FIGURA 21-IV).

Figura 21: *Nephroselmis* sp. isolada de Ubatuba por micropipetagem (meio *f*/2). Diferentes estágios do ciclo celular. (I) Fase vegetativa; (II) e (III) Iniciando o processo de divisão celular- fusão binária; (IV) Finalização da divisão celular (cepa uba1/1).

4.2.2.4. Trebouxiophyceae Friedl 1995

A classe Trebouxiophyceae é morfologicamente definida por células móveis com um ou mais pares de flagelos, sem mastigonemas; a mitose do grupo é fechada e a reprodução sexuada se dá por meio de autósporos ou zoósporos; a reprodução sexuada

também é reportada; são organismos osmotróficos e autotróficos (GUIRY & GUIRY, 2013).

De acordo com Guiry & Guiry (2013), existem 33 espécies de *Chlorella* com status taxonômico aceito, descritas de acordo com Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN). No Brasil já foram documentadas cinco espécies do gênero *Chlorella* e uma variedade (TUCCI *et al.*, 2013).

As estirpes isoladas da classe Trebouxiophyceae são aparentemente do gênero *Chlorella* M. Beijerinck 1890. De acordo com Guiry & Guiry (2013), *Chlorella* é um gênero definido morfollogicamente como células solitárias ou agregadas em pequenos grupos, globosas ou elipsoidais. As paredes celulares são delicadas. O cloroplasto é parietal e possui um pirenóide coberto por um envelope de amido. Ocorre reprodução assexuada por autósporos, de 2 a 8 por células, que são liberados após a ruptura da parede da célula mãe. Formas flageladas e reprodução sexuada são desconhecidas para o gênero. *Chlorella* é comum em habitat aquático, onde ocorre tanto em ambientes dulcícolas, quanto marinhos.

As cepas de *Chlorella* isoladas no presente estudo foram isoladas com o meio *Erd-Shreiber*. Elas foram isoladas à partir de culturas mistas, inoculadas com água proveniente de Ubatuba, por meio da técnica de plaqueamento em meio semissólido. O meio de cultura *Erd-Shreiber* leva uma boa quantidade de extrato de solo em sua composição, que é uma importante fonte de carbono orgânico dissolvido para as microalgas. O bom crescimento dessas linhagens neste meio leva a supor que, como as linhagens de Trebouxiophyceae são osmotróficas, organismos como *Chlorella* se beneficiam da fonte de carbono orgânico dissolvido.

Foram isoladas seis linhagens, aparentemente de duas morfoespécies distintas, ilustradas na Figura 22. Uma das morfoespécies (FIGURA 22: I e II) tem forma elipsóide, mede de 4-5µm, cloroplasto parietal, grânulos observados, um pirenóide por célula, cor verde clara, habito de vida solitário, forma poucos agregados de células. A outra morfoespécie é ligeiramente maior (FIGURA 22- III; FIGURA 22- IV), tem entre 6- 8µm, é mais arredondada, possui grânulos visíveis, pirenóide mais evidente, e forma mais

aglomerados de células. Por falta de bibliografia especializada para esse grupo proveniente de ambientes marinhos, as estirpes não foram identificadas até nível específico.

Figura 22: Cepas de *Chlorella* sp isoladas de Ubatuba por plaqueamento em meio semissólido (meio *Erd- Shreiber*). (I) ubá 02/10; (II) uba02/11; (III) uba02/ 13; (IV) uba02/ 14. Microfotografias em 1000 vezes.

4.2.3. Ochrophyta T. Cavalier-Smith

As Ochrophyta estão no reino Chromista e pertencem ao sob-reino Stramenopiles (=Heterokonta) (REVIERS, 2006) (FIGURA 2). Todas as algas dessa linhagem obtiveram seus plastídios pelo processo de endossimbiose secundária. Os plastídios possuem clorofilas *a* e *c*, juntamente com fucoxantina. O produto de reserva celular é geralmente crisolaminarina, armazenada dentro de vesículas no citoplasma (LEE, 2008).

De acordo com Guiry & Guiry, 2013, Ochrophyta é subdividida em dezoito classes. Ochrophyta é a divisão de algas que possui maior número de espécies descritas atualmente, somando 12.385 (GUIRY & GUIRY, 2013).

4.2.3.1. Chrysophyceae Pascher 1914

As Chrysophyceae são algas quase que exclusivamente microscópicas, com maior diversidade em águas continentais e classificadas em duas classes proximamente relacionadas: Chrysophyceae e Synurophyceae (ANDERSEN, 2007). Ambas as classes possuem cloroplastos com clorofilas *a* e *c*, assim como um grande espectro de carotenoides e xantofilas. O produto de reserva típico é a crisolaminarina. As Chrysophyceae podem ter células nuas, às vezes embebida em matriz gelatinosa, ou coberta por escamas orgânicas, lórica orgânica (algumas mineralizadas), tecas ou, raramente, parede celular (ANDERSEN, 2007).

A classe foi criada por Pascher em 1914, que baseou a classificação das ordens nas formas vegetativas das espécies e na morfologia dos flagelos (ANDERSEN *et al.*, 1999). Após os estudos de Pascher, a classe continuou crescendo com a descrição de diversas outras espécies. Bourrelly contribuiu com muitos tratados, levando em consideração o ciclo de vida dos organismos e a morfologia dos flagelos, dividindo as Chrysophyceae em três subclasses: Acontochrysophycidae (sem flagelos), Heterochrysophyceae (um flagelo ou dois flagelos diferentes entre si) e Isochrysophycidae (dois flagelos iguais) (ANDERSEN *et al.*, 1999).

Nas ultimas décadas, o uso da microscopia eletrônica, desvendando a microestrutura, associado a estudos da composição dos pigmentos fotossintéticos e estudos comparando sequências moleculares provocaram uma revolução na classificação biológica desse grupo. A classe Haptophyceae foi descoberta pela microscopia eletrônica, a partir de então, a maior parte das Chrysophyceae descritas por Bourrelly foram reclassificadas (ANDERSEN *et al.*, 1999). O uso de novas técnicas possibilitou outros tipos de inferências e novas classes foram surgindo, fragmentando Chrysophyceae em Dictyochophyceae, Synurophyceae, Pelagophyceae, Chrysomerophyceae, Phaeothamniophyceae, Choanoflagellata (ANDERSEN *et al.*, 1999).

No presente estudo, foram isoladas nove cepas da classe Chrysophyceae, provavelmente do gênero *Ochromonas* Vysotskii (Wysotzki) 1887 (FIGURA 23 e 24). *Ochromonas* é caracterizado por células sem carapaça, solitárias, esféricas a elipsóides ou piriformes na vista ventral. O ápice da célula é truncado obliquamente, de onde emergem dois flagelos microscópicos diferentes entre si, um grande com mastigonemas tubulares tripartites e outro pequeno e delicado. As células em geral são livre natantes, ocasionalmente podem descansar ou se aderir ao substrato por meio de sua parte posterior. As células podem vir a se tornar amebóides, perdendo o seu flagelo. A superfície da célula de várias espécies é coberta por pequenas verrugas excretadas. Geralmente há um ou dois cloroplastos por célula, raramente ocorrem vários. A cor dos cloroplastos varia entre amarelo a marrom, eventualmente esverdeado, em geral tem um estigma, e poucas espécies têm pirenóide. A reprodução assexuada envolve tanto a divisão das células ativas quanto das células imóveis, que se dividem em envelopes gelatinosos. As células que se dividem em envelopes gelatinosos podem produzir colônias palmelóides com muitas células. A reprodução sexuada é desconhecida. Auxotrofia para vários tipos de vitaminas é comum no gênero. Nutrição heterotrófica, tanto por osmotrofia quanto por fagocitose são comuns e acompanham a nutrição por fotossíntese. Partículas sólidas são englobadas em vacúolos. As espécies de *Ochromonas* ocorrem em todo o mundo, algumas provavelmente são cosmopolitas. A maior parte das espécies compõe o fitoplâncton de águas dulcícolas, entretanto, há espécies que são de águas salobras e marinhas (GUIRY & GUIRY, 2013).

As cepas isoladas do presente estudo são móveis, unicelulares, medem entre 5-7µm

de comprimento e entre 3-5µm de largura. Com o uso de microscopia ótica, apenas um flagelo retorcido é visualizável. A célula tem forma elipsóide a globosa, dependendo do estado do ciclo celular que o organismo se encontra, Células sem flagelo também ocorrem, e em muitos casos, ocorre formação de aglomerados celulares sem flagelos. Aparentemente ocorre exsudação de algum composto que possibilite a formação de biofilme pelas células na cultura. As culturas foram obtidas tanto pelo meio *Guillard* quanto pelo meio *Erd-Schreiber*, e foram isoladas pelas técnicas de plaqueamento em meio semissólido e micropipetagem e diluições sucessivas a partir de culturas mistas, estabelecidas com inóculo proveniente de Ubatuba.

As células de *Ochromonas* são muito competitivas em culturas, pois foram facilmente isoladas a partir de culturas mistas. Nas culturas mistas estabelecidas, tanto com meio de cultura *Erd-Schreiber* quanto *Guillard*, estes organismos prevalecem após muitos meses, mesmo sem refertilizar as culturas. Tal observação sugere variação da nutrição desses organismos, que são autotróficos, osmotróficos e também realizam fagocitose. Dessa forma, a escassez de micronutrientes dissolvidos na água no meio de cultura não é problemática, uma vez que esses organismos podem fagocitar outras algas e bactérias (DALEY *et al.*, 1973; PORTER, 1988).

A classificação morfológica das Chrysophyceae em geral é incongruente com os dados de biologia molecular e ultraestrutura. A classificação das Chrysophyceae é incerta desde classes e ordens até o nível de gênero e espécie, sendo difícil resolver os conflitos evolutivos com dados morfológicos e moleculares, permanecendo dúvidas em como descrever e classificar os organismos de forma significativa (ANDERSEN, 2007). Os dados moleculares e ultraestruturais refutam a classificação com base no número de flagelos. Aparentemente todas as Chrysophyceae têm dois flagelos (ou apenas os corpúsculos basais). Dessa forma, a classificação das Chrysophyceae não pode se basear no número de flagelos.

Estudos envolvendo filogenia molecular com várias espécies de *Chromulina* e *Ochromonas*, considerados os gêneros mais típicos de Chrysophyceae, mostraram que os gêneros são polifiléticos. Os dados sugerem que organismos unicelulares móveis

possivelmente surgiram independentemente várias vezes de outras formas de vida por evolução reducionista (ANDERSEN, 2007).

Segundo Guiry & Guiry (2013), existem 485 espécies descritas para a classe Chrysophyceae, sendo 37 pertencentes ao gênero *Ochromonas*. No Brasil, há registro de 43 espécies para a classe, dentre essas, três são representantes do gênero. O único registro de espécie desse gênero para a costa do Brasil é *Ochromonas mutabilis* G. A. Klebs (MENEZES, 2013a). Para o estado de São Paulo, o registro é novo, de acordo com a revisão de Villac *et al.* (2008).

Figura 23: Cepas de *Ochromonas* sp. isoladas de Ubatuba por micropipetagem (meio f/2): (I) e (II) Uba 1/12; (III) Uba 1/13; (IV) Uba 1/16; (V) Uba 1/17; (VI) Uba 1/18. Microfotografias em 1000 vezes.

Figura 24: Cepas de *Ochromonas* sp. isoladas de Ubatuba por micropipetagem (meio f/2): **(VII)** Uba 1/19; **(VIII)** Uba 1/20; **(IX)** Uba 1/21; **(X)** Uba 1/22; **(XI)** Uba 1/22; **(XII)** Uba 1/23. Microfotografias em 1000 vezes.

4.2.3.2. Bacillariophyceae Haeckel, 1878

As diatomáceas são algas comumente unicelulares e às vezes coloniais, encontradas em quase todos os habitat aquáticos como organismos de vida livre, fotossintéticos autótrofos, heterotróficos ou simbiontes. As células são revestidas por uma parede celular composta de sílica, chamada frústula, que é rígida e parece uma caixa com duas partes que se encaixam. Os cloroplastos contêm clorofilas *a*, *c*₁ e *c*₂, e o principal carotenoide é a fucoxantina, que dá às células a cor característica (LEE, 2008).

A investigação da biodiversidade das diatomáceas iniciou-se com o reconhecimento das diferenças do formato da valva ou frústula, inicialmente por meio da microscopia ótica, e posteriormente por microscopia eletrônica. Nas últimas décadas, a biologia molecular tem elucidado os relacionamentos filogenéticos entre as diatomáceas (WILLIANS, 2007).

A classificação biológica dos níveis superiores das diatomáceas tem sofrido várias modificações nas últimas décadas. Willians (2007) atribui essa revolução ao fato de que as hierarquias foram por muito tempo baseadas em caracteres morfológicos subjetivos, que não refletiam homologias. As evidências dos dados moleculares geraram outras relações não reveladas pela morfologia, mas próximas ao proposto por registros fósseis (WILLIANS, 2007). Atualmente, apenas o grupo das diatomáceas penadas é aceito como monofilético, sendo derivado de algum grupo das diatomáceas cêntricas. Entretanto, o grupo irmão das diatomáceas penadas ainda não é consenso entre os especialistas (WILLIANS, 2007).

De acordo com Guiry & Guiry (2013) existem 8.872 espécies de diatomáceas descritas no mundo. No Brasil, já foram descritas 1.133 espécies de diatomáceas, quatro subespécies e 407 variedades (ESKINAZA-LEÇA *et al.*, 2013). Para a costa do estado de São Paulo há registro de 469 espécies, que representam mais de 80% das espécies documentadas (VILLAC *et al.*, 2008) (FIGURA 3-II).

De longe, é o grupo mais bem documentado de microalgas no Brasil. É evidente que as diatomáceas são o grupo mais diverso em número de espécies no fitoplâncton, entretanto, devido às características da frústula de silicato, que é bem conservada por

fixadores químicos comumente usados (formaldeído), permitindo uma boa diferenciação morfológica entre os organismos. É verdade também que o Brasil possui muitos mais taxonomistas na área das diatomáceas, em relação aos demais grupos de microalgas.

No presente estudo foram isoladas cinco cepas pertencentes a Bacillariophyceae. Duas delas, do gênero *Thalassiosira* Cleve 1873, foram isoladas de Ubatuba por meio da técnica de micropipetagem e diluições sucessivas a partir de cultura mista (FIGURA 25: III e IV). As células são circulares em vista valvar, diâmetro entre 7-12µm. O comprimento das células em vista pleural varia entre 7-9µm. Há vários cloroplastos por célula, dispostos na periferia da célula de cor marrom- dourado. Ornamentações na parede não foram observadas. Há tendência das células se aglomerarem em colônias não lineares. Colônias formando fileiras foram pouco observadas. Em algumas se observa a estrutura hialina de sílica que interconecta as células. Foram observadas bactérias aderidas à frústula de algumas células (FIGURA 25- IV).

Uma cepa do gênero *Skeletonema* Greville 1875 foi obtida por micropipetagem e diluições sucessivas a partir de cultura mista estabelecida com inóculo de Ubatuba. As células têm entre 2-3µm de largura e entre 5-8µm de comprimento, quando observados em vista pleural. A espécie possui apenas um cloroplasto por célula, de cor castanho dourado.

Outra diatomácea também foi obtida pelos mesmos procedimentos descritos acima, com inóculo procedente de Ubatuba. Essa cepa foi identificada como *Nitzschia* cf. *longissima* (Brébisson) Ralfs in Pritchard 1861 (FIGURA 25- I). As células são alongadas, medindo entre 50-56µm de comprimento, e entre 3- 4µm de largura. Possuem aparentemente dois cloroplastos castanho dourados por célula.

A última cepa de Bacillariophyceae foi isolada pela mesma técnica que as demais, entretanto a cultura mista foi inoculada com água de Cananéia. O organismo é do gênero *Odontella* C. Agardh 1832 (FIGURA 25: V-VI). A carapaça de silicato é bem mais evidente, truncada e ornamentada que as demais cepas isoladas da classe. Ocorrem vários cloroplastos elipsóides castanho-dourados por célula. As células geralmente formam cadeias, ligadas pelos processos da frústula.

Figura 25: Cepas de Bacillariophyceae isoladas de Ubatuba e Cananéia (meio f/2): (I) *Nitzschia* cf. *longissima* (cepa uba 1/ 4); (II) *Skeletonema* sp. (cepa uba 1/8); (III) e (IV) *Thalassiosira* sp. (cepas uba 1/6; uba 1/9); (V) e (VI) *Odontela* sp. (cepa can 16). Microfotografias em 1000 vezes de aumento.

4.2.3.3. Não identificados

Três cepas de organismos cocóides, ente 3-4 μ m, foram isoladas por plaqueamento em meio sólido, tendo como inóculo cultura mista obtida com água de Ubatuba, conforme descrito no item 3.3.4. As células são livres, tem formato esférico, um cloroplasto amarelado por célula e um pirenóide (FIGURA 26). Devido à convergência evolutiva no fitoplâncton marinho para formas cocóides, reportadas em diversos estudos (PORTER *et al.*, 1999; MASSANA, 2011), não se identificou a classe dessas cepas. Entretanto, devido às características da cor, pode-se afirmar que são da divisão Ochrophyta. Para a costa de São Paulo não há registro de nenhum organismo pertencente à divisão Ochrophyta, além das diatomáceas e silicoflagelados, de acordo com a revisão de Villac *et al.* (2008).

Figura 26: Cepas de organismos não identificados de Ochrophyta isolados de Ubatuba por meio sólido (meio f/2): (I) Cepa uba 1/24; (II) Cepa uba 1/26; (III) e (IV) Cepa uba 1/35. Microfotografias em 1000 vezes.

4.2.4. Cryptophyta Cavalier-Smith 1986

4.2.4.1. Cryptophyceae F.E.Fritsch in G.S.West & F.E.Fritsch, 1927

As Cryptophyceae são um grupo de organismos majoritariamente autotróficos, biflagelados e nanoplancctônicos. Cerca de 200 espécies fotossintetizantes já foram descritas (CERINO & ZINGONE, 2007). Poucos táxons não possuem plastídios (*Goniomonas*) ou contém um plastídio complexo sem pigmentos (*Chilomonas*) (MARIN *et al.*, 1998). O grupo pode ser encontrado em ambientes salobros, dulcícolas, costeiros e de mar aberto (KLAVENESS, 1985), onde desempenham um importante papel nas redes tróficas, provavelmente por terem alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e polissacarídeos (DUNSTAN *et al.*, 2005; NOVARINO, 2003). As Cryptophyceae também são capazes de formar florações em diversos ambientes (TUCCI *et al.*, 2011).

As Cryptophyceae são facilmente reconhecíveis por microscopia ótica, devido às características morfológicas (BUTCHER, 1967). Os flagelos são homodinâmicos, quase do mesmo tamanho, e se inserem apicalmente ou lateralmente na célula. Uma citofaringe e vestíbulo em uma superfície dão ao organismo o formato irregular. Escamas orgânicas são comuns na superfície do flagelo e algumas vezes no corpo da célula (LEE, 2008).

A porção externa da célula, ou periplasto, é composta pela membrana plasmática e uma placa, ou séries de placas, diretamente abaixo da membrana plasmática. O pirenóide, produto de reserva da célula, fica localizado fora do envelope do cloroplasto, mas dentro das membranas do retículo endoplasmático que envolvem o cloroplasto e o nucleomorfo. O grupo possui projéteis, chamados ejectiossomos, que são uma estrutura diferente dos tricócitos encontrados nos dinoflagelados. Os ejectiossomos estão localizados por toda a célula e são compostos por dois corpos de tamanhos diferentes cobertos por uma membrana simples. Os ejectiossomos descarregam quando o organismo é estressado, o que resulta no movimento da célula na direção oposta. Os ejectiossomos podem funcionar como um mecanismo de escape, ou podem ser um mecanismo direto de defesa contra predadores.

Nos cloroplastos, os tilacóides estão agrupados majoritariamente em pares e não há conexões entre os tilacóides adjacentes (GANTT *et al.*, 1971), sendo o único grupo que possui esse tipo de arranjo dos cloroplastos. As células contêm clorofilas *a* e *c*₂,

ficobiliproteínas e carotenoides. O principal carotenoide presente é o α -caroteno, e a principal xantofila, a diatoxantina (LEE, 2008). Há três grupos de ficoeritrinas e três grupos de ficocianina, todas diferentes das ficobiliproteínas encontradas nas cianobactérias e algas vermelhas (HILL & ROWAN, 1989). As ficobiliproteínas ficam no espaço intratilacoidal e não estão do lado do estroma dos tilacóides em ficobilissomos como em cianobactérias e algas vermelhas. Cada espécie de Cryptophyceae possui apenas um tipo de ficobiliproteína, ou ficocianina ou ficoeritrina, mas nunca ambos (ROWAN, 1989).

As Cryptophyta são conhecidas por serem organismos quiméricos originados a partir de um evento de endossimbiose secundária entre algas vermelhas e um hospedeiro não fotossintético que deu origem a um cloroplasto complexo (CAVALIER-SMITH, 2000). De acordo com Marin *et al.* (1998) análises filogenéticas com sequências de SSU rRNA sugerem que o processo que originou as algas desse grupo ocorreu de forma independente, sendo um grupo monofilético (BALDAUF, 2008).

As Cryptophyceae ainda retém o núcleo vestigial da alga vermelha endossimbionte como um pequeno nucleomorfo (DOUGLAS *et al.*, 2001; ARCHIBALD, 2007). Como o cloroplasto das Cryptophyceae é resultado de uma endossimbiose secundária, a membrana formada pelo vacúolo originalmente anexado ao endossimbionte, aparentemente se fundiu com o envelope nuclear, colocando-o no retículo endoplasmático rugoso (DOUGLAS *et al.*, 2001). Sendo assim, o cloroplasto desse grupo é envolvido por duas membranas do retículo endoplasmático do cloroplasto e duas membranas do envelope do cloroplasto, totalizando quatro membranas. Como resultado do processo de endossimbiose, as Cryptophyceae possuem dois compartimentos citosólicos e quatro genomas (FIGURA 27) cada um codificando sínteses de proteínas em maquinarias dispostas em diferentes compartimentos e realizando intercâmbio dessas moléculas (DOUGLAS *et al.*, 2001; ARCHIBALD, 2007). Entre a membrana externa e a interna do retículo endoplasmático do cloroplasto ficam localizados os grãos de amido e o nucleomorfo.

Figura 27: Endossimbiose nas Cryptophyta e organização celular dos representantes autótrofos do grupo. Adaptado de Douglas *et. al.* (2001).

A visão sobre filogenia dos eucariontes mudou bastante após o uso da biologia molecular como ferramenta para inferência filogenética. Na classificação proposta atualmente para os eucariontes apresentada em Baldauf (2008), as criptofíceas não formam um clado monofilético com nenhum outro grupo e estão mais proximamente relacionadas com as Haptophyceae (FIGURA 2).

Devido à fragilidade e sensibilidade do grupo aos agentes químicos fixadores de amostras biológicas e a falta de características morfológicas conspícuas para caracterização, as Cryptophyceae são comumente deixadas de lado em estudos de rotina sobre o fitoplâncton (KLAVENESS, 1985; THRONDSSEN, 1997). Nos últimos anos, a taxonomia das Cryptophyceae vem sendo baseada em características ultraestruturais, como forma das placas internas e externas do periplasto (CERINO & ZINGONE, 2006; XING *et al.*, 2008; WETHERBEE *et al.*, 1985), a posição do nucleomorfo (NOVARINO, 1991), a raiz do sistema flagelar, a forma do sistema citofaringe-sulco (HILL & WETHERBEE, 1986;

HILL & WETHERBEE, 1988; WETHERBEE *et al.*, 1986) e o tipo de biliproteína (HILL & ROWAN, 1989).

O número e forma dessas placas do periplasto são usados para caracterizar muitos gêneros. Um problema da classificação morfológica pelas placas do periplasto está na alteração durante o ciclo de vida (fase haploide e diploide) das Cryptophyceae, pois alguns gêneros podem ter placas diferentes nos diferentes estágios de vida (HILL & WETHERBEE, 1986; HOEF-EMDEN & MELKONIAN, 2003). Hoef-Emden (2007) mostrou a presença de reprodução sexuada no grupo e alternância da fase haploide/diploide em alguns gêneros.

Embora o conceito morfológico de espécie domine o campo da taxonomia do fitoplâncton, fica claro que este é insuficiente para estimar a real biodiversidade dos organismos, uma vez que características morfológicas distinguíveis são difíceis de visualizar e a morfologia é influenciada por fatores externos e por alterações no ciclo de vida dos organismos. Nos últimos anos a diversidade genética em grupos morfológicamente definidos do fitoplâncton foi explorada e revelaram uma ampla diversidade críptica (HOEF- EMDEN, 2007; SIMON *et al.*, 2009).

Estudos de inferência filogenética usando cepas de *Cryptomonas* revelaram incongruências entre morfoespécies e as espécies biológicas dentro dos táxons estudados (HOEF-EMDEN, 2007). Cepas geneticamente idênticas quando comparadas morfológicamente correspondiam a espécies morfológicas distintas, enquanto que cepas pertencentes à mesma morfoespécie eram espécies geneticamente diversas.

No Brasil, todos os levantamentos realizados para as Cryptophyceae são baseados em dados morfológicos gerados por microscopia ótica (MENEZES & NOVARINO, 2003; TUCCI *et al.*, 2011), o que faz com que essa identificação seja incerta. A maior parte dos trabalhos disponíveis de Cryptophyceae no Brasil foi realizada em água doce no estado de São Paulo. De acordo com Castro & Bicudo (2007) foram publicados 28 trabalhos com enfoques diversificados. Para os ambientes salobro e marinho há apenas quatro registros de Cryptophyceae não identificadas e/ ou com identificação não clara: *Cryptomonas* sp., *Hemiselmis* sp., *Rhodomonas* sp., e *Rhodomonas* cf. *minuta* Skuja (MENEZES &

NOVARINO, 2003). Para a costa do estado de São Paulo não há registros, segundo Villac *et al.* (2008).

Entretanto, recentemente foram descritas novas espécies da classe Cryptophyceae. Quatro novas espécies do gênero *Hemiselmis* foram descritas por Lane & Archibald (2008). Em 2012 um novo gênero com uma nova espécie foi descrito para a Espanha: *Urgorri complanatus* Laza-Martínez, 2012, que é estuarina e potencialmente desencadeadora de uma maré vermelha, pois suas florações podem ser seguidas por florações de dinoflagelados cf. *Pfiesteria* (LAZA- MARTÍNEZ, 2012). Ambos os trabalhos integram dados de morfologia e biologia molecular.

Foram isoladas dez cepas de Cryptophyceae, nove delas foram isoladas a partir de culturas mistas estabelecidas com água de Cananéia, com uso do meio *Guillard f/2*, utilizando a técnica de micropipetagem e diluições sucessivas. Outra cepa foi isolada a partir de cultura mista inoculada com água de Ubatuba, usando meio *Erd- Schreiber*, pela técnica de micropipetagem e diluições sucessivas. As cepas de Cananéia são da família Pyrenomonadaceae Novarino & Lucas. Outra cepa do BMA&K isolada também da região de Cananéia (o clone Crypto-C2) pertence também às Pyrenomonadaceae. Esta cepa foi isolada por diluição seriada no ano de 1990, indicando que este organismo é abundante para a região.

As células das cepas de Pyrenomonadaceae têm entre 7-15µm de comprimento, 5-7µm de largura. As células têm formato irregular, pirenóide conspícuo, cloroplasto parietal, cor rosa-vermelho, possuem uma fileira de ejectiossomos circundando a citofaringe, dois flagelos quase iguais. As estruturas como o pirenóide e ejectiossomos são bem observadas no uso de contraste de fase (FIGURAS 28- V; 30 XII- XVII).

Estes organismos têm fototaxia positiva e costumam formar aglomerados de células, biofilmes, especialmente nas vidrarias. Se levado em consideração apenas a morfologia revelada pelo uso da microscopia ótica, estas linhagens poderiam se identificadas como *Rhodomonas* Karsten 1898. Entretanto, devido à falta de dados ultraestruturais, enfatizado por diversos autores como caracteres taxonômicos, não há como identificar estas cepas a

nível genérico, muito menos até nível de espécie.

A outra cepa isolada de Cryptophyceae, procedente de Ubatuba, é do gênero *Hemiselmis* Park 1949 (FIGURA 31). As células são livre natantes, tem forma de rim, possuem tamanho diminuto (4-5µm), biflageladas, vestíbulo deslocado para porção central da célula, mas não é localizado no exatamente no meio. A citofaringe tubular também é deslocada, e se estende obliquamente ao longo da célula, e é rodeada por ejectiossomos. O cloroplasto é único, lobado, de cor verde e pirenóide conspícuo. As células são muito ativas quando observadas em microscopia ótica, com movimento natatório rápido, e aparentemente, com fototaxia negativa. As culturas não têm cor marcada, mas eventualmente ficam verde bem claro. Entretanto, mesmo pálida a cultura atinge altas densidades celulares. O gênero *Hemiselmis* é facilmente reconhecido entre as Cryptophyceae, uma vez que o deslocamento do vestíbulo e da citofaringe parece ser uma característica morfológica única dentro da classe, constituindo uma apomorfia para o gênero. É curioso *Hemiselmis* ser a única linhagem dentro de Cryptophyta que possui espécies com ficocianina ou com ficoeritrina, pois os demais gêneros possuem apenas um dos pigmentos.

Testes realizados com formaldeído e lugol para estas cepas mostraram que elas são sensíveis a agentes fixadores. Entretanto, o lugol ainda conserva boa parte das características da célula, matem a forma celular e estruturas como ejectiossomos e pirenóide. Um problema do lugol é o escurecimento da célula (FIGURA 30-XV). O formaldeído é inadequado para a fixação destes organismos, mesmo com concentrações abaixo das usadas em estudos de rotina, como observado (FIGURA 28-VI; FIGURA 30-XIV). As células perdem o formato e os flagelos, ficam praticamente irreconhecíveis.

Figura 28: Cepas de Pyrenomonadaceae (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio *f*/2): (I) Cepa can 17; (II) Cepa can 17; (III) Cepa can 17; (IV) Cepa can 18; (V) Cepa can 18 (contraste de fase); (VI) Cepa can 18 (fixado com formaldeído). Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.

Figura 29: Cepas de Pyrenomonadaceae (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio $f/2$): (VII) Cepa can 29; (VIII) Cepa can 30; (IX) Cepa can 31; (X) Cepa can 32; (XI) Cepa can 33; (XII) Cepa can 33 (célula em duplicação). Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.

Figura 30: Cepas de Pyrenomonadaceae (Cryptophyceae) isoladas de Cananéia por micropipetagem (meio *f/2*): (**XIII**) Ceba can 33 (contraste de fase); (**XIV**), Ceba can 33 (fixado com formol); (**XV**) Ceba can 33 (fixado com lugol); (**XVI**) Ceba can 34; (**XVII**) Ceba can 34 (contraste de fase); (**XVIII**) Ceba can 35. Todas as microfotografias foram feitas com aumento de 1000 vezes.

Figura 31: *Hemiselmis* sp. (Cryptophyceae) isolada de Ubatuba por micropipetagem (meio *Erd- Shreiber*): cepa uba2/5 em diferentes vistas e focos.

4.3. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos são moléculas com estruturas eficientes na captação da luz entre 400 e 700nm. Existem três tipos distintos: as clorofilas, os carotenoides e as biliproteínas. Todos os organismos fotossintetizantes possuem clorofilas e carotenoides. Já as biliproteínas são restritas a Rhodophyta, Cyanobacteria e Cryptophyta. Entretanto, simbiose entre Cryptophyceae, ciliados e dinoflagelados, (PARK *et al*, 2006) abre uma exceção na distribuição das biliproteínas.

As clorofilas são compostos tetrapirrólicos com átomo de magnésio quelado no centro do anel do sistema. Todos os organismos fotossintéticos têm clorofila *a* (ou a_2), e a maior parte das classes também tem ou clorofila *b* (ou b_2), ou clorofila c_s , e raramente clorofila *d* (KIRK, 1994). A clorofila *a* geralmente é a clorofila mais abundante. As clorofilas *a* e *b* ocorrem nas cianobactérias Prochlorophyta, nas Chlorophyta e nos grupos originados a partir de endossimbiose que envolveram as algas verdes, Euglenozoa e Chlorarachniophyta. As clorofilas do tipo *c* são encontradas nas Ochrophyta, Cryptophyta e Dinophyta (JEFFREY & VESK, 2005).

No espectro de absorção das clorofilas *a* e *b*, ambas possuem uma banda forte no vermelho e outra mais forte na região do azul. A absorção é baixa na faixa do verde, o que reflete na cor destes pigmentos (KIRK, 1994). As clorofilas do tipo *c* absorvem mais na faixa do azul e menos na faixa do vermelho quando comparada ao espectro de absorção das clorofilas *a* e *b*. A clorofila *a* absorve fracamente entre 450 e 650nm, e as clorofilas *b* e *c*, quando presentes, têm a capacidade de aumentar a absorção nessa faixa do espectro de luz (KIRK, 1994).

Os carotenoides são outra classe de pigmentos fotossintéticos, quimicamente distintos das clorofilas, pois são compostos isoprenóides C_{40} . Eles ampliam o espectro de absorção das clorofilas na faixa final do azul. Há muito mais variedades nas formas químicas de carotenoides do que das clorofilas, provavelmente, porque a clorofila é o pigmento crucial para o início da reação da fotossíntese, e os carotenoides são apenas pigmentos acessórios.

As biliproteínas, ou ficobilinas, são pigmentos hidrossolúveis encontrados em poucos grupos, são característicos pela cor vermelha (ficoeritrina, ficoetritrocianina) ou azul (ficocianina, aloficocianina) (KIRK, 1994).

Foram obtidas curvas de absorvância para as clorofilas e carotenoides das linhagens *Nephroselmis* sp. (FIGURA 32), *Ochromonas* sp. (FIGURA 32), *Hemiselmis* sp. (FIGURA 32), as Pyrenomonadaceae sp. (FIGURAS 33, 34 e 35), e duas cepas do BMA&K, *Rhodomonas* RJ e Crypto-C2 (FIGURA 36). As biliproteínas foram analisadas para todas as Cryptophyta (FIGURAS 32 a 36).

O padrão observado da cepa de *Nephroselmis* sp. é característico das algas que têm clorofilas *a* e *b*, as Chlorophyta. O pico observado em 434nm é da clorofila *a*. Ensaios com HPLC observaram que o pico de absorvância da clorofila *a* em extratos com acetona é em 430nm (JEFFREY *et al.*, 2005). Essa pequena diferença de valores pode ser atribuída a interferência dos demais pigmentos, pois o extrato não é purificado. O pico no 662,5nm também é característico da clorofila *a*. A presença da clorofila *b* pode ser observada pelos picos de absorvância em 458.5nm e 649.5nm, uma vez em HPLC, usando-se extrato em acetona 100% os picos da clorofila *b* ficam em 456.9nm e 645.5nm (JEFFREY *et al.*, 2005).

O padrão da curva de absorvância observado na cepa *Ochromonas* sp. (FIGURA 32) é característico das Ochrophyta, algas que contém clorofilas *a* e *c*. Os picos visualizados em 434 e 663.5nm referem-se a clorofila *a*. A clorofila *c* não pode ser identificada por um pico, pois é mascarada pela absorvância da clorofila *a* e dos carotenoides. Entretanto, o aumento da curva entre 433 a 477 é o resultado da interferência desse pigmento. Provavelmente, o pico que aparece em 477 é devido à presença de algum carotenoide.

As Cryptophyceae autotróficas têm uma combinação de pigmentos fotossintéticos única: clorofila *a*, clorofila *c*₂, ficocianina ou ficoeritrina, além dos carotenoides (HILL & ROWAN, 1986; ROWAN, 1989). As Cryptophyceae contém apenas um tipo de ficocianina ou ficoeritrina por espécie, diferindo dos pigmentos equivalentes nas classes que contém ficobilissomos (Cyanobacteria e Rhodophyta). Os ficobilissomos, que são um conjunto de

moléculas associadas a membranas dos tilacóides, ocorrem em Rhodophyta e Cyanobacteria, e não ocorrem em Cryptophyceae. A presença ou ausência dos ficobilissomos afeta a captura da luz nos dois grupos. Nas Cyanobacteria e Rhodophyta, a luz capturada passa pelo gradiente ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, clorofila *a*. Já nas Cryptophyceae os pigmentos estão nos espaços intratilacoidais e reagem diretamente com a clorofila, uma vez que a aloficocianina não é encontrada nas Cryptophyceae. (HILL & ROWAN, 1986; ROWAN, 1989).

Em todas as cepas de Cryptophyceae analisadas, a clorofila *a* pode ser observada pelos picos 433-434nm e 663.5nm. A clorofila *c* também aparece mascarada, como em *Ochromonas* sp., pelo pico que aparece entre 481- 482nm, referente aos carotenoides. A presença da clorofila *c* é confirmada pelo aumento da absorvância entre 433- 482nm, pois o pico da clorofila *c* na faixa do azul é entre 445-450nm (JEFFREY *et al.*, 2005).

Pigmentos lipossolúveis, como clorofilas e carotenoides, quando extraídos com solventes apolares as ligações pigmento-proteína são rompidas, neste caso, o espectro de um dado pigmento é idêntico ao de qualquer fonte. As ficobilinas são pigmentos hidrossolúveis que estão ligados a apoproteínas. Essa ligação covalente não é rompida quando os pigmentos são extraídos da célula com água, devido à interação entre o cromóforo e a proteína, o espectro da biliproteína varia entre espécies.

O número e tipos de cromóforos de ficobilina ligados covalentemente às apoproteínas são cruciais na definição de picos no espectro de absorção. Interações entre ficobilinas e apoproteínas e o estado de polimerização das unidades vai afetar a forma do espectro. As ficocianinas das Cryptophyceae têm um espectro mais complexo que as ficoeritrinas, com mais de três cromóforos distintos na molécula.

A complexidade do espectro de absorção das biliproteínas varia, podendo ter de um a três picos distintos, especialmente as ficoeritrinas. Geralmente alguns picos mal definidos ou “ombros” podem ocorrer, o que é característico de certos pigmentos.

Confusões sobre a nomenclatura das biliproteínas das Cryptophyceae pode ser evitado pela identificação desses pigmentos de acordo com o comprimento de onda de

máxima absorção no espectro visível, como o adotado em Hill & Rowan (1986).

O gênero identificado morfollogicamente como *Hemiselmis* sp. pode ser confirmado através do espectro de absorvância comparado ao trabalho de Hill & Rowan (1986), pois o pico de 618nm encontrado no presente trabalho é bem próximo a 615nm, o encontrado em Hill & Rowan (1986). As curvas tem um padrão um pouco diferente, comparando os dados do presente estudo e dos autores citados acima, pois o maior pico encontrado no presente estudo foi em 568nm, e não em 618nm.

Os resultados obtidos pelas curvas de absorvância confirmam que as demais cepas de Cryptophyceae são da família Pyrenomonadaceae. Os picos variaram entre 539-544. Comparando os resultados obtidos com os apresentados em Hill & Rowan (1986), os picos encontrados são mais próximos de *Rhodomonas* sp., em relação aos demais organismos estudados.

Figura 32: Pigmentos fotossintéticos: cepas *Nephroselmis* sp. (UBA01/01), *Ochromonas* sp. (UBA01/21) e *Hemiselmis* sp. (UBA02/05).

Figura 33: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae (Can17, Can 18 e Can29)

Figura 34: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae (Can 30, Can 31 e Can 32)

Figura 35: Pigmentos fotossintéticos das cepas de Pyrenomonadaceae (Can 33, Can 34 e Can 35).

Figura 36: Pigmentos fotossintéticos: cepas de Pyrenomonadaceae do BMA&K (*Rhodomonas* RJ e BMA&K 39- Cypto-C2)

5. Considerações Finais

Todos os métodos tradicionais de isolamento têm seus problemas e limitações, por isso, é importante conhecê-los bem para otimizar o isolamento das espécies de interesse. Os organismos isolados no presente estudo são mais adaptados a maiores concentrações de nutrientes, uma vez que não se usou formulações de meio de cultura diluído. Outros estudos são necessários, utilizando-se outras concentrações e outros meios de cultura a fim de aumentar o número de espécies isoladas das áreas estudadas.

As técnicas de isolamento aplicadas do decorrer deste trabalho permitiram o isolamento de 49 cepas. As classes e numero de cepas isolados foram Cyanophyceae (*Chroococcus* sp. 11; Pseudoanabaenaceae, 5), Trebouxiphyceae (*Chlorella* sp., 4), Prasinophyceae (1), Nephroselmidophyceae (*Nephroselmis* sp., 1), Chrysophyceae (*Ochromonas* sp., 9), Bacillariophyceae (*Nitzschia* cf. *longissima*, 1; *Thalassiosira* sp. 2; *Odontella* sp., 1, *Skeletonema* sp., 1), Cryptophyceae (Pyrenomonadaceae sp. 9; *Hemiselmis* sp., 1) e Ochrophyta não identificado (3).

A micropipetagem é o único método que seleciona diretamente o organismo de interesse, permitindo o isolamento dos organismos que estão em menores densidades na amostra original, e por isso foi o método mais usado no presente estudo. Entretanto, sua execução é difícil e tem grande margem de insucesso, além de ser inadequada para organismos menores de 4µm, uma vez que são quase invisíveis em aumentos de 10 e 25 vezes. Todos os organismos monadais e as diatomáceas foram isolados com essa técnica.

O plaqueamento em meio sólido é uma técnica simples e fácil, entretanto é extremamente seletivo, pois poucos organismos conseguem crescer sobre a superfície do meio. Grupos que possuem paredes cobrindo as células são mais facilmente isolados com essa técnica. Foram isolados organismos de Cyanobacteria (Pseudoanabaenaceae) e Ochrophyta (unicelulares não identificados) com o emprego dessa técnica.

O plaqueamento em meio semissólido é uma bom complemento à diluição seriada, uma vez que se consegue isolar organismos que não estejam tão densos no inóculo original. Testes realizados com este procedimento permitiram o crescimento de células como

Hemiselmis sp., *Ochromonas* sp. entre outros flagelados. Muitas das culturas obtidas com esta técnica foram perdidas quando o BMA&K passou por reformas, pois os organismos foram mantidos por três meses a temperatura de 18°C.

A diluição em série é uma técnica fácil e que permite isolamento dos organismos mais abundantes no ambiente, embora seja extremamente seletiva para os organismos mais competitivos de acordo com o meio de cultura empregado. Entretanto, este é um importante método a ser usado para o estudo dos organismos mais abundantes no ambiente e permite uma abordagem ambiental, correlacionando os resultados do isolamento com a abundância dos organismos isolados na amostra original, além de permitir a observação *in vivo*, o que facilita a identificação. Embora seja um método simples e barato, não é muito utilizado, e se desconhecem trabalhos publicados com essa abordagem para o Brasil.

As Prasinophyceae podem ser importantes organismos componentes do picoplâncton das regiões costeiras e oceânicas da costa de São Paulo, embora praticamente desconhecidas para todo o Brasil. Uma cepa do grupo foi isolada por diluição em série, refletindo a abundância do organismo na amostra original.

As Cryptophyceae, apesar de desconhecidas, devem desempenhar um importante papel como produtores primários na região estuarina de Cananéia, pois uma das cepas do BMA&K, antes não identificada, foi isolada por diluição em série, método que seleciona apenas os organismos mais abundantes no ambiente. Esta cepa foi identificada como da família Pyrenomonadaceae.

Os organismos estudados no presente estudo, como *Nephroselmis*, *Hemiselmis*, Pyrenomonadaceae, *Ochromonas*, Ochrophyta (não identificados), Prasinophyceae (não identificado), *Chlamydomonas* e *Chlorella* são novos registros para o fitoplâncton marinho para o estado de São Paulo. Com relação a Cryptophyta, não há registro de espécies para costa do Brasil. Todos esses achados refletem a falta de taxonomistas de microalgas para o ambiente marinho no Brasil (exceto taxonomistas de diatomáceas e dinoflagelados).

Os estudos focados no pico e nanoplâncton para a costa do Brasil estão há mais de vinte anos atrasados quando comparados a estudos em outras regiões do mundo onde esses

estudos estão mais desenvolvidos. Grandes problemas impedem a ampliação do conhecimento da biodiversidade do nano e picofitoplâncton para águas marinhas brasileiras, sendo o principal relacionado a falta de recursos, tanto humanos quanto materiais, nas instituições de ensino e pesquisa do Brasil. Microscópios eletrônicos e laboratórios de biologia molecular são raros e demandam um grande investimento financeiro.

A questão do fixador utilizado nas amostras de fitoplâncton também é um problema adicional. O formaldeído, fixador de amostras ambientais amplamente utilizado nos estudos de fitoplâncton marinho é inapropriado para conservar os organismos sem carapaça, como observado nos testes realizados, pois altera a morfologia da célula impossibilitando o reconhecimento taxonômico. Para o estudo do nano e picoplâncton, o lugol é um fixador mais adequado, pois conserva as células frágeis e mantém os flagelos dos organismos móveis.

Os organismos isolados neste trabalho são um importante material para estudo da taxonomia e filogenia de linhagens da costa do Brasil, uma vez que não há estudos envolvendo as linhagens isoladas da costa brasileira. Há muito trabalho pela frente se quisermos entender e conhecer a composição dos organismos responsáveis pela maior parte da produção primária da costa do Brasil.

6. Referências Bibliográficas

1. ABE, D.S. **Contribuição das frações do micro, nano e picofitoplâncton para a biomassa e produtividade primária do ecossistema costeiro de Ubatuba, Estado de São Paulo.** 1993. 199p. Dissertação (Mestre)- Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, São Paulo, 1993.
2. ARCHIBALD, J. Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. **BioEssays.** v.29, p. 392- 402, 2007.
3. AIDAR, E. *et al.* Ecossistema costeiro subtropical: nutrientes dissolvidos, fitoplâncton e clorofila-a e suas relações com as condições oceanográficas na região de Ubatuba, SP. Publicação Esp. **Inst. Oceanogr, São Paulo**, n. 10, p.9-43, 1993.
4. AMORIM, Dalton de Souza. Sistemática e Diversidade Biológica. In: AMORIM, Dalton de Souza. **Fundamentos de Sistemática e Filogenética.** Ribeirão Preto: Holos, 2002. Cap. 1, p. 15-18.
5. ANCONA, Cintia Maria. **Aspectos da variação espacial e temporal da biomassa e produção fitoplanctônica e parâmetros correlatos no estuário e baía de Santos.** 2007. 229 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, São Paulo, 2007.
6. ANDERSEN, Robert A. *et al.* Phylogenetic Analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae. **Protist**, v. 150, n. , p.71-84, 1999.
7. ANDERSEN, Robert A.; KAWACHI, Masanobu (Ed.). Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques.** San Diego: Elsevier, 2005. Cap. 6, p. 83-100.
8. ANDERSEN, R. A. Molecular Systematics of the Chrysophyceae and Synurophyceae. In: BRODIE, Juliet; LEWIS, Jane (Ed.). **Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics.** Crc Press Taylor & Francis Group, 2007. Cap. 15, p.285-314. (75).
9. BALDAUF, S. An Overview of the Phylogeny and diversity of Eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, n. 3, p. 263- 273, 2008.
10. BARRERA-ALBA, José Juan *et al.* Bacterial and phytoplankton dynamics in a subtropical estuary. **Hydrobiologia**, n. 598, p.229-246, 2008.
11. BERGESCH, M.; ODEBRECHT, C. Characteristics and Importance of Planktonic Flagellates in Marine Coastal and Oceanic Ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v., n. , p.173-196, 2001.
12. BERGESCH, M.; ODEBRECHT, C.; MOESTRUP, Ø. Nanoflagellates from coastal waters of southern Brazil (32°C). **Botanica Marina**, New York, p. 35-50, 2008.
13. BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M.. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil.** 2. ed. São Carlos: Rima, 2005. 489 p.
14. BUTCHER, R.W. **An introductory account of the smaller algae of British coastal waters.** Part I: Introduction and Chlorophyceae. Vol. ser. IV (Part 1) pp. 74. Great Britain: Minist. Agric. Fish. Food, Fish. Invest. 1959.

15. BUTCHER, R. W. An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters: Cryptophyceae. **Fishery Investigations**, London, n.4 , v.4 , p.1-54, 1967.
16. CASTRO, Ana Alice Jarreta de; BICUDO, Carlos Eduardo de Mattos. **Flora Ficológica do Estado de São Paulo: Cryptophyceae**. São Paulo: Rima, 2007. 11 v.
17. CAVALIER-SMITH, T. Membrane heredity and early chloroplast evolution. **Trends Plant Sci**, n. 5, p. 174- 182, 2000.
18. CERINO, F.; ZINGONE, A. A survey of cryptomonad diversity and seasonality at a coastal Mediterranean site. **European Journal of Phycology**, n. 41, v. 4, p. 363-378, 2006
19. CERINO, F.; ZINGONE, A. Decrypting Cryptomonads: a challenge for molecular taxonomy. In: BRODIE, J.; LEWIS, J. **Unravelling the Algae: the past, present and future of algal systematic**. USA: CRC Press, 2007. p. 197-214.
20. CHRÉTIENNOT-DINET, M-J. *et al.* A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). **Phycologia**, v. 94, n. 4, p.285-292, 1995.
21. DALEY, R. J.; MORRIS, G. P.; BROWN, S. R. Phagotropic ingestion of a Blue-Green Alga by *Ochromonas*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 58- 61, 1973.
22. DELWICHE, Charles F. Algae in the warp and weave of life: bound by plastids. In: BRODIE, Juliet; LEWIS, Jane. **Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics**. London: Crc Press, 2007. Cap. 2, p. 7-20. (The systematics Association Special Volume Series 75).
23. DES-MARAIS, D.J. When did photosynthesis emerge on Earth? **Science**, v. 289, n., p.1703-1705, 2000.
24. DOUGLAS, S. *et al.*, The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. **Nature**. n. 410, p. 1091-1096, 2001.
25. DUNSTAN, G. A.; BROWN, M. R.; VOLKMAN, J. K. Cryptophyceae and Rhodophyceae: chemotaxonomy, phylogeny and application. **Phytochemistry**, n.66, p. 2557-2570, 2005.
26. ESKINAZI-LEÇA, E. *et al.* *Bacillariophyceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB97964>. Acessado em 19 de junho de 2013.
27. FALKOWSKI, Paul G.; RAVEN, John A.. **Aquatic Photosynthesis**. Usa: Blackwell Science, 1997. 375 p.
28. FALKOWSKI, Paul G. *et al.* The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. **Science**, v. 305, n. , p.354-359, 2004.
29. FIELD, Christopher B. *et al.* Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. **Science**, v. 281, n. , p.237-240, 1998.
30. GANTT, E.; EDWARDS, M.R.; PROVASOLI, L. Chloroplast Structure of the Cryptophyceae: evidence for phycobiliproteins within intrethylakoidal spaces. **The Journal of Cell Biology**, v.48, p. 280-290, 1971.
31. GIANESELLA, Sônia Maria Flores *et al.* Assessment of plankton community and environmental conditions in São Sebastião Channel prior to the construction of a produced water outfall. **Revista Brasileira de Oceanografia**, São Paulo, n. 47, p.29-46, 1999.

32. GIANESELLA, S. M. F.; SALDANHA-CORRÊA, F.M.P. “Avaliação da comunidade fitoplanctônica na área adjacente ao emissário submarino de esgotos na Praia da Enseada, Guarujá (SP), em Janeiro e Julho de 2002”. **III Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde- Meio Ambiente e Saúde**. 21 a 23 de Julho de 2003, Santos, São Paulo, p.18-21, 2003.
33. GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, John H.. Studies of Marine Planktonic Diatoms: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. **Canadian Journal Of Microbiology**, Vancouver, v. 8, n. , p.229-239, 1962.
34. GUILLARD, R. R. L.. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, Walter L.; CHANLEY, Matoira H. **Culture of Marine Invertebrate Animals**. New York: Plenum Press, 1975. p. 29-70.
35. GUILLOU, Laure *et al.* *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). **Journal Of Phycology**, v. 35, n. 2, p.368-381, 1999.
36. GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acessado em: 17 Junho de 2013.
37. HILL, D. R. A.; ROWAN, K. S. The Biliproteins of the Cryptophyceae. **Phycologia**, v. 28, n. 4, p. 455-463, 1989.
38. HILL, D. R. A.; WEHERBEE, R. *Proteomonas sulcata* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae), a cryptomonad with two morphologically distinct and alternating forms. **Phycologia**, v. 25, n. 4, p. 521- 543, 1986
39. HILL, D.R.A.; WETHERBEE, R. The Structure and Taxonomy of *Rhinomonas pauca* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae). **Phycologia**, v. 27, n. 3, p.355-365, 1988.
40. HOEF-EMDEN, K.; MELKONIAN, M (2003). Revision of the Genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): A combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a Long- Hidden Dimorphism. **Protist**, v. 157, p. 371-409.
41. HOEF-EMDEM, K. Revision of the genera *Cryptomonas* (Cryptophyceae)II: Incongruence's between the classical morphospecies concept and molecular phylogeny in smaller pyrenoid-less cells. **Phycologia**, v. 46, p. 402- 428, 2007.
42. HUTCHINSON, G E. The Paradox of the Plankton. **The American Naturalist**, v. 85, n. 95, p.137-145, 1961.
43. JEFFREY, S. W.; MANTOURA, R.F.C.; BJORNLAND, T.. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In: JEFFREY, S.W.; MANTOURA, R.F.C.; WRIGHT, S.W. (Comp.). **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods**. 2. ed. Paris: Rógar S.A., 2005. Cap. , p. 449-559. (Unesco Monographs on Oceanographic Methodology).
44. JEFFREY, S. W.; VESK, M. **Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures**. 2. ed. Madrid: Gráficas Rógar S.A., 2005. 375 p.
45. JEONG, Hae Jin *et al.* Feeding by the heterotrophic dinoflagellate *Protoperidinium bipes* on the diatom *Skeletonema costatum*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 36, n. , p.171-179, 2004.
46. KIRK, J.T.O.. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1994. 509 p.

47. KLAIVENESS, D. Classical and Modern Criteria for Determining Species of Cryptophyceae. **Bulletin of Plankton Society of Japan**, n. 32, v.2, p111- 123, 1985.
48. LAKEMAN, Michael Boyd; CATTOLICO, Rose Ann. Cryptic Diversity in Phytoplankton Cultures is Revealed Using a Simple Plating Technique. **J. Phycol.**, v. 43, n. , p.662-674, 2007.
49. LATZ, Michael I.; JEONG, Hae Jin. Effect of red tide dinoflagellate diet and cannibalism on the bioluminescence of the heterotrophic dinoflagellates *Protoperdinium* spp. **Marine Ecology Progress Series**, v. 132, n. , p.275-285, 1996.
50. LAZA-MARTÍNEZ, Aitor. *Urgorri complanatus* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae), a red-tide-forming species in brackish waters. **Journal of Phycology**, v. 48, p.423-435, 2012.
51. LEE, Robert E. **Phycology**. 4. ed. New York: Cambridge, 2008. Cap. 9, p. 321-332.
52. LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Editora Rima. 2006.
53. MARIN, B; KLINGBERG, M.; MELKONIAN, M. Phylogenetic Relationships among the Cryptophyta: Analyses of Nuclear- Encoded SSU rRNA Sequences Support the Monophyly of Extant Plastid- Containing Lineages. **Protist**, n. 149, p. 265-276, 1998.
54. MAYR, E. The biological meaning of species. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 1, n. , p.311-320, 1969.
55. MENEZES, M.; NOVARINO, G. How diverse are planktonic cryptomonads in Brazil?: Advantages and difficulties of a taxonomic- biogeographical approach. **Hydrobiologia**, n. 502, p. 297- 306, 2003.
56. MENEZES, Mariângela *et al.* Identification of the toxic alga *Alexandrium Tamiyavanichi* (Dinophyceae) from northeastern Brazil: A combined morphological and rDNA sequence (partial LSU and ITS) approach. **Journal Of Phycology**, Usa, 2010. p. 1239-1251.
57. MENEZES, M. 2013. *Chrysophyceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013a. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB107778>. Acessado em: 10 de maio de 2013.
58. MENEZES, M.. *Nephroselmidophyceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013b. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128680>. Acessado em: 15 de abril de 2013.
59. MENEZES, M.. *Prasinophyceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013c. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB107051>. Acessado em 20 de junho de 2013.
60. MOESTRUP, Ø. Identification by electron microscopy of marine nanoplakton from New Zealand, including the description of four new species. **New Zealand Journal of Botany**, Dinamarca, v. 17, n. 1, p.61-95, 1979.
61. MOON-VAN DER STAAY, Seung Yeo; WACHTER, Rupert De; VAULOT, Daniel. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. **Nature**, v. 409, n. , p.607-610, 2000.

62. MOSER, G. A.O. **Aspectos da eutrofização no sistema estuarino de Santos: distribuição espaço-temporal da biomassa e produtividade primária fitoplanctônica e transporte instantâneo de sal, clorofila-a, material em suspensão e nutrientes.** 2002. Tese (Doutor)- Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Instituto Oceanográfico, São Paulo, 2002.
63. NAKAYAMA, Takeshi *et al.* Phylogeny and ultrastructure of *Nephroselmis* and *Pseudoscurfieldia* (Chlorophyta), including the description of *Nephroselmis anterostigmatica* sp. nov. and a proposal for the Nephroselmiales ord. nov. **Phycologia**, v. 46, n. 6, p.680-697, 2007.
64. NOT, Fabrice *et al.* A Single Species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), Dominates the Eukaryotic Picoplankton in the Western English Channel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p.4064-4072, 2004.
65. NORTON, Trevor A.; MELKONIAN, Michael; ANDERSEN, Robert A. Algal Biodiversity. **Phycologia**, v. 35, n. 4, p.308-326, 1996.
66. NOVARINO, G. Observations on *Rhinomonas reticulata* comb. Nov. and *R. reticulada* var. *eleniana* var. Nov (Cryptophyceae), with comments on the genera *Pyrenomonas* and *Rhodomonas*. **Nordic Journal of Botany**, n. 11, p. 243- 252, 1991.
67. NOVARINO, G. A companion to the identification of cryptomonad flagellates (Cryptophyceae= Cryptomonadea). **Hydrobiologia**, n. 502, p.225-270, 2003.
68. PARK, Myung Gil *et al.* First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 45, n. , p.101-106, 2006.
69. PORTER, K. G. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. **Hydrobiologia**, Netherlands, v.159, n., p. 89- 97, 1988.
70. POTTER, D. *et al.* Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p.99-107, 1999.
71. PRÖSCHOLD, Thomas; LELIAERT, Frederik. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: BRODIE, Juliet; LEWIS, Jane (Ed.). **Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics.** Crc Press Taylor & Francis Group, 2007. Cap. 7, p. 123-153. (75)
72. REVIERS, Bruno de. **Biologia e Filogenia das Algas.** Paris: Artmed, 2006. 280 p.
73. ROWAN, K. S. The Biliproteins. In: ROWAN, K. S. **Photosynthetic Pigments of Algae.** 1.ed. New York: Cambridge University Press, 1989. Cap. 5, p. 166- 211.
74. SALDANHA, Flavia Marisa Prado. **Simulação da mistura vertical de massas de água da região de Ubatuba (SP):** Efeitos sobre a produção primária e biomassa fitoplanctônica. 1993. 2 v. Dissertação (Mestre) - Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
75. SALDANHA-CORRÊA, F. M. P.; GIANESELLA, S. M. F. “Avaliação do fitoplâncton nas águas adjacentes ao difusor do emissário de esgotos do Saco da Capela, Ilha Bela (SP), em Janeiro e Julho de 2002”. **III Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde- Meio Ambiente e Saúde.** 21 a 23 de Julho de 2003, Santos, São Paulo, p.13-17, 2003.

76. SALDANHA-CORRÊA, F. M. P.; GIANESELLA, S. M. F. Produção Primária e Fitoplâncton. In: PIRES-VANIN, A.M.S.. **Oceanografia de um Ecossistema Costeiro Subtropical: Plataforma de São Sebastião**. São Paulo: Edusp, 2008. p. 223-252.
77. SANT'ANNA, Célia Leite; BRANCO, Luís Henrique Zanini; AZEVEDO, Maria Teresa de Paiva. Cyanophyceae/ Cyanobacteria. In: BICUDO, Carlos Eduardo de Mattos; MENEZES, Mariângela (Orgs.). **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2006. Cap. 5, p. 19-82.
78. SHERR, Evelyn B.; SHERR, Barry F.. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 352, n. , p.187-197, 2007.
79. SIMON *et al.* Diversity and evolution of marine phytoplankton. **C. R. Biologies**, n. 332, p. 159-170, 2009.
80. SLAPETA, Jan; LÓPEZ-GARCÍA, Purificación; MOREIRA, David. Global Dispersal and Ancient Cryptic Species in the Smallest Marine Eukaryotes. **Molecular Biology And Evolution**, Xxx, v. 23, n. 1, p.23-29, 2006.
81. SOURNIA, A.; CHRÉTIENNOT-DINET, M-J.; RICARD, M. Marine Phytoplakton: how many species in the world ocean? **Journal Of Plakton Research**, v. 5, n. 13, p.1093-1099, 1991.
82. THRONDSSEN, J.. Estimating cell numbers: The dilution culture method. In: SOURNIA, A. (Ed.). **Phytoplankton Manual**. Paris: Page Brothers (nordwich) Ltd, 1978. Cap. 76, p. 218-224. (Unesco Monographs on Oceanographic Methodology).
83. THRONDSSEN, Jahn. Estimating cell numbers. In: HAKKEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds.). **Manual of Harmful Marine Microalgae**. 33. ed. Paris, 1995. Cap. 4, p. 63-80. (IOC Manuals and Guides).
84. THRONDSSEN, J. The Planktonic Marine Flagellates. In: TOMAS, Carmelo R. **Identifying Marine Phytoplakton**. San Diego, Usa: Academic Press, 1997. p. 591-729.
85. TIRICHINE, Leïla; BOWLER, Chris. Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. **The Plant Journal**, v. 66, n. , p.45-57, 2011.
86. TUCCI, A. *et al.* Checklist das Cryptophyceae do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrópica**, v. 11, n. 1, p.1-13, 2011.
87. TUCCI, A.; NOGUEIRA, I.; MENEZES, M.. *Trebouxiophyceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128664>. Acessado em: 21 de junho de 2013.
88. UKELES, R. Cultivation of Plants: Unicellular Plants. In: KINNE, O. (Ed.). **Marine Ecology**. London: John Wiley & Sons, 1976. p. 367-529.
89. VAULOT, Daniel *et al.* The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3\mu\text{m}$) in marine ecosystems. **Fems Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p.795-820, 2008.
90. VILLAC, Maria Célia; NORONHA, V. A. P. C.; PINTO, T. A.. The phytoplankton biodiversity of the coast of the state of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, n. 8, p.151-173, 2008.

91. VIPREY, Manon *et al.* Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 7, p.1804-1822, 2008.
92. WATANABE, Makoto M. *et al.* Purification of freshwater picoplanktonic cyanobacteria by pour- plating in. **Phycological Research**, v. 48, p.71-75, 1998.
- WETHERBEE, R.; HILL, D. R. A.; McFADDEN, G. I, Periplast structure of the Cryptomonad Flagellate *Hemiselmis brunnescens*. **Protoplasma**, n. 131, p.11- 22, 1986.
93. WETHERBEE, R.; HILL, D. R. A.; BRETT, S. T. The Structure of the periplast components and their association with the plasma membrane in a cryptomonad flagellate. **Can J. Bot.** n. 65, p. 1019-1026, 1987.
94. WILLIAMS, David M.. Classification and diatom systematics: the past, the present, and the future. In: BRODIE, Juliet; LEWIS, Jane. **Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics**. Xxxx: Crc Press, 2007. Cap. 4, p. 57-92.
95. XING *et al.* Observations of several cryptomonad flagellates from China Sea by scanning electron microscopy. **Journal of Systematics and Evolution**, n. 46, v. 12, p. 205-212, 2008.
96. YOON, Hwan Su; HACKETT, Jeremiah D.; BHATTACHARYA, Debashish. A single origin of the peridinin- and fucoxanthincontaining plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci., Usa**, n. 99, p.11724-11729, 2002.
97. ZILLMANN, S.M.S. **Distribuição sazonal do fitoplâncton na radial entre Ilha Anchieta e Ilha da Vitória (Lat.23o31'S Long.45o06'W a Lat.23o45'S Long. 45o01'W) na região de Ubatuba, São Paulo**. 1990. 201f. Dissertação (Mestre). Curso de Oceanografia, Departamento de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

7. Anexos

Taxonomia Biomolecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Algas Marinhas (LAM) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB USP) sob coordenação da Professora Dra Mariana Cabral de Oliveira. O DNA das microalgas foi extraído com o *kit* NucleoSpin® Plant II, a partir da biomassa congelada em nitrogênio líquido (produção e coleta especificados no item 3.4). As etapas e reagentes empregados estão descritas no protocolo que acompanha o kit.

Após a extração do DNA, uma alíquota foi submetida à reação em cadeia da DNA polimerase (polymerase chain reaction- PCR) com kit Invitrogen em um termociclador. Este foi programado para 30 ciclos entre as temperaturas de 95°C (1min.), 55°C (2min) e 68°C (3min). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel (agarose aproximadamente 0.7%) para verificação da PCR.

O produto de PCR foi purificado utilizando o kit GFX Illustra (reagentes e protocolo fornecidos pelo kit). Posteriormente, adicionou-se uma alíquota do produto purificado de PCR aos reagentes do kit “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” para a reação de sequenciamento. Essa solução foi submetida ao ciclo de sequenciamento em um termociclador. Após a reação de sequenciamento, a amostra passa pelo processo de precipitação do DNA e depois é ressuspensa em formamida e levada ao sequenciador automático (3130xl Applied Biosynthesis ou 3730DNA Life Technologies).

A maior parte das cepas escolhidas foi recém- isoladas, e as Cryptophyceae em função de características evolutivas únicas, como expostas anteriormente. Outras linhagens também foram trabalhadas. Foram utilizados primers da região do SSU rDNA (ribossomal small subunit) para o núcleo SSU (e também nucleomorfo para Cryptophyta). A tabela 1 (do anexo) mostra as sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados para PCR e sequenciamento.

As cepas *Nanochloropsis* sp. e *Hemiselmis* sp. (nucleomorfo) tiveram todas as sequências obtidas para as regiões do rSSU conferidas junto banco de dados genéticos

online, o GENBANK, com uma ferramenta denominada BLAST (ZHENG ZHANG *et al.*, 2000). As sequências ainda tem que passar por um processo de montagem e edição, que ainda não foi realizado. Sendo assim, não há como avançar nos resultados. A continuidade dos estudos moleculares iniciados com este trabalho está prevista para ter continuidade em novo projeto com esta finalidade.

HOEF-EMDEN, K.; MARIN, B.; MELKONIAN, M. (2002). Nuclear and Nucleomorph SSU rDNA Phylogeny in the Cryptophyta and the Evolution of the Cryptophyte Diversity. **Molecular Evolution**, v.55, p. 161-179.

HOEF-EMDEN, K.; MELKONIAN, M (2003). Revision of the Genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): A combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a Long- Hidden Dimorphism. **Protist**, v. 157, p. 371-409.

ZHENG ZHANG *et al.* A greedy algorithm for aligning DNA sequences, **J Comput Biol** 2000, v.7, n.1-2, p. 203-14.

Tabela 1: Primers usados nas reações de PCR e sequenciamento.

Designação	Sequências de oligonucleotídeos (5' - 3')
Primers para PCR SSU NÚCLEO	
**CrN1F	CTG CCA GTA GTC ATA TGC TTG TCT C
18S 3'	GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG GAA
*18S5'	CCA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T
Primers para PCR SSU Nucleomorfo	
**CrNM1F	CAGTAGTCATATGCTTGTCTTAAG
18S 3'	GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG GAA
Primers para sequenciamento	
**CrN1F	CTG CCA GTA GTC ATA TGC TTG TCT C
18S5'	CCA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T
530F	GAG GGC AAG TCT GGT G
1055F	GGT GGT GCA TGG CCG
18S 3'	GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG GAA
536R	GAA TTA CCG CGG CTG CTG
1055R	CGG CCA TGC ACC ACC

*Primers usados nas cepas do grupo externo.

** Hoef-Enden *et al.* (2002) e Hoef- Emden & Melkonian (2003)