

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**DINOFLAGELADOS PLANCTÔNICOS DO
EXTREMO SUL DO BRASIL:
IDENTIFICAÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E
RELAÇÃO COM FATORES ABIÓTICOS *IN
SITU E IN VITRO.***

CAROLINA ANTUARTE ISLABÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Clarisse Odebrecht

**RIO GRANDE
Setembro 2015**

“Every day is a new day. It is better to be lucky. But I would rather be exact. Then when luck comes you are ready”

(Ernest Hemingway – The Old man and the Sea)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande – FURG, ao Instituto de Oceanografia, ao programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, ao laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos e a CAPES pela estrutura e ensino oferecidos para que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço à minha orientadora, Clarisse Odebrecht, por ter aceitado me acompanhar e ensinar. Por todas as correções feitas, pelas conversas, pelas oportunidades e pelo exemplo. Ter a oportunidade de aprender com a Sra só deixa esta etapa mais feliz!

Agradeço à minha banca de acompanhamento, Virginia Tavano, Paulo Cesar Abreu e João Sarkis Yunes, por todas as sugestões, conselhos, aulas, motivação e carinho.

Ao amigo e colega Carlos Rafael B. Mendes pela parceria, por dividir conhecimento, por acompanhar e tratar com muita seriedade e dedicação as minhas ideias! Obrigada Rafa!

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório, por tanta ajuda, amizade, incentivo, conversas e por dias sempre melhores! Em especial ao Ng Haig They e Elisa Seyboth pela ajuda com as dúvidas e análises estatísticas. À Vera e Votto, que são grandes incentivadores. Aos colegas que trabalharam comigo nos artigos, Rafa, Arnaldo e Amália. À querida Nathalia Miosso pela ajuda e companhia nos dias de experimento. Aos amigos Savênia, Lucélia, Andrea, Fabi, Elis, Ana Luisa e Márcio pela amizade e por fazerem parte da minha vida!

Agradeço à minha amiga e professora de Biologia Fany Wieth e a professora Marli Bergesh por terem sido pessoas fundamentais no caminho até aqui!

Agradeço à minha mãe por toda educação que recebi. Obrigada pelo teu amor!

Gratidão!

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais dos dinoflagelados	1
1.2 Importância ecológica e econômica dos dinoflagelados	5
1.3 Dinoflagelados e o ecossistema marinho.....	7
1.3.1 O papel dos dinoflagelados na estrutura da comunidade fitoplanctônica.....	8
1.3.2 Salinidade.....	11
1.3.3 Irradiância.....	14
1.4 OBJETIVOS.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	31
4. DISCUSSÃO GERAL	37
5. CONCLUSÕES.....	54
LITERATURA CITADA.....	56
APÊNDICES.....	70

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Sul do Brasil (verão, 2013), com ênfase no papel dos dinoflagelados.

Apêndice 2: Influence of salinity on the growth of *Akashiwo sanguinea* and *Prorocentrum micans* (Dinophyta) under acclimated conditions and abrupt changes.

Apêndice 3: Effects of irradiance on growth, pigment content and photosynthetic efficiency of three peridinin-containing dinoflagellates.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

S: salinidade

PAR: Radiação fotossinteticamente ativa

ACCL: aclimatação

No ACCL: sem aclimatação

LL: intensidade de luz baixa (low light),

HL: intensidade de luz alta (high light)

ANOVA: análise de variância

HPLC; high performance liquid chromatography;

PAM: technique of pulse amplitude modulated;

Chl *a*: clorofila *a*;

Perid: Peridinina;

Diadino; Diadinoxantina;

Dino: Dincoxantina;

MgDVP: Mg- 2,4- divinylpheoporphyrin a₅ monomethyl ester;

β,β -Car: β,β -Caroteno;

Ddc: Diadinochromo

CCA: análise de correspondência canônica

MLD: profundidade da camada de mistura

DIN: nitrogênio inorgânico dissolvido total

Dpe: diatomáceas penadas

AT: Água tropical

ACAS: Água Central do Atlântico Sul

ASA: Água Suantártica

ASTP/ STSW: Água Sutropical de Plataforma

PRP: Pluma do Rio da Prata

ASAP: Água Subantártica de Plataforma

FSTP: Frente subtropical de plataforma

ZCBM: zona de confluência Brasil-Malvinas

ELPA: estuário da Lagoa dos Patos

DCM: Deep Chlorophyll Maximum

CTD: Instrumento para medição da Condutividade, Temperatura e Profundidade.

RESUMO

Aspectos da fisiologia e ecologia de dinoflagelados planctônicos do extremo Sul do Brasil foram avaliados. As amostras foram coletadas na região estuarina e costeira (experimentos em laboratório) onde cultivos unialgais de três espécies foram estabelecidos, e na plataforma continental (estudo de campo). No verão de 2013, foi avaliada pela primeira vez a distribuição vertical dos dinoflagelados na plataforma continental do sul do Brasil. A estratificação da coluna de água ao longo do transecto costa-talude foi determinante para a estruturação da comunidade fitoplanctônica e principalmente para a maior contribuição dos dinoflagelados no verão, também correlacionados com a presença da Água Subtropical de plataforma (ASTP). Diatomáceas dominaram nas estações mais próximas à costa, onde a coluna de água estava homogênea, e foram substituídas por dinoflagelados com o aumento da estratificação. Ao longo do gradiente, dois tipos de dinoflagelados foram verificados: Tipo 1 (contendo peridininina) nas estações próximas à costa, e Tipo 2 (contendo fucoxantina), os últimos contribuindo com mais da metade da biomassa (em clorofila *a*) nas estações situadas na plataforma continental, principalmente na profundidade de máxima clorofila e com maiores concentrações de nitrogênio inorgânico dissolvido. A presença de dinoflagelados do Tipo 2, especialmente Gymnodiniales como cf. *Karenia*, é de particular interesse, pois incluem espécies tóxicas que estão mais adaptadas para arrasto e dispersão pelas correntes costeiras. Em laboratório, o efeito de duas importantes variáveis ambientais, salinidade e irradiância, foi testado na taxa de crescimento, aclimatação, volume celular, composição dos pigmentos e eficiência fotossintética de *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans* e *Scrippsiella trochoidea*. Os dinoflagelados mostraram habilidade para crescer diante de mudanças bruscas de salinidade, mais pronunciada em *A. sanguinea*. A salinidade ótima (25-30) para as culturas coincidiu com os maiores valores de densidade celular destas espécies no ambiente. Dois níveis de irradiância foram testados (baixo LL ± 87 ; alto HL 450-490 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$) e as espécies não apresentaram fotoinibição mas sim tolerância a alta luz. Resultados similares na taxa de crescimento foram verificados em LL e HL para *A. sanguinea* e *P. micans*, enquanto que para *S. trochoidea* a taxa foi mais alta em HL. A concentração de pigmentos fotossintéticos foi maior em LL e a concentração de pigmentos fotoprotetores foi baixa mesmo sob alta irradiância. Alta eficiência fotossintética ($F_v/F_m > 0.5$) foi verificada em *S. trochoidea* e *P. micans*, ao contrário de *A. sanguinea*, possivelmente relacionada com diferentes graus de trofia entre as espécies.

Palavras-chave: *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans*, *Scrippsiella trochoidea*, Peridininina, Fucoxantina, Fisiologia-ecologia.

ABSTRACT

Physiological and ecological aspects of planktonic dinoflagellates from southern Brazil were evaluated. Samples were collected in the estuarine and coastal regions and cultures of three species were established (laboratory experiments), and on the continental shelf (field study). The vertical distribution of dinoflagellates on the continental shelf off southern Brazil was evaluated for the first time in summer 2013. Water column stratification along the coast-continental slope transect was crucial to the structure of the phytoplankton community and especially for the greatest contribution of dinoflagellates. Diatoms dominated the stations near the coast under homogeneous water column, and were replaced by dinoflagellates with increasing stratification. Along the transect gradient, two dinoflagellates types were observed: type 1 (containing peridinin) near the coast, and Type 2 (containing fucoxanthin) accounting for more than half of the biomass (chlorophyll *a*) in the stations located on the continental shelf, mainly at the maximum chlorophyll *a* layer and higher dissolved inorganic nitrogen concentration. The presence of Type 2 dinoflagellates, especially Gymnodiniales as cf. *Karenia* is of particular interest because they include toxic species that are adapted to be dragged and dispersed by coastal currents. The effect of two important environmental variables, salinity and irradiance was tested on growth rate, acclimation, cell volume, pigment composition and photosynthetic efficiency of *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans* and *Scrippsiella trochoidea*. Dinoflagellates were able to grow following sudden changes in salinity, more pronounced in *A. sanguinea*. The optimal salinity (25-30) in culture coincided with the highest cell densities for the species in the environment. Two levels of irradiance were tested (low light LL ± 87 ; high light HL 450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the species showed no photoinhibition but rather tolerance to high light. Similar growth rates were found for *A. sanguinea* and *P. micans* at LL and HL, while *S. trochoidea* presented higher values at HL. The concentration of photosynthetic pigments was higher in LL and the concentration of photoprotective pigments was low even under high irradiance. High photosynthetic efficiency ($F_v/F_m > 0.5$) was found for *S. trochoidea* and *P. micans*, unlike *A. sanguinea*, possibly associated with different degrees of trophic abilities between species.

Key words: *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans*, *Scrippsiella trochoidea*, Peridinin, Fucoxanthin, Physiology.

1. INTRODUÇÃO

O fitoplâncton desempenha um papel crucial nos ecossistemas marinhos, determinando a estrutura e a eficiência das teias alimentares, ciclagem de nutrientes e o fluxo de partículas para águas profundas. Pode ser definido como o coletivo de organismos fotossintéticos unicelulares, adaptados para viver parcial ou continuamente em aparente suspensão nos oceanos. Como tal, constitui o componente autotrófico do plâncton e um importante produtor primário de carbono orgânico na coluna de água do oceano e ambientes aquáticos continentais (Reynolds 2006).

O fitoplâncton estuarino e marinho reúne populações de espécies continentais e oceânicas, sendo necessário entender a influência de variáveis abióticas na formação dessas assembleias, bem como as interações entre as espécies (Begon et al. 1986). Junto com as diatomáceas e alguns flagelados (ex. primnesiofitas), os dinoflagelados são um dos principais componentes do fitoplâncton marinho, e como produtores primários, eles representam uma base trófica fundamental na vida marinha. Em adição a isto, muitas espécies são obrigatoriamente heterotróficas, e desempenham um papel importante como consumidores na alça microbiana (Hoppenrath et al. 2009).

1.1 Características gerais dos dinoflagelados

Os dinoflagelados (aproximadamente 2.400 espécies recentes) ocorrem em todas as latitudes, em águas doces e marinhas, mas a sua abundância e diversidade são maiores em ambientes marinhos de baixa latitude. A maioria dos dinoflagelados (82%) habita águas marinhas, enquanto 17% do total de espécies colonizam águas continentais

(Gómez 2012). A maioria das espécies é planctônica, mas também existem dinoflagelados bentônicos, parasitas de invertebrados marinhos e peixes, ou ainda vivendo como zooxantelas em radiolários, foraminíferos, corais, moluscos, anêmonas e medusas (Taylor et al. 2008). Os primeiros registros fósseis são da era Paleozóica, Período Siluriano (435–460 milhões de anos). Portanto, os dinoflagelados estão entre os organismos mais antigos na história da Terra, após as cianobactérias, clorofíceas e rodofíceas (Hoppenrath et al. 2009).

Os dinoflagelados são haplóides em sua fase vegetativa, exceto *Noctiluca* (Hoppenrath et al. 2009). A principal forma de reprodução é vegetativa, através da divisão binária das células mãe (haplóides), em 2 células-filhas haplóides. A divisão pode ser em plano oblíquo, cada célula-filha recebendo a epiteca ou a hipoteca e formando a parte restante. Nos dinoflagelados tecados, a divisão pode dar-se dentro da célula-mãe, ou não. Entretanto, muitos dinoflagelados apresentam um ciclo de vida complexo, com reprodução sexuada: após a união de gametas (isogamia, anisogamia ou hologamia) formam-se zigotos, que podem formar cistos de resistência (hipnozigoto) ou cistos temporários (planozigoto). Os cistos de resistência podem sobreviver no sedimento por vários meses até anos, sob condições desfavoráveis para as células vegetativas, tolerando inclusive condições anóxicas. Com o excistamento, uma ou duas células vegetativas haplóides são liberadas (Bravo & Figueroa 2014).

Metade das espécies planctônicas apresenta hábito heterotrófico e faz parte do protozooplâncton, enquanto que a outra metade apresenta metabolismo autotrófico, auxotrófico ou mixotrófico (Gómez 2012). Algumas espécies de dinoflagelados possuem capacidade de bioluminescência e muitas apresentam um ciclo de vida complexo, com uma fase de vida bentônica e outra planctônica (Taylor et al. 2008). As

florações de dinoflagelados têm grande importância na cadeia alimentar clássica e também na alça microbiana. Espécies autotróficas alimentam o protozooplâncton e metazoários (zooplâncton, larvas de peixes e bentos), enquanto que, as espécies mixotróficas e heterotróficas alimentam-se de bacterioplâncton, fitoplâncton, protozooplâncton e de crustáceos pequenos. Nos sistemas pelágicos, o microzooplâncton preda significativamente o fitoplâncton e frequentemente, os dinoflagelados compõem mais de 50% desta biomassa. Por sua vez, a taxa de herbivoria dos dinoflagelados sobre as diatomáceas pode ser alta, e comparável a taxa de copépodos e outros organismos do mesozooplâncton (Sherr & Sherr 2007). A captura de alimento dá-se de forma variada, com ingestão ou digestão externa das presas. Neste caso, pseudópodes oriundos da região do sulco (“véu de alimentação”) são usados para digerir as presas, semelhante ao mecanismo adotado por foraminíferos. Outras formas de alimentação são a sucção da seiva citoplasmática da presa por um pedúnculo, ou a fagocitose de uma presa inteira através do sulco longitudinal (Taylor 1987).

O fósforo e o nitrogênio são os dois principais macronutrientes que afetam o crescimento de dinoflagelados autotróficos (Barsanti & Gualtieri 2005, Arrigo 2005), cujas estratégias de absorção e armazenamento de nutrientes incluem a utilização de nitrogênio e fósforo inorgânico e orgânico, vitaminas, metais traço e outros substratos de crescimento como ácido húmico. O conhecimento sobre a eficiência de absorção dos nutrientes pelas microalgas ainda é limitado. Em uma revisão sobre a ecofisiologia de 18 espécies de dinoflagelados nocivos de áreas de ressurgência, Kudela et al. (2010) reportaram a capacidade de absorção de nitrato (16 espécies), amônio (14 espécies), e uréia (6 espécies). Foi demonstrado, também, que amônio e uréia são preferencialmente utilizadas por flagelados (Dortch 1990), mas a biomassa máxima e florações são

controlados pela disponibilidade de nitrato (Kudela & Peterson 2009). Da mesma forma, florações de dinoflagelados foram relacionadas com a disponibilidade de fontes orgânicas de nitrogênio, como a uréia (Switzer 2008). Existe pouca informação sobre o crescimento de microalgas marinhas sob baixas concentrações de fósforo, mas a utilização de formas orgânicas deste nutriente (Mendes et al. 2011) parece ser uma vantagem ecológica importante.

Com respeito à morfologia, os dinoflagelados são diversos e, devido a presença de dois flagelos, possuem movimento giratório característico. Em sua forma básica, apresentam um flagelo transversal, situado no cingulo ao redor de toda célula; e outro longitudinal, situado em um sulco ventral. A célula é formada pela epiteca (anterior) e hipoteca (posterior). Outra característica dos dinoflagelados, é a presença de um núcleo grande e conspícuo (dinocáron), devido aos cromossomos condensados durante a interfase (Taylor 1987).

Os dinoflagelados são tradicionalmente divididos em “tecados” e “atecados”, de acordo com a quantidade de celulose depositada nas vesículas (anfiesma) que cobrem a sua superfície, sendo o último grupo menos conhecido (Gómez 2007). Estudos mais recentes que combinam morfologia e composição molecular têm revelado novas espécies, exigindo uma nova classificação dos dinoflagelados (Hoppenrath et al. 2009). O principal problema na identificação das espécies “atecadas” é a deterioração, com a morte celular, de estruturas cruciais para o seu diagnóstico, como a elucidação do percurso da linha apical, poro ventral e elementos de ultra-estrutura do anfiesma (Takayama 1985), tornando-se indispensável a observação de células vivas e análise da composição molecular (Hoppenrath et al. 2009). Os dinoflagelados tecados são mais robustos devido à presença de placas celulósicas que revestem a célula (Hallegraff et al.

2004). Geralmente, este sistema de placas tem suporte filogenético com base na constituição molecular (Yamaguchi et al. 2006), mas muitas espécies requerem o conhecimento de sua composição genética para a devida identificação e classificação.

1.2 Importância ecológica e econômica dos dinoflagelados

1.2.1 Florações

As florações de dinoflagelados desenvolvem-se principalmente sob condições de alta temperatura e águas calmas, preferencialmente em situações de coluna de água estratificada, que propiciam a locomoção de suas células. O crescimento dos dinoflagelados geralmente aumenta após uma floração de diatomáceas e a consequente redução de nutrientes inorgânicos dissolvidos na coluna de água. Esta situação ocorre no verão em regiões de alta latitude, ou durante o ano todo em regiões oceânicas tropicais e favorece as espécies com capacidade auxotrófica/heterotrófica (Taylor et al. 2008).

A denominação “maré vermelha” é comumente usada para caracterizar fenômenos que resultam em mudanças na cor da água - esverdeada, amarelada, marrom, além de avermelhada - devido à presença de células em grande quantidade. Os efeitos negativos da maré vermelha são alterações de viscosidade da água e capacidade de filtração do zooplâncton e a redução de oxigênio dissolvido.

1.2.2 Florações de dinoflagelados nocivos

Nas últimas décadas, florações de algas nocivas (FANs) tem aumentado em frequência e distribuição geográfica, ocorrendo em todas regiões do mundo. Algumas

espécies de dinoflagelados produzem toxinas que afetam o homem ou a fauna através do consumo de moluscos bivalves e/ou peixes de recifes de corais contaminados ou exposição à água ou aerossol. Nesses casos, os organismos tóxicos podem não estar presentes em grande quantidade e não alterar a cor da água. A intoxicação do homem dá-se principalmente pela ingestão de mariscos que se alimentaram de dinoflagelados tóxicos e concentram suas toxinas. Quando espécies tóxicas estão presentes em alta densidade, e são ingeridas por suspensívoros (sobretudo mariscos, zooplâncton e peixes herbívoros), as toxinas acumuladas são transferidas ao longo da cadeia alimentar. Em adição a estes efeitos na saúde humana, as toxinas de dinoflagelados são responsáveis pela morte de peixes e mariscos e tem causado grandes mortalidades de mamíferos marinhos, aves e outros animais dependendo da teia alimentar (Wang 2008).

Em torno de 200 espécies de microalgas, das quais 80 espécies de dinoflagelados, produzem toxinas (Smayda & Reynolds 2003). Os dinoflagelados produtores de toxinas representam um risco para a saúde pública, exploração sustentável de recursos marinhos e atividades de aquicultura em zonas costeiras. Cerca de 2.000 casos de intoxicação humana são registrados a cada ano, com uma taxa de mortalidade de 15% (Hallegraeff et al. 2004). As principais toxinas de dinoflagelados são as saxitoxinas e variantes, que causam o envenenamento paralisante por molusco (*Paralytic Shellfish Poisoning- PSP*), o ácido ocadaico e dinofisistoxinas, responsáveis pelo envenenamento diarréico por molusco (*Diarrhetic Shellfish Poisoning – DSP*), as brevetoxinas, pelo envenenamento neurotóxico por molusco (*Neurotoxic Shellfish Poisoning - NSP*) e astoxinas causadoras da ciguatera, intoxicação alimentar causada pelo consumo de peixes contaminados em regiões subtropicais e tropicais (Hallegraeff et al. 2004). No entanto, novas síndromes

de envenenamento tem sido descritas recentemente, causadas por toxinas produzidas por dinoflagelados, como toxinas azaspirácidas, iessotoxinas e palitoxinas (Wang 2008).

Florações nocivas de dinoflagelados foram documentadas no Oceano Atlântico Sul Ocidental (Carreto et al. 2001, Ferrari & Méndez 2000, Odebrecht et al. 2002, Persich et al. 2006) com a presença de espécies reconhecidamente produtoras de PSP (*Alexandrium tamarense* e *Gymnodinium catenatum*) e toxinas lipofílicas (DSP, PTX) (complexo *Dinophysis acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata* e *D. tripos*). Além disto, espécies potencialmente nocivas (*Prorocentrum minimum* e *Gyrodinium cf. aureolum*) e outras associadas com produção de cistos de resistência (*Scrippsiella trochoidea*, *Heterocapsa triquetra*) também ocorrem (Rosa & Buselato 1981, Tavares et al. 2009, Islabão 2010, Haraguchi & Odebrecht 2010). Em três ocasiões (1978, 1981 e 1993), florações de Gymnodiniales foram associadas com a mortandade da fauna intertidal na costa do Rio Grande do Sul (Garcia et al. 1994, Rosa & Buselato 1981, Odebrecht et al. 1995, 2002).

1.3 Dinoflagelados e o ecossistema marinho

Devido a sua diversidade fisiológica, o papel dos dinoflagelados no ecossistema marinho é variado. Espécies fotossintéticas são importantes produtores primários, e periodicamente podem ter grande impacto. Espécies não fotossintéticas absorvem compostos orgânicos dissolvidos, realizam fagotrofia ou digestão extracelular e, ao contrário das anteriores, sobrevivem em profundidades não iluminadas, na água e no sedimento. A mobilidade por meio dos flagelos permite otimizar sua localização e evitar a sedimentação em condições estáveis na coluna de água, sendo esta

característica considerada chave na sua competição com as diatomáceas, e os dinoflagelados favorecidos nos meses de verão (Taylor et al. 2008).

Neste estudo, a distribuição vertical de dinoflagelados foi avaliada pela primeira vez na plataforma continental do sul do Brasil. Ainda, o efeito de duas importantes variáveis ambientais - intensidade de luz e salinidade, foram avaliados na ecofisiologia dos dinoflagelados. Esses fatores controlam a concentração, composição e distribuição do fitoplâncton na região do estuário da Lagoa dos Patos (Abreu et al. 1994, 1995; Odebrecht et al. 2013).

1.3.1 O papel dos dinoflagelados na comunidade de fitoplâncton

As formas de vida do fitoplâncton representam adaptações ao longo de um gradiente de intensidade de turbulência, que influencia a exposição luminosa e a disponibilidade e absorção de nutrientes. Em geral, as diatomáceas predominam em regiões de maior turbulência ($2 - 100 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e alto teor de nutrientes, ao contrário dos dinoflagelados ($0,02 - 1 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (Margalef 1978, Cullen et al. 2002). É bem conhecido que estes últimos são favorecidos em águas estratificadas e baixa concentração de nutrientes inorgânicos dissolvidos, principalmente pela sua habilidade de migração vertical na coluna de água, alta afinidade por nutrientes e também pela sua capacidade mixotrófica e heterotrófica (Hoppenrath et al. 2009, Sherr & Sherr 2007). Mas, devido às características morfo-funcionais de algumas espécies que formam grandes florações, tais como, a alta taxa de crescimento, tamanho celular pequeno-intermediário, mobilidade eficiente e forma de vida morfometricamente simples, essas requerem uma grande disponibilidade de nutrientes (Smayda &

Reynolds 2001). Habitats relativamente rasos (águas costeiras) e enriquecidos com nutrientes, mesohalinos e com poucas trocas, favorecem florações de dinoflagelados gymnodinióides e algumas formas tecadas como *Alexandrium minutum*, *Heterocapsa triquetra*, *Scrippsiella trochoidea* e *Prorocentrum* spp. (Smayda & Reynolds 2001).

Três estratégias/formas de vida observadas no fitoplâncton de água doce (Reynolds 1988) foram aplicadas aos dinoflagelados e associadas aos ambientes marinhos ao longo de um gradiente de nutrientes e grau de mistura (Smayda & Reynolds 2001). As estratégias consideradas foram: (a) a capacidade de colonizar (estratégia C, *colonist*), por espécies de tamanho celular pequeno a intermediário como *Gymnodinium* spp. *Gyrodinium* spp, *Scrippsiella trochoidea* e *Prorocentrum minimum*, que frequentemente predominam em ambientes perturbados, com alta concentração de nutrientes; (b) a tolerância para suportar estresse (estratégia S, *stress tolerant*) ao baixo teor de nutrientes e capacidade de manter -se em determinada profundidade, através da própria mobilidade ou em combinação com mecanismos de auto-regulação, por espécies de tamanho celular tipicamente grande, como *Dinophysis acuminata*, *Amphisolenia* spp. e *Ornithocercus* spp., e (c) a tolerância frente a perturbação física das massas de água, derivada do seu deslocamento por correntes, frentes oceanográficas ou ressurgências (estratégia R, *ruderal*), por espécies como *Gymnodinium mikimotoi*, *G. catenatum*, *G. breve* e *Alexandrium tamarense*.

Os dinoflagelados podem ser encontrados sem pigmentos (heterótrofos), com seu próprio plastídeo (carotenóides de dinoflagelados e peridininina) ou com plastídeos derivados de criptófitas, diatomáceas penadas ou cêntricas, primnesiofitas ou prasinofitas/clorofitas. Alguns dinoflagelados abrigam células de cianobactérias simbióticas intactas (Jefrey et al. 2011). Portanto, a maioria dos dinoflagelados

autotróficos apresenta os pigmentos Chl *a* e *c*₂, e peridininina como principal pigmento acessório. Outros seis tipos de cloroplastos foram descritos recentemente, propiciando novas descrições de espécies de dinoflagelados (Zapata et al. 2012). A quantificação precisa da concentração dos pigmentos fotossintéticos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) permite o estudo da composição e estrutura dos grupos de fitoplâncton, inclusive do nano e pico-plâncton. Esses últimos requerem técnicas especiais de microscopia para sua análise e são normalmente difíceis de identificar em análises realizadas ao microscópio óptico. Por outro lado, as análises de pigmentos são relativamente rápidas, sendo uma ferramenta importante no monitoramento das populações fitoplanctônicas (Wright and Jeffrey, 2006; Mendes et al. 2011).

A região da plataforma continental do sul do Brasil é caracterizada pela mistura de massas de água quentes e frias, costeiras e oceânicas, resultando em gradientes horizontais e verticais de densidade da água, elevada diversidade de fitoplâncton e produtividade biológica (Ciotti et al. 1995; Odebrecht & Garcia 1998; Gaeta & Brandini 2006). Na região costeira, elevadas concentrações de fitoplâncton são observadas no final do inverno e primavera, onde diatomáceas (ex. *Skeletonema costatum*) são abundantes nas águas próximas a desembocadura da Lagoa dos Patos. A água costeira, sob influência do Rio da Prata, favorece o crescimento de dinoflagelados tecados (*Scrippsiella* cf. *trochoidea*, *Prorocentrum* spp., *Dinophysis* spp., *Ceratium* spp.) (Odebrecht & Garcia 1998). A presença da Pluma do Rio da Prata proporciona altas densidades de dinoflagelados ressaltando o papel da estratificação vertical da coluna de água (Islabão 2010). Ao largo na plataforma continental, alta densidade relativa de dinoflagelados tecados autotróficos/mixotróficos como *Heterocapsa*, *Scrippsiella trochoidea* e *Ceratium*, e espécies heterotróficas como *Protoberidinium* spp. e *Gyrodinium* spp. foram verificadas

(Ciotti 1990). Mais ao sul, na costa do Uruguai, em período de primavera, o fitoplâncton foi associado com duas zonas do Rio da Prata: (a) zona interior (frente de turbidez) dominada principalmente por nanoflagelados (*Cryptomonas*) e algumas diatomáceas típicas de água doce (*Aulacoseira granulata*) e ambientes turvos (*Paralia sulcata*); (b) zona exterior dominada por diatomáceas e dinoflagelados marinhos, de acordo com as condições de estratificação da coluna de água (Ferrari 2008). Em outra ocasião no final da primavera, florações de dinoflagelados coincidiram com altos valores de nutrientes e baixa turbulência ao longo da Pluma do Rio da Prata (Carreto et al. 2008).

Os dinoflagelados são um grupo de interesse particular na região do extremo Sul do Brasil, pela sua adaptação ao aumento da dinâmica em zonas de frentes oceanográficas, mistura vertical durante o enfraquecimento de ressurgências costeiras ou deslocamento por correntes costeiras. A região da plataforma é caracterizada pela existência de fortes gradientes horizontais e verticais de densidade da água. Os gradientes de temperatura e salinidade são determinados pela presença de águas de descarga continental como a Lagoa dos Patos e Rio da Prata, águas de origem tropical e subantártica. *Será testada a hipótese de que a abundância, composição e forma de vida dos dinoflagelados estão relacionados com o grau de estabilidade na coluna de água e teor de nutrientes ao longo de um transecto costa-talude (onshore-offshore) no extremo Sul do Brasil.*

1.3.2 Salinidade

A salinidade representa um importante fator ecológico em ambientes marinhos em geral, mas especialmente em regiões costeiras, onde as suas variações influenciam as respostas metabólicas, a seleção de espécies e a distribuição de toda a biota, inclusive

de microalgas (Gessner & Schramm 1971; Smayda 1980). A composição de espécies de microalgas também é influenciada pela salinidade, ao passo que o seu crescimento e abundância são determinados por outros fatores como a disponibilidade de luz, temperatura e nutrientes (Smayda 1980; Kirst 1989). Em geral, as espécies de fitoplâncton presentes em ambientes estuarinos exibem uma ampla tolerância a variações de salinidade (eurihalinas) e crescem também em águas de baixa salinidade, ao contrário de espécies oceânicas que requerem constantemente águas de salinidade alta (estenohalinas); as costeiras assumem uma posição intermediária (Kirst 1989). As espécies de água doce são menos tolerantes e a maioria é substituída por espécies marinhas mesmo em águas que apresentam baixos valores de salinidade (S 0,5; Smayda 1983). Em ambientes com grandes flutuações de salinidade, diferenças interespecíficas quanto à tolerância às flutuações de salinidade desempenham um importante papel na estruturação das comunidades fitoplanctônicas (Kirst 1989; Floder et al. 2010).

O efeito do estresse osmótico sobre o crescimento das microalgas tem sido estudado em espécies de água doce (Fodorpataki & Bartha 2004) e planctônicas marinhas, principalmente diatomáceas (Qasim et al. 1972; Sigaud-Kutner & Aidar 1995; Radchenko & Il'yash 2006). Em dinoflagelados, o efeito da salinidade foi investigado no crescimento de espécies tóxicas e potencialmente nocivas (Kim et al. 2004; Lim & Ogata 2005; Roder et al. 2012; Yamaguchi et al. 2012), associado ao efeito da temperatura, irradiância e nutrientes, que desencadeiam florações e a produção de toxinas (Yamamoto et al. 2013; Jauffrais et al. 2013). Foi constatado que as resposta às mudanças de salinidade são específicas e não dependem somente da salinidade absoluta, mas também da velocidade e duração do estresse osmótico (Qasim et al. 1972).

O efeito de condições ambientais sobre o crescimento e fisiologia de algas é geralmente avaliado em experimentos de laboratório, após a aclimação das cepas de microalgas às condições de cultivo na qual as células mantêm sua taxa de crescimento máxima. Isto é obtido através de múltiplas transferências para novo meio de cultivo ou com suprimento contínuo (quimiostato), permitindo o ajuste fisiológico das células. Entretanto, em ambientes costeiros e especialmente em estuários, as populações são frequentemente submetidas ao estresse osmótico, devido a variações bruscas de salinidade, sem que haja tempo suficiente para permitir a sua aclimação. O tempo de aclimação em experimentos de laboratório não é padronizado e varia de dias (Yamamoto et al. 2002) a meses (Kim et al. 2004; Matsubara et al. 2007), dificultando comparações de resultados. A necessidade de aclimação pode ser questionada, especialmente em ambientes costeiros e estuarinos, onde as populações estão frequentemente sujeitas a mudanças bruscas de salinidade. No estuário da Lagoa dos Patos e costa adjacente no sul do Brasil, grandes variações de salinidade ocorrem devido à circulação horizontal induzida pelo vento. O fitoplâncton nesta área está sujeito a mudanças de salinidade de 10 – 20 unidades de salinidade em poucas horas, geralmente entre as salinidades 10 e 30 (Odebrecht et al. 1995; Abreu et al. 2010; Fujita & Odebrecht 2007). Considerando estas grandes flutuações de salinidade em ambientes costeiros/ estuarinos, o presente estudo avaliará *a hipótese de que, quando submetidos a mudanças abruptas de salinidade, a taxa de crescimento de dinoflagelados eurihalinos são similares em condições com e sem pré- aclimação.*

1.3.3 Irradiância

Os dinoflagelados formam um grupo trófico diverso de protistas alveolados com cerca de 50% de organismos autotróficos, embora com distinto grau de mixotrofia (Steidinger & Tangen 1995). Assim, os dinoflagelados são importantes produtores primários, mas também produtores secundários com um papel relevante na alça microbiana marinha. Esta diversidade trófica, em conjunto com as suas habilidades fisiológicas, permite aos dinoflagelados explorar e ter sucesso no ambiente pelágico, em massas de água fisicamente misturadas mediante estresse de luz e até mesmo em águas com limitação de nutrientes (Smayda 2002).

A maioria dos dinoflagelados autotróficos contém cloroplastos envoltos por três membranas, adquiridos ao longo de sua evolução através da endossimbiose de microalgas, como diatomáceas, haptófitas, prasinófitas (Jeffrey et al. 2011). Os pigmentos Chl *a* e *c*₂, e peridinina como o principal pigmento acessório, são característicos dos ditos “cloroplastos com Peridinina” (neste estudo denominados como Dinoflagelados Tipo I) originados por endossimbiose secundária; seus plastídeos são derivados de algas vermelhas (Jeffrey et al. 2011). Outros seis tipos de cloroplastos, de diferentes origens evolutivas, foram descritos recentemente e propiciaram novas descrições de espécies de dinoflagelados (Zapata et al. 2012). Os dinoflagelados que contêm fucoxantina, com perfil pigmentar semelhante às haptófitas são denominados, neste trabalho, como Dinoflagelados Tipo II).

Estratégias fotoadaptativas frente às flutuações no nível de irradiância são importantes na ecologia de microalgas com flagelos, e permitem explorar os vários nichos de disponibilidade de luz (Smayda 1997, 2002). Entre essas estratégias

fotoadaptativas, destaca-se o requerimento por luz para o funcionamento da fotossíntese e crescimento celular. Em geral, as microalgas respondem à reduzida irradiância com o aumento no conteúdo de pigmentos e/ou uma mudança na sua composição, garantindo uma absorção eficiente (Johnsen & Sakshaug 1993). Entretanto, respostas diferentes são encontradas entre as espécies (Richardson et al. 1983; Henriksen et al. 2002). Richardson et al. (1983) verificaram que os dinoflagelados geralmente fotossintetizam e crescem melhor em baixa irradiância ($7-50 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) apresentando fotoinibição em $<100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Entretanto Falkowski et al. (1985), Garcia & Purdie (1992), Montresor et al. (2003), Deng et al. (2004) e Matsubara et al. (2007) relataram que a irradiância de fotoinibição para diferentes espécies de dinoflagelados foi bem superior ($>500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Além disso, os resultados clássicos de Ryther (1956) mostraram que os grupos “algas verdes”, diatomáceas e dinoflagelados apresentam um padrão diferente entre si, sendo que os últimos apresentam o maior valor de luz de saturação para a fotossíntese ($560-700 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com fotoinibição entre $790-930 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, evidenciando sua adaptação à alta irradiância.

A resposta fotossintética dos dinoflagelados pode, em parte, ser explicada pela composição e conteúdo de pigmentos e a razão pigmento/Chl *a* total, os quais são fortemente influenciados pela irradiância e disponibilidade de nutrientes. Além disto, a intensidade da fluorescência da Chl *a in vivo* fornece informação importante sobre a fisiologia das microalgas, pois o fluxo da fluorescência é proporcional à luz excitante, à sua biomassa e ao rendimento fotoquímico da fluorescência. O rendimento fotoquímico da fluorescência da Chl *a in vivo* varia de acordo com est\u00edmulos ambientais, principalmente luz e nutrientes. Em especial, duas medidas de fluorescência fornecem informa\u00e7\u00e3o direta sobre a efici\u00eancia dos processos fotossint\u00e9ticos do fotossistema II

(PSII) e o estado fisiológico do fitoplâncton (Huot & Babin 2010): i) fluxo máximo de fluorescência *in vivo* (F_m), quando todos os centros de reação estão fechados (saturação luminosa) e ii) fluxo mínimo de fluorescência *in vivo* (F_0), medido no escuro, quando todos os centros de reação estão abertos. A máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) é dada pela razão entre a fluorescência variável F_v ($F_m - F_0$) e a fluorescência máxima F_m .

A caracterização dos pigmentos e a variação em sua composição em espécies cultivadas, são fundamentais para a aplicação fidedigna da quimiotaxonomia, como ferramenta para o conhecimento da diversidade de microalgas em amostras naturais (Henriksen et al. 2002; Zapata et al. 2012). Henriksen et al. (2002) verificaram que a relação pigmento/chl *a* variou pouco em espécies de um mesmo grupo fitoplanctônico. Ao contrário dos resultados obtidos por Ruivo et al. (2011), que verificaram diferenças significativas na razão pigmentos/chl *a* durante o crescimento e também entre espécies do mesmo grupo. Contudo, Henriksen et al. (2002) apontam que os valores das razões pigmentares obtidas da literatura diferem em um fator de dois ou mais daqueles observados em espécies cultivadas e oriundas de diferentes áreas. Uma resolução fidedigna das razões entre os principais pigmentos, possibilita a utilização das mesmas como ferramentas quimio-taxonômicas (ex. Wright et al. 2009) com uma resposta mais rápida, comparada a técnicas convencionais de microscopia, sobre a composição e biomassa de microalgas, e conseqüentemente da qualidade da água no ambiente.

Com base nesta informação, será avaliada a hipótese de que espécies de dinoflagelados com o mesmo tipo de cloroplasto (Tipo 1: peridinina/dinoxantina/chl c_2 ; Zapata et al. 2012) apresentam respostas específicas quanto ao seu crescimento celular

e eficiência fotossintética e que as razões pigmento/Chl a total são similares quando expostas a níveis de irradiância baixo ou elevado.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Geral

Avaliar aspectos da fisiologia e ecologia dos dinoflagelados planctônicos no extremo Sul do Brasil, ressaltando a distribuição e relação das espécies com fatores abióticos e sua contribuição na comunidade fitoplanctônica.

1.4.2 Específicos

- 1) Avaliar a estrutura e composição do fitoplâncton ao longo de um transecto desde a desembocadura da Lagoa dos Patos na costa até o talude.
- 2) Determinar a contribuição dos dinoflagelados na comunidade fitoplanctônica e sua relação com a estabilidade vertical na coluna de água.
- 3) Testar o efeito de variações bruscas de salinidade no crescimento de duas espécies de dinoflagelados, *Prorocentrum micans* Ehrenberg e *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen *et* Moestrup isolados da região de estudo.
- 4) Testar o efeito da irradiância no crescimento, volume celular, composição dos pigmentos e suas razões, e a eficiência fotossintética do fotossistema II em três espécies de dinoflagelados, *Prorocentrum micans*, *Akashiwo sanguinea* e *Scrippsiella trochoidea* isolados da região de estudo.

O primeiro e segundo objetivos específicos foram desenvolvidos em um artigo que está em preparação (Artigo 1, em preparação). O terceiro objetivo foi desenvolvido em um artigo publicado (Artigo 2); e o último objetivo em um artigo que se encontra submetido para publicação (Artigo 3).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Após a descrição da área de estudo, a metodologia está apresentada na ordem dos objetivos propostos.

Área de estudo

A Lagoa dos Patos é a maior lagoa costeira do tipo “estrangulada” do mundo (Kjerfve 1986). Sua região estuarina representa aproximadamente 10% da área da Lagoa e apresenta uma conexão com o Oceano Atlântico (Asmus 1997). No estuário da Lagoa dos Patos (ELPA), as variações na densidade, composição e biomassa (clorofila *a*, Chl *a*) do fitoplâncton, assim como de fatores ambientais (temperatura, salinidade e nutrientes) estão relacionadas ao ciclo meteorológico, em especial com o regime de chuvas e a disponibilidade luminosa (Odebrecht et al. 2013; Haraguchi et al. 2015). A frequência na substituição de espécies fitoplanctônicas lacustres por marinhas está associada, em curta escala, com a salinidade, controlada pela circulação da água que, por sua vez, é determinada pela direção e intensidade dos ventos (Fujita & Odebrecht 2007; Abreu et al. 2010). A concentração do fitoplâncton aumenta na primavera/verão e geralmente ocorre em função da maior disponibilidade de luz e maior tempo de residência da água do interior da laguna. Ao contrário, no inverno, a baixa disponibilidade de luz nas águas turvas do

ELPA limita o crescimento e a produção primária, embora valores elevados sejam observados esporadicamente neste período (Abreu et al. 1994, 2010).

Na região da desembocadura do ELPA, próximo à cidade de Rio Grande (Lat. 32°12' S), a plataforma e talude continental são influenciados por diversas massas de água: Água Tropical (AT), Água Central do Atlântico Sul (ACAS), Água Subantártica (ASA) e Água Subantártica de Plataforma (ASAP) (Möller et al. 2008). As propriedades termohalinas da água na plataforma continental ainda variam conforme o volume descarregado por importantes aportes continentais, como a pluma do Rio da Prata (PRP) e da Lagoa dos Patos, e do grau de influência da AT e ASA. Duas variedades de Água Subtropical de Plataforma (ASTP) são observadas, procedentes da mistura de ASAP com AT ou de PRP com AT (Möller et al. 2008, Piola et al. 2008). A presença de massas de água com características físico-químicas distintas resulta na formação da Frente Subtropical de Plataforma (FSTP), que apresenta variabilidade sazonal, com um marcado gradiente termo-halino na quebra de plataforma, perpendicular à costa em torno da latitude 32° S (Piola et al. 2008), separando ASAP de ASTP (Möller et al. 2008). As principais fontes de nutrientes na região são PRP (silicato e fosfato), ASAP (nitrato e fosfato) e ACAS (nitrato), quando esta ascende à superfície (Braga et al. 2008). A variação latitudinal da PRP está relacionada com a descarga de água continental e o regime de ventos (Miranda 1973, Moller et al. 2008), e afeta a circulação e estratificação termo-halina na plataforma continental. Na plataforma continental próximo à costa, ocorre o predomínio de PRP com menor salinidade em superfície (Matano et al. 2010), formando uma frente horizontal que divide a ASAP de forma abrupta na direção costa-oceano (Piola et al. 2000). A PRP e Lagoa dos Patos influenciam significativamente a produção e o crescimento do fitoplâncton nesta região geográfica, e períodos de maior precipitação (por exemplo em anos de *El Niño*) foram associados com um aumento de Chl *a* na plataforma continental (Abreu et al. 1995, Ciotti et al. 1995, Braga et al. 2008).

2.1 Metodologia referente aos objetivos 1 e 2 (Apêndice 1)

❖ Amostragem

Foram realizadas amostragens na desembocadura do ELPA ao longo de um transecto costa-talude para o estudo da estrutura da comunidade fitoplanctônica em relação às condições ambientais.

No âmbito do projeto “Dinâmica do Ecossistema Marinho e suas implicações para o sequestro de carbono (DEMI-SeC)”, um cruzeiro oceanográfico foi realizado no verão austral (20-23 fevereiro de 2013) entre a costa e a região oceânica ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos (Lat. 32°12S). Perfis verticais de temperatura, salinidade e de fluorescência (sensores CTD e de fluorescência) foram determinados previamente à amostragem da água efetuada com garrafas de Niskin, em sete estações oceanográficas. As profundidades amostradas em cada estação foram definidas selecionando-se no mínimo quatro e preferencialmente sete profundidades, de acordo com o grau de estratificação. As coletas foram sempre realizadas em superfície, acima e abaixo e na própria termoclina/haloclina, e na profundidade de fluorescência máxima da Chl *a*, exceto na estação 6 (0, 10 e 20m). Foram coletadas amostras de água para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos, contagem celular do fitoplâncton (fixação com soluções de lugol 2% e formol 1%) e pigmentos (superfície e profundidade com clorofila máxima - DCM).

❖ Salinidade e densidade celular de *A. sanguinea* e *P. micans* na Praia do Cassino

A relação entre a salinidade e a densidade celular de *A. sanguinea* e *P. micans* observados na zona de arrebentação da Praia do Cassino foi avaliada. Os dados ambientais de salinidade, frequência de ocorrência e densidade celular das espécies foram obtidos de dados históricos mensalmente entre 1994 e 2013, no âmbito do projeto de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD) no estuário da Lagoa dos Patos e Costa Adjacente. Os detalhes dos procedimentos de amostragem e métodos analíticos foram descritos por Odebrecht et al. (2010). A abundância de células de *A. sanguinea* e *P. micans* foi estimada usando o método de sedimentação (Utermöhl 1958). A frequência de observações das duas espécies nas amostras mensais foi determinada para cada estação do ano, considerando como 100% o total de 57 meses por estação durante 20 anos, que é 228 (N meses analisados) por estação ($228/4= 57$).

❖ **Cruzeiro Oceanográfico**

Água de superfície e profundidade de fluorescência máxima foi coletada (1,5 L) para análise dos pigmentos em HPLC. As amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro (Whatman GF/F) e acondicionadas imediatamente em nitrogênio líquido.

Com base no teor de pigmentos, a abundância relativa dos grupos de fitoplâncton que contribuíram para a biomassa total de clorofila *a* (Chl *a*) foi calculada usando o software CHEMTAX (chemical taxonomy software, version 1.95). As razões iniciais entre os pigmentos diagnósticos de cada grupo e a Chl *a* para as respectivas classes de algas foi obtida de Higgins et al. (2011). Com base nos pigmentos presentes e contagens ao microscópio, de todas as amostras coletadas, oito grupos foram considerados: diatomáceas, dinoflagelados Tipo 1 (dinoflagelados com peridininina) e

Tipo 2 (dinoflagelados com fucoxantina), primnesiofitas, criptofitas, prasinofitas, *Synechococcus* e *Prochlorococcus*.

Para otimização da matriz de input, 60 tabelas com as razões pigmentares foram geradas multiplicando-se cada razão da tabela inicial por uma função randômica (Wright et al. 2009). Os seis melhores resultados de output (com menor residual) foram selecionados para aplicar 15 corridas sucessivas do CHEMTAX e checar a razão de convergência (Latasa 2007). O resultado final foi calculado como a média entre as seis matrizes de output finais obtidas após o processamento descrito acima (matriz input e output).

❖ ***Grau de estratificação da coluna de água***

O grau de estratificação da coluna de água foi calculado com base na Frequência de Brünt-Väisälä (*ciclos/hora*), que considera a gravidade ($m\ s^{-2}$) e a densidade potencial da água ($Kg\ m^{-3}$). A densidade potencial da água do mar (ρ) foi obtida com base nos perfis de temperatura e salinidade, e a profundidade da camada de mistura (MLD) foi determinada conforme proposto por Kara et al. (2000). Foi considerado que a frequência máxima imediatamente abaixo da MLD representa a força da pycnoclina e esse valor foi adotado para representar a estabilidade máxima (Castro et al. 2002; Araújo 2012).

❖ ***Quantificação de fitoplâncton de amostras ambientais***

As amostras de água para a contagem do fitoplâncton foram preservadas em frascos âmbar (com formol 1% e outro com lugol 2%) e analisadas pelo método de Utermöhl (1958), em câmaras de sedimentação ao microscópio invertido. Na amostra sedimentada

(50 mL) os organismos foram contados nos aumentos de 100x e 400x e o número de indivíduos multiplicados pelos respectivos fatores de área do campo. O número (N) mínimo de organismos dominantes contado foi de 100, garantindo uma estimativa da margem de erro de +/-20% (Lund et al. 1958). A densidade de diatomáceas, dinoflagelados, cianobactérias, cianobactérias cocóides em duas faixas de tamanho ($\leq 3 \mu\text{m}$; 4-7 μm), tintinídeos e ciliados aloricados, foi expressa em número de organismos por litro. A identificação dos organismos foi realizada em nível de gênero e quando possível de espécie, especialmente para os dinoflagelados.

❖ *Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos*

A água para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos (amônio, nitrito, nitrato, fosfato silicato) foi filtrada em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/A). Do filtrado, 15 ml foram utilizados para análise de amônio (UNESCO 1983) e 250 ml armazenados em freezer para posterior análise segundo Strickland & Parsons (1972). A concentração dos elementos nitrogenados foi somada e apresentada como nitrogênio inorgânico dissolvido total. A razão N:P foi considerada com base no número atômico (Redfield 1963).

❖ *Análise Estatística*

Para explorar as relações entre a biomassa dos grupos do fitoplâncton determinados pelo CHEMTAX e as condições ambientais, foi aplicada uma análise de Correspondência Canônica (CCA) e o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). A temperatura da água, salinidade, frequência média de Brünt-Väisälä (BV) em camadas de 10 metros abaixo do ponto coletado, concentração dos nutrientes inorgânicos

dissolvidos (nitrogênio total, fosfato e silicato) e clorofila *a* (Chl *a*) foram as variáveis abióticas incluídas na análise de Correspondência Canônica (CCA) usando o programa CANOCO 4.5 (Tera Braak & Smilauer 2002).

2.2 Metodologia referente aos objetivos 3 e 4 (Apêndices 2 e 3)

❖ Amostragem

Com o objetivo de isolar cepas de dinoflagelados e estabelecer seu cultivo, foram realizadas coletas semanais na desembocadura da Lagoa dos Patos nos meses de verão, e mensais em três estações fixas, duas delas localizadas no estuário e uma na zona de arrebentação da praia do Cassino. As células de dinoflagelados coletadas foram isoladas para cultivo imediatamente após coleta, ao microscópio óptico, mediante sucção com micropipeta de Pasteur e lavagem de cada célula em gotas de meio L1 (Guillard & Hargraves 1993). A técnica para as células que possuem fototactismo positivo (migração para um ponto luminoso) facilitou o isolamento. As células isoladas foram cultivadas em meio de cultivo L1, em incubadoras com fotoperíodo (12:12h), temperatura e salinidade controlados e similares às condições no dia da coleta.

❖ Isolamento das espécies e culturas

Amostras de plâncton contendo células de *Akashiwo sanguinea* (AKASAN01-B) e *Prorocentrum micans* (PROMIC01-B) foram isoladas no final da primavera (11/2011) no estuário da Lagoa dos Patos (20 °C, salinidade 30) e de *Scrippsiella trochoidea* (SCRTR001- P) no inverno (08/2012) na Praia do Cassino (15 °C, salinidade 25). Cepas das três espécies foram obtidas usando micropipeta tipo Pasteur, lavadas e mantidas em meio de cultivo L1 (Guillard & Hargraves 1993), em salinidade 25 ou 30,

temperatura 20 ± 1 °C, luz visível obtida mediante lâmpadas fluorescentes de luz branca Osram ®, intensidade de 80-100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 12:12 h luz:escuro. As culturas estoque, das tr\u00eas esp\u00e9cies, foram mantidas em tubos de ensaio e frascos tipo Erlenmeyer (125 mL) e regularmente transferidas (10-15 dias) para meio de cultivo (L1) novo (in\u00f3culos de aproximadamente 1/3 do volume final) durante a fase exponencial do seu crescimento, em temperatura 20 ± 1 °C, luz vis\u00edvel com intensidade de 80-100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 12:12 h.

❖ **Aclima\u00e7\u00e3o das culturas**

- ❖ **Salinidade:** Meio de cultivo L1 em salinidades de 10, 15, 25, 30 e 35 foi preparado pela dilui\u00e7\u00e3o de \u00e1gua do mar com \u00e1gua destilada. As culturas foram aclimatadas em cada salinidade, por no m\u00ednimo, tr\u00eas transfer\u00eancias durante a fase exponencial, ao longo de um m\u00eas. As c\u00e9lulas em fase exponencial foram inoculadas em frascos tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo meio de cultivo em cada salinidade.
- ❖ **Luz:** As culturas das tr\u00eas esp\u00e9cies foram aclimatadas em regimes de baixa luz (Low Light: LL 87- 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta luz (High Light: HL 450-490 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) atrav\u00e9s de tr\u00eas transfer\u00eancias durante a fase exponencial ao longo de um m\u00eas. As c\u00e9lulas em fase exponencial foram inoculadas em frascos tipo Erlenmeyer (125 mL), em quadruplicata, contendo meio de cultivo L1 com salinidade 30 para *P. micans* (PROMIC01-B) e salinidade 25 para *A. sanguinea* (AKASAN01-B) e *S. trochoidea* (SCRTR01-P) em incubadoras com fotoper\u00edodo controlado (12:12 horas de luz e escuro) e temperatura de 20 °C.

❖ **Curvas de crescimento**

Nos experimentos de salinidade, o crescimento foi monitorado diariamente pela contagem celular, de amostras fixadas com solução de lugol neutro (1%), em câmaras de Sedgewick Rafter ao microscópio invertido (OLYMPUS IX51). A taxa específica de crescimento (μd^{-1}) foi calculada na fase de crescimento exponencial, onde os valores da concentração celular foram transformados para logaritmo (ln) e aplicada uma regressão linear em relação ao tempo (dias) durante a fase exponencial (Zar 1996, Wood et al. 2005). A capacidade de suporte (máxima densidade celular) foi estimada como a concentração média da máxima densidade celular com base em uma curva logística (Xin et al. 2011).

No experimento do efeito da irradiância, a taxa de crescimento das espécies foi estimada com base na contagem celular diária de amostras vivas com auxílio de um citômetro (FlowCAM[®], *Fluid Imaging Technologies*) utilizando uma célula de fluxo de 100 μm e objetiva 10x para *A. sanguinea* e de 20x para as outras espécies. O método “Autoimage Mode” foi utilizado em um intervalo de tempo definido (2 minutos), e a densidade e tamanho de todas as células na faixa de tamanho selecionada (10-60 μm *S. trochoidea*; 10-100 μm para *P. micans* e *A. sanguinea*) foram registradas. As condições metodológicas foram determinadas em pré-teste, no qual não foi verificada diferença entre a contagem automatizada e aquela realizada ao microscópio invertido em câmaras de Sedgewick Rafter ($p > 0,05$). A taxa específica de crescimento (μd^{-1}) foi calculada como descrito acima.

❖ **Crescimento frente a mudanças bruscas de salinidade**

Para avaliar a resposta sob mudanças abruptas de salinidade, a taxa de crescimento de referência obtida no teste com aclimação (salinidade 25, *A. sanguinea*; 30 *P.*

micans) foi comparada com a taxa de crescimento resultante de tratamentos sem aclimação, em salinidade mais alta (S 35) e baixa (S 15 ou 20) para ambas espécies. As culturas em triplicata foram mantidas nas mesmas condições descritas acima e o crescimento e a capacidade de suporte estimados conforme descrito anteriormente (Aclimação). Culturas aclimatadas de *A. sanguinea* e *P. micans* em salinidade de referência (25 e 30) foram inoculadas no início da fase exponencial em frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo meio de cultivo com salinidade de 15 e 35 para *A. sanguinea* e de 20 e 35 para *P. micans*. A menor salinidade testada neste experimento foi diferente para ambas espécies porque o crescimento e a capacidade de suporte de *P. micans* foram inibidos em salinidade de 15 com aclimação.

❖ Volume celular

Para comparar os resultados entre as espécies de diferentes tamanhos, os dados de pigmento foram padronizados por volume celular. O volume celular foi calculado a partir de medidas nas três dimensões de 30 a 400 indivíduos, de acordo com o dia amostrado, utilizando as medições dadas pelo FlowCam[®] nos dias 2, 7 e 14 dos cultivos e aplicação de formas geométricas. Para *P. micans* e *A. sanguinea*, foi usada a forma “elipsóide achatado” e para *S. trochoidea* a forma “cone com meia esfera” (Olenina et al. 2006, Hillebrand et al. 1999). A terceira dimensão (espessura) de *P. micans* foi obtida utilizando o microscópio ótico, em aumento de 400x. Primeiramente, foi estimado o volume individual de cada célula, que serviu para a estimativa dos valores médios.

❖ Perfil de pigmentos

Experimento com luz: a composição dos pigmentos fotossintéticos foi determinada nos dias 2, 7 e 14 de cultivo, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os pigmentos analisados foram clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *c*₂ (Chl *c*₂), peridina (Perid), diadinoxantina (Diadino), diatoxantina (Diato), dinoxantina (Dino), Mg-2,4-divinylpheoporphyryn *a*₅ monomethyl ester (MgDVP), β,β-Caroteno (ββ-Car) e diadinocromo (Ddc). Um volume conhecido (5-10 mL) de cultura foi filtrado (filtro de fibra de vidro, Whatman GF/F) e imediatamente guardado em ultrafreezer (-80°C). Os pigmentos foram extraídos utilizando 3 ml de solução padrão de metanol 95%, tamponado com acetato de amônio 2% e com a adição de padrão interno 0,115 mg L⁻¹ de trans-β-apo-8'-carotenal, para verificar a otimização da extração. Para a extração dos pigmentos, os filtros foram macerados com um bastão de vidro, colocados em congelador (-20°C, 60 min) e submetidos a um banho frio de ultrassom de 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5 min, temperatura 3°C) e o sobrenadante filtrado em filtro de membrana de 0,2 μm de poro (Millipore Fluoropore Membrane filters, 13 mm de diâmetro), o qual foi colocado imediatamente no auto-injetor do HPLC refrigerado a 4°C. O extrato dos pigmentos foi analisado, utilizando um HPLC Shimadzu composto por um módulo distribuidor de solventes (LC-20AD) com um sistema de controle (CBM-20A), um detector de fotodiodos (SPD-M20A) e um detector de fluorescência (RF-10AXL). A separação cromatográfica dos pigmentos foi efetuada usando uma coluna C8 monomérica (SunFire; 15 cm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro; 3,5 μm de tamanho das partículas) em temperatura constante de 25°C. A fase móvel (solventes) e o seu respectivo gradiente seguiu o método desenvolvido por Zapata et al. (2000), otimizado por Mendes et al. (2007), com um fluxo de 1 ml min⁻¹ e

volume de injeção de 100 µl. Os picos referentes aos pigmentos fotossintéticos foram identificados e quantificados usando como referência padrões comerciais da DHI (Institute for Water and Environment, Denmark). A concentração foi calculada a partir do sinal obtido pelo detector de fotodiodos e/ou pelo detector de fluorescência, para o caso dos pigmentos clorofilianos. Os picos foram integrados utilizando software LC-solution, mas todas as integrações dos picos foram verificadas e corrigidas manualmente quando for necessário. Para correção das perdas e mudanças de volume, as concentrações dos pigmentos foram normalizados por padrões internos.

❖ Eficiência fotossintética

A eficiência fotossintética foi determinada nos dias 2, 7 e 14 de cada cultivo, utilizando a técnica de fluorimetria de pulsos de amplitude modulada (PAM), com o auxílio de um Phyto-PAM fluorometer (Walz GmbH®, Effeltrich, Germany). A máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m) foi calculada como:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

onde F_v é a fluorescência variável, F_m é a fluorescência máxima e F_0 é a fluorescência mínima (após período de escuro). As amostras eram mantidas no escuro por 30 minutos (Schreiber et al. 1995) antes de transferi-las para uma cubeta onde foram realizadas as medições de F_0 e, após um pulso saturante (0.3 s e $2600 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), as medições de F_m . A fluorescência de fundo foi corrigida em amostras através do mesmo procedimento.

❖ Observação de lipídio intracelular

Durante o experimento, a presença de lipídios foi observada em ambos os tratamentos e com aparente aumento nas células ao longo do crescimento. A presença de lipídios em estruturas intracelulares encontradas nas células no experimento em HL na fase estacionária (dia 14) foi testada com aplicação de corante vermelho do Nilo (Wu et al. 2013) e observação ao microscópio invertido de epifluorescência Zeiss Axiovert 135 em aumento de 400x, equipado com filtro de excitação em luz azul (Ex. 365 e Em. 397). As imagens foram tomadas usando o software zen 2012. Uma nova cultura de *A. sanguinea* foi estabelecida em HL, sob as mesmas condições (ver Métodos item 2.2.2.2) para confirmar o padrão verificado durante o experimento.

❖ Análises estatísticas

O efeito da salinidade na taxa de crescimento das espécies cultivadas foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey *a posteriori* e nível de significância α de 0,05 utilizando-se o programa Statistica 7 (Stat Soft. 2004).

Além disso, para testar a relação entre a salinidade e a densidade celular de ambas as espécies no ambiente, um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial negativa foi aplicado para uma série temporal de 20 anos da Praia do Cassino. Este teste foi realizado com o pacote de funções MASS (Venables & Ripley 2002) do software estatístico R (R Development Core Team 2014).

O efeito da intensidade de luz na taxa de crescimento, composição de pigmentos e fases do crescimento das espécies foi avaliado através de análise de variância (ANOVA *one-way*) e teste de Tukey *a posteriori* com nível de significância $p \leq 0,05$ utilizando-se o programa Statistica 7 (Stat Soft. 2004).

3. SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os resultados detalhados se encontram em três artigos, o primeiro em preparação, o segundo publicado e o terceiro submetido (Apêndices). A seguir, os resultados são apresentados de forma sucinta.

3.1 *Artigo 1: “Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Sul do Brasil (verão, 2013), com ênfase no papel dos dinoflagelados”*

(Apêndice 1, em preparação).

As formas de vida do fitoplâncton apresentam adaptações ao longo de um gradiente de intensidade de turbulência, que influencia a exposição luminosa e a disponibilidade de nutrientes. Em geral, as diatomáceas predominam em regiões de maior turbulência e alto teor de nutrientes, ao contrário dos dinoflagelados, que são favorecidos em águas estratificadas e com baixa concentração de nutrientes inorgânicos dissolvidos. Neste estudo avaliamos a estrutura e composição do fitoplâncton durante o verão ao longo de um transecto entre a costa e a região oceânica ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos (Lat. 32°12S) em sete estações oceanográficas amostradas em profundidades discretas na coluna de água. Perfis verticais de temperatura, salinidade e fluorescência foram realizados antes da coleta de amostras para quantificação do fitoplâncton, nutrientes inorgânicos dissolvidos e pigmentos, analisados em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foram verificadas três massas de água ao longo do transecto: Água Tropical (AT), Água Subtropical de Plataforma (ASTP) e Pluma do Rio da Prata (PRP). A concentração de Chl *a* foi maior nas duas estações mais próximas à costa, onde a coluna de água estava homogênea e as diatomáceas eram dominantes. Este grupo

foi sendo substituído por dinoflagelados em condições de estratificação. Organismos picoplanctônicos foram representativos em amostras superficiais, com baixa concentração de nutrientes. Ao longo do gradiente, dois tipos de dinoflagelados foram verificados: Tipo 1 (dinoflagelados com peridinina) com uma pequena contribuição, principalmente nas duas estações próximas à costa e representados por *Prorocentrum* e *Scrippsiella*; e Tipo 2 (dinoflagelados com fucoxantina) que representaram mais que 50% do total de Chl *a* nas estações situadas na plataforma continental, principalmente na profundidade de máximo de clorofila, representados principalmente por pequenas células de Gymnodiniales (<15 μm). A maior biomassa de dinoflagelados foi positivamente correlacionada com a Frequência de Brünt-Väisälä, reforçando o papel da estratificação na estruturação da comunidade fitoplanctônica e na distribuição dos dinoflagelados em período de verão, na plataforma continental do Sul do Brasil.

3.2 Artigo 2: “Influence of salinity on the growth of *Akashiwo*

***sanguinea* and *Prorocentrum micans* (Dinophyta) under**

***acclimated conditions and abrupt changes*”** (Apêndice 2, publicado. Marine Biology Research. DOI: 10.1080/17451000.2015.1031798).

O objetivo deste estudo foi avaliar, em laboratório, a influência da salinidade (S) no crescimento e na capacidade de suporte dos dinofagelados *Akashiwo sanguinea* e *Prorocentrum micans*, isolados na região costeira do sul do Brasil, e a sua relação com as condições no ambiente. O efeito da salinidade foi testado sob condições aclimatadas e frente a mudanças bruscas de salinidade. As culturas foram aclimatadas durante um mês em salinidade de 10, 15, 20, 25, 30 ou 35 e verificado o seu ótimo de crescimento. As culturas aclimatadas foram transferidas, sem aclimação, para limites menores (S 15 para *A. sanguinea*; S 20 para *P. micans*) e maiores (S 35, ambas espécies) de salinidade. *A. sanguinea* apresentou crescimento máximo na S 25 e ampla tolerância (μ 0.26- 0.76 d^{-1}) na faixa de salinidade testada (S 10–35), enquanto que, sua capacidade de suporte foi maior e menor em S 30 e S 10, respectivamente. *P. micans* cresceu mais rapidamente e atingiu maior capacidade de suporte em salinidades mais altas (S 25-35) e sua taxa de crescimento (0.11-0.45 d^{-1}) variou mais nas salinidades testadas. A resposta das células às mudanças bruscas de salinidade também foram específicas: sem diferença para *P. micans* ou com aumento na taxa de crescimento para *A. sanguinea*, comparado aos resultados com aclimação. A análise da ocorrência destas espécies na zona de surf da Praia do Cassino ao longo de 20 anos revelou que no ambiente, *A. sanguinea* e *P. micans*, são encontradas em faixa de salinidade semelhante, principalmente entre 25-30, com maior frequência e densidade celular durante os meses de verão e outono. A relação entre salinidade e densidade celular teve padrão

semelhante com os resultados verificados em laboratório. A habilidade para crescer diante de mudanças bruscas de salinidade é um mecanismo importante na formação de florações. Considerando o cenário de mudanças climáticas, um aumento no regime de chuvas está previsto para a região geográfica no sul do Brasil. Portanto, nossos resultados sugerem que *A. sanguinea* provavelmente terá mais sucesso que *P. micans* e poderá formar florações na região, devido a sua ampla tolerância à salinidade e maiores taxas de crescimento nas salinidades mais baixas.

3.3 Artigo 3: “Effects of irradiance on growth, pigment content and photosynthetic efficiency on three peridinin-containing dinoflagellates” (Apêndice 3, submetido para análise).

As microalgas possuem diferentes requerimentos por luz para seu crescimento e fotossíntese. Neste estudo, foi testado o efeito de dois níveis de irradiâncias (baixa luz- LL ± 87 e alta luz- HL 450-490 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no crescimento, volume celular, concentração de lipídios intracelulares, composição pigmentar e eficiência fotossintética em três espécies de dinoflagelados: *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans* e *Scrippsiella trochoidea*. As culturas foram isoladas no sul do Brasil e aclimatadas durante 1 mês em cada irradiância, em ciclos de 12:12 h claro/escuro, temperatura de 20 °C e salinidade entre 25 (*Akashiwo sanguinea* e *Scrippsiella trochoidea*) e 30 (*Prorocentrum micans*). A composição dos pigmentos fotossintéticos foi determinada nos dias 2, 7 e 14 de cultivo, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por fluorescência ou DAD. Nos mesmos dias, a eficiência fotossintética (F_v/F_m) foi determinada pela técnica de fluorimetria de pulsos de amplitude modulada (PAM) e o conteúdo de lipídio intracelular utilizando o corante vermelho do Nilo. O crescimento celular e as medidas de tamanho foram monitoradas diariamente usando o Flow CAM[®]. Resultados similares na taxa de crescimento foram verificados para *A. sanguinea* e *P. micans* em LL e HL, enquanto que a taxa de crescimento de *S. trochoidea* foi significativamente maior sob HL. Mudanças no volume celular de *A. sanguinea* e *P. micans* foram observadas, a primeira com volume significativamente maior sob LL e, a segunda, apresentou um aumento em seu volume ao longo do período de crescimento, em ambas irradiâncias. De forma geral, a concentração de pigmentos fotossintéticos por volume celular foi maior em LL e a

concentração de pigmentos fotoprotetores foi baixa mesmo sob alta irradiância, quando comparada com a concentração sob LL. A razão peridinina/Chl *a* não diferiu entre as irradiâncias testadas nem entre as fases do crescimento de *A. sanguinea* e *P. micans*, resultando em uma razão conservativa, diferente e maior em LL para *S. trochoidea*. Alta eficiência fotossintética ($F_v/F_m > 0.5$) foi verificada para *S. trochoidea* e *P. micans* e este resultado foi relacionado com a composição pigmentar destas espécies. Ao contrário, *A. sanguinea* apresentou eficiência fotossintética significativamente menor que as espécies anteriores, possivelmente relacionado com seu maior tamanho celular e ainda devido a diferentes graus de mixotrofia entre as espécies. Observações ao microscópio revelaram um aumento na concentração de lipídios intracelares para todas as espécies em HL. Em conclusão, as três espécies toleram alta irradiância e aumentam a concentração lipídica sob intensidade de luz mais alta.

4. DISCUSSÃO GERAL

O estudo da fisioecologia dos dinoflagelados e sua relação com parâmetros ambientais permitiu avançar no conhecimento a respeito dos dinoflagelados planctônicos na região sul do Brasil. A conexão dos trabalhos desenvolvidos, ainda que diferentes espécies tenham sido avaliadas em laboratório e no campo, possibilitou compreender algumas respostas a determinadas condições e sobre a distribuição dos organismos no ambiente. Marcantes diferenças oceanográficas entre a região costeira, de plataforma e talude tem papel chave na estrutura da comunidade fitoplanctônica e na ocorrência e distribuição dos dinoflagelados.

O papel dos dinoflagelados – estudos no ambiente

As formas de vida do fitoplâncton apresentam adaptações ao longo de um gradiente de intensidade de turbulência, que influencia a exposição luminosa e a absorção de nutrientes. Em geral, as diatomáceas predominam em regiões de maior turbulência e alto teor de nutrientes, ao contrário dos dinoflagelados (Margalef 1978) que são favorecidos em águas estratificadas e com baixa concentração de nutrientes inorgânicos dissolvidos. Os resultados obtidos no primeiro artigo (apêndice 1) abordam o papel da estabilidade da coluna de água na estruturação da comunidade fitoplanctônica no extremo sul do Brasil.

Em período de verão, ocorreram dinoflagelados com cloroplastos dos tipos I (contendo Peridinina) e II (contendo Fucoxantina), mas a contribuição da biomassa do grupo I foi pequena, apresentando fraca correlação com os parâmetros ambientais mensurados. Embora a contribuição dos dinoflagelados Tipo 1 tenha sido baixa, esta foi

maior nas estações mais próximas à costa, com a presença de *Prorocentrum* spp. e *Scrippsiella* sp. Os dinoflagelados com cloroplasto Tipo 2 aumentaram sua contribuição ao longo do transecto na direção do talude, representadas principalmente por Gymnodiniales pequenos (5-10 μm), os quais por sua vez não estavam excluídos nas estações mais costeiras. Nas estações situadas na plataforma continental, *Gymnodinium*, cf. *Karenia*, *Katodinium*, *Prorocentrum minimum*, *Protoperidinium* e *Gyrodinium* foram identificados. Verificou-se que as duas estações mais homogêneas e costeiras favorecem dinoflagelados do Tipo 1, em contrapartida, dinoflagelados Tipo 2 também podem ocorrer nestes habitats bem como em toda a plataforma. Sua contribuição (biomassa) é diretamente proporcional ao aumento da salinidade e estabilidade na coluna d'água.

Os organismos com maior contribuição para a biomassa (*Chla a*) foram diatomáceas em toda coluna de água nas duas estações mais próximas à costa, dinoflagelados Tipo 2 e cianobactérias (*Synechococcus*) na plataforma continental. Nas estações costeiras, a coluna de água se apresentou mais homogênea e com concentração de nutrientes relativamente baixa. No extremo sul do Brasil, em período de verão, a concentração de nutrientes é baixa sob a influência da Corrente do Brasil (Niencheski & Fillmann 1998), bem como a abundância de fitoplâncton; algumas diatomáceas de águas quentes (por ex. *Rhizosolenia* spp. e *Chaetoceros* spp.) ocorrem em águas próximas da costa (Dohms 1983).

O aumento da contribuição de dinoflagelados Tipo 2 na plataforma continental em direção ao talude foi correlacionado positivamente com a estratificação da coluna de água. Primnesiofitas e cianobactérias (*Synechococcus* e *Prochlorococcus*) foram abundantes principalmente em superfície. Esses organismos são adaptados a baixas

concentrações de nutrientes (Schlüter et al. 2011; Mendes et al. 2015). Classicamente, as maiores abundâncias e a ocorrência de florações de dinoflagelados estão associados com águas estratificadas e baixas concentrações de nutrientes. De acordo com a mandala de Margalef (1979) a seleção de algas nocivas e o começo de suas florações são abioticamente regulados pela interação entre a turbulência e nutrientes. Entretanto, foi constatado que, ao contrário do que tradicionalmente se assumia, os dinoflagelados toleram um grau de turbulência e velocidade típicos de intensa mistura vertical, como observado em fenômenos de ressurgência e em zonas de frentes oceanográficas, e que esta habilidade não estaria restrita a formas de vida tolerantes a mistura (*ruderals*), mas provavelmente aos dinoflagelados em geral (Smayda 2002). Ao longo do trajeto costal nos oceanos, a inércia contra a mistura das massas de água geralmente aumenta, bem como ocorre o aprofundamento da camada estratificada e uma significativa diminuição nas concentrações dos nutrientes (Smayda 2002). A correlação positiva verificada entre a biomassa de dinoflagelados Tipo 2 com a frequência de Brünt-Väisälä (N) indica a importância da estratificação na distribuição desses organismos na região do presente estudo. Contudo, as maiores densidades de dinoflagelados Tipo 2 foram encontradas imediatamente acima ou na base da camada de mistura, coincidindo com os maiores valores da frequência de Brünt-Väisälä, associada à camada de clorofila máxima, como observado por Taylor (1987). No presente estudo, os dinoflagelados autotróficos (*Gymnodiniales*) foram observados em águas mais superficiais do que as espécies heterotróficas (*Gyrodinium* spp.). A resposta à luz varia de acordo com as espécies e com o seu estado nutricional, mas de modo geral, os dinoflagelados são mais tolerantes à alta irradiância do que outros grupos do fitoplâncton (Ryther, 1956) e algumas espécies apresentam fotoinibição em alta irradiância ($>500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

¹⁾ (Falkowski et al. 1985; Garcia & Purdie 1992; Montresor et al. 2003). Conforme verificado no artigo 3, as espécies isoladas na região costeira foram capazes de crescer, sem fotoinibição aparente em alta irradiância.

A correlação positiva entre a biomassa (Chl *a*) e densidade de dinoflagelados com a salinidade, resulta do aumento da contribuição dos dinoflagelados em direção ao talude. A maioria das espécies de dinoflagelados são marinhas, algumas eurialinas ou estenoalinas, e geralmente habitam águas com salinidade entre 20-30, raramente em salinidade maior que 40 (Taylor 1987). Ao contrário da salinidade, a correlação da biomassa com a temperatura foi negativa, pois a sua maior contribuição deu-se principalmente nas profundidades de clorofila máxima. Dinoflagelados ocorrem em uma faixa ampla de temperatura, geralmente predominando em águas mais quentes, nos trópicos durante o ano todo e nas regiões temperadas em períodos quentes (verão) (Taylor 1987).

O conhecimento a respeito das acumulações de fitoplâncton em subsuperfície ou profundidades de máxima clorofila foi aprimorado com o desenvolvimento de medidas contínuas de fluorescência (Lorenzen 1996). Em profundidades de clorofila máxima na plataforma continental de regiões marinhas temperadas, a dominância de dinoflagelados pode estender-se desde o final do verão (Iriarte & Bernal 1990; Richardson et al. 2000; Weston et al. 2005) até o outono, quando ocorrem florações em superfície (Holligan & Harbour 1977). A mobilidade dos dinoflagelados permite sua agregação em determinada profundidade resultando em uma alta variabilidade na composição das populações do fitoplâncton na coluna de água (Iriarte & Bernal, 1990).

A relação entre a abundância de dinoflagelados e a estratificação térmica foi relacionada com a presença de ASTP na área de estudo. As linhas isopicnais (de igual densidade) indicam intensa mistura na plataforma continental e a presença de duas variedades de água subtropical de plataforma (ASTP): uma variedade quente ($>21\text{ }^{\circ}\text{C}$; $S\ 33,5 < S \leq 35,3$) pela mistura da PRP com águas do talude, e uma variedade fria ($>18,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $S\ 33,5 < S \leq 36$), pela mistura da Água Subantártica de Plataforma com as águas do talude (Möller et al. 2008; Piola et al. 2000). A presença de dinoflagelados associada com ASTP foi documentada na plataforma continental no extremo sul do Brasil (Islabão 2010) e no estado do Paraná, em águas quentes oligotróficas da corrente do Brasil (Brandini & Fernandes 1996). Ao longo de um transecto entre São Paulo ($25^{\circ}30'S$) e a Península Antártica ($62^{\circ}05'S$), os dinoflagelados foram mais representativos que as diatomáceas em águas oligotróficas subtropicais e em algumas estações ao sul da zona de confluência Brasil-Malvinas no final da primavera (Fernandes & Brandini 1999). Destacou-se neste estudo, também, a importância de uma camada superficial de baixa salinidade, originada do aporte terrestre, em especial da água da Pluma do Rio da Prata (PRP) sobre a distribuição dos dinoflagelados, que em seu processo de mistura, forma frentes importantes por exemplo para *Karenia* spp., adaptados ao arrasto e dispersão nas correntes costeiras (Smayda 2002). Na plataforma continental da Argentina, o sistema de águas subantárticas de plataforma (ASAP) está sazonalmente separado do sistema costeiro pela presença de uma frente costeira, associada com florações de *Gyrodinium* cf. *aureolum* na plataforma (Carreto et al. 1995). A advecção de águas de menor salinidade da região costeira do Rio da Prata favoreceram o desenvolvimento de dinoflagelados na plataforma argentina, assim como, no extremo sul do Brasil. As águas oriundas do Rio da Prata parecem ser um fator chave que regula o

desenvolvimento de florações nos sistemas de ASAP, embora esta influência seja maior na primavera (Carreto et al. 1995). Águas ricas em nutrientes, picnoclina rasa e a influência da PRP parecem favorecer as florações *Gyrodinium cf. aureolum* (Negri et al. 1992).

Os nutrientes correlacionaram-se positivamente com os máximos de Chl *a* próximos à costa, onde as diatomáceas, seguidas de criptofitas tiveram a maior contribuição. A correlação com nutrientes também foi positiva (principalmente DIN) com dinoflagelados Tipo 2 na profundidade de máxima clorofila, e negativa com Primnesiofitas, Prochlorococcus e Synechococcus. A migração vertical diária é um importante mecanismo na ecologia dos dinoflagelados pelo qual conseguem acessar a radiação fotossinteticamente ativa, movendo-se para próximo da superfície durante o dia e para camadas mais ricas em nutrientes à noite. Em ambientes estuarinos, são capazes de atravessar gradientes de salinidade e de temperatura (Jephson 2012). Como as maiores concentrações de nitrogênio, fósforo e silicato inorgânicos dissolvidos estavam abaixo da base da camada de mistura, em profundidade superior a 40 m, pode-se explicar a vantagem de espécies com flagelos e com capacidade de deslocamento vertical, para otimizar o seu crescimento e sobrevivência. É possível que dinoflagelados mixotróficos se acumulem na picnoclina para explorar uma combinação ótima de disponibilidade de presas, nutrientes e luz, favorecidos em uma coluna de água estável (Jephson & Carlsson 2009). Neste estudo, verificou-se que a distribuição dos dinoflagelados autotróficos foi mais superficial do que as espécies heterotróficas, enfatizando a relação da distribuição vertical com a luz e a capacidade da migração em colunas de água estáveis.

A presença de dinoflagelados do Tipo 2, especialmente Gymnodiniales como cf. *Karenia*, é de particular interesse, pois estão adaptados para arrasto e dispersão nas correntes costeiras, podem ser acumulados em sistemas de frentes e incluem espécies tóxicas (Smayda 2002). Os resultados deste estudo enfatizam a possibilidade de que suas florações possam ocorrer na região de estudo. A presença de uma população “inóculo” representa uma condição essencial, sendo o sucesso posterior influenciado pelas taxas de crescimento e de dispersão (“pelagic seed bank hypothesis”, Smayda 2002). As maiores densidades de cf. *Karenia* spp. foram verificadas em zona de frente pelo encontro de água da pluma do rio da Plata, de menor salinidade, com a Água Subtropical de Plataforma (ASTP), indicando a sua adaptação a um maior grau de mistura, como proposto por Smayda (2002) e também evidenciado por Carreto et al. (2001), que registraram uma floração massiva (8-9 milhões de Cel/L) de *Gymnodinium* sp. em águas costeiras no sul do Chile, durante a primavera, causando uma alta mortalidade de mariscos, salmão de cultivo e outros peixes. O perfil pigmentar da espécie foi similar ao de outras espécies consideradas ictiotóxicas (*G. mikimotoi*, *G. breve*, *G. galatheanum*) e dos dinoflagelados Tipo II registrados neste estudo. É importante ressaltar que existe uma grande dificuldade para identificar espécies atecadas que deterioram-se facilmente, impossibilitando a observação de estruturas cruciais para o seu diagnóstico, como a elucidação do percurso da linha apical, poro ventral e elementos de ultra-estrutura do amfiesma (Takayama 1985), tornando-se indispensável a observação de células vivas e análise da composição molecular (Hoppenrath et al. 2009).

Em síntese, ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos a contribuição dos dinoflagelados foi significativa no verão de 2013. Houve uma clara separação das

amostras ao longo do trajeto costa- talude, no qual as diatomáceas predominaram nas estações costeiras e coluna de água homogênea, sendo substituídas por dinoflagelados em condições de estratificação, em direção ao talude. Organismos picoplanctônicos estavam presentes principalmente em amostras superficiais, com baixa concentração de nutrientes. Ao longo do gradiente, dois tipos de dinoflagelados foram verificados: Tipo 1 (contendo peridinina, *Prorocentrum* e *Scrippsiella*) com uma pequena contribuição nas duas estações próximas à costa, e Tipo 2 (contendo fucoxantina, *Gymnodiniales* 5-10 μm , cf. *Karenia* e *Katodinium*.), com uma contribuição maior que 50% do total de Chl *a* nas estações situadas na plataforma continental, principalmente em profundidade com máximo de Chl *a*. A biomassa de dinoflagelados foi positivamente correlacionada com a Frequência de Brünt-Väisälä reforçando o papel da estratificação na estruturação da comunidade fitoplanctônica.

A fisiologia dos dinoflagelados – estudos em laboratório

Em regiões costeiras, a salinidade tem um papel ecológico muito importante e suas variações influenciam as respostas metabólicas, a seleção de espécies e a distribuição de toda a biota (Gessner & Schramm 1971; Smayda 1980). Em geral, as espécies do fitoplâncton presentes em ambientes estuarinos exibem uma ampla tolerância a variações de salinidade (eurihalinas), ao contrário de espécies oceânicas (Kirst 1989). Os organismos estudados foram isolados de amostras obtidas na desembocadura da Lagoa dos Patos no outono austral, em salinidade 30 e temperatura de 20°C. Estas espécies apresentam ampla distribuição geográfica (Tabela 1, Apêndice 2) e a capacidade de crescer frente a rápidas mudanças de salinidade poderia ser um mecanismo importante no desenvolvimento de suas florações.

Experimentos em laboratório são comumente realizados para testar o efeito de condições ambientais no crescimento e fisiologia de microalgas. Para isto, as culturas passam por um período de aclimação às condições que serão testadas para seu completo ajuste fisiológico. Nos experimentos realizados nesta Tese, adotamos a metodologia de aclimação proposta por Wood et al. (2005), na qual, as culturas foram mantidas por um mês ou mais, nas condições experimentais. Neste período foram realizadas entre 3-4 transferências das culturas na fase exponencial do crescimento. Existe pouca informação na literatura sobre aclimação à salinidade e o tempo de aclimação empregado em experimentos em laboratório varia de dias (Yamamoto et al. 2002) a meses (Kim et al. 2004; Matsubara et al. 2007) tornando, muitas vezes, a comparação dos resultados difícil. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, verificamos que a duração do período de aclimação influencia a taxa de crescimento. As culturas, em condições ótimas de crescimento, mantiveram ou até mesmo aumentaram a taxa de crescimento diante de mudanças rápidas na salinidade. No entanto, este resultado representa uma característica importante das espécies estudadas, pois as medidas feitas após a aclimação em laboratório podem não ser aplicadas ao ambiente.

No presente estudo, a salinidade ótima para o crescimento de *Akashiwo sanguinea* e *Prorocentrum micans* (25-30) esta dentro do limite reportado para estas espécies (Matsubara et al. 2007; Kain et al. 1960; Guimarães & Rörig 2004). Entretanto, *A. sanguinea* apresentou maior tolerância na faixa de salinidade testada (S 10-35), ao passo que *P. micans* cresceu melhor nos maiores valores de salinidade (25-35). A exposição das células a mudanças bruscas de salinidade, após aclimação na salinidade de referência (ótimo), resultou em aumento na taxa de crescimento. Além disto, esta

taxa não diferiu significativamente entre os tratamentos expostos ao choque osmótico de salinidade menor (15 e 20) e maior (35), ao contrário do que foi observado no experimento com aclimação. Embora a taxa de crescimento tenha sido relativamente alta em ambas as espécies, com aclimação a baixa salinidade estas não alcançaram alta densidade celular. A exposição das células a mudanças bruscas de salinidade resultou em taxa de crescimento e capacidade de suporte similares entre os tratamentos. Esses resultados confirmaram que ambas as espécies possuem mecanismos eficientes de aclimação osmótica, mas mais pronunciados em *A. sanguinea*, propiciando o seu crescimento mesmo sob condições aparentemente de estresse.

Os resultados em laboratório coincidiram com os maiores valores de densidade celular verificados no ambiente (Praia do Cassino). Análises de fitoplâncton realizadas entre os anos de 1994 e 2013 (235 amostras) revelaram que *A. sanguinea* e *P. micans* apresentam um ciclo sazonal na região de estudo, com maior frequência de ocorrência (18% e 20% respectivamente) e densidade celular durante os meses de verão e outono (Figura 3, Apêndice 2). *A. sanguinea* (média 12.000 Cel/L) ocorreu entre a faixa de salinidade de 14 e 31 e temperatura entre 12 e 30° C, observando-se os maiores valores de densidade em meses de outono (máximo 170.000 Cel/L, salinidade 20, temperatura 23° C). *Prorocentrum micans* (média 1.772 Cel/L) ocorreu em valores maiores de salinidade (25-35) quando comparado com *A. sanguinea* e em temperatura similar (11-29° C), mas apresentou densidade celular menor (máximo 6.400 Cel/L). A relação entre salinidade e densidade celular foi significativa para ambas as espécies. *A. sanguinea* apresentou correlação negativa com salinidade, enquanto *P. micans* foi relacionada positivamente com salinidade, indicando que a salinidade influencia a distribuição e concentração dessas espécies. Interessante foi verificar que a taxa máxima de

crescimento de *A. sanguinea* foi similar ao valor encontrado por Matsubara et al. (2007) em cepas da Baía de Hakata (Japão). A preferência por água de salinidade relativamente baixa favorece suas florações no começo do verão (estação chuvosa), quando cresce mais rapidamente do que outros flagelados, similar aos nossos resultados, com preferência por águas de menor salinidade devido à descarga da Lagoa dos Patos e sua pluma costeira (Odebrecht et al. 2010). Embora nenhum efeito nocivo tenha sido associado com a presença de *A. sanguinea* na Praia do Cassino, suas florações em outras regiões do mundo tem sido aparentemente associadas com morte de aves marinhas (Phillips et al. 2011), crustáceos e peixes (Vazquez et al. 2011).

No cenário de mudanças climáticas, mudanças no regime de chuvas e salinidade de águas costeiras representam um fator de estresse e podem alterar a composição da comunidade, diversidade e dominância dos produtores primários (Flöder et al. 2010). Portanto, a capacidade de rápidos ajustes diante de mudanças bruscas de salinidade, como verificado para *A. sanguinea* e *P. micans*, representa uma vantagem competitiva para a sobrevivência e sucesso. Os efeitos da salinidade variam com as espécies e estão relacionados com a sua regionalidade (Lim & Ogata 2005). Considerando as previsões de aumento das chuvas na região do Sul do Brasil no futuro (IPCC 2013), nossos resultados indicam que *A. sanguinea*, devido a sua ampla tolerância à salinidade quando comparado a *P. micans*, terá provavelmente mais sucesso e tem o potencial de formar densas florações, sob estas condições, nesta região geográfica no futuro.

No modelo conceitual proposto por Margalef, a seleção de espécies que formam florações, nocivas ou não, é regulada por interações principalmente entre turbulência, disponibilidade de luz e nutrientes (Smayda & Reynolds 2001; Smayda 2002). Entretanto, dada a importância da salinidade e as mudanças previstas no regime de

chuvas, é proposto que esta variável seja considerada nos modelos de composição de espécies.

A diversidade trófica em conjunto com as habilidades fisiológicas, permite aos dinoflagelados explorar e ter sucesso em várias situações no ambiente pelágico e a relação deste grupo com a luz é bastante variável, assim como sua composição pigmentar. A maioria das espécies autotróficas apresenta os pigmentos Chl *a* e *c*₂, e a Peridininina como principal pigmento acessório (Tipo 1, Zapata et al. 2012). Com base nas combinações de clorofilas e carotenóides, Zapata et al. (2012) descreveram seis tipos de cloroplastos de dinoflagelados de acordo com seus pigmentos (64 espécies, 122 cepas). Os tipos I (contendo Peridininina) e tipo II (contendo Fucoxantina, em Zapata et al. 2012 como tipos II e III) foram estudados nesta Tese. No terceiro trabalho (apêndice 3), realizado em laboratório, o efeito de dois níveis de irradiância (baixo= ±87; alto= 450-490 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi investigado na fisiologia (volume celular, pigmentos, eficiência fotossint\u00e9tica e presen\u00e7a de lip\u00eddeos) de tr\u00eas esp\u00e9cies (Tipo 1) isoladas na regi\u00e3o costeira, demonstrando que as respostas fisiol\u00f3gicas \u00e0 irradi\u00e2ncia s\u00e3o esp\u00e9cie-espec\u00edficas, mesmo apresentando o mesmo tipo de cloroplasto.

O efeito da irradi\u00e2ncia no volume celular \u00e9 pouco conhecido. Em geral, o tamanho celular dos diferentes organismos est\u00e1 inversamente relacionado com sua taxa de crescimento; esta regra \u00e9 v\u00e1lida para procariotos autotr\u00f3ficos (cianobact\u00e9rias) e microalgas unicelulares (Banse 1976; Geider et al. 1986; Nielsen 2006). No presente estudo, a taxa de crescimento de *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans* e *Scrippsiella trochoidea* foi similar em alta luz ($\mu \sim 0.28 \text{ d}^{-1}$), e *S. trochoidea* cresceu mais lentamente em baixa luz ($\mu 0.23 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$). A diferen\u00e7a de tamanho celular entre estas esp\u00e9cies n\u00e3o influenciou expressivamente a taxa de crescimento em temperatura

constante e sem limitação por nutrientes (fase exponencial do crescimento). Entretanto, mudanças no volume celular foram verificadas em *A. sanguinea* e *P. micans* nos dois níveis de irradiância. O maior tamanho de *A. sanguinea* em baixa luz coincidiu com o aumento na concentração dos pigmentos fotossintéticos (Chl *a* e Peridina) por volume celular. Este resultado foi diferente daquele apresentado por Garcia & Purdie (1992) para o dinoflagelado *Gyrodinium cf. aureolum*, cujo volume e conteúdo de carbono celular diminuíram em baixa irradiância ($<100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os resultados para *P. micans* não mostraram diferença no volume celular entre as irradiâncias, mas um aumento de tamanho ao longo das fases de crescimento. Estes resultados também diferiram dos estudos de Falkowski et al. (1985) que encontraram um aumento no volume e conteúdo de carbono celular em alta irradiância ($600 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Assim como para *A. sanguinea*, a concentração de Chl *a* por biovolume de *P. micans* aumentou nas células cultivadas em baixa luz e em ambas as irradiâncias, as células foram significativamente menores no início do cultivo.

Diversos fatores influenciam o volume celular, como a disponibilidade de nutrientes, irradiância e temperatura (Geider et al. 1986), mas os mecanismos fisiológicos envolvidos nas mudanças provocadas pela irradiância no volume celular ainda são desconhecidos e, aparentemente, existem diferenças entre espécies. Baixos valores da razão Chl *a* por biovolume do fitoplâncton foram relacionados com alta luz e temperatura em um lago oligotrófico quando dinoflagelados predominaram (Felip & Catalan 2000). Em situações de luz limitante, um aumento no conteúdo de Chl *a* por célula tem sido observado em culturas e populações naturais (Felip & Catalan 2000). Entretanto, em algumas situações, baixa irradiância promove uma redução no volume celular (Senger & Fleischhacker 1978; Perri et al. 1981 *in* Felip & Catalan 2000).

Portanto, assume-se, que as condições de luz afetam o conteúdo pigmentar mas também o tamanho celular dos dinoflagelados.

Os resultados do presente estudo confirmam que *A. sanguinea* e *P. micans* são capazes de crescer em uma ampla faixa de irradiância e toleram alta intensidade luminosa sem sofrer fotoinibição ($500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), assim como nos estudos de Uchida (1981), Cullen & Horrigan (1981), Falkowisk et al. (1985) e Matsubara et al. (2007). Ao contrário, *S. trochoidea* apresentou maior crescimento em alta luz, e as células cultivadas em baixa luz apresentaram teor de Chl *a* até três vezes maior, sem mudança em seu volume celular. A taxa de crescimento obtida em alta luz ($\mu 0,29 \text{ d}^{-1}$) foi similar ao valor médio verificado em $500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por Montresor et al. (2003). Zhuo-Ping et al. (2009) avaliaram o efeito combinado da irradiância e disponibilidade de ferro em *S. trochoidea* e obtiveram maior densidade e taxa de crescimento ($0,22 \text{ d}^{-1}$) em $70 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com alta concentração de ferro ($6,3 \text{ mg L}^{-1}$). Zhuo-Ping et al. (2009) adotaram como alta luz um valor próximo àquele que consideramos como baixa luz, e os resultados da taxa de crescimento foram similares ($0,23 \text{ d}^{-1}$) ao presente estudo. Em conjunto, esta espécie tem preferência por alta intensidade de luz.

A concentração de pigmentos fotossintéticos por volume celular das três espécies foi superior em baixa luz e os pigmentos fotoprotetores predominaram em alta luz, embora em baixa concentração. Além disto, *A. sanguinea* e *P. micans* apresentaram padrões semelhantes ao longo do tempo, com redução de Chl *a*, Perid e Diadino+Diato na fase exponencial, principalmente em baixa luz, possivelmente devido a rápida divisão celular e adaptação à luz mais baixa. A concentração de pigmentos fotossintéticos das microalgas geralmente aumenta da fase exponencial para a

estacionária, enquanto que a concentração dos pigmentos fotoprotetores está relacionada com a prevenção de danos foto-oxidativos (Ruivo et al. 2011). O aumento na concentração de Chl *a* em condições aclimatadas a alta luz, como foi verificado para *P. micans* (Apêndice 3, Fig 4: dia 7 para o dia 14), pode indicar uma redução no efeito pacote e/ou aumento nas razões de carotenóides e xantofilas por Chl *a* (Morel & Bricaud 1981 in MacIntyre et al. 2002). A razão Perid/Chl *a* permaneceu estável em ambas irradiâncias testadas e fases do crescimento de *A. sanguinea* e *P. micans*, indicando variações semelhantes em ambos pigmentos e a alta eficiência da Perid, o principal pigmento acessório dos dinoflagelados (Prézelin 1987) em transferir energia. Este resultado representa uma vantagem na aplicação de estudos quimio-taxonômicos em comunidades naturais do fitoplâncton. Por outro lado, a irradiância afetou a razão Perid/Chl *a* de *S. trochoidea*, que apresentou até 3 vezes mais Chl *a* e Perid em alta luz comparado ao cultivo em baixa luz. Apesar de não ter sido verificada diferença nos pigmentos fotoprotetores (Diadino + Diato) entre baixa luz e alta luz, esta espécie apresentou o dobro de concentração desses pigmentos comparado às espécies anteriores.

Em geral, os pigmentos fotossintéticos incorporados em complexos coletores de luz variam em consonância com a Chl *a*, independente da irradiância (Ruivo et al. 2011). Já os pigmentos fotoprotetores tendem a aumentar em alta luz, pois atuam como um mecanismo para a prevenção de danos foto-oxidativos em microalgas (Ruivo et al. 2011). No presente estudo, ao contrário do esperado, a razão da concentração de muitos pigmentos em relação a Chl *a* variou com a irradiância em *A. sanguinea* (Chl *c*₂, Diadino, Dino), *P. micans* (Dinox e Ddc) e *S. trochoidea* (maioria dos pigmentos) nas irradiâncias testadas. O baixo valor da razão entre pigmentos fotoprotetores e Chl *a*, inclusive Diato:Chl *a*, muitas vezes abaixo do limite de detecção, indicaram que a foto-

proteção não foi relevante. O processo de foto-aclimatação talvez explique a baixa razão de pigmentos foto-protetores pela Chl *a*, pois envolve mudanças na composição macromolecular e na ultraestrutura do aparato fotossintético (MacIntyre et al. 2002). Em *A. sanguinea* a razão Diadino:Chl *a* foi o dobro em alta luz que em baixa luz, e maior (0,27), quando comparada às demais espécies (< 0,23). A funcionalidade fotoprotetora da Dinox também foi mais clara para *A. sanguinea*, com valores superiores em alta luz.

A eficiência fotossintética de *A. sanguinea* foi baixa. Em condições ótimas de nutrientes, valores de Fv/Fm variam entre os táxons de algas (Sugget et al. 2003), sendo baixos (Fv/Fm= 0.3- 0.4) em eucariotos menores (< 20 µm) e altos (Fv/Fm= > 0.6) em organismos maiores (Sugget et al. 2003). Apesar da eficiência fotossintética significativamente menor de *A. sanguinea*, esta espécie cresceu igualmente em ambas as irradiâncias e a relação de pigmento/volume celular foi comparável às demais espécies, especialmente *P. micans*. A influência do tamanho não está clara (Dijkman & Kromkamp 2006; Key et al. 2009). É conhecido que o efeito pacote, estresse por nutrientes e outros fatores não necessariamente relacionados ao tamanho, influenciam na eficiência fotossintética. Pequenas diferenças entre espécies podem ser significativas e representar características reais, e não causadas por processos estocásticos que afetariam todas as espécies (Dijkman & Kromkamp 2006). A baixa eficiência fotossintética de *A. sanguinea* possivelmente esteja relacionada com a sua capacidade fagotrófica e osmotrófica, entretanto, *P. micans* e *S. trochoidea* também são espécies mixotróficas (Jeong et al. 2005). Cabe reforçar que existem diferentes graus de mixotrofia, desde os mixótrofos “ideais” que usam fototrofia e fagotrofia com a mesma eficiência até algas predominantemente fototróficas, ou predominantemente

heterotróficas (Stoecker 1998). Talvez diferentes graus de mixotrofia entre as espécies de dinoflagelados sejam refletidos na magnitude da eficiência fotossintética.

Um valor máximo de F_v/F_m não pode ser estabelecido para todas as algas, tendo em vista as diferenças entre as espécies mesmo em um grupo taxonômico (Sugget e al. 2004). Altos valores de eficiência fotossintética ($F_v/F_m > 0,5$) foram verificados na fase exponencial do cultivo em baixa luz de *P. micans* e em ambas irradiâncias de *S. trochoidea*. A redução da eficiência fotossintética em ambas as irradiâncias ao longo do crescimento (*S. trochoidea*) ou no final (*P. micans*) está possivelmente associada com a fase estacionária das culturas devido a limitação por nutrientes (MacIntyre et al. 2002).

Aparentemente, com base em observações visuais, a quantidade de lipídios foi maior para as três espécies, em cultivos com maior irradiância. Em microalgas, o aumento no conteúdo de ácidos graxos insaturados foi relacionado com a diminuição da temperatura (Dalsgaard et al. 2003) e com aumento da salinidade (Morgan-Kiss et al. 2006). No presente estudo, a síntese de lipídios foi intensificada em alta luz, mesmo as células não apresentando sinais de estresse, como um aumento significativo na concentração de pigmentos fotoprotetores. As maiores concentrações de glóbulos esféricos lipídicos foram observadas na região anterior das células.

Considerando as informações discutidas nos três trabalhos apresentados, as espécies estudadas em laboratório (com peridinina, Tipo 1) estão melhor adaptadas a baixas intensidades de luz, como frequentemente verificado na região estuarina e a oscilações bruscas de salinidade. Estas espécies (*Prorocentrum micans*, *Akashiwo sanguinea* e *Scrippsiella trochoidea*) estão associadas com os habitats costeiros (I e II, Smayda 2002) apresentando como estratégia/forma de vida principal a capacidade de

colonizar (“C, *colonists*”) ambientes fisicamente perturbados com alta concentração de nutrientes. Cabe ressaltar, que as características morfológicas e fisiológicas destas espécies as tornam mais fáceis para cultivo e estudo em laboratório, comparadas, as espécies do Tipo 2 (com fucoxantina), com maior contribuição na plataforma continental. Este grupo de espécies esteve associado com águas de salinidade mais alta e constante, e distribuído imediatamente acima ou na picnoclina, onde também foram verificadas as maiores concentrações de nutrientes. Embora dinoflagelados Tipo 2 também ocorram na região costeira, o aumento da estratificação aparentemente foi determinante para sua maior densidade. Neste estudo, os dinoflagelados Tipo 2 estiveram associados com os ambientes costeiros, de plataforma e zonas de frentes oceanográficas (Ex. cf. *Karenia*), podendo as espécies apresentar as três estratégias de vida propostas por Smayda (2002). Por fim, é sugerido que as marcantes diferenças oceanográficas entre os ambientes estudados nesta Tese (região estuarina/costeira e plataforma continental) refletiram na distribuição dos dinoflagelados.

5. CONCLUSÕES

1. A estrutura e composição do fitoplâncton revelou uma separação clara das amostras ao longo do gradiente costeiro em direção ao talude no verão de 2013, no qual as diatomáceas predominaram nas estações costeiras e coluna de água homogênea, sendo substituídas por dinoflagelados em condições de maior estratificação. Organismos picoplanctônicos foram representativos de amostras superficiais, com baixa concentração de nutrientes. Este padrão confere com o conhecimento clássico sobre a ecologia dos dinoflagelados e com o modelo proposto por Smayda & Reynolds (2001). Neste contexto, dinoflagelados,

especialmente Gymnodiniales como cf. *Karenia*, foram verificados em zona de frente pelo encontro de água da pluma do rio da Prata com a Água Subtropical de Plataforma (ASTP), indicando a sua adaptação a um maior grau de mistura, como proposto por Smayda (2002).

2. A contribuição dos dinoflagelados para o total de Chl *a* foi significativa ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos, no período de estudo (verão de 2013), com uma diferença na sua distribuição: dinoflagelados Tipo 1 (contendo peridinina: *Prorocentrum*, *Scrippsiella*) encontrados principalmente nas estações próximas à costa; e Tipo 2 (contendo fucoxantina: Gymnodiniales) que aumentaram sua biomassa ao longo da trajetória em direção ao talude. A correlação positiva entre a biomassa de dinoflagelados Tipo 2, que representaram mais que 50% do total de Chl *a* nas estações situadas na plataforma continental, com a frequência de Brünt-Väisälä (*N*) reforçou a importância da estratificação na distribuição para estes dinoflagelados no sul do Brasil.
3. A salinidade ótima para o crescimento de *Akashiwo sanguinea* e *Prorocentrum micans* em laboratório (25-30) condizem com os valores nos quais foram encontrados em maior densidade celular na zona de arrebentação na Praia do Cassino, onde apresentaram um ciclo sazonal com maiores valores durante os meses de verão e outono. A exposição das células a mudanças bruscas de salinidade resultou em taxas de crescimento e capacidades de suporte similares entre os tratamentos com menor e maior salinidade. Esses resultados confirmaram que ambas as espécies possuem mecanismos eficientes de

aclimação osmótica propiciando o seu crescimento mesmo sob condições aparentemente de estresse, mais pronunciado em *A. sanguinea*.

4. Os níveis de irradiância testados (87-90 e 450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não afetaram o crescimento celular de *A. sanguinea* e *P. micans*, ao contrário de *S. trochoidea*, que cresceu melhor em alta irradiância. As três espécies apresentaram maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos quando cultivadas em baixa irradiância e a síntese de pigmentos fotoprotetores não foi significativamente acentuada em alta irradiância, indicando a ausência de fotoinibição. A razão Perid/Chl *a* foi conservativa em *A. sanguinea* e *P. micans*, independente da irradiância. Altos valores de eficiência fotossintética foram verificados em *S. trochoidea* e *P. micans*, ao contrário de *A. sanguinea*, possivelmente relacionado com sua estratégia mixotrófica. O aumento da irradiância resultou em uma maior quantidade de lipídios nas três espécies.

LITERATURA CITADA

ABREU PC, C ODEBRECHT & A GONZÁLES. 1994. Particulate and dissolved phytoplankton production of Patos Lagoon estuary, southern Brazil: comparison of methods and influencing factors. *J Plankton Res.*, 16: 737- 75.

ABREU PC, C HARTMANN & C ODEBRECHT. 1995. Nutrient rich salt-water and its influence on the phytoplankton of the Patos Lagoon estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* (40): 219-229.

ABREU PC, M BERGESCH, LA PROENÇA, CAE GARCIA & ODEBRECHT C. 2010. Short- and long-term chlorophyll *a* variability in the shallow microtidal Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *Estuar Coast.*, 33: 554-69.

ARAÚJO RG, SZ SOUZA, CRB MENDES, VM TAVANO, RC POLLERY & CAE GARCIA. 2012. Brazil-Malvinas confluence: effects of environmental variability on phytoplankton community structure. *J Plankton Res.*, 34 (5): 399- 415.

ARRIGO, KR. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*. Vol 437. Doi: 10.1038/ nature 04158.

- ASMUS, ML. 1997. A planície costeira e a Lagoa dos Patos. In; Seelinger U, C Odebrecht & JP Castello (eds.) Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. *Ecoscientia*, Rio Grande. p 9.
- BANSE K (1976) Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size- A review. *J. phycol.*, 12: 135- 140.
- BARSANTI, L & P GUALTIERI. 2005. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC Press. 301 p.
- BEGON M, JL HARPER & CR TOWNSEND. 1986. Ecology: individuals, populations and communities. Blackwell. Oxford. 945 p.
- BHATTACHARYA, D. 1997. Origins of Algae and their Plastids. New York: Springer.
- BRAGA ES, VC CHIOZZINI, GBB BERBEL, JCC MALUF, VMC AGUIAR, M CHARO, D MOLINA, SI ROMERO & BB EICHLER. 2008. Nutrient distributions over the Southwestern South Atlantic continental shelf from Mar del Plata (Argentina) to Itajaí (Brazil): Winter-summer aspects. *Cont. Shelf Res.*, 28: 1649-1661.
- BRANDINI FP & LF FERNANDES. 1996. Microalgae of the continental shelf off Paraná State, southeastern Brazil: a review studies. *Rev. bras. Oceanogr.*, 44(1): 69- 80.
- BRAVO I & RI FIGUEROA. 2014. Towards an Ecological Understanding of Dinoflagellate Cyst Functions. *Microorganisms.*, (2): 11-32. doi:10.3390/microorganisms2010011.
- CARRETO JI, VA LUTZ, MO CARIGNAN, AD CUCCHI & SG MARCO. 1995. Hydrography and chlorophyll *a* in a transect from the coast to shelf-break in the Argentinian Sea. *Cont. Shelf Res.*, 15: 315- 336.
- CARRETO JI, M SEGUEL, NG MONTOYA, A CL...MENT & MO CARIGNAN. 2001. Pigment profile of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. from a massive bloom in southern Chile. *J Plankton Res.*, 23 (10): 1171- 1175.
- CARRETO JI, N MONTOYA, R AKSELMAN, MO CARIGNAN, RI SILVA, & DAC
- CASTRO, CG, AF RÍOS, MD DOVAL & FF PÉREZ. 2002. Nutrient utilisation and chlorophyll distribution in the Atlantic sector of the Southern Ocean during Austral Summer 1995-96. *Deep-Sea Res. II*, 49: 623-641.
- CIOTTI, AM. 1990. Fitoplâncton da plataforma continental do Sul do Brasil: clorofila *a*, feopigmentos e análise preliminar da produção primária (outubro de 1987 e setembro de 1988). Dissertação de mestrado. Universidade do Rio grande, Brasil. 86 p.
- CIOTTI AM, C ODEBRECHT, G FILLMANN & OO MOLLER JR. 1995. Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. *Cont. Shelf Res.* 15 (14): 1737-1756.

COLLEONI. 2008. Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Río de la Plata maritime front. *Cont. shelf Res.* 28: 1589-1606.

CULLEN JJ & SG HERRIGAN. 1981. Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Mar Biol.*, 62: 81-9.

CULLEN, JJ, FRANKS PJS, KARL DM & A LONGHURST. 2002. Physical influences on marine ecosystem dynamics. In: Robinson AR, McCarthy JJ, Rothschild BJ (eds.) *The Sea*, Volume 12, ISBN 0-471-18901-4 © 2002 John Wiley & Sons, Inc., New York.

DALSGAARD J, MST JOHN, G KATTNER, DC MÜLLER-NAVARRA & W HAGEN. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv Mar Biol.*, 46: 225-340.

DENG G, YG LI, HJ HU, YZ QI, YH GENG & ZK LI. 2004. Effects of temperature, light and pH on photosynthesis, and of Light-dark cycle on growth rate and biomass of *Scrippsiella trochoidea* and *Alexandrium tamarense*. *Journal of Wuhan Botanical Research.*, 22: 129- 135.

DIJKMAN NA & JC KROMKAMP. 2006. Photosynthetic characteristics of the phytoplankton in the Scheldt estuary: community and single-cell fluorescence measurements. *Eur. J. Phycol* 41: 425-434.

DOHMS V. 1983. Zusammensetzung und Verteilung des Phytoplanktons in Beziehung zu den Wassermassen der subtropischen konvergenzzone im S, dwestatlantik (januar-Marz 1981). Tese de Doutorado. Univ Christian- Albrechts, Alemanha.

DORTCH, Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser.*, 61: 183-201.

FALKOWSKI PG, R GAN & K WYMAN. 1985. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr.*, 30: 311-321.

FELIP M & J CATALAN. 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial. *J Plankton Res.*, 22: 91-105.

FERNANDES LF & FP BRANDINI. 1999. Comunidades microplanctônicas no oceano atlântico sul ocidental: biomassa e distribuição em novembro de 1992. *Rev. bras. Oceanogr.*, 47(2): 189- 205.

FERRARI G & SM MENDEZ. 2000. Report to phytoplankton species producing coastal water discoloration in Uruguay. *Iheringia Sér. Bot.*, Porto Alegre., 54: 3- 18.

FERRARI, GC. 2008. Fitoplancton del Estuario del Río de La Plata y Frente Oceanico: Su relacion com las massas de água. Dissertação de Mestrado. Universidade de la República, Uruguay. 113 p.

FLÖDER S, S JASCHINSKI, G WELLS & CW BURNS. 2010. Dominance and compensatory growth in phytoplankton communities under salinity stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 395: 223-31.

FODORPATAKI L & C BARTHA. 2004. Salt stress tolerance of a freshwater green alga under different photon flux densities. *Stud Univ Babeş Bolyai Biol.*, 2:86- 93.

FUJITA CCO & C ODEBRECHT. 2007. Short-term variability of chlorophyll a and phytoplankton composition in a shallow area of the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Atlântica*. Rio Grande., 29 (2):93-107.

GAETA SA & FP BRANDINI. 2006. Produção primária do fitoplâncton na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). In: CLDB Rossi-Wongtschowski & LS Madureira (coord). O Ambiente oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil.. Editora da USP. São Paulo. 219-264.

GARCIA VMT & DA PURDIE. 1992. The influence of irradiance on growth, photosynthesis and respiration of *Gyrodinium aureolum*. *J Plankton Res.*, 14: 1251-1265.

GARCIA VMT, C ODEBRECHT & LR RÖRIG.1994. Florações nocivas de fitoplâncton na costa brasileira. Intergov. Oceanogr. Comm. Workshop Rep 101 [Anex III]: 9-14.

GEIDER RJ, T PLATT & JA RAVEN. 1986. Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: A synthesis. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 30: 93- 104.

GESSNER F & W SCHRAMM. 1971. Salinity: Plants. In Kinne O, editor. *Mar. Ecol. vol I, Environmental Factors.*, 1: 705-1083.

GÓMEZ F. 2012. A quatitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity.*, 10 (3): 267-275.

GUILLARD RRL & PE HARGRAVES. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycology.*, 32: 234-236.

GUIMARÃES SCP & LR RORIG. 2004. Efeito da salinidade no crescimento dos dinoflagelados *Prorocentrum micans* Ehrenberg e *Prorocentrum* cf. *obtusum* Ostefeld isolados da costa Catarinense – Brasil. *Revista Estudos de Biologia.*, 54: 29-36.

HALLEGRAEFF, GM, DM ANDERSON & AD CEMBELLA. 2004. Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO. France, 793 p.

HARAGUCHI, L & C ODEBRECHT, 2010. Dinophysiales (Dinophyceae) no extremo Sul do Brasil (inverno de 2005, ver.,o de 2007). *Biota Neot.*, 10(3): 101-114.

HARAGUCHI L, CARSTENSEN J, ABREU PC & ODEBRECHT C. 2015. Long-term changes of the phytoplankton community and biomass in the subtropical shallow Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Estuar, Coast Shelf Sci.* (no prelo).

- HENRIKSEN P, B RIEMANN, H KAAS, HM SØRENSEN & HL SØRENSEN. 2002. Effects of nutrient- limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *J. Plankton Res.*, 24: 835–858.
- HIGGINS HW, SW WRIGHT & L SCHLÜTER. 2011. Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds.) *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, 845 p.
- HILLEBRAND H, CD DÜRSELEN, D KIRSCHTEL, U POLLINGHER & T ZOHARY. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol.*, 35: 403–424.
- HOLLIGAN, PM AND DS HARBOUR. 1977. The vertical distribution and succession of phytoplankton in the western English Channel in 1975 and 1976. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 57: 1075-1093.
- HOPPENRATH M, ELBRACHTER M & G DREBES. 2009. *Marine Phytoplankton: Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt*. Stuttgart, Germany: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller). 264 p.
- HUBOLD G. 1980. Hydrography and plankton off southern Brazil and Rio da Prata, August- November 1977, *Atlântica (Rio Grande)*., 4: 1- 21.
- HUOT Y & M BABIN. 2010. Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, Developments in Applied phycology. In: Suggett DJ, Prásil O and Borowitzka MA (eds.), 31–74.
- IPCC 2013. *Climate Change 2013. The Physical Science Basis*. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. 222 p.
- IRIARTE JL & P BERNAL. 1990. Vertical distribution of diatoms and thecate dinoflagellates in the Gulf of Arauco: species composition, relative abundance, and the chlorophyll maximum layer. *Sci Mar.*, 54 (4): 389- 399.
- ISLABÃO, CA. 2010. Dinoflagelados do microplâncton da plataforma continental e talude do extremo sul do Brasil (inverno 2005; verão 2007). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil. 107 p.
- JAUFFRAIS T, V SÉCHETA, C HERRENKNECHT, P TRUQUET, S VÉRONIQUE , U TILLMANN & P HESS. 2013. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Harmful Algae.*, 27: 138-48.
- JEFFREY SW, WW SIMON & M ZAPATA. 2011. Microalgal classes and their signature pigments. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds.)

Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, 845 p.

JEONG HJ, YD YOO, JY PARK, JY SON, ST KIM, SH LEE, KY KIM & WH YIH. 2005. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates□: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquat. Microb. Ecol.*, 40:133-150.

JEPHSON T & P CARLSSON. 2009. Species- and stratification-dependent diel vertical migration behavior of three dinoflagellate species in a laboratory study. *J. Plankton Res.*, 31(11): 1353- 1362.

JEPHSON T., CARLSSON P., FAGERBERG, T. 2012. Dominant impact of water exchange and disruption of stratification on dinoflagellate vertical distribution. *Est. Coast. Shelf Sci.*, 112: 198-206.

JOHNSEN G & E SAKSHAUG. 1993. Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloomforming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol.*, 29: 627-642.

KAIN JM & GE FOGG. 1960. Studies on the growth of marine phytoplankton. III. *Prorocentrum micans*. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 39:33-50.

KARA AB, PA ROCHFORD & HE HULBURT. 2000. An optimal definition for ocean mixed layer depth. *J Geophys Res.*, 105(7): 803- 825.

KEY T, A MCCARTHY, DA CAMPBELL, C SIX, S ROY & ZV FINKEL. 2009. Cell size trade-offs govern light exploitation strategies in marine phytoplankton. *Environmental Microbiology.*, doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02046.x

KIM D, Y MATSUYAMA, S NAGASOE, M YAMAGUCHI, Y YOON, Y OSHIMA, N IMADA & T HONJO. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *J. Plankton Res.*, 26: 61-66.

KIRST GO. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 21-53.

KJERFVE B. 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons. In: Wolfe DA (ed.) *Estuarine variability*. *Academic Press, New York*. 63- 82.

KUDELA, RM & T PETERSON. 2009. Influence of a buoyant river plume on phytoplankton nutrient dynamics: what controls standing stocks and productivity? *J. Geophys. Res.*, 114, C00B11. doi: 10.1029/2008/C004913.

KUDELA, RM, S SEEYAVE & WP COCHLAN. 2010. The role of nutrients in regulation and promotion of harmful algal blooms in upwelling systems. *Progr Oceanogr.*, 85: 122-135.

- LATASA M. 2007. Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. *Mar Ecol Prog Ser.*, 329: 13–21.
- LIM P & T OGATA. 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon* 45: 699-710.
- LOHRENZEN CJ. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 13; 223–227.
- LUND, J.W.G.; KILPLING, C. & Le CREN, E.D. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia.*, 11: 143 170.
- MACINTYRE HL, TM KANA, T ANNING & R GEIDER. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 38: 17-32.
- MARGALEF R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta.*, 1: 493–509.
- MATANO RP, ED PALMA & AR PIOLA. 2010. The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean Sci.*, 6: 983-995.
- MATSUBARA T, S NAGASOE, Y YAMASAKI, T SHIKATA, Y SHIMASAKI, Y OSHIMA & T HONJO. 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 342: 226-30.
- MENDES CR, P CARTAXANA V BROTAS. 2007. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. *Limnol Oceanogr: Methods* 5: 363-370.
- MENDES CR, C SÁ, J VITORINO, C BORGES, V GARCIA & V BROTAS. 2011. Spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Nazaré submarine canyon region (Portugal); HPLC- CHEMTAX approach. *J. Mar. Syst.*, 87: 90- 101.
- MENDES CRB, R KERR, VM TAVANO, FA CAVALHEIRO, CAE GARCIA, DRG DESSAI & N ANILKUMAR. 2015. Cross-front phytoplankton pigments and chemotaxonomic groups in the Indian sector of the Southern Ocean. *Deep-Sea Res II., Tropical Studies in Oceanography.*, 118: 221-232.
- MIRANDA LB. 1972. Propriedades e variáveis físicas das águas da plataforma continental do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- MIRANDA LB, EF LUEDERMANN & SW MIYAO. 1973. Distribuição da temperatura, salinidade e circulação geral em superfície. Relatório sobre a segunda pesquisa oceanográfica e pesqueira do Atlântico Sul entre Torres e Maldonado (Lat 29°-35° S). *Publ Esp Inst Oceanogr (S Paulo).*, 3(2): 1- 82.
- MOLLER, OO, AR PIOLA, AC FREITAS & EJD CAMPOS. 2008. The effects of river

discharge and seasonal winds on the shelf off southeastern South America. *Cont. Shelf Res.*, 1607-1624.

MONTRESOR M, S SGROSSO, G PROCACCINI, WHCF KOOISTRA. 2003. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species. *Phycologia.*, 42: 56–70.

MOREIRA D, H LeGUYADER & H PHILLIPE. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature.*, 405: 69- 72.

MOREL A & A BRICAUD. 1981. Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, 28: 1375–1393.

MORGAN-KISS RM, JC PRISCU, T POCOCK, L GUDYNAITE-SAVITCH & NP HUNER. 2006. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 222–252.

NEGRI RM, JI CARRETO, HR BENAVIDES, R AKSELMAN & VA LUTZ. 1992. An usual bloom of *Gyrodinium cf. aureolum* in the Argentine sea: community structure and conditioning factors. *J Plankton Res.*, 14 (2): 261- 269.

NIELSEN, SL. 2006. Size-dependent growth rates in eukaryotic and prokaryotic algae exemplified by green algae and cyanobacteria: comparisons between unicells and colonial growth forms. *J. Plankton Res.*, 28: 489– 498.

NIENCHESKI, L. F. H. ; FILLMANN, G. 1998. Características Químicas - Ambientes Costeiros e Marinhos e Sua Biota. In: U. Seeliger; C. Odebrecht; J.P. Castello. (Org.). Os Ecossistemas Costeiros e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, RS: Editora Ecoscientia. 341 p.

ODEBRECHT C, L RÖRIG, VMT GARCIA & PC ABREU. 1995. Shellfish mortality and a red tide event in southern Brazil. In: Lassus P, Arzul G, Erard-Le Denn E, Gentien P & Marcaillou –Le Baut C, editors. Harmful marine algal blooms. *Paris: Lavoisier Publishing.*, 213- 218.

ODEBRECHT C & L DJURFELDT. 1996. The role of nearshore mixing on the phytoplankton size structure off Cape Santa Marta Grande, southern Brazil (spring 1989). *Arch Fish Mar Res.*, 43(3): 13- 26.

ODEBRECHT, C & VMT GARCIA. 1998. In: SEELIGER U, ODEBRECHT C & CASTELLO JP (Eds.) Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande: Ecoscientia. 341 p.

ODEBRECHT, C, SMFO AZEVEDO, VMT GARCIA, VLM HUSZAR, VF MAGALHAES, M MENEZES, LAO POENÇA, LR RÖRIG, D TENEMBAUM, MC VILLAC & JS YUNES. 2002. Floraciones de microalgas nocivas em Brasil: Estado del

arte y proyectos em curso. In: SAR, EA, ME FERRARIO & B REGUERA (Eds.) Floraciones de Algas Nocivas en el Cono Sur Americano. 219- 233.

ODEBRECHT C, M BERGESCH, LR RÖRIG & PC ABREU. 2010. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992–2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries and Coasts.*, 33: 570-83.

ODEBRECHT C, ABREU PC, BEMVENUTI CE, COLLING LA, COPERTINO M, COSTA CSB, GARCIA AM, MARANGONI JC, M'LLER OO, MUELBERT JH, VIEIRA J & SEELIGER U. 2013. O efeito de perturbações naturais e antrópicas na ecologia do estuário da Lagoa dos Patos. In: Tabarelli M et al. (Eds.) PELD- CNPq: Dez anos do programa de pesquisas ecológicas de longa duração no Brasil: achados, lições e perspectivas. Recife. Universidade da UFPE. 446 p.

OLENINA I, S HAJDU, L EDLER, A ANDERSSON, N WASMUND, S BUSH, J GÖBEL, S GROMISZ, S HUSEBY, M HUTTUMEN, A JEANUS, P KOKKONEM, I LEDAINE, E NIEMKIEWICZ. 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. HELCOM Baltic Sea Environmental Proceedings. No. 106. 144 p.

PALMER JD. 2003. The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and whodunit? *J. Phycol.*, 39: 4- 11.

PERSICH GR, D KULIS, DM ANDERSON & VMT GARCIA. 2006. Probable origin and toxin profile of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech from southern Brazil. *Harmful Algae.*, 36-44 p.

PERRY MJ, MC TALBOT & RS ALBERTE. 1981. Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar Biol.*, 61: 1- 61.

PHILLIPS EM, JE ZAMON, HN NEVINS, CM GIBBLE, RS DUERR & LH KERR. 2011. Summary of Birds Killed by a harmful algal bloom along the South Washington and North Oregon coasts during October 2009. *Northwestern Naturalist.*, 92: 120-6.

PIOLA AR, EJD CAMPOS, OO MOLLER, M CHARO & C MARTINEZ. 2000. Subtropical Shelf Front off eastern South America. *J. Geophys. Res.*, 105 (C3): 6565-6578.

PIOLA AR, OO MOLLER, RA GUERRERO & EJD CAMPOS. 2008. Variability of the subtropical shelf front off eastern South America: Winter 2003 and summer 2004. *Cont. Shelf Res.* 28: 1639-1648.

PRÉZELIN, BB. 1987. Photosynthetic physiology of dinoflagellates. In: Taylor FJR (ed.) *The biology of dinoflagellates*, Blackwell, 174- 223.

QASIM SZ, PMA BHATTATHIRI & VP DEVASSY. 1972. The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Mar. Biol.*, 12: 200-206.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- RADCHENKO IG & LV IL'YASH. 2006. Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *The Biological Bulletin* 33: 242-7.
- REDFIELD AC, BH KETCHUM & FA RICHARDS. 1963. The influence of organisms on the composition of sea-water. In: HILL, MN (Ed.), *The Sea*. Interscience, New York, (2): 26-77 p.
- REYNOLDS C. 1988. Functional morphology and adaptative strategies of freshwater phytoplankton. In: SANDGREN, CD (Ed.), *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press. 388-433 p.
- REYNOLDS CS. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. 535 p.
- RICHARDSON BYK, J BEARDALL & JA RAVEN. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phycol.*, 93: 157-191.
- RICHARDSON K, AW VISSER & FBO PEDERSEN. 2000. Subsurface phytoplankton blooms fuel pelagic production in the North Sea. *J. Plankton Res.*, 22: 1663-1671.
- RÖDER K, MF HANTZSCHE, C GEBÜHR, C MIENE, T HELBIG, B KROCK, M HOPPENRATH, B LUCKAS & G GERDTS. 2012. Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae.*, 15: 59-70.
- RODRÍGUEZ F, M CHAUTON, G JOHNSEN, K ANDRESEN, LM OLSEN & M ZAPATA. 2006. Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Mar Biol* 148: 963-971
- RYTHER, JH. 1956. Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity. *Limnol Oceanogr.*, 1: 61- 70.
- ROSA, ZM & TC BUSELATO. 1981. Sobre a ocorrência de flora Alga, de Gyrodinium aureolum HULBURT (DINOPHYCEAE) no litoral sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Ser. Bot.*, Porto Alegre. (28): 167-179.
- RUIVO M, A AMORIM & P CARTAXANA. 2011. Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: implications for chemotaxonomy in coastal waters. *J Plankton Res.*, 33: 1012- 1022.
- RYTHER JH. 1956. Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity. *Limnol Oceanogr.*, 1: 61- 70.

SCHLÜTER L, P HENRIKSEN, TG NIELSEN & HH JAKOBSEN, 2011. Phytoplankton composition and biomass across the Southern Indian Ocean. *Deep-Sea Res I.*, 58: 546–556.

SCHREIBER U, H HORMANN, C NEUBAUER & C KLUGHANLNER. 1995. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Aust J Plant Physiol.*, 22: 209-220.

SENGER H & PH FLEISHCHACKER. 1978. Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions. *Physiologia Pl.*, 43: 35- 42.

SHERR EB & BF SHERR. 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in The sea. *Mar Ecol Prog Ser.*, 352: 187-197.

SIGAUD-KUTNER TC & E AIDAR. 1995. The influence of osmotic shocks on the growth rate and chlorophyll-a content of planktonic algae species. *Bol. Inst. Oceanogr S Paulo.*, 43: 89-98.

SMAYDA, TJ. 1980. Phytoplankton species succession. In: Morris I, editor. The physiological ecology of phytoplankton. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, 493-570.

SMAYDA TJ & PK BIENFANG. 1983. Suspension properties of various phyletic groups of phytoplankton and tintinnids in an oligotrophic, subtropical system. *Mar. Ecol.*, 4: 289-300.

SMAYDA, TJ. 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol Oceanogr.*, 42: 1137–1153.

SMAYDA TJ & CS REYNOLDS. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.*, 23: 447-61.

SMAYDA, TJ. 2002. Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks”. *Harmful Algae.*, 1: 95-112.

SMAYDA TJ & CS REYNOLDS. 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research.*, 49: 95-106.

SMAYDA TJ & VL TRAINER. 2010. Dinoflagellate blooms in upwelling systems: Seeding, variability, and contrasts with diatom bloom behaviour. *Progr. Oceanogr.*, 85: 92–107.

STEIDINGER, KA & K TANGEN. 1995. Dinoflagellates. In: TOMAS C. (ed.). *Identifying marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press. California, USA. 387-584.

- STOECKER, DK. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *Eur. J. Protistol.*, 34: 281- 290.
- STRICKLAND, JDH & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, Second Edition, Ottawa, Canada.
- SUGGET DJ, K OXBOROUGH, NR BAKER, HL MACINTYRE, TM KANA, RJ GEIDER. 2003. Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll a fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton. *Eur J Phycol.*, 38: 371- 384.
- SUGGET DJ, HL MACINTYRE & RJ GEIDER. 2004. Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnol Oceanogr Methods* 2: 316- 332.
- SWITZER, T. 2008. Urea loading from a spring storm-Knysa estuary, South Africa. *Harm Algae.*, 8: 66- 69.
- TAKAYAMA, H. 1985. Apical Grooves of Unarmored Dinoflagellates. *Bulletin of Plankton Society of Japan.*, 32 (2): 129-140.
- TAVARES, J.F.R., PROENÇA, L.A.O. & ODEBRECHT, C. 2009. Assessing the harmful microalgae occurrence and temporal variation in a coastal aquaculture area, southern Brazil. *Atlântica, Rio Grande.*, 31 (2): 129-144. doi: 10.5088/atl.2009.31.2.129.
- TAYLOR FJR. 1987. The biology of dinoflagellates. *Botanical Monographs.*, 21. 785 p.
- TAYLOR FJR, M HOPPENRATH & JF SALDARRIAGA. 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodivers Conserv.*, 17: 407–418.
- TER BRAAK CJF & SMILAUER P. 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, New York, USA, 500 p.
- UCHIDA, T. 1981. The relationships between *Prorocentrum micans* growth and its ecological environment. Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science Hokkaido University 7: 17-76.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and guides 12.
- UTERMÖHL H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie., 9: 1-38.
- VÁZQUEZ EJN, IG LIZARRAGA, CJB SCHMIDT, AC TAPIA, DJL CORTES, FEH SANDOVAL, AH TAPIA & JJB GUZMAN. 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *J. Environ. Biol.*, 34: 413-23.

- VENABLES WN & BD RIPLEY. 2002. Modern Applied Statistics with S. 4th Edition. New York: Springer. 495 p.
- WANG, DA-ZHI. 2008. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Mar. Drugs*, 6, 349-371; DOI: 10.3390/md20080016
- WESTON K, L FERNAND, DK MILLS, L DELAHUNTY & J BROWN. 2005. Primary production in the deep chlorophyll maximum of the central North Sea. *J. Plankton Res.*, 27(9): 909–922.
- WOOD AM, RC EVERROAD & LM WINGARD. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R [ed.] *Algal Culturing Techniques*. Oxford: Elsevier Academic Press. 269- 285.
- WRIGHT SW & SW JEFFREY. 2006. Pigment markers for phytoplankton production. In: Volkmann JK (Ed.) *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Springer- Verlag, Berlin, 71- 104.
- WRIGHT SW, A ISHIKAWA, HJ MARCHANT, AT DAVIDSON, RL VAN DEN ENDEN & GV NASH. 2009. Composition and significance of picophytoplankton in Antarctic waters. *Polar Biol.*, 32: 797–808.
- WU S, B ZHANG, A HUANG, L HUAN, L HE, A LIN, J NIU & G WANG. 2013. Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricorutum* using Nile red and BODIPY 505/515. *J Appl Phycol.*, 26: 1659–1668.
- XIN L, HH YING & ZY PING. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.*, 102: 3098-102.
- YAMAGUCHI, A, H KAWAMURA, & T HORIGUCHI. 2006. A further phylogenetic study of the heterotrophic dinoflagellate genus, *Protoperidinium* (Dinophyceae) based on small and large subunit ribosomal RNA gene sequences. *Phycol. Res.*, 54: 317-329.
- YAMAGUCHI H, T YOSHIMATSU, Y TANIMOTO, S SATO, T NISHIMURA, K UEHARA & M ADACHI. 2012. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovate* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters. *Phycol. Res.*, 60: 297-304.
- YAMAMOTO T, SJ OH & Y KATAOKA. 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, 68:356-63.
- YAMAMOTO K, H TSUJIMURA, M NAKAJIMA & PJ HARRISON. 2013. Flushing rate and salinity may control the blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in a river/estuary in Osaka Bay, Japan. *J. Oceanogr.*, 69:727-36.

ZAPATA M, F RODRIGUEZ F & JL GARRIDO. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser.*, 195: 29-45.

ZAPATA M, S FRAGA, F RODRÍGUEZ & J GARRIDO. 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar Ecol Progr Ser.*, 465: 33–52.

ZHUO-PING C, H WEI-WEI, A MIN & D SHUN-SHAN. 2009. Coupled effects of irradiance and iron on the growth of a harmful algal bloom-causing microalga *Scrippsiella trochoidea*. *Acta Ecol. Sin.*, 29: 297–301.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Apresentação

Este apêndice refere-se ao artigo intitulado “Estrutura da comunidade fitoplanctônica no Sul do Brasil (verão, 2013), com ênfase no papel dos dinoflagelados”. O artigo está em fase final de preparação.

ESTRUTURA DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA NO SUL DO BRASIL (VERÃO, 2013), COM ÊNFASE NO PAPEL DOS DINOFLAGELADOS

Carolina Islabão, Carlos Rafael Mendes, Amália Maria Sacilotto Detoni e Clarisse Odebrecht

RESUMO

Neste estudo, avaliamos a estrutura e composição do fitoplâncton durante o verão de 2013 ao longo de um transecto entre a costa e a região oceânica ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos (Lat. 32°12S), em sete estações oceanográfica amostradas em profundidades discretas na coluna de água. Perfis verticais de temperatura, salinidade e fluorescência foram realizados antes da coleta de amostras para quantificação do fitoplâncton, nutrientes inorgânicos dissolvidos e pigmentos, analisados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foram verificadas três massas de água ao longo do transecto: Água Tropical (AT), Água Subtropical de Plataforma (ASTP) e Pluma do Rio da Prata (PRP). A concentração de clorofila *a* (Chl *a*) foi maior nas duas estações mais próximas à costa, onde a coluna de água estava homogênea e as diatomáceas eram dominantes. Este grupo foi sendo substituído por dinoflagelados ao longo do perfil, em condições de estratificação. Organismos picoplanctônicos foram representativos em amostras superficiais, com baixa concentração de nutrientes. Ao longo do gradiente, dois tipos de dinoflagelados foram verificados: Tipo 1 (Peridinin-containing dinoflagellates), com uma pequena contribuição, principalmente nas duas estações próximas à costa e representados por *Prorocentrum* e *Scrippsiella*; e Tipo 2 (Haptophyte-containing dinoflagellates), que representaram mais que 50% do total de Chl *a* nas estações situadas na plataforma continental, principalmente na profundidade de máximo de clorofila, representados

principalmente por pequenas células de Gymnodiniales (<15 μm). A maior biomassa de dinoflagelados foi positivamente correlacionada com a Frequência de Brünt-Väisälä, reforçando o papel da estratificação na estruturação da comunidade fitoplanctônica e na distribuição dos dinoflagelados em período de verão, na plataforma continental do Sul do Brasil.

Palavras-chave: Dinoflagelados, Estratificação, Peridinina, Fucoxantina, Gymnodiniales.

1. INTRODUÇÃO

As formas de vida do fitoplâncton apresentam adaptações ao longo de um gradiente de intensidade de turbulência, que influencia a exposição luminosa e a absorção de nutrientes. Em geral, as diatomáceas predominam em regiões de maior turbulência (2 – 100 cm^2/s) e alto teor de nutrientes, ao contrário dos dinoflagelados (0,02 – 1 cm^2/s) (Margalef 1978). É bem conhecido que estes são favorecidos em águas estratificadas e com baixa concentração de nutrientes inorgânicos dissolvidos, principalmente pela sua habilidade de migração vertical na coluna de água, alta afinidade por nutrientes e também pela sua capacidade mixotrófica e heterotrófica (Hoppenrath *et al.* 2009, Sherr & Sherr 2007). Entretanto, nem todos estão associados com águas pobres em nutrientes, devido as características fisiológicas de determinadas espécies (taxa de crescimento maiores, tamanho celular pequeno-intermediário, alta mobilidade, forma de vida morfometricamente simples) e, principalmente em situações de grandes florações, os dinoflagelados podem também requerer alto nível de nutrientes (Smayda & Reynolds 2001). Por exemplo, habitats relativamente rasos (águas costeiras) e enriquecidos com nutrientes, mesohalinos e com trocas reduzidas com águas mais oceânicas, favorecem florações de dinoflagelados de espécies gymnodinióides e outras

formas tecadas como *Alexandrium minutum*, *Heterocapsa triquetra*, *Scrippsiella trochoidea* e *Prorocentrum* spp. (Smayda & Reynolds 2001).

Devido à sua diversidade fisiológica, o papel dos dinoflagelados no ecossistema marinho também é variado. Espécies fotossintéticas são importantes produtores primários que periodicamente podem ter grande importância na sustentabilidade de um ecossistema marinho. Espécies não fotossintéticas absorvem compostos orgânicos dissolvidos, realizam fagotrofia ou digestão extracelular e, ao contrário das anteriores, sobrevivem em profundidades não iluminadas, na água e/ou no sedimento. A mobilidade por meio de flagelos permite otimizar sua localização e evitar a sedimentação em condições estáveis na coluna de água, sendo esta característica considerada chave na sua competição com as diatomáceas, sendo os dinoflagelados favorecidos nos meses de verão (Taylor et al. 2008).

Os cloroplastos das algas eucarióticas e de todas as plantas também são organelas endossimbióticas, originalmente derivadas de um ancestral (cianobactéria) que desenvolveu a capacidade de fotossíntese oxigênica, e que foi incorporado em uma célula hospedeira de um protista heterotrófico de origem desconhecida (Bhattacharya 1997; Palmer 2003; Jeffrey et al. 2011). O desenvolvimento evolutivo dos processos de endossimbiose resultaram nas três principais linhagens: Glaucocystophytas, Vermelhas e Verdes (Moreira et al. 2000). As cianobactérias atuais derivaram diretamente do ancestral (Cyanobacterium), sem futuras endossimbioses (Jeffrey et al. 2011). Os plastídeos de heterokontes (diatomáceas, algas marrons, Chrisofitas etc.), haptófitas, criptofitas e dinoflagelados surgiram de um ancestral da linhagem vermelha, a partir de diferentes processos de endossimbioses secundárias e terciárias. Por meio de um processo similar, euglenófitas, chlorarachnioófitas e dinoflagelados “verdes” adquiriram

seus plastídeos do ancestral (prasinofitas/chlorofitas). Os dinoflagelados podem ser encontrados com nenhum pigmento (heterótrofos), com seu próprio plastídeo (carotenóides de dinoflagelados com peridininina) ou com plastídeos derivados de criptofitas, diatomáceas penadas ou cêntricas, primnesiofitas ou prasinofitas/chlorofitas. Alguns dinoflagelados podem ainda abrigar células (cianobactérias) simbióticas intactas (Jeffrey et al. 2011). Portanto, os típicos dinoflagelados autotróficos apresentam Chl *a* e *c*₂, e peridininina como principal pigmento acessório, sendo portanto, designados como cloroplastos com peridininina. Além disto, outros seis tipos de cloroplastos foram descritos para os dinoflagelados, propiciando inclusive novas descrições de espécies (Zapata et al. 2012).

A quantificação precisa da concentração dos pigmentos fotossintéticos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) permite o estudo da composição e estrutura dos grupos de fitoplâncton, inclusive do nano-e picoplâncton. Estes últimos requerem técnicas especiais de microscopia para sua análise e são normalmente difíceis de identificar em análises realizadas ao microscópio óptico. As análises de pigmentos são também relativamente rápidas, proporcionando uma ferramenta importante no monitoramento das populações fitoplanctônicas (Wright and Jeffrey, 2006; Mendes et al. 2011).

A região da plataforma continental do sul do Brasil é caracterizada pela existência de gradientes horizontais e verticais de densidade devido à mistura de massas de água quentes e frias, costeiras e oceânicas, resultando em uma elevada diversidade de fitoplâncton e produtividade biológica (Ciotti *et al.* 1995; Odebrecht & Garcia 1998; Gaeta & Brandini 2006). Na região costeira, elevadas concentrações de fitoplâncton são esperadas no final do inverno e primavera, quando diatomáceas (*Skeletonema costatum*)

são abundantes nas águas próximas à desembocadura da Lagoa dos Patos. A água costeira, sob influência do Rio da Prata, favorece o crescimento de dinoflagelados tecados como *Scrippsiella* cf. *trochoidea*, *Prorocentrum* spp., *Dinophysis* spp e *Ceratium* spp. (Odebrecht & Garcia, 1998). A presença da pluma do Rio da Prata (PRP) foi relacionada com altas densidades de dinoflagelados, indicando a importância da fertilização pela descarga terrestre e o papel da estratificação vertical da coluna d'água (Islabão, 2010). Ao largo da plataforma continental, altas densidades relativas de dinoflagelados tecados autotróficos/mixotróficos, como *Heterocapsa*, *Scrippsiella trochoidea* e *Ceratium*, mas também espécies heterotróficas como *Protoperdinium* spp. e *Gyrodinium* spp., foi verificada (Ciotti, 1990). Mais ao sul, na costa do Uruguai, durante a primavera, o fitoplâncton foi associado com duas zonas do Rio da Prata: (a) zona interior (frente de turbidez), dominada principalmente por nanoflagelados (e.g. *Cryptomonas*) e algumas diatomáceas típicas de água doce (e.g. *Aulacoseira granulata*) e de ambientes turvos (e.g. *Paralia sulcata*); (b) zona dominada por espécies marinhas de diatomáceas e dinoflagelados, de acordo com as condições de estratificação da coluna de água (Ferrari, 2008). Em outra ocasião, florações de dinoflagelados foram observadas ao longo da PRP no final da primavera, coincidindo com altos valores de nutrientes e baixa turbulência (Carreto *et al.*, 2008).

O presente estudo tem por objetivo caracterizar a estrutura e composição das comunidades de fitoplâncton em uma região geográfica de transição no Oceano Atlântico Sul Ocidental. Simultaneamente, pretendemos testar a hipótese de que também neste ambiente, a contribuição dos dinoflagelados está relacionada com uma maior estabilidade na coluna de água e menor teor de nutrientes, os quais definem

também as formas de vida distribuídas ao longo de um gradiente costa-talude (onshore-offshore).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo: Na região da desembocadura da Lagoa dos Patos, próximo à cidade de Rio Grande (Lat. 32°12' S), a plataforma e talude continental são influenciados por diversas massas de água: Água Tropical (AT), Água Central do Atlântico Sul (ACAS), Água Subantártica (ASA) e Água Subantártica de Plataforma (ASAP). As propriedades termohalinas da água na plataforma continental variam ainda conforme o volume descarregado por importantes aportes continentais, como a pluma do Rio da Prata (PRP) e da Lagoa dos Patos, e do grau de influência da AT e da ASA. Duas variedades de Água Subtropical de Plataforma (ASTP) são observadas, procedentes da mistura da ASAP com a AT ou da PRP com a AT (Möller *et al.* 2008, Piola *et al.* 2008). A presença de massas de água com características físico-químicas distintas resulta na formação da Frente Subtropical de Plataforma (FSTP), que apresenta variabilidade sazonal, com um marcado gradiente termo-halino na quebra de plataforma, perpendicular à costa em torno da latitude 32° S (Piola *et al.* 2008), separando a ASAP da ASTP (Möller *et al.* 2008). As principais fontes de nutrientes na região são provenientes da PRP (silicato e fosfato), da ASAP (nitrato e fosfato) e da ACAS (nitrato), quando esta ascende à superfície (Braga *et al.* 2008). A variação latitudinal da PRP está relacionada com a descarga de água continental e com o regime de ventos (Miranda 1972, Moller *et al.* 2008), que afetam a circulação e estratificação termo-halina na plataforma continental. Na plataforma continental próximo à costa, ocorre o predomínio da PRP com menor salinidade em superfície (Matano *et al.* 2010), formando

uma frente horizontal que divide a ASAP de forma abrupta na direção costa-oceano (Piola et al. 2000). A PRP e Lagoa dos Patos influenciam significativamente a produção e o crescimento do fitoplâncton nesta região geográfica, sendo que períodos de maior precipitação (por exemplo em anos de *El Niño*) têm sido associados com um aumento de Chl *a* na plataforma continental (Abreu et al. 1995, Ciotti et al. 1995, Braga et al. 2008).

Amostragem: No âmbito do projeto "Dinâmica do Ecossistema Marinho e suas implicações para o sequestro de carbono (DEMI-SeC)", um cruzeiro oceanográfico foi realizado no verão austral (20-23 fevereiro de 2013) entre a costa e a região oceânica ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos (Lat. 32°12S) (Apêndice 1, Fig. 1). Perfis verticais de PAR, temperatura, salinidade e de fluorescência (sensores CTD - Sea-Bird CTD/Carrousel 911+ system[®] e de fluorescência sensor PAR - WetLabs ECO-AFL/FL[®]) foram determinados previamente à amostragem da água com garrafas de Niskin, em sete estações. As profundidades amostradas em cada estação oceanográfica foram definidas selecionando-se no mínimo quatro profundidades, de acordo com o grau de estratificação: superfície, na profundidade de fluorescência máxima e em profundidades intermediárias acima e abaixo do máximo de fluorescência, exceto na #6, onde apenas se efetuaram coletas para contagem nas profundidades de 0, 10 e 20m.

Grau de estratificação da coluna de água: O grau de estratificação da coluna de água foi calculado com base na Frequência de Brünt-Väisälä (*ciclos/hora*), que considera a gravidade ($m\ s^{-2}$) e a densidade potencial da água ($Kg\ m^{-3}$). A densidade potencial da água do mar (ρ) foi obtida através dos perfis de temperatura e salinidade, e a profundidade da

camada de mistura (MLD) foi determinada conforme proposto por Kara et al. (2000). Foi considerado que a frequência máxima imediatamente abaixo da MLD representa a força da pycnoclina e esse valor foi adotado para representar a estabilidade máxima (Castro et al. 2002; Araújo 2012).

Nutrientes Inorgânicos Dissolvidos: A água para análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos (amônio, nitrito, nitrato, fosfato e silicato) foi filtrada em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/A). Do filtrado, 15 ml foram utilizados para análise de amônio (UNESCO 1983) e 250 ml armazenados em freezer para posterior análise segundo Strickland & Parsons (1972). A concentração dos elementos nitrogenados foi somada e apresentada como nitrogênio inorgânico dissolvido total (DIN). A razão N:P foi estimada com base no número atômico. As análises foram realizadas no Lab. de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos – FURG.

Quantificação de fitoplâncton: As amostras de água para a contagem do fitoplâncton foram preservadas em frascos âmbar (com formol 1% e/ou com lugol 2%) e analisadas pelo método de Utermöhl (1958), em câmaras de sedimentação (50 mL) ao microscópio invertido. Os organismos (número de indivíduos em células) foram contados nos aumentos de 100x e 400x. O número (N) mínimo contado de organismos dominantes foi de 100, garantindo uma estimativa da margem de erro de +/-20% (Hallegraeff et al. 2003). A densidade de diatomáceas, dinoflagelados, cianobactérias totais, cianobactérias cocóides em duas faixas de tamanho (0-3 μm ; 4-7 μm), tintinídeos e ciliados aloricados, foi expressa em número de organismos por L^{-1} . A identificação dos organismos foi realizada em nível de gênero (exceto cianobactérias cocóides de 1- 10 μm) e, quando possível, de espécie, especialmente para os dinoflagelados.

Pigmentos: Em superfície e na profundidade de fluorescência máxima da clorofila (DCM), foi coletada água (1,5 L) para análise dos pigmentos por HPLC. As amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro (GF/F) e acondicionadas imediatamente após a filtração em nitrogênio líquido. Para a extração dos pigmentos, os filtros foram macerados com um bastão de vidro, colocados em congelador (-20°C, 60 min) e submetidos a um banho frio de ultrassom de 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5 min, temperatura 3°C) e o sobrenadante filtrado em filtro de membrana de 0,2 µm de poro (Millipore Fluoropore Membrane filters, 13 mm de diâmetro), o qual foi colocado imediatamente no auto-injetor do HPLC refrigerado a 4°C. O extrato dos pigmentos foi analisado, utilizando um HPLC Shimadzu composto por um módulo distribuidor de solventes (LC-20AD) com um sistema de controle (CBM-20A), um detector de fotodiodos (SPD-M20A) e um detector de fluorescência (RF-10AXL). A separação cromatográfica dos pigmentos foi efetuada usando uma coluna C8 monomérica (SunFire; 15 cm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro; 3,5 µm de tamanho das partículas) a uma temperatura constante de 25°C. A fase móvel (solventes) e o seu respectivo gradiente seguiu o método desenvolvido por Zapata et al. (2000), discutido e otimizado por Mendes et al. (2007), com um fluxo de 1 ml min⁻¹ e um volume de injeção de 100 µl. Os picos referentes aos pigmentos fotossintéticos foram identificados e quantificados usando como referência padrões comerciais da DHI (Institute for Water and Environment, Denmark). A concentração foi calculada a partir do sinal obtido pelo detector de fotodiodos e/ou pelo detector de fluorescência, para o caso dos pigmentos clorofilianos. Os picos foram integrados utilizando o software LC-solution, mas todas as integrações dos picos foram verificadas e corrigidas manualmente quando for

necessário. Para correção das perdas e mudanças de volume, as concentrações dos pigmentos foram normalizados por padrões internos.

Com base no teor de pigmentos, a abundância relativa dos grupos de fitoplâncton que contribuíram para a biomassa total de clorofila *a* (Chl *a*) foi calculada usando o software CHEMTAX (chemical taxonomy software, version 1.95), que utiliza uma matriz de razões entre alguns pigmentos “diagnósticos” e a Chl *a*. As razões iniciais (matriz de input) para as classes de algas foram obtidas de (Higgins et al. 2011). Com base nos pigmentos e contagens ao microscópio, oito grupos foram considerados neste estudo: diatomáceas, dinoflagelados Tipo 1 (peridinin-containing dinoflagellates) e Tipo 2 (haptophyte-containing dinoflagellates), primnesiofitas, criptofitas, prasinofitas, *Synechococcus* e *Prochlorococcus*.

Para otimização da matriz de input, 60 tabelas com as razões pigmentares foram geradas multiplicando-se cada razão da tabela inicial por uma função randômica (Wright et al. 2009). Os seis melhores resultados de output (com menor residual) foram selecionados para aplicar 15 corridas sucessivas no CHEMTAX e verificar a razão de convergência final (Latasa, 2007). O resultado final foi calculado como a média entre as seis matrizes de output finais obtidas após o processamento descrito acima (matriz de input e output). A análise dos pigmentos por HPLC seguida da análise dos dados com CHEMTAX é considerado um método efetivo para se determinar a abundância relativados diferentes grupos do fitoplâncton.

Análise estatística: A relação entre a biomassa dos grupos do fitoplâncton determinados pelo CHEMTAX e as condições ambientais, foi avaliada em uma análise de Correspondência Canônica (CCA) e avaliada por um teste de permutação de Monte

Carlo ($p < 0,05$). A temperatura da água, salinidade, frequência média de Brünt-Väisälä (BV) em camadas de 10 metros abaixo do ponto coletado, concentração dos nutrientes inorgânicos dissolvidos (nitrogênio total, fosfato e silicato) e clorofila *a* (Chl *a*) foram as variáveis incluídas na CCA, realizada usando o CANOCO 4.5 (Ter Braak and Smilauer, 2002).

3 RESULTADOS

3.1. Condições Oceanográficas

3.1.1. Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR)

Os valores de PAR ($0-3.986 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) atingiram altos valores na camada superficial ($100-200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, até 20m) e foram baixos nas duas estações mais costeiras e estação 5 que foi amostrada à noite. (Fig 2a).

3.1.2 Temperatura e Salinidade

A temperatura da água foi alta ($>24 \text{ }^\circ\text{C}$) na camada superficial (0–20m de profundidade) em toda a região, diminuindo gradualmente em maiores profundidades. A salinidade da água (31–36), ao contrário, aumentou com a profundidade, exceto nas estações externas da plataforma (estações 6 e 7) onde os valores foram altos ao longo de toda a coluna de água (Figura 2b, c). Foram verificadas três massas de água ao longo do transecto com base nos índices termohalinos propostos por Möller et al. (2008): Água Tropical (AT), Água Subtropical de Plataforma (ASTP) e Pluma do Rio da Prata (PRP). A PRP foi observada na camada superficial das estações 4, 5 e 6, e a ASTP ocupou uma grande porção da plataforma continental e toda a coluna de água nas estações 1, 2 e 3.

3.1.3 Estratificação da coluna de água

A profundidade da camada de mistura (MLD) variou entre 22 e 36 m, sendo mais profunda na estação mais externa (estação 7). As estações mais costeiras (estações 1 e 2) apresentaram-se homoganeamente misturadas e a partir da estação 3, fortemente estratificadas. Na profundidade de estabilidade máxima (força da pycnoclina) a frequência de Brünt-Väisälä variou entre 17 e 26 ciclos/h, no entanto, nas estações 6, 5 e 3 a estratificação foi mais intensa (23-26 ciclos/h) do que nas estações 7 e 4 (17-19 ciclos/h) (Fig. 2d). A profundidade de máxima estabilidade variou entre 20 m (estação 6) e 40m (estação 7).

3.1.4 Nutrientes inorgânicos dissolvidos

A concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN; nitrato+nitrito+amônia) variou entre 0,02 μM e 6,91 μM . Os maiores valores (média 4,28-5,14 μM) foram verificados entre 40 e 50m de profundidade nas #5 e #4 (Fig. 2e). O teor de fosfato inorgânico dissolvido variou entre 0,01 e 0,17 μM , com maiores valores em 10 m (estação 6; 0,17 μM) e 40-50m (estação 4; 0,13 μM) (Fig. 2f). O teor de silicato inorgânico dissolvido foi sempre baixo (0,01-1,36 μM); no entanto, com valores $>1 \mu\text{M}$ verificados no mesmo estrato (40-50 m; estações 3, 4 e 5) em que os valores máximos dos demais nutrientes foram encontrados (Fig. 2g). A razão N:P variou bastante (0.25-98) e as duas estações costeiras apresentaram as menores concentrações médias de fósforo ($0,05 \pm 0,03 \mu\text{M}$).

3.1.5 Clorofila *a* (Chl *a*)

A concentração de Chl *a* ($0,14 - 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentou os maiores valores nas estações costeiras ($0,7-1,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Nas demais, a concentração de Chl *a* variou entre 0,14 e 0,75

$\mu\text{g L}^{-1}$, com o menor valor na estação 6 ($0,14 \mu\text{g L}^{-1}$). Na profundidade de máxima clorofila (DCM), a concentração de Chl *a* variou entre $0,14$ e $0,80 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 3a).

3.2. Fitoplâncton

3.2.1. Quantificação dos organismos em microscopia óptica

As diatomáceas predominaram nas estações costeiras (Fig. 3b), principalmente diatomáceas penadas (Dpe, *Nitzschia*) em todas as profundidades amostradas, exceto na estação 2, em superfície, onde uma alta densidade ($7 \cdot 10^6 \text{ cells L}^{-1}$) da diatomácea cêntrica *Thalassiosira minuscula* foi observada. Os dinoflagelados *Prorocentrum* (*P. micans*, *P. scutellum*, *P. gracile*, *P. triestinum*, *P. compressum*), *Scrippsiella* cf. *trochoidea*, *Gymnodinium*, *Protoperidinium* e *Gyrodinium* apresentaram baixas densidades.

Nas demais estações, houve um domínio de dinoflagelados comparado às diatomáceas, em todas as profundidades, exceto na estação 5, 40m. A densidade de dinoflagelados, principalmente da Ordem Gymnodiniales e *Gyrodinium*, aumentou da costa em direção ao talude (Fig. 3c,d), com os maiores valores médios ($80\text{-}100.000 \text{ cells L}^{-1}$) nas estações 5, 6 e 7..

Nas estações 3 e 4, os maiores valores de densidade de dinoflagelados (*Gymnodinium* $5\text{-}10 \mu\text{m}$, $12.000 \text{ ~} 30.000 \text{ cells L}^{-1}$; *Gyrodinium* $\sim 10 \mu\text{m}$, $\sim 12.000 \text{ cells L}^{-1}$) foram verificados em 30 m de profundidade, onde a MLD era de 26 m e 23 m, respectivamente. Outros gêneros observados em menor densidade foram, *Amphidinium*, *Protoperidinium*, *Oxytoxum* na estação 3, e *Prorocentrum*, *Amphidinium*, *Karlodinium*, *Gyrodinium*, *Katodinium* e *Heterocapsa* na estação 4. Células classificadas como cf. *Karenia* ($\pm 5 \mu\text{m}$) foram observadas ($\sim 8000 \text{ cells L}^{-1}$) também na estação 4. Na estação 5

(MLD 27 m), os dinoflagelados foram abundantes em 20 m, mas pequenas diatomáceas cêntricas (3-5 μm) predominaram em 40 m e 50 m (máximo $\sim 126.000 \text{ cells L}^{-1}$). Na estação 6 (MLD 22 m), os dinoflagelados da Ordem Gymnodiniales (5-10 μm) contribuíram com a maior densidade ($46.000 \text{ cells L}^{-1}$) e na estação 7, onde se observou a camada de mistura mais profunda (MLD $\pm 36\text{m}$), a sua maior densidade média foi observada em 10 m, na qual Gymnodiniales (5-12,5 μm) contribuíram com a maior densidade ($\pm 77.000 \text{ cells L}^{-1}$). Espécies heterotróficas de *Protoperdinium* ($\sim 6.000 \text{ cell L}^{-1}$) e, em menor densidade, *Gyrodinium*, *Podolampas* e *Corythodinium*, bem como autotróficas/mixotróficas como de *Prorocentrum*, *Ceratium* e *Torodinium* foram também observadas.

3.2.2 Contribuição dos grupos do fitoplâncton (HPLC/ CHEMTAX)

A contribuição relativa dos principais grupos do fitoplâncton em amostras da superfície, calculada através do CHEMTAX (Fig. 4), indicou a dominância de diatomáceas nas estações costeiras 1 e 2 com 77% e 57%, respectivamente, de contribuição para o total de Chl *a* (índice de biomassa). Nas demais estações, as diatomáceas contribuíram menos de 11%. Os dinoflagelados tiveram pequena contribuição na região costeira, na qual o Tipo 1 (com peridinina) representou < 3% da biomassa e os dinoflagelados do Tipo 2 (com fucoxantina) entre 4 e 16%. A contribuição dos últimos, entretanto, aumentou nas estações mais oceânica, contribuindo entre 15 e 30% para a biomassa total. Da mesma forma, a contribuição das cianobactérias *Synechococcus* (5-40%) e *Prochlorococcus* (9-20%) aumentou nas estações da plataforma continental. Criptofitas e prasinofitas estiveram presentes em todas as estações e representaram na média entre 7% e 20% da biomassa total em

superfície, respectivamente. No entanto, a contribuição de criptofitas foi maior na estação #1 (7%) e de prasinofitas na estação 7 (17%).

Na profundidade de máximo de Chl *a* (DCM) (Fig. 4b) também se observou uma maior contribuição de diatomáceas nas estações mais próximas à costa (>70% do total de Chl *a*) e na estação 4, em 40m de profundidade, (63%). A contribuição de dinoflagelados do Tipo 1 foi sempre baixa ($\leq 3\%$ da biomassa total). No entanto, os dinoflagelados Tipo 2 apresentaram contribuições maiores, com os menores valores próximo à costa (estação 1: 4-6%; estação 2: 15-16%), aumentando significativamente em direção às estações mais oceânicas, onde representaram 51% e 64% da biomassa total nas estações 5 (40m) e 7 (50m), respectivamente. Nas demais, a contribuição deste grupo variou entre 25-30% da biomassa total. A maior contribuição de *Synechococcus* (38%) e *Prochlorococcus* (21%) foi verificada na estação 6 em 35m de profundidade. Primesiofitas e criptofitas registraram baixas contribuições (<7% da biomassa total). Prasinofitas representaram quase sempre menos de 10% da biomassa, exceto na estação 7 (50m) onde este grupo contribuiu com 17% do total de Chl *a*.

4. Relação da biomassa do fitoplâncton com parâmetros ambientais

O resultado do teste de Monte Carlo indicou que as variáveis ambientais temperatura, salinidade, frequência de Brünt-Väisälä, nitrogênio inorgânico dissolvido total, fosfato, silicato e Chl *a* contribuíram significativamente para explicar a distribuição espacial de cada grupo do fitoplâncton ($p < 0.01$). A análise de Correspondência Canônica (CCA), resultou na explicação de 95% da distribuição dos grupos nos dois primeiros eixos de ordenação da CCA, sendo 80% referente ao primeiro eixo e 15% ao segundo (Fig. 5). O primeiro eixo revelou a distribuição dos grupos

associados com águas costeiras e temperatura superficial mais alta, separando-os dos demais situados na plataforma continental. Nas estações costeiras, as maiores concentrações de Chl *a* estavam relacionadas principalmente com diatomáceas e criptofitas e com os nutrientes, principalmente DIN, e negativamente com a salinidade e frequência de Brünt-Väisälä. O segundo eixo revelou uma separação dos grupos de fitoplâncton associada com amostras de superfície ou DCM. Os dinoflagelados Tipo 2 dominaram nas amostras de DCM, onde a correlação foi positiva com o grau de estratificação (frequência de Brünt-Väisälä) e os nutrientes inorgânicos dissolvidos, e negativa com a temperatura. Primnesiófitas, Prochlorofitas e *Synechococcus* ficaram mais associadas com as amostras de superfície, com maiores temperaturas e menores concentrações de nutrientes.

4. DISCUSSÃO

Os organismos com maior contribuição para a biomassa (Chl *a*) foram diatomáceas em toda coluna de água nas duas estações mais próximas à costa; enquanto que dinoflagelados Tipo 2 e cianobactérias (*Synechococcus*) predominaram na plataforma continental. Nas estações costeiras, a coluna de água se apresentou mais homogênea e com concentração de nutrientes relativamente baixa. No extremo sul do Brasil, no período de verão, a concentração de nutrientes é baixa sob a influência da Corrente do Brasil (Niencheski & Fillmann 1998), assim como a abundância de fitoplâncton; algumas diatomáceas de águas quentes (por ex. *Rhizosolenia* spp. e *Chaethoceros* spp.) ocorrem em águas próximas da costa (Dohms 1983).

O aumento da contribuição de dinoflagelados Tipo 2 na plataforma continental em direção ao talude foi correlacionado positivamente com a estratificação da coluna de água. Primnesiofitas e cianobactérias (*Synechococcus* e *Prochlorococcus*) foram abundantes principalmente em superfície. Esses organismos são adaptados a baixa concentração de nutrientes (Schlüter et al. 2011; Mendes et al. 2015). Classicamente, as maiores abundâncias e a ocorrência de florações de dinoflagelados estão associados com águas estratificadas e baixa concentração de nutrientes. De acordo com a mandala de Margalef (1979) a seleção de algas nocivas e o começo de suas florações são abioticamente regulados pela interação entre a turbulência e nutrientes. Entretanto, foi constatado que, ao contrário do que tradicionalmente se assumia, os dinoflagelados toleram um grau de turbulência e velocidade típicos de intensa mistura vertical, como observado em fenômenos de ressurgências e em zonas de frentes oceanográficas, e que esta habilidade não estaria restrita a formas de vida tolerantes a mistura (*ruderals*), mas provavelmente aos dinoflagelados em geral (Smayda 2002). Ao longo do trajeto costal talude nos oceanos, a inércia contra a mistura das massas de água geralmente aumenta, bem como ocorre o aprofundamento da camada estratificada e uma significativa diminuição nas concentrações dos nutrientes (Smayda 2002). A correlação positiva verificada entre a biomassa de dinoflagelados Tipo 2 com a frequência de Brünt-Väisälä (N) (Fig. 5) indica a importância da estratificação na distribuição desses organismos na região do presente estudo. Contudo, as maiores densidades de dinoflagelados Tipo 2 foram encontradas imediatamente acima ou na base da camada de mistura, coincidindo com os maiores valores da frequência de Brünt-Väisälä, associados à camada de clorofila máxima, como observado por Taylor (1987). No presente estudo, os dinoflagelados autotróficos (Gymnodiniales) foram observados em águas mais

superficiais do que as espécies heterotróficas (*Gyrodinium* spp.) (Fig. 3b, 3c). A resposta à luz varia de acordo com as espécies e com o seu estado nutricional, mas de modo geral, os dinoflagelados são mais tolerantes a alta irradiância do que outros grupos do fitoplâncton (Ryther, 1956) e algumas espécies apresentam fotoinibição em alta irradiância ($>500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Falkowski et al. 1985; Garcia & Purdie 1992; Montresor et al. 2003). Conforme verificado no artigo 3, as espécies isoladas na região costeira foram capazes de crescer, sem fotoinibição aparente, em alta irradiância.

A correlação positiva entre a biomassa (Chl *a*) e densidade de dinoflagelados (Fig. 5) com a salinidade, resulta do aumento da contribuição dos dinoflagelados em direção ao talude. A maioria das espécies de dinoflagelados são marinhas, algumas eurialinas ou estenoalinas, e geralmente habitam águas com salinidade entre 20-30, raramente em salinidade maior que 40 (Taylor 1987). Ao contrário da salinidade, a correlação da biomassa com a temperatura foi negativa, pois a sua maior contribuição deu-se principalmente nas profundidades de clorofila máxima. Dinoflagelados ocorrem em uma faixa ampla de temperatura, geralmente predominando em águas mais quentes, nos trópicos durante o ano todo e em períodos quentes (verão) nas regiões temperadas (Taylor 1987).

O conhecimento a respeito das acumulações de fitoplâncton em subsuperfície ou profundidades de máxima clorofila foi aprimorado com o desenvolvimento de medidas contínuas de fluorescência (Lorenzen 1996). A dominância de dinoflagelados em profundidades de clorofila máxima, em plataforma continental de regiões marinhas temperadas, no final do verão (Iriarte & Bernal 1990; Richardson et al. 2000; Weston et al. 2005) pode manter-se até o outono, quando ocorrem florações em superfície (Holligan & Harbour 1977). A mobilidade dos dinoflagelados permite sua agregação

em determinada profundidade resultando em uma alta variabilidade na composição das populações do fitoplâncton na coluna de água (Iriarte & Bernal, 1990).

A relação entre a abundância de dinoflagelados e a estratificação térmica foi relacionada com a presença de ASTP na área de estudo. As linhas isopícnais (de igual densidade) indicam intensa mistura na plataforma continental e a presença de duas variedades de água subtropical de plataforma (ASTP): uma variedade quente ($>21\text{ }^{\circ}\text{C}$; $S\ 33,5 < S \leq 35,3$) pela mistura da PRP com águas do talude, e uma variedade fria ($>18,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $S\ 33,5 < S \leq 36$), pela mistura da Água Subantártica de Plataforma com as águas do talude (Möller et al. 2008; Piola et al. 2000). A presença de dinoflagelados associada com ASTP foi documentada na plataforma continental no extremo sul do Brasil (Islabão 2010) e no estado do Paraná, em águas quentes oligotróficas da corrente do Brasil (Brandini & Fernandes 1996). Ao longo de um transecto entre São Paulo ($25^{\circ}30'S$) e a Península Antártica ($62^{\circ}05'S$), os dinoflagelados foram mais representativos que as diatomáceas em águas oligotróficas subtropicais e em algumas estações ao sul da zona de confluência Brasil-Malvinas no final da primavera (Fernandes & Brandini 1999).

Destacou-se neste estudo também, a importância de uma camada superficial de baixa salinidade, originada do aporte terrestre, em especial da água da Pluma do Rio da Prata (PRP) para a distribuição dos dinoflagelados, que em seu processo de mistura, forma frentes importantes por exemplo para *Karenia* spp., adaptados ao arrasto e dispersão nas correntes costeiras (Smayda 2002). Na plataforma continental da Argentina, o sistema de águas subantárticas de plataforma (ASAP) está sazonalmente separado do sistema costeiro pela presença de uma frente costeira, associada com florações de *Gyrodinium* cf. *aureolum* na plataforma (Carreto et al. 1995). A advecção de águas de menor salinidade da região costeira do Rio da Prata favoreceram o

desenvolvimento de dinoflagelados na plataforma argentina, assim como, no extremo sul do Brasil. As águas oriundas do Rio da Prata parecem ser um fator chave que regula o desenvolvimento de florações nos sistemas de ASAP, embora esta influência seja maior na primavera (Carreto et al. 1995). Águas ricas em nutrientes, picnoclina rasa e a influência da PRP parecem favorecer as florações *Gyrodinium cf. aureolum* (Negri et al. 1992).

Os nutrientes correlacionaram-se positivamente com os máximos de Chl *a* próximos à costa, onde as diatomáceas, seguidas de criptofitas tiveram a maior contribuição. A correlação com nutrientes também foi positiva (principalmente DIN) com dinoflagelados Tipo 2 na profundidade de máxima clorofila, e negativa com Primnesiofitas, Prochlorococcus e Synechococcus. A migração vertical diária é um importante mecanismo na ecologia dos dinoflagelados pelo qual conseguem acessar a radiação fotossinteticamente ativa, movendo-se para próximo da superfície durante o dia e para camadas mais ricas em nutrientes à noite. Em ambientes estuarinos, são capazes de atravessar gradientes de salinidade e de temperatura (Jephson 2012). Como as maiores concentrações de nitrogênio, fósforo e silicato inorgânicos dissolvidos estavam abaixo da base da camada de mistura, em profundidade superior à 40m, pode-se explicar a vantagem de espécies com flagelos e com capacidade de deslocamento vertical, para otimizar o seu crescimento e sobrevivência. É possível que dinoflagelados mixotróficos se acumulem na picnoclina para explorar uma combinação ótima de disponibilidade de presas, nutrientes e luz, favorecidos em uma coluna de água estável (Jephson & Carlsson 2009). Neste estudo, verificou-se que a distribuição dos dinoflagelados auto e mixotróficos foi mais superficial do que as espécies

heterotróficas, enfatizando a relação da distribuição vertical com a luz e a capacidade da migração em colunas de água estáveis.

A presença de dinoflagelados do Tipo 2, especialmente Gymnodiniales como cf. *Karenia*, é de particular interesse, pois estão adaptados para arrasto e dispersão nas correntes costeiras, podem ser acumulados em sistemas de frentes e incluem espécies tóxicas (Smayda 2002). Os resultados deste estudo enfatizam a possibilidade de que suas florações possam ocorrer na região de estudo. A presença de uma população “inóculo” representa uma condição essencial, sendo o sucesso posterior influenciado pelas taxas de crescimento e de dispersão (“pelagic seed bank” hypothesis, Smayda 2002). As maiores densidades de cf. *Karenia* spp. foram verificadas em zona de frente pelo encontro de água da pluma do rio da Plata, de menor salinidade, com a Água Subtropical de Plataforma (ASTP), indicando a sua adaptação a um maior grau de mistura, como proposto por Smayda (2002) e também evidenciado por Carreto et al. (2001), que registraram uma floração massiva (8- 9 milhões de Cel/ L) de *Gymnodinium* sp. em águas costeiras no sul do Chile, durante a primavera, causando uma alta mortalidade de mariscos, salmão de cultivo e outros peixes. O perfil pigmentar da espécie foi similar ao de outras espécies consideradas ictiotóxicas (*G. mikimotoi*, *G. breve*, *G. galatheanum*) e dos dinoflagelados Tipo II registrados neste estudo. É importante ressaltar que existe uma grande dificuldade para identificar espécies atecadas que deterioram-se facilmente, impossibilitando a observação de estruturas cruciais para o seu diagnóstico, como a elucidação do percurso da linha apical, poro ventral e elementos de ultra-estrutura do amfiesma (Takayama 1985), tornando-se indispensável a observação de células vivas e análise da composição molecular (Hoppenrath et al. 2009).

Em síntese, ao largo da desembocadura da Lagoa dos Patos a contribuição dos dinoflagelados foi significativa no verão de 2013. Houve uma clara separação das amostras ao longo do gradiente costa-talude, no qual as diatomáceas predominaram nas estações costeiras e coluna de água homogênea, sendo substituídas por dinoflagelados em condições de estratificação em direção ao talude. Organismos picoplanctônicos estavam presentes principalmente em amostras superficiais, com baixa concentração de nutrientes. Ao longo do gradiente, dois tipos de dinoflagelados foram verificados: Tipo 1 (contendo peridinina, *Prorocentrum* e *Scrippsiella*) com uma pequena contribuição nas duas estações próximas à costa, e Tipo 2 (contendo fucoxantina, *Gymnodiniales* (5-10 μm), cf. *Karenia* e *Katodinium*.), com uma contribuição maior que 50% do total de Chl *a* nas estações situadas na plataforma continental, principalmente em profundidade com máximo de Chl *a*. A biomassa de dinoflagelados foi positivamente correlacionada com a Frequência de Brünt-Väisälä reforçando o papel da estratificação na estruturação da comunidade fitoplanctônica.

REFERÊNCIAS

ABREU PC, C HARTMANN & C ODEBRECHT. 1995. Nutrient rich salt-water and its influence on the phytoplankton of the Patos Lagoon estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* (40): 219-229.

ARAÚJO RG, SZ SOUZA, CRB MENDES, VM TAVANO, RC POLLERY & CAE GARCIA. 2012. Brazil-Malvinas confluence: effects of environmental variability on phytoplankton community structure. *J Plank Res.*, 34 (5): 399- 415.

BHATTACHARYA, D. 1997. *Origins de Algae and their Plastids*. New York: Springer.

BRAGA ES, VC CHIOZZINI, GBB BERBEL, JCC MALUF, VMC AGUIAR, M

- CHARO, D MOLINA, SI ROMERO & BB EICHLER. 2008. Nutrient distributions over the Southwestern South Atlantic continental shelf from Mar del Plata (Argentina) to Itajaí (Brazil): Winter-summer aspects. *Cont. Shelf Res.* 28: 1649-1661.
- BRANDINI FP & LF FERNANDES. 1996. Microalgae of the continental shelf off Paraná State, southeastern Brazil: a review studies. *Rev. bras. oceanogr.*, 44(1): 69- 80.
- CARRETO JI, VA LUTZ, MO CARIGNAN, AD CUCCHI & SG MARCO. 1995. Hydrography and chlorophyll a in a transect from the coast to shelf-break in the Argentinian Sea. *Cont. Shelf Res.*, 15: 315- 336.
- CARRETO JI, N MONTOYA, R AKSELMAN, MO CARIGNAN, RI SILVA, & DAC COLLEONI. 2008. Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Río de la Plata maritime front. *Cont. shelf Res.* 28: 1589-1606.
- CASTRO, CG, AF RÍOS, MD DOVAL & FF PÉREZ. 2002. Nutrient utilisation and chlorophyll distribution in the Atlantic sector of the Southern Ocean during Austral Summer 1995-96. *Deep-Sea Res. II*, 49: 623-641.
- CIOTTI, AM. 1990. Fitoplâncton da plataforma continental do Sul do Brasil: clorofila a, feopigmentos e análise preliminar da produção primária (outubro de 1987 e setembro de 1988). Dissertação de mestrado. Universidade do Rio grande, Brasil. 86 p.
- CIOTTI AM, C ODEBRECHT, G FILLMANN & OO MOLLER JR. 1995. Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. *Cont. Shelf Res.* 15 (14): 1737-1756.
- FALKOWSKI PG, R GAN & K WYMAN. 1985. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr.*, 30: 311–321.
- FERNANDES LF & FP BRANDINI. 1999. Comunidades microplanctônicas no oceano atlântico sul ocidental: biomassa e distribuição em novembro de 1992. *Rev. bras. oceanogr.*, 47(2): 189- 205.
- FERRARI, GC. 2008. Fitoplancton del Estuario del Rio de La Plata y Frente Oceanico: Su relacion com las massas de água. Dissertação de Mestrado. Universidade de la República, Uruguay. 113 p.
- GAETA SA & FP BRANDINI. 2006. Produção primária do fitoplâncton na região entre o Cabo de São Tomé (RJ) e o Chuí (RS). In: CLDB Rossi-Wongtschowski & LS Madureira (coord). O Ambiente oceanográfico da Plataforma Continental e do Talude na Região Sudeste-Sul do Brasil. pp. 219-264. Editora da USP. São Paulo.

- GARCIA VMT & DA PURDIE. 1992. The influence of irradiance on growth, protosynthesis and respiration of *Gyrodinium aureolum*. *J Plankton Res.*, 14: 1251-1265.
- HALLEGRAEFF, GM, ANDERSON D & AD CEMBELLA. 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae. Manual on Oceanographic Methodology 11, UNESCO, Paris. 793p.
- HIGGINS HW, SW WRIGHT & L SCHLÜTER. 2011. Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds.) *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, pp 845.
- HOLLIGAN, PM AND DS HARBOUR. 1977. The vertical distribution and succession of phytoplankton in the western English Channel in 1975 and 1976. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 57: 1075–1093.
- HOPPENRATH M, M ELBRACHTER & G DREBES. 2009. Marine Phytoplankton: Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. Germany: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller) Stuttgart. 264 p.
- IRIARTE JL & P BERNAL. 1990. Vertical distribution of diatoms and thecate dinoflagellates in the Gulf of Arauco: species composition, relative abundance, and the chlorophyll maximum layer. *Sci Mar.*, 54 (4): 389- 399.
- ISLABÃO, CA. 2010. Dinoflagelados do micróplâncton da plataforma continental e talude do extremo sul do Brasil (inverno 2005; verão 2007). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil. 107 p.
- JEFFREY SW, WW SIMON & M ZAPATA. 2011. Microalgal classes and their signature pigments. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds.) *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, pp 845.
- JEPHSON T & P CARLSSON. 2009. Species- and stratification-dependent diel vertical migration behavior of three dinoflagellate species in a laboratory study. *J. Plankton Res.*, 31(11): 1353- 1362.
- JEPHSON T, T FAGERBERG, P CARLSSON. 2011. Dependency of dinoflagellate vertical migration on salinity stratification. *Aquatic Microbial Ecol.*, 63: 255–264.
- KARA AB, PA ROCHFORD & HE HULBURT. 2000. An optimal definition for ocean mixed layer depth. *J Geophys Res.*, 105(7): 803- 825.
- LALLI, C & T PARSONS. 1993. *Biological Oceanography: An Introduction*. Butterworth & Heinemann Ltd. UK. 301 p.

- LATASA M. 2007. Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. *Mar Ecol Prog Ser.*, 329: 13–21.
- LOHRENZEN CJ. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 13; 223–227.
- MARGALEF R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta.*, 1: 493–509.
- MATANO RP, ED PALMA & AR PIOLA. 2010. The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean Sci.*, 6: 983–995.
- MENDES CR, C SÁ, J VITORINO, C BORGES, V GARCIA & V BROTAS. 2011. Spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Nazaré submarine canyon region (Portugal); HPLC- CHEMTAX approach. *Journal of Marine Systems.*, 87: 90–101.
- MENDES CRB, R KERR, VM TAVANO, FA CAVALHEIRO, CAE GARCIA, DRG DESSAI & N ANILKUMAR. 2015. Cross-front phytoplankton pigments and chemotaxonomic groups in the Indian sector of the Southern Ocean. *Deep-Sea Res II., Tropical Studies in Oceanography.*, 118; 221–232.
- MIRANDA LB. 1972. Propriedades e variáveis físicas das águas da plataforma continental do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- MOLLER, OO, AR PIOLA, AC FREITAS & EJD CAMPOS. 2008. The effects of river discharge and seasonal winds on the shelf off southeastern South America. *Cont. Shelf Res.*, 1607–1624.
- MONTRESOR M, S SGROSSO, G PROCACCINI & WHCF KOOISTRA. 2003. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species. *Phycologia.*, 42: 56–70.
- MOREIRA D, H LeGUYADER & H PHILLIPE. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature.*, 405: 69– 72.
- NEGRI RM, JI CARRETO, HR BENAVIDES, R AKSELMAN & VA LUTZ. 1992. An usual bloom of *Gyrodinium* cf. *aureolum* in the Argentine sea: community structure and conditioning factors. *J Plankton Res.*, 14 (2): 261- 269.
- ODEBRECHT, C & VMT GARCIA. 1998. In: SEELIGER U, ODEBRECHT C & CASTELLO JP (Eds.) Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande: *Ecoscintia* 341 p.

- PALMER, JD. 2003. The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and who dunit? *J. Phycol.* 39: 4- 11.
- PIOLA, AR, EJD CAMPOS, OO MOLLER, M CHARO & C MARTINEZ. 2000. Subtropical Shelf Front off eastern South America. *Journal of Geophysical Research.* 105 (C3): 6565-6578.
- PIOLA, AR, OO MOLLER, RA GUERRERO & EJD CAMPOS. 2008. Variability of the subtropical shelf front off eastern South America: Winter 2003 and summer 2004. *Cont. Shelf Res.* 28: 1639-1648.
- RICHARDSON K, AW VISSER & F BO PEDERSEN. 2000. Subsurface phytoplankton blooms fuel pelagic production in the North Sea. *J. Plankton Res.*, 22: 1663–1671.
- RYTHER JH. 1956. Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity. *Limnol Oceanogr.*, 1: 61- 70.
- SCHLÜTER L, P HENRIKSEN, TG NIELSEN & HH JAKOBSEN, 2011. Phytoplankton composition and biomass across the Southern Indian Ocean. *Deep-Sea Res I.*, 58: 546–556.
- SHERR EB & BF SHERR. 2007. Heterotrophic dinoflagellates: a significant component of microzooplankton biomass and major grazers of diatoms in The sea. *Mar Ecol Prog Ser.*, 352: 187-197.
- SMAYDA TJ & CS REYNOLDS. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J Plankton Res.* ,23(5): 447- 461.
- SMAYDA, TJ. 2002. Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks”. *Harmful Algae*, 1, 95-112.
- SMAYDA TJ & VL TRAINER. 2010. Dinoflagellate blooms in upwelling systems: Seeding, variability, and contrasts with diatom bloom behaviour. *Progress in Oceanography.*, 85: 92–107.
- TAYLOR FJR. 1987. The biology of dinoflagellates. *Botanical Monographs.*, 21. 785 p.
- TAYLOR FJR, M HOPPENRATH & JF SALDARRIAGA. 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodivers Conserv.*, 17: 407–418.

- TER BRAAK CJF & SMILAUER P. 2002. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, New York, USA, p. 500.
- UTERMÖHL H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie.*, 9:1-38.
- WESTON K, L FERNAND, DK MILLS, L DELAHUNTY & J BROWN. 2005. Primary production in the deep chlorophyll maximum of the central North Sea. *J. Plankton Res.*, 27(9): 909–922.
- WRIGHT SW & SW JEFFREY. 2006. Pigment markers for phytoplankton production. In: Volkmann JK (Ed.) *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Springer-Verlag, Berlin, pp, 71- 104.
- WRIGHT SW, A ISHIKAWA, HJ MARCHANT, AT DAVIDSON, RL VAN DEN ENDEN & GV NASH. 2009. Composition and significance of picophytoplankton in Antarctic waters. *Polar Biol.*, 32: 797–808.
- ZAPATA M, S FRAGA, F RODRÍGUEZ & J GARRIDO. 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar Ecol Progr Ser.*, 465: 33–52.

Fig 1: Transecto costa- talude realizado no verão de 2013 no sul do Brasil: a) salinidade superficial ao longo do transecto elucidando a intrusão de uma frente horizontal formada pela Pluma do Rio da Prata e b) temperatura superficial média semanal (MODIS-Aqua). As estações de coleta estão representadas por números de 1 a 7.

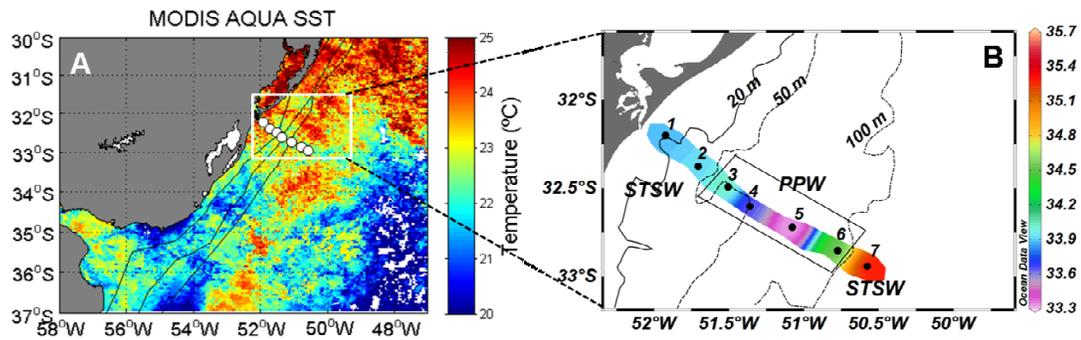


Fig 2: Distribuição horizontal e vertical da Radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (a), Temperatura (b), Salinidade (c), valor (Ciclos/hora) de Brünt-Väisälä (d), Nitrogênio inorgânico dissolvido (DIN) (e), Fosfato inorgânico dissolvido (f), Silicato inorgânico dissolvido e razão N:P (h) ao longo do transecto costa-talude. As linhas verticais indicam as estações nas quais foram realizados os perfis verticais e coleta de água.

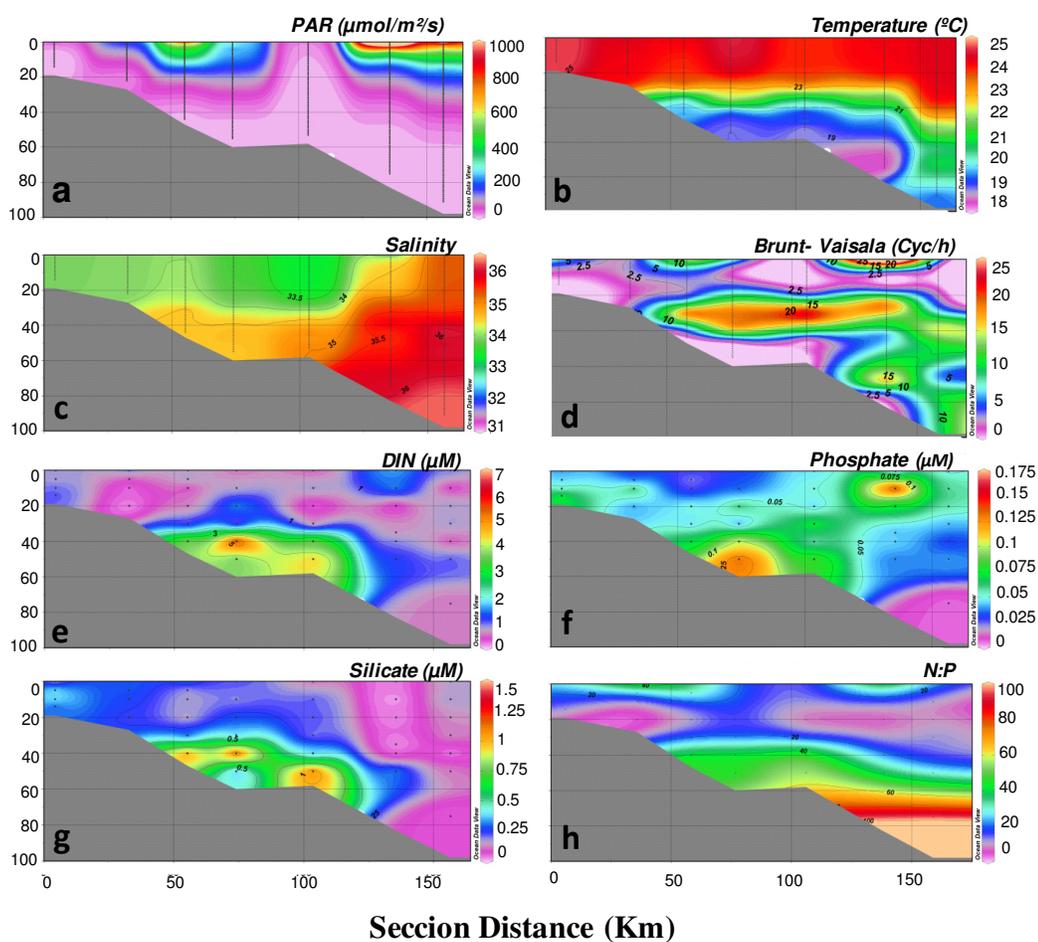


Fig 3: Distribuição de Diatomáceas (a), Dinoflagelados autotróficos (b), Dinoflagelados heterotróficos (c) e cocóides (1-10 μm) (d) ao longo do transecto costa-talude. Os pontos verticais indicam as profundidades coletadas.

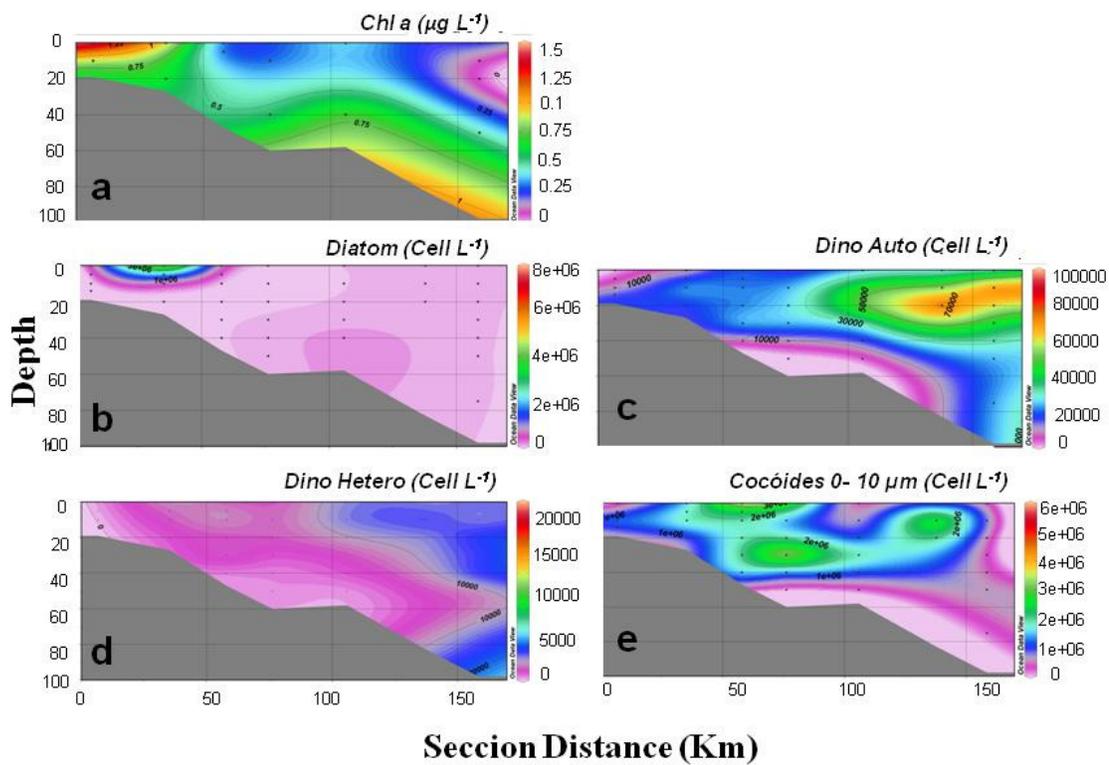


Fig 4: Contribuição relativa dos principais grupos do fitoplâncton pelo total de clorofila *a* coletado em superfície (Surface) e na profundidade com máxima clorofila (DCM), estimada a partir dos dados de pigmentos (HPLC) usando o software CHEMTAX.

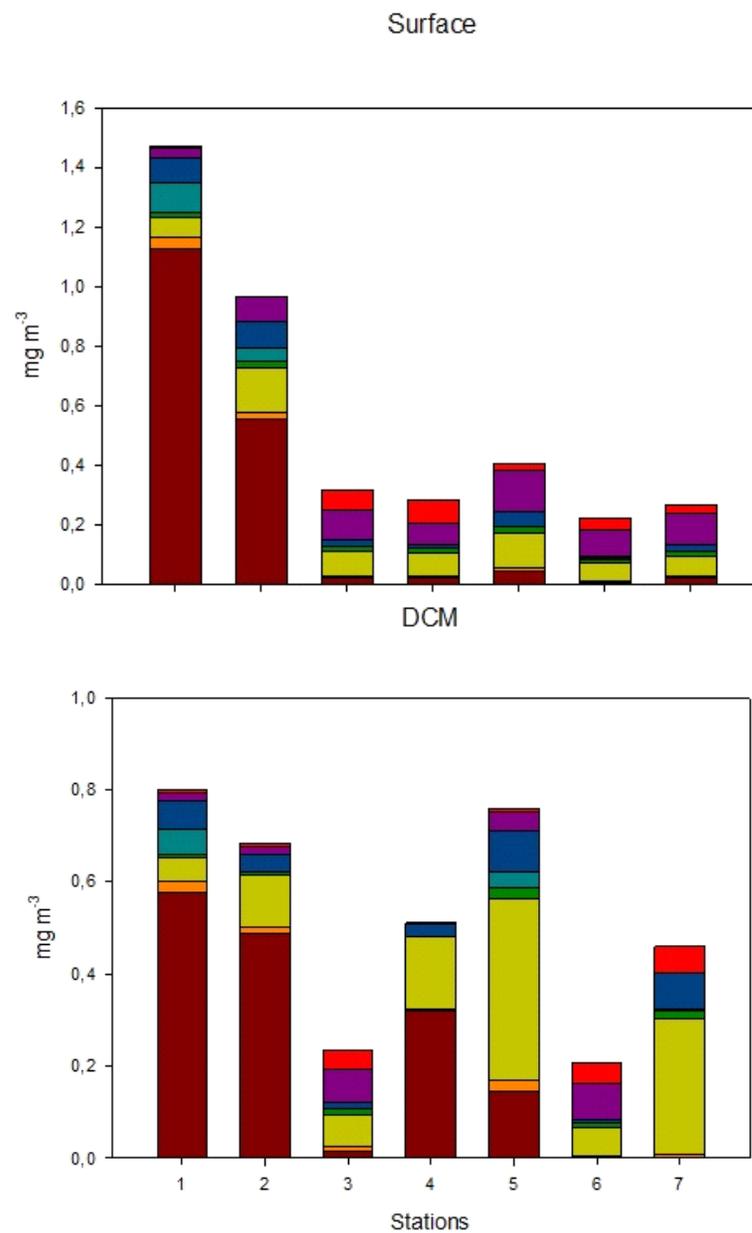
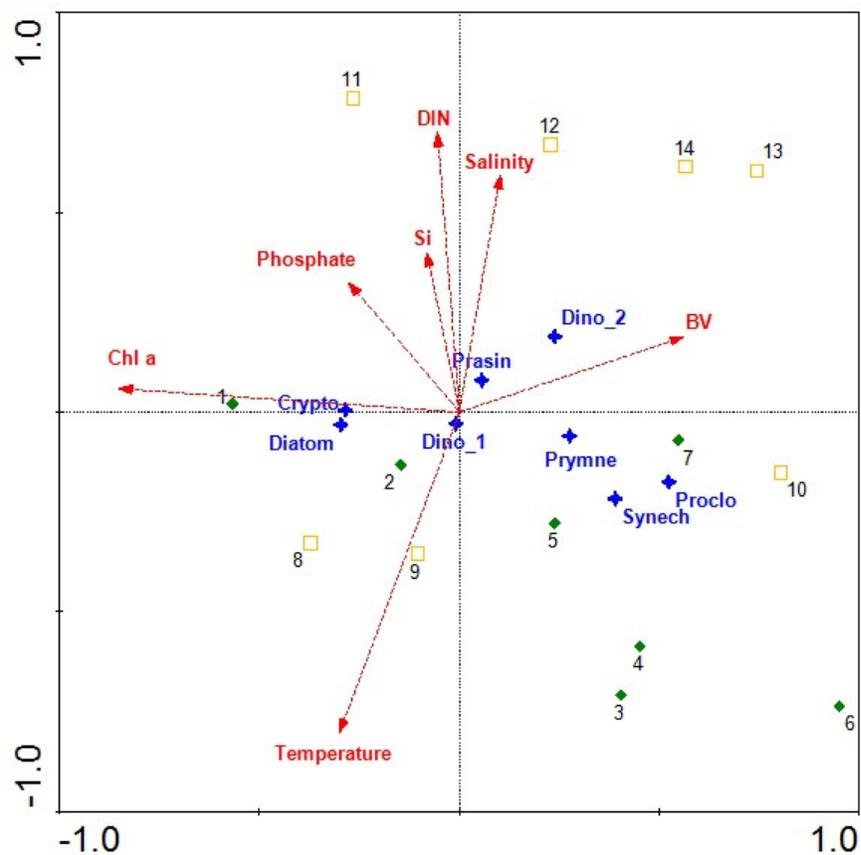


Fig 5: Diagrama da Análise de Correspondência Canônica (CCA) relativo aos dados absolutos da contribuição dos grupos do fitoplâncton: Diatomáceas (Diatom), Criptofitas (Crpto), Dinoflagelados com Peridinina (Dino_1), Dinoflagelados com Fucoxantina (Dino_2), Prasinofitas (Prasi), Primnesiofitas (Prymne), Prochlorococcus (Proclo) e Synechococcus (Synech). As variáveis consideradas foram temperatura (Temperature), salinidade (Salinity), frequência de Brünt-Väisälä (BV), nitrogênio inorgânico dissolvido total (DIN), fosfato (Phosphate), silicato (Silicate) e clorofila a (Chl a). As estações da superfície estão indicadas por losângulos e as estações na DCM por quadrados.



APÊNDICE 2

Apresentação

Este apêndice refere-se ao artigo intitulado “Influence of salinity on the growth of *Akashiwo sanguinea* and *Prorocentrum micans* (Dinophyta) under acclimated conditions and abrupt changes”. Este artigo foi aceito em Março de 2015 no periódico “Marine Biology Research Journal”. **DOI:** 10.1080/17451000.2015.1031798.

Influence of salinity on the growth of *Akashiwo sanguinea* and *Prorocentrum micans* (Dinophyta) under acclimated conditions and abrupt changes

CAROLINA ANTUARTE ISLABÃO* AND CLARISSE ODEBRECHT

Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Campus Carreiros, Carreiros RS, Brazil

SALINITY INFLUENCE: ACCLIMATION VERSUS ABRUPT CHANGES

* corresponding author: Carolina Antuarte Islabão, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Itália Ave, km 8, CEP 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

Tel: 55 53 32336535

E-mail: gcarolislabao@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of salinity (S) fluctuations on the growth and carrying capacity of the dinoflagellates *Akashiwo sanguinea* and *Prorocentrum micans*, isolated from coastal water in southern Brazil, and the relationship between salinity and their distribution in the environment. The effect of salinity on these species was tested under acclimated conditions and abrupt salinity changes. Cultures were acclimated for one month (S 10, 15, 20, 25, 30, and 35), and the optimum growth was established. The acclimated cultures that presented optimal growth were transferred, without acclimation, to higher and lower salinities. *A. sanguinea* showed maximum growth at salinity 25 with a broad tolerance (S 10-35), and carrying capacity was highest and lowest at salinity 30 and 10, respectively. *P. micans*

grew better and had a higher carrying capacity at a higher salinity (25-35). The response of cells to salinity variation was also species specific: no change (*P. micans*) or an increased growth rate (*A. sanguinea*). In the surf zone of Cassino Beach, both species had higher frequency and cell density in summer and autumn. The relationship between salinity and cell density coincided with the results obtained in the laboratory. The ability to grow under salinity changes is an important mechanism that leads to dinoflagellate blooms. With the increasing rainfall in southern Brazil as a result of climate change, *A. sanguinea* will likely be more successful than *P. micans* and form blooms in this region, due to its broad range of salinity tolerance.

Key words: salinity, acclimation, Dinoflagellates growth

Introduction

Salinity variations influence the metabolic responses, species selection and distribution of the entire biota in marine environments, and this is especially true in estuaries and coastal regions. The distribution of microalgae species is influenced by salinity, whereas their growth and abundance are mainly determined by the availability of light, temperature and nutrients (Smayda 1980; Kirst 1989). In general, estuarine phytoplankton species exhibit a wide tolerance to salinity variations and even grow in low saline conditions (euryhaline). Unlike true marine species that cannot tolerate a wide salinity range (stenohaline), coastal species take an intermediate position (Kirst, 1989). Freshwater species are less tolerant and mostly replaced by marine species in low salinity (oligohaline) water (Smayda 1983). Interspecific differences in tolerance to salinity fluctuations play an important role in structuring phytoplankton communities in environments with large salinity fluctuations (Kirst 1989; Flöder et al. 2010). In recent

years, climate change has been intensifying the pressures on marine plants and animals. For instance, rainfall shifts will influence salinity changes and phytoplankton species composition, thus affecting the functioning of coastal ecosystems (Flöder & Burns 2004; Flöder et al. 2010; IPCC 2013, Bollmann et al. 2010).

The effect of osmotic stress on the growth of diatoms was studied in freshwater (Fodorpataki & Bartha 2004) and marine species (Qasim et al. 1972; Sigaud-Kutner & Aidar, 1995; Radchenko & Il'yash 2006; Balzano et al. 2010). The effect of salinity on growth physiology, toxin production and cell size was investigated for the harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* Margalef, *Alexandrium* spp., *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann) Butschli, *Ostreopsis ovata* Fukuyo, *Azadinium spinosum* Elbrächter & Tillmann and *Karenia brevis* (C.C. Davis) G.Hansen & Ø. Moestrup (Kim et al. 2004; Lim & Ogata 2005; Röder et al. 2012; Yamaguchi et al. 2012; Errera et al. 2012; Jauffrais et al. 2013; Sunda et al. 2013). Yamamoto et al. (2013) demonstrated the relationship between the initiation of the bloom of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, emended U. John and salinity in Osaka Bay, Japan, and a subsequent accumulation of paralytic shellfish toxin. A decrease of 2 salinity units suppressed the bloom peak of *A. tamarense* and anticipated it. Inversely, an increase of 2 salinity units intensified and delayed the bloom by approximately one week. Responses to salinity changes are species specific and depend on the absolute salinity value, as well as the duration of change and osmotic stress (Qasim et al. 1972).

The effect of environmental conditions on the growth and physiology of microalgae is usually assessed in laboratory experiments following the acclimation of the strains. Acclimation is achieved through multiple transfers to new culture media (batch culture) or continuous supply (chemostat), allowing the physiological

adjustment. However, the acclimation time in laboratory experiments is not standardised and varies between days (Yamamoto et al. 2002) and months (Kim et al. 2004; Matsubara et al. 2007), making the comparison of results sometimes difficult. In addition, it may be questioned if acclimation is really necessary, especially in coastal and estuarine environments, where the populations are often subjected to abrupt salinity changes. For instance, in the Patos Lagoon Estuary and adjacent Cassino Beach in southern Brazil, large salinity variations occur due to wind induced horizontal circulation. Phytoplankton in this area are subjected to salinity changes of 10 to 20 units in just a few hours, generally between salinities 10 and 30 (Odebrecht et al. 1995; Abreu et al. 2010; Fujita and Odebrecht 2007). Considering these large salinity fluctuations, this study aimed to evaluate the hypothesis that the growth rate of two euryhaline dinoflagellates is similar with and without salinity acclimation, under abrupt salinity change. For this purpose, the optimum growth rate and the carrying capacity of two worldwide distributed dinoflagellate species, isolated from coastal water in southern Brazil, *Prorocentrum micans* Ehrenberg and *Akashiwo sanguinea* (K. Hirasaka) G. Hansen & Ø. Moestrup were compared under acclimated conditions and following abrupt salinity change. In addition, the relationship between salinity and cell density of both species was evaluated in the surf zone of the sandy Cassino Beach to determine if the laboratory results corresponded to the environmental conditions regarding the optimum salinity range of *P. micans* and *A. sanguinea*.

Materials and methods

Cells of *A. sanguinea* (AKASAN01-B) and *P. micans* (PROMIC01-B) sampled in the Patos Lagoon Estuary inlet in November 2011 (20 °C, salinity 30) were isolated, washed and maintained in medium L1 (Guillard & Hargraves 1993) at salinity (S) and temperature conditions found in the field (S 30; 20±1 °C), photosynthetically active radiation (PAR) of approximately 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 12:12 h light:dark.

Acclimation experiment

Cells were acclimated to the salinity range frequently found in the Patos Lagoon and adjacent Cassino Beach. The L1 culture medium was prepared by diluting seawater with distilled water to achieve final salinities of 10, 15, 25, 30 and 35. Triplicate original cultures were acclimated in each salinity value through at least three transfers over a month during the exponential growth phase. Cells in the early exponential growth phase were inoculated into Erlenmeyer flasks (125 ml) containing culture medium with a different salinity. The growth was monitored daily by counting cells in the samples fixed with neutral Lugol solution (1%) in Sedgewick Rafter chambers and observed under an inverted microscope (OLYMPUS IX51). The specific growth rate (μd^{-1}) was calculated during the exponential growth phase, when the cell concentrations were log (ln) transformed and a linear regression was applied (Zar 1996; Wood et al. 2005). The carrying capacity (maximum cell density) in the cultures was estimated as the average concentration of the maximum cell density based on a logistic curve (Xin et al. 2011).

Salinity changes experiment

To evaluate the response under abrupt salinity changes, the optimum growth rate obtained in the test with acclimation (optimum salinity: S 25, *A. sanguinea*; S 30, *P. micans*) was compared with the growth rate in treatments without acclimation in higher (S 35) and lower (S 15, *A. sanguinea*; S 20, *P. micans*) salinity. The triplicate cultures were maintained in the same experimental conditions, and cell growth and carrying capacity were estimated as previously described. Acclimated cultures of *A. sanguinea* and *P. micans* at optimum salinity were inoculated at the beginning of the exponential phase in vials (125 ml) containing culture medium with S 15 and S 35 for *A. sanguinea*, and S 20 and 35 for *P. micans*. The low salinity tested in this experiment was distinct for both species, because the growth and carrying capacity of *P. micans* were clearly inhibited at salinity 15 with acclimation.

Salinity and cell density of A. sanguinea and P. micans at Cassino Beach

The relationship between the salinity and cell density of *A. sanguinea* and *P. micans* was evaluated in the highly variable surf zone of Cassino Beach to evaluate whether the results obtained in the laboratory corresponded to environmental conditions regarding the salinity optimum range of both species. The environmental data for salinity, occurrence frequency and cell density of the investigated species were obtained monthly between 1994 and 2013 at the surf zone of Cassino Beach, in the framework of the Brazilian Long Term Ecological Research (BR-LTER). The details of the sampling procedures and analytical methods were described in Odebrecht et al. (2010). The abundance of cells of *A. sanguinea* and *P. micans* was estimated using the sedimentation method (Utermöhl 1958). The number of observations of these species in monthly

samples was determined as frequency for each season of the year, considering 100% the total of 57 months per season during the 20 years, that is 228 (N months analysed) per season ($228/4 = 57$).

Statistical analysis

The salinity effect on the growth rate of both species was evaluated by variance analysis (ANOVA) and Tukey's test *a posteriori*, with significance level α of 0.05 using the Statistica 7 program (Stat Soft 2004). To test the relationship between the salinity and the cell density of both species, a generalized linear model (GLM) with a negative binomial distribution was applied to the 20-year time series from Cassino Beach. This test was run with the help of the package MASS functions (Venables & Ripley 2002) within the R statistical software environment (R Development Core Team, 2014).

Results

A. sanguinea

The growth rate of *A. sanguinea* in the acclimation experiment (μ 0.26-0.76 d⁻¹) showed a wide salinity tolerance at the tested salinities with the significantly highest value at S 25 (Figure 1a). The carrying capacity was the greatest at higher salinities (S \geq 25) than at lower salinities, with average values of $>7,000$ cell ml⁻¹ and $<2,500$ cell ml⁻¹, respectively (Figure 2a). When subjected to salinity changes (S 15 and 35), the *A. sanguinea* growth rate was similar in both treatments (μ 0.43). The growth rate was significantly lower than at the optimum salinity of 25 (μ 0.70), but higher than the value found at the same salinity with acclimation (Figure 1a). The carrying capacity in the

treatments with salinity changes was similar (4,000 average cell mL⁻¹) between the treatments, but higher than in the acclimated cultures for S 15 and lower for S 35.

P. micans

The growth rate of *P. micans* in the acclimation experiment (μ 0.11-0.41 d⁻¹) was significantly higher at S 25 to S 35 and lowest at S 15 (Figure 1(b)). The carrying capacity presented a similar pattern, with the highest value (~50.000 cells mL⁻¹) achieved at higher salinity (25-35), and the lowest at S 15 (~1.250 cells mL⁻¹) (Figure 2(b)). When submitted to salinity changes (S 20 and 35), the growth rate and carrying capacity of *P. micans* did not differ significantly between these treatments or between salinities with and without acclimation (Figure 1(b)).

Seasonal variation of A. sanguinea and P. micans at Cassino Beach surf zone

In the surf zone of Cassino Beach, the occurrence frequency of *A. sanguinea* and *P. micans* was 18% and 20%, respectively, based on monthly phytoplankton samples analysed between 1994 and 2013 (N 235). Both species presented a seasonal pattern, with higher frequency and cell density in summer and autumn (Figure 3). *A. sanguinea* (average 12,000 cells L⁻¹) occurred in the salinity range of 14-31, and the temperature was between 12-30 °C, with the highest density in the autumn (maximum 170,000 cells L⁻¹, salinity 20, temperature 23 °C). *P. micans* (average 1,772 cells L⁻¹) occurred in a higher salinity range (25-35) when compared to *A. sanguinea*. It occurred at a similar temperature (11-29 °C) as *A. sanguinea*, but had a lower cell density (maximum 6,400 cells L⁻¹). The relationship between salinity and cell density was significant ($p < 0,001$) for both species. *A. sanguinea* was negatively related to salinity (coefficient -0,29) while *P. micans* was positively related to salinity (coefficient 0,05).

Discussion

The euryhaline response of the dinoflagellates *A. sanguinea* and *P. micans* observed in the growth rate assays was within the limits reported elsewhere (Matsubara et al. 2007; Kain et al. 1960; Guimarães & Rörig 2004). The osmotic shock resulting from salinity fluctuations affects the phytoplankton growth rate (Kirst 1989), but it is also recognised that estuarine species may adjust the concentration of internal cytoplasm (Darley 1982). Our results demonstrated that both species had efficient mechanisms for osmotic regulation that favoured growth under abrupt salinity changes, but this was more pronounced for *A. sanguinea*. *A. sanguinea* had a wider salinity tolerance (10-35) than *P. micans* (20-35). Although a relatively high growth rate was observed for both species with acclimation at low salinity, they did not achieve high cell numbers. The exposure of the cells to abrupt salinity changes resulted in similar growth rates and carrying capacity between low and high salinity. The growth rate of *A. sanguinea* was stimulated when the cells were exposed to abrupt changes. The abrupt salinity variation did not elicit significant changes to the growth rate of *P. micans* when compared to the acclimated culture.

There is little information regarding salinity acclimation in the literature, and our results supported the fact that the duration of the acclimation period influenced the growth rate. Cells growing in optimum conditions can maintain and even increase their growth rate when subjected to salinity changes. For *P. micans*, the results supported our initial hypothesis that the growth rate was similar with and without salinity acclimation, under abrupt salinity changes. Kain et al. (1960) also showed a relatively steady optimal growth (μ 0.30 d⁻¹) when exposed to salinities between 20 and 40 when inoculated from S 35, supporting a general pattern for euryhaline species. However, the different growth

rate in the acclimated versus non-acclimated conditions observed for *A. sanguinea* indicates the existence of species specific metabolic adaptation mechanisms, and that measurements made after acclimation in the laboratory may not directly apply to the environment.

The optimum salinity of the cultures coincided with the highest cell density observed in the environment. For *P. micans*, the positive correlation between salinity and cell density in the surf zone of Cassino Beach indicated that salinity played a role in influencing its distribution and concentration. Interestingly, for *A. sanguinea*, the maximum growth rate in our study was similar to the value found by Matsubara et al. (2007) with a strain from Haakata Bay at the same temperature and salinity (0.99 div day⁻¹). The preference of *A. sanguinea* for lower salinity favours their blooms in coastal areas influenced by freshwater discharge. In Hakata Bay, high abundances coincided with the rainy season (Matsubara et al. 2007), similar to the results in the surf zone of Cassino Beach. Salinity was negatively related to cell density, and the highest concentration at a salinity of 23 was close to the maximum growth rate observed in the culture. *A. sanguinea* reached a much higher cell concentration in this environment than the carrying capacity observed in the cultures, indicating that other factors influenced cell density, possibly those related to the freshwater discharge of Patos Lagoon and its coastal plume (Odebrecht et al. 2010). The plume front and lateral intrusions may generate layers of lateral transport of phytoplankton- or nutrient- rich waters into adjacent waters (Durham & Stoker 2012), and thus physically concentrate the cells. No harmful effect was observed along the southern Brazil coast when blooms of *A. sanguinea* were observed, although this species was associated with the death of seabirds (Phillips et al. 2011), crustaceans and fish (Figueroa et al. 2011) elsewhere.

The dinoflagellates *A. sanguinea* and *P. micans* present a wide geographic distribution in environments with large salinity fluctuations (see Table I). Their success is most likely related to salinity change, as discussed above, but other factors influence the seasonal pattern (summer-autumn species). These species have an advantage in their multiple adaptive strategies and diverse habitat preferences (Smayda & Reynolds 2003), but the seasonal pattern agrees with the general idea of dinoflagellates dominating summer and autumn blooms after the main period of diatom blooms (Hoek et al. 1995).

In the climate change scenario, shifts in the rainfall regime and salinity of coastal waters represent a stressor that can alter community composition, diversity and dominance of primary producers (Flöder et al. 2010). The salinity effect varies with species and regions (Lim & Ogata 2005); however, the capacity of rapid adjustments under abrupt salinity changes, as observed for *A. sanguinea* and *P. micans*, represents an adaptive advantage for survival and success. The optimum growth rate and carrying capacity obtained in the laboratory for *A. sanguinea* and *P. micans*, and the wider salinity range for the former, agreed with the salinity conditions in which they were observed in the surf zone of the subtropical Cassino Beach. Considering the climate change predictions of increased rainfall in this geographical area in the future (IPCC 2013), our results supported that *A. sanguinea*, due to its wider salinity tolerance than *P. micans*, will likely succeed and form high density blooms in this region.

In the conceptual model codified by Margalef, the selection of harmful and benign red tide bloom species is viewed as being regulated by interactions mainly between turbulence, light availability, and nutrients (Smayda & Reynolds 2001; Smayda 2002). Given the importance of salinity and the changing rainfall regime

according to the climate change predictions, we suggest that this variable should be considered in species composition models.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Brazilian Long-Term Ecological Research (BR-LTER), through the Ministry of Science and Technology (MCT/CNPQ) and FAPERGS. Similarly, by Post Graduate Program in Biological Oceanography - FURG and Ministry of Education (CAPES).

References

- Abreu PC, Bergesch M, Proença LA, Garcia CAE, Odebrecht C. 2010. Short- and long-term chlorophyll *a* variability in the shallow microtidal Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. *Estuaries and Coasts* 33: 554-69.
- Alkawri AAS, Ramaiah N. 2010. Spatio- temporal variability of dinoflagellate assemblages in different salinity regimes in the west coast of India. *Harmful Algae* 9:153-62.
- Anselmo TPA. 2007. Monitorização do fitoplâncton no estuário do Tejo : contagem e identificação de espécies, índice de biomassa, análise pigmentar e resposta fotossintética. Master's Dissertation. Universidade de Lisboa. 78 pages. (in Portuguese)
- Balech E. 1988. Los dinoflagelados del Atlântico Sudoccidental. Madrid: Instituto Español de Oceanografía. 310 pages. (in Spanish)
- Balkis HAN. 2003. Seasonal variations in the phytoplankton and nutrient dynamics in the neritic water of Büyükçekmece Bay, Sea of Marmara. *Journal of Plankton Research* 25:703-17.

Balzano S, Sarno D, Kooistra W. 2010. Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten *Skeletonema* strains. *Journal of Plankton Research* 0:1-9.

Bass AE, Packard TT. 1977. Physical, chemical and biological observations from JOINT II R/V Alpha Helix, Leg 0, 5-20 March 1976. CUEA Data Report 41 pages.

Bollmann M, Bosch T, Colijin F, Ebinghaus R, Froese R, Güssow K, et al. 2010. World Ocean review 1. Maribus. 232 pages.

Braarud T. 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. In: Sears M, editor. *Oceanography*, Washington, D.C: American Association for Advancement of Science Publication 67:271-98.

Cardoso LS. 1998. Dinoflagelados da Ilha do Arvoredo e da Praia de Ponta das Canas, Santa Catarina, Brasil. *Biociências* 6:3-54. (in Portuguese)

Cullen JJ, Horrigan SG. 1981. Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Marine Biology* 62:81-9.

Darley WM. 1982. *Algal Biology: A physiological approach*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 168 pages.

Du X, Peterson W, McCulloch A, Liu G. 2011. An unusual bloom of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* off the central Oregon, USA, coast in autumn 2009. *Harmful Algae* 10: 784-93.

Durham WM, Stocker R. 2012. *Thin Phytoplankton Layers: Characteristics, Mechanisms,*

and Consequences. *Annual Review of Marine Science* 4:177-207.

Errera RM, Campbell L. 2012. Correction for Errera and Campbell, Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:17723-4.

Faust MA, Gulledge RA. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium* 42:1-144.

Figueroa RI, Vázquez JA, Massanet A, Murado MA, Bravo I. 2011. Interactive Effects of Salinity and Temperature on Planozygote and Cyst Formation of *Alexandrium Minutum* (Dinophyceae) in Culture 1. *Journal of Phycology* 47:13–24.

Flöder S, Burns CW. 2004. Phytoplankton diversity of shallow tidal lakes: influence of periodic salinity changes on diversity and species number of a natural assemblage. *Journal of Phycology* 40: 54-61.

Flöder S, Jaschinski S, Wells G, Burns CW. 2010. Dominance and compensatory growth in phytoplankton communities under salinity stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395:223-31.

Fodorpataki L, Bartha C. 2004. Salt stress tolerance of a freshwater green alga under different photon flux densities. *Studia Universitatis Babes Bolyai Biology* 2:86- 93.

Fujita CCO, Odebrecht C. 2007. Short-term variability of chlorophyll a and phytoplankton composition in a shallow area of the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Atlântica. Rio Grande* 29 (2):93-107.

Gameiro C, Cartaxana P, Cabrita MT, Brotas V. 2004. Variability in Chlorophyll and Phytoplankton Composition in an Estuarine System. *Hydrobiologia* 525:113-24.

Gayoso AM, Fulco VK. 2006. Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral pore occurrence in natural and cultured cells. *Harmful Algae* 5:233-41.

Gessner F, Schramm W. 1971. Salinity: Plants. In Kinne O, editor. *Marine Ecology* vol I, Environmental Factors 1:705-1083.

Guillard RRL, Hargraves PE. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycology* 32:234-6.

Guimarães, SCP, Rorig LR. 2004. Efeito da salinidade no crescimento dos dinoflagelados *Prorocentrum micans* Ehrenberg e *Prorocentrum* cf. *obtusum* Ostenfeld isolados da costa Catarinense – Brasil. *Revista Estudos de Biologia* 54:29-36. (in Portuguese)

Hodgkiss IJ, Lu S. 2004. The effects of nutrients and their ratios on phytoplankton abundance in Junk Bay, Hong Kong. *Hydrobiologia* 512:215-29.

Hoek VD, Mann DG, Jahns HM. 1995. *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press. 627 pages.

Hoppenrath M, Elbrachter M, Drebes G. 2009. *Marine Phytoplankton: Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt*. Stuttgart, Germany: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller). 264 pages.

Horner R, Garrison D, Plumley G. 1997. The ecology and oceanography of harmful algal blooms. *Limnology and Oceanography* 42:1076-88.

Ignatiades L, Skretas OG. 2010. A review on toxic and harmful algae in Greek coastal waters (E. Mediterranean Sea). *Toxins* 2:1019-37.

IPCC 2013. *Climate Change 2013. The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* 222 pages.

Jauffrais T, Sécheta V, Herrenknecht C, Truquet P, Véronique S, Tillmann U, et al. 2013. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Harmful Algae* 27:138-48.

Johnson WS, Allen DM. 2005. *Zooplankton of the Atlantic and Gulf Coasts: a Guide to their Identification and Ecology.* Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press. 379 pages.

Jeong HJ, Yoo YD, Park, Song JY, Kim ST, Lee SH, et al. 2005. Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquatic Microbial Ecology* 40:133-50.

Jessup DA, Miller MA, Ryan JP, Nevins HM, Kerkerling HA, Mekebri A, et al. 2009. Mass stranding of marine birds caused by a surfactant-producing red tide. *PloS One* 4: e4550.8 pages.

Kain JM, Fogg GE. 1960. Studies on the growth of marine phytoplankton. III. *Prorocentrum micans*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 39:33-50.

Katano T, Yoshida M, Yamaguchi S, Hamada T, Yoshino K, Hayami Y. 2011. Diel vertical migration and cell division of bloom-forming dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* in the Ariake Sea, Japan. Plankton and Benthos Research 6:92-100.

Kim D, Matsuyama Y, Nagasoe S, Yamaguchi M, Yoon Y, Oshima Y, et al. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). Journal of Plankton Research 26:61-66.

Kim G, Lee YW, Joung DJ, Kim KR, Kim K. 2006. Real-time monitoring of nutrient concentrations and red-tide outbreaks in the southern sea of Korea. Geophysical Research Letters 33:1-4.

Kirst GO. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40:21-53.

Kremer LM, Rosa ZM. 1983. Dinoflagelados do microplâncton de Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia 30:3-35. (in Portuguese)

Licea S, Zamudio ME, Luna R, Soto J. 2004. Free-living dinoflagellates in the southern Gulf of Mexico: Report of data (1979 – 2002). Physiological Research 52:419-28.

Lim P, Ogata T. 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). Toxicon 45:699-710.

Lizárraga IG, Orozco MLH, Schmidt CB, Casillas GS. 2001. Red tides along the coasts of Baja California Sur, México (1984 to 2001). *Oceanides* 16:127-34.

Macedo CX. 2007. Dinâmica Temporal de microalgas de zona de arrebentação na Praia dos Navegantes – SC. Master's Dissertation. Universidade Federal do Paraná. 95 pages. (in Portuguese)

Manjarrez JLP, Castro GG, Escamilla JH, Cepeda EO. 2001. Cysts of *Lingulodinium polyedrum*, red tide producing organism in the Todos Santos Bay (winter-spring, 2000). *Ciencias Marinas* 27: 543-58.

Marshall HG, Cohn MS. 1982. Seasonal Phytoplankton Assemblages in Northeastern Coastal Waters of the United States. NOAA technical memorandum nmfs-f/nec- 15. 36 pages.

Marshall HG. 1995. Succession of dinoflagellate blooms in the Chesapeake Bay, U.S.A. In: Lassus, P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C, editors. Harmful Marine Algal Blooms: Proceedings of the Sixth International Conference on toxicmarine phytoplankton, Nantes, France. 615-20.

Marshall HG. 2005. A review of phytoplankton composition within Chesapeake Bay and its tidal estuaries. *Journal of Plankton Research* 27:1083-102.

Matsubara T, Nagasoe S, Yamasaki Y, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, et al. 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342:226-30.

Nakamura H, Kobayashi J, Hirata Y. 1982. Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 250:113-18.

Neale PJ, Banaszak AT, Jarriel CR. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguinium* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology* 34:928-38.

Odebrecht, C, Rörig L, Garcia VMT & Abreu PC. 1995. Shellfish mortality and a red tide event in southern Brazil. In: Lassus P, Arzul G, Erard-Le Denn E, Gentien P & Marcaillou –Le Baut C, editors. Harmful marine algal blooms. Paris: Lavoisier Publishing, p 213-18.

Odebrecht C, Bergesch M, Rörig LR, Abreu PC. 2010. Phytoplankton Interannual Variability at Cassino Beach, Southern Brazil (1992–2007), with Emphasis on the Surf Zone Diatom *Asterionellopsis glacialis*. *Estuaries and Coasts* 33:570-83.

Park M, Cooney S, Kim J Coats D. 2002. Effects of parasitism on diel vertical migration, phototaxis/geotaxis, and swimming speed of the bloom-forming dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Aquatic Microbial Ecology* 29:11-18.

Peterson TD, Toews HNJ, Robinson CLK, Harrison PJ. 2007. Nutrient and phytoplankton dynamics in the Queen Charlotte Islands (Canada) during the summer upwelling seasons of 2001-2002. *Journal of Plankton Research* 29:219-39.

Phillips EM, Zamon JE, Nevins HN, Gobble CM, Duerr RS, Kerr LH. 2011. Summary of Birds Killed by a harmful algal bloom along the South Washington and North Oregon coasts during October 2009. *Northwestern Naturalist* 92:120-6.

Qasim SZ, Bhattathiri PMA, Devassy VP. 1972. The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Marine Biology* 12:200-6.

Quinlan EL, Philips EJ. 2007. Phytoplankton assemblages across the marine to low-salinity transition zone in a blackwater dominated estuary. *Journal of Plankton Research* 29:401-16.

R Development Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Radchenko IG, Il'yash LV. 2006. Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *The Biological Bulletin* 33:242-7.

Resende P, Azeiteiro UM, Gonçalves F, Pereira MJ. 2007. Distribution and ecological preferences of diatoms and dinoflagellates in the west Iberian Coastal zone (North Portugal). *Acta Oecologia* 32:224-35.

Röder K, Hantzsche MF, Gebühr C, Miene C, Helbig T, Krock B, et al. 2012. Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 15:59-70.

Rojas de Mendiola R. 1979. Red tide along the Peruvian coast. In: Taylor D L, Seliger H H, editors. Toxic Dinoflagellate Blooms (Proceedings of the 2nd International Conference). North Holland: Elsevier, p 183-190.

Sahraoui I, Bouchouicha D, Mabrouk HH, Halaili AS. 2013. Driving factors of the potentially toxic and harmful species of *Prorocentrum* Ehrenberg in a semi-enclosed Mediterranean lagoon (Tunisia, SW Mediterranean). *Mediterranean Marine Science* 14:353-62.

Shankle AM, Mayali X, Franks PJS. 2004. Temporal patterns in population genetic diversity of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 40:239-47.

Sigaud-Kutner TC, Aidar E. 1995. The influence of osmotic shocks on the growth rate and chlorophyll-a content of planktonic algae species. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 43:89-98.

Silva A, Palma S, Oliveira PB, Moita MT. 2009. Composition and interannual variability of phytoplankton in a coastal upwelling region (Lisbon Bay, Portugal). *Journal of Sea Research* 62: 238-49.

Smayda TJ. 1980. Phytoplankton species succession. In: Morris I, editor. *The physiological ecology of phytoplankton*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p 493-570.

Smayda TJ, Bienfang PK. 1983. Suspension properties of various phyletic groups of phytoplankton and tintinnids in an oligotrophic, subtropical system. *Marine Ecology* 4:289-300.

- Smayda TJ, Reynolds CS. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *Journal of Plankton Research* 23:447-61.
- Smayda TJ. 2002. Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks”. *Harmful Algae* 1:95-112.
- Smayda TJ, Reynolds CS. 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research* 49:95-106.
- Sunda WG, Burtleson C, Hardson DR, Morey JS, Wang Z, Wolney J, et al. 2013. Osmotic stress does not trigger brevetoxin production in the dinoflagellate *Karenia brevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(25):10223-8.
- Thomas WH, Dodson AN, Linden C. 1973. Optimum light and temperature requirements for *Gymnodinium splendens*, a larval fish food organism. *Fishery Bulletin* 71:599-601.
- Uchida T. 1981. The relationships between *Prorocentrum micans* growth and its ecological environment. *Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science Hokkaido University* 7:17-76.
- Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9:1-38. (in German).

- Vázquez EJN, Lizarraga IG, Schmidt CJB, Tapia AC, Cortes DJL, Sandoval FEH, et al. 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology* 34:413-23.
- Venables WN, Ripley BD. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. 4th Edition. New York: Springer. 495 pages.
- Voltolina D. 1993. The origin of recurrent blooms of *Gymnodinium sanguineum* (Hirasaka) in a shallow lagoon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168:217-22.
- Wolmarans K. 2012. The influence of nutrients on surf-zone phytoplankton dynamics. Master's Dissertation. Nelson Mandela Metropolitan University, South Africa. 136 pages.
- Wood AM, Everroad RC, Wingard LM. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R, editor. *Algal Culturing Techniques*. Oxford: Elsevier Academic Press, p 269-85.
- Yamaguchi H, Yoshimatsu T, Tanimoto Y, Sato S, Nishimura T., Uehara K, et al. 2012. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovate* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters. *Phycological Research* 60:297-304.
- Yamamoto K, Tsujimura H, Nakajima M, Harrison PJ. 2013. Flushing rate and salinity may control the blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in a river/estuary in Osaka Bay, Japan. *Journal of Oceanography* 69:727-36.

Yamamoto T, Oh SJ, Kataoka Y. 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science* 68:356-63.

Xin L, Ying HH, Ping ZY. 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology* 102: 3098-102.

Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall. 663 pages.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

Figure 1: Specific growth rate (μ d⁻¹) with (gray bars) and without (black bars) salinity acclimation: of *A. sanguinea* (a) and *P. micans* (b) growing in culture at salinities of 10, 15, 20, 25, 30 and 35. The significant difference is indicated by letters to acclimation test and by symbols to compare the same salinities with and without acclimation.

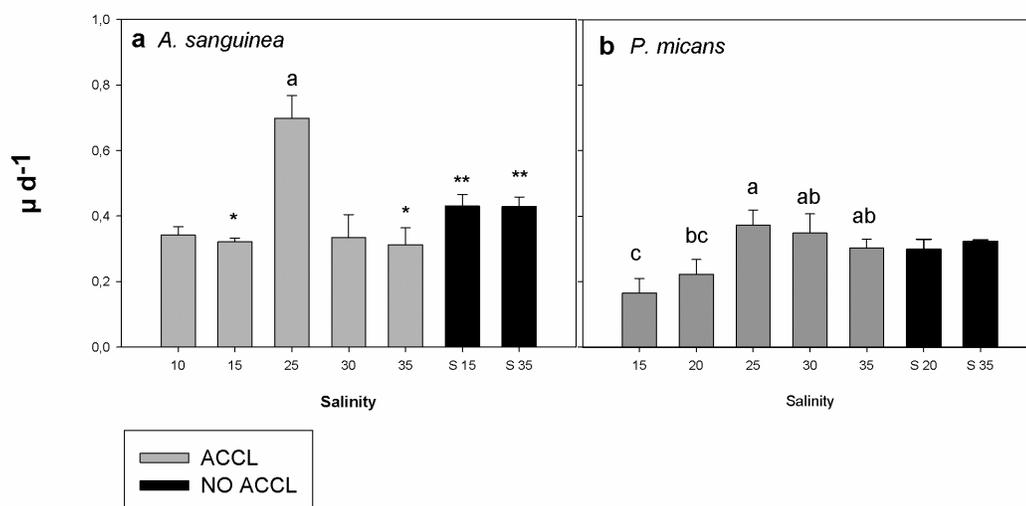


Figure 2: Carrying capacity of *A. sanguinea* (a) and *P. micans* (b) at salinities of 10-35 with and without salinity acclimation.

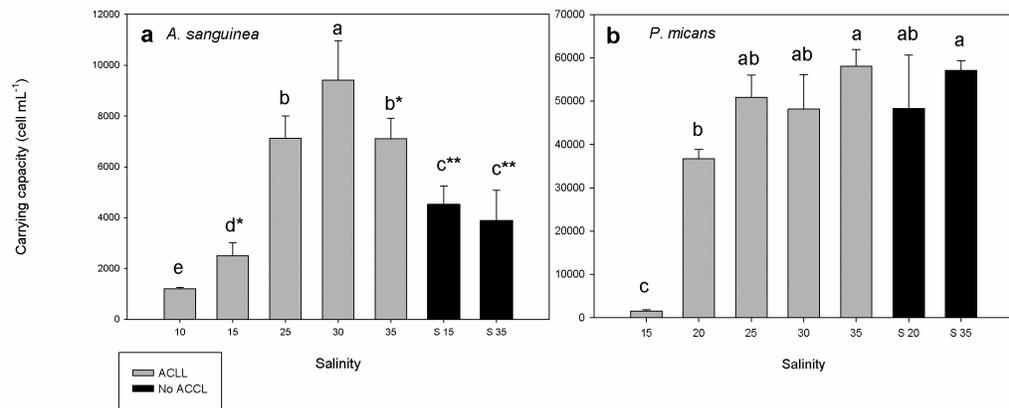


Figure 3: Seasonal observations of *A. sanguinea* (black) and *P. micans* (grey) based on monthly samples at the surf zone of Cassino Beach from 1994 to 2013. The average salinity when each species was present is indicated by triangles.

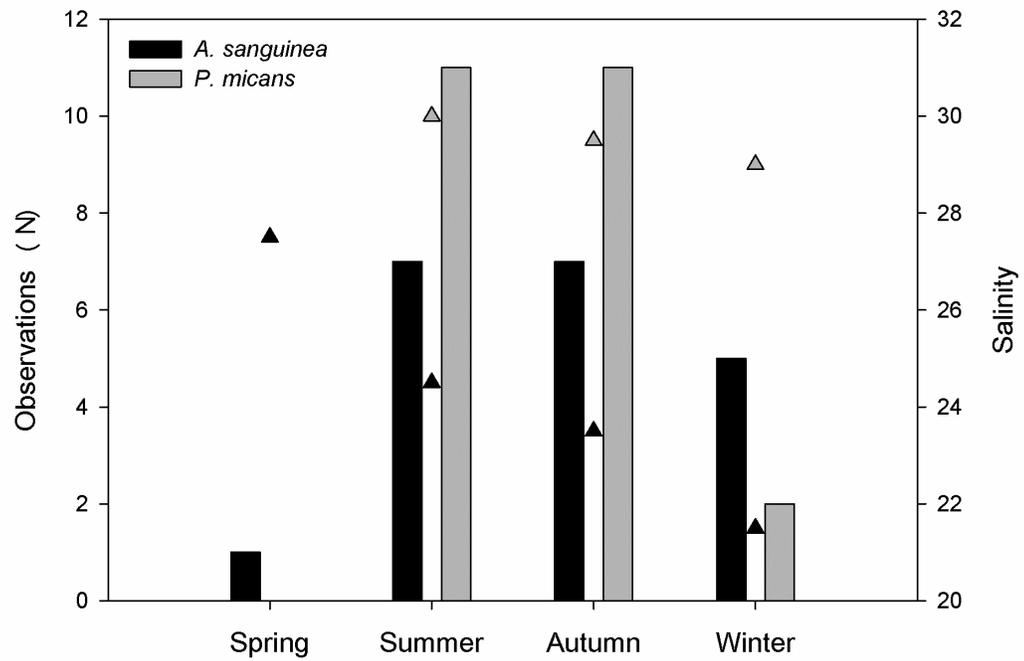


Table I: Global review of distribution, temperature, salinity and season of occurrence of *A. sanguinea* and *P. micans*.

	Local	T °C	Salinity	Season	Reference
<i>Akashiwo sanguinea</i>	Canada: Esquimalt Lagoon	14	-	Summer	Voltolina 1993
	USA: Southern California	15	-	Spring	Cullen and Horrigan 1981
	USA: Monterey - Bay, California	-	-	Autumn	Jessup <i>et al.</i> 2009
	USA: Chesapeake Bay	-	-	Mid-Spring, Summer/Autumn	Marshall, 1995a; Marshall <i>et al.</i> 2005
	USA: Chesapeake Bay	25	15	-	Neale <i>et al.</i> 1998
	USA: Punta Abreojos to La Bocana	-	-	Summer	Vázquez <i>et al.</i> 2011
	USA: Chesapeake Bay isolates	20	15	-	Park <i>et al.</i> 2002
	USA: Scripps Pier	20- 27	-	Summer & Autumn	Thomas <i>et al.</i> 1973
	USA: central Oregon	11- 12	33- 33	Summer & Autumn	Du <i>et al.</i> 2011
	México: Baja California Sur	-	-	Summer	Lizarraga <i>et al.</i> 2001
	North Sea	-	-	Autumn	Hoppenrath <i>et al.</i> 2009
	Japan: Ariake Sea	27- 29	26- 30	Summer	Katano <i>et al.</i> 2011
	Japan: Hakata Bay	25 ^o C	30	Autumn	Matsubara <i>et al.</i> 2007
	Korea: Masan-Chinhae Bay	13- 22	28- 33	Spring & Autumn	Kim <i>et al.</i> 2006
	Argentina: Quequén	16	-	-	Balech 1988
	Peru	17- 23	34	Autumn	Rojas de Mendiola 1979
	Brazil: Cassino Beach	12- 30	14- 31	Mainly summer-autumn	Present study
<i>Prorocentrum micans</i>	Canada: Queen Charlotte Islands	-	-	Late Summer	Peterson <i>et al.</i> 2007
	USA: Scripps Pier	22	-	Spring & Autumn	Shankle <i>et al.</i> 2004
	USA: Northeastern Coastal	-	-	Mainly Autumn & Winter	Marshall and Cohn 1982
	USA: Chesapeake Bay	-	-	Summer	Marshall <i>et al.</i> 2005
	USA: Suwannee River, Florida	21- 29.9	22- 35	Mainly summer-autumn	Quinlan and Philips 2007
	Mexico: Southern Gulf of Mexico	-	-	Summer and Autumn	Licea <i>et al.</i> 2004
	Mexico: Bahia de Todos Santos	-	-	Spring	Manjarrez <i>et al.</i> 2001
	North Sea	-	-	, mainly Summer & Autumn	Hoppenrath <i>et al.</i> 2009
	England: Plymouth	-	11- 20	-	Kain and Fogg 1960
	Portugal: Tejo estuary	12- 21	32	Autumn	Anselmo 2007
	Portugal: Tagus estuary	14- 25	14- 35	-	Gameiro <i>et al.</i> 2004
	Portugal: Lisbon Bay	-	-	Summer and Autumn	Silva <i>et al.</i> 2009
	Portugal: West Iberian	18.3	-	late Summer- early Autumn	Resende <i>et al.</i> 2007
	Norway: Oslofjord	-	20	-	Braarud 1961
	Mediterranean Sea: Thermaikos Gulf	-	-	Mainly Spring	Ignatiades and Gotsis-Skretas 2010
	Turkey: Buyukçekmece Bay	7- 24	20- 37	All year, mainly Spring	Balkis 2003
	India: Goa	-	15- 30	Autumn, Winter, Spring	Alkawri and Ramaiah 2010
	Korea: Jinhae	21	28	Spring or Autumn	Jeong <i>et al.</i> 2005
	Korea: Masan-Chinhae Bay	13- 22	28- 33	Spring	Kim <i>et al.</i> 2006
	Japan: Hokkaido	18- 20	10- 22	-	Uchida, 1981* culture
	Japan: Hokkaido	20- 22	-	Late summer- Autumn	Uchida 1981
	South African: Algoa Bay	19	-	-	Wolmarans 2012
	Tunisia: Mediterranean lagoon	±15	34	Winter	Sahraoui <i>et al.</i> 2013
	-	13- 24	15- 35	-	Nakamura <i>et al.</i> 1982
	-	25	-	Spring & Winter	Barker, 1935 in Thomas <i>et al.</i> 1973
	South Atlantic	5.5- 23	33.6- 36.2	-	Balech 1988
	Argentina: Golfo Nuevo	18	34	Mainly summer	Gayoso and Fulco 2006
Brazil: Santa Catarinal	-	30	Winter	Guimarães and Rorig 2004	
Brazil: Santa Catarina	-	-	Mainly Summer	Cardoso 1998	
Brazil: Tramandaí Beach	-	-	Summer & Autumn	Kremer and Rosa 1983	
Brazil: Paraná	23- 24	29- 32	Mainly summer-autumn	Macedo 2007	
Brazil: Cassino Beach	11- 29	25- 35	Mainly summer-autumn	Present study	

APÊNDICE 3

Apresentação

Este apêndice refere-se ao artigo intitulado “Effects of irradiance on growth, pigment content and photosynthetic efficiency on three peridinin-containing dinoflagellates”. O artigo foi submetido para publicação ao periódico “Marine Biology”.

Effects of irradiance on growth, pigment content and photosynthetic efficiency on three peridinin-containing dinoflagellates

Carolina a. Islabão¹, Carlos R. B. Mendes², Arnaldo d. P. G. Russo³ and Clarisse Odebrecht⁴

^{1,2,3,4}Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, Itália Ave., km 8, Cep 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

*Corresponding author: gcarolislabao@gmail.com

Abstract

The effects of two irradiance levels on growth, cell volume, pigment content and photosynthetic efficiency were analysed in cultures of the peridinin-containing dinoflagellates *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans* and *Scrippsiella trochoidea*. Strains were isolated from coastal water in southern Brazil, and cells were grown at low (LL 87-90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and high (HL 450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) light intensities. The composition of photosynthetic pigments was analysed at days 2, 7 and 14 of growth by high-performance-liquid-chromatography and the photosynthetic efficiency (F_v/F_m) was determined by pulse-amplitude-modulated fluorometry. On day 14, cells were stained with Nile Red for lipid content and observed under the fluorescence microscope. Similar growth rates were observed for *A. sanguinea* (0,26- 0,33) and *P. micans* (0,25- 0,31) under HL and LL, whereas it was significantly higher under HL for *S. trochoidea* ($0,29 \pm 0,02$; $p < 0,001$). Changes in the cell volume along the growth curve were observed for *A. sanguinea* and *P. micans*. The three species presented low concentration of photoprotective pigments under HL and LL. However, *S. trochoidea* and *P. micans* showed higher photosynthetic efficiency (average: $F_v/F_m > 0.5$) compared to *A. sanguinea* ($F_v/F_m \sim 0.2$). Microscope observation revealed that intracellular lipid concentration increased in the three species, in all growth stages at HL. In short, the three dinoflagellates are adapted to high light intensity but present specific physiological responses when exposed to LL and HL.

Keywords: irradiance, peridinin, *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans*, *Scrippsiella trochoidea*.

Introduction

Dinoflagellates form a diverse group of alveolate protists with approximately 50% of autotrophic species presenting varying degrees of mixotrophy; the other species are exclusively heterotrophic (Steidinger and Tangen 1997). Therefore, dinoflagellates can be important primary or secondary producers, the latter playing an important role in the ocean microbial loop by taking up bacteria, which are then transferred up the food web (Azam 1998). Phagotrophy of dinoflagellates can significantly augment C, N, and P supplies in nutrient-enriched waters like eutrophic estuaries and marine coasts (Burkholder et al. 2008 and

references therein). The trophic diversity, together with their physiological abilities, allow dinoflagellates to explore and succeed in various conditions in the pelagic environment, including physically mixed water masses as well as under light stressed and nutrient limitations (Smayda 2002).

Most autotrophic dinoflagellates contain chloroplasts surrounded by three membranes, acquired throughout evolution and endosymbiosis with other microalgae that contain chlorophyll c_2 and peridinin as their major accessory pigments (Jeffrey et al. 2010). The occurrence of peridinin-containing chloroplasts is widespread among autotrophic dinoflagellates, although several dinoflagellate species with different pigment profiles were observed in previous studies (see Zapata et al. 2012 and references therein). The peridinin-containing chloroplasts were originated by secondary endosymbiosis, while other chloroplast types were obtained through tertiary endosymbiosis. Consequently, pigment diversity found in photosynthetic dinoflagellates provides information for inferring evolutionary lineages within dinoflagellates and tracing their distribution and abundance in coastal and open-ocean waters (Zapata et al. 2012).

Photoadaptive strategies are important in flagellate microalgae ecology to handle short-term fluctuations in irradiance levels and allow the exploration of various light niches in the water column (Smayda 1997; 2002). One important and common photoacclimation mechanism of microalgae in aquatic environments is an increase in pigment content and/or change in pigment composition, ensuring efficient absorption under reduced irradiance (Johnsen and Sakshaug 1993). However, the response is not uniform among groups and/or species (Henriksen et al. 2002). Richardson et al. (1983) reported that, despite variations between phytoplankton groups, dinoflagellates photosynthesized and normally grew better at low irradiance ($7\text{-}50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), showing photoinhibition at values $>100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. However other studies reported higher photoinhibitory irradiances ($>500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for different dinoflagellate species (Falkowski et al. 1985; Garcia and Purdie 1992; Montresor et al. 2003; Deng et al. 2004; Matsubara et al. 2007). Furthermore, the classic study of Ryther (1956) indicated that green algae, diatoms and dinoflagellates presented different patterns regarding responses to irradiance, with dinoflagellates showing the highest light saturation for photosynthesis ($560\text{-}700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and photoinhibitory irradiances ($790\text{-}930 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which would imply an adaptation of dinoflagellates to high irradiance.

The characterization of single species pigments is important for reliable application of chemotaxonomy, which is a practical tool for determining microalgae diversity in natural samples (Henriksen et al. 2002; Zapata et al. 2012). The pigment composition is normally expressed as the ratio pigment/Chl a , which can be rather stable among phytoplankton species of the same group (Henriksen et al. 2002). However, significant differences between species of the same group occur in the pigment/Chl a ratio according to their growth phase (Ruivo et al. 2011). Values of pigment ratios found in the literature differ by a factor of two or more when compared to those observed in cultured species from different geographical areas (Henriksen et al. 2002). Reliable information on the pigment ratios of studied species and conditions is thus required in chemotaxonomy to estimate the composition and biomass of microalgae

and, consequently, infer information about the water quality in the environment. Additional screening by microscopy is always recommended since it reduces the risk of misinterpretation of pigment data alone (Ruivo et al. 2011).

The photosynthetic response of dinoflagellates can be partially explained by the composition and content of pigments and pigment/chlorophyll *a* ratios, which are, in turn, strongly influenced by irradiance and nutrient availability. Additionally, *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence provides important information on the physiology of microalgae because the fluorescence flux is proportional to the quality of exciting light, microalgae biomass and photochemical fluorescence yield. The photochemical yield of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence varies according to environmental stimuli, especially light and nutrients.

In this study, we evaluated three autotrophic, typically coastal bloom forming and globally important dinoflagellates, *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen et Moestrup, *Prorocentrum micans* Ehrenberg and *Scrippsiella trochoidea* (Stein) Balech ex Loeblich III (Dinophyta). These species present the same type of chloroplast (type 1: peridinin/dinoxantin/chl c_2 ; Zapata et al. 2012), and we analysed the effects of irradiance on their growth, cell volume, pigment content, pigment/Chl *a* ratios, photosynthetic efficiency of the photosystem II and the presence of lipid droplets. The results are discussed with regard to the physio-ecology of dinoflagellates in coastal waters.

Material and Methods

Species isolation and cultures: Plankton samples containing cells of *A. sanguinea* and *P. micans* were collected in the austral spring (November 2011) in the estuary of the Patos Lagoon (20 °C, salinity 30), and of *S. trochoidea* were collected in the winter (August 2012) in the surf zone of Cassino Beach (15 °C, salinity 25). Cells were isolated using a Pasteur pipette, washed and maintained in L1 medium (Guillard and Hargraves 1993) at salinities of 25 and 30, a temperature of 20±1 °C, irradiance (PAR) between 80 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (white light fluorescent lamps Osram®) and a photoperiod of 12:12 h light:dark. The L1 medium (N:P = 24:1) was chosen as a good marine medium for coastal microalgae (Andersen 2005) and the three species grew well after isolation. Cultures were separated into two batches and acclimated in low light (LL, 87-90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high light (HL, 450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) through three transfers over one month during the exponential growth phase. The irradiance values approximately corresponded to measured values in the Patos Lagoon estuary and coastal ocean region (Odebrecht and Abreu, 1995). Cells in the exponential growth phase were inoculated in Erlenmeyer flasks (125 ml) in quadruplicate, containing L1 medium (Guillard & Hargraves 1993) with salinity for *P. micans* (PROMIC01-B) and 25 for both *A. sanguinea* (AKASAN01 b) and *S. trochoidea* (SCRTR001-P). Cultures were kept in incubators with a controlled photoperiod and temperature as described above. The salinity was based on best results for growth this species in laboratory (Islabão and Odebrecht, 2015) and for *S. trochoidea* was chosen according to the collect time, The position of the bottles was changed daily.

Growth curves: The growth rate was estimated based on daily cell counts of live samples using a FlowCAM[®] (*Fluid Imaging Technologies*) with a flow cell of 100 μm and 10x magnification for *A. sanguinea* and 20x for *P. micans* and *S. trochoidea*. The method “Autoimage Mode” was used in 2 minutes time intervals, and the concentration, size and morphology of all cells in the selected size range (10-60 μm for *S. trochoidea*; 10-100 μm for both *P. micans* and *A. sanguinea*) were recorded.

Methodological conditions were determined in a pre-test, in which no difference was found between the automated counting and that performed in the microscope, using Sedgewick Rafter chambers ($P > 0.05$). The specific growth rate (μd^{-1}) was calculated using data in the exponential growth phase by a linear regression of $\log(\ln)$ transformed cell concentration values against time (Zar 1996; Wood et al. 2005).

Cell Volume: Pigment data were standardized by cellular volume to compare the results between species of different sizes. Cell volume was estimated based on size measurements using the FlowCam[®] data and correspondence to geometric shapes: flattened ellipsoid for *P. micans* and *A. sanguinea* and a cone with half sphere for *S. trochoidea* (Hillebrand et al. 1999; Olenina et al. 2006). The third dimension of *P. micans* was obtained by optical microscopy at 400x magnification and using the FlowCam[®] to another species. Measurements of individual dimensions of each cell were performed using the FlowCam[®] on days 2, 7 and 14, and the average values were estimated afterward. The number of measured cells of each species ranged from 30 to 400 according to the sampling day.

Pigment profiles: The composition of the following pigments was determined on days 2, 7 and 14 using a high performance liquid chromatography (HPLC) technique: Chlorophylls *a* (Chl *a*) and *c*₂ (Chl *c*₂), Peridinin (Perid), Diadinoxanthin (Diadino), Diatoxanthin (Diato), Dincoxanthin (Dino), Mg-2,4-divinylpheoporphyrin *a*₅ monomethyl ester (MgDVP), β,β -Carotene ($\beta\beta$ -Car) and Diadinochrome (Ddc). A volume (5-10 ml) of culture was filtered (glass fibre filter, Whatman GF/F) and immediately stored (ultrafreezer, -80 °C). The pigments were extracted using 3 ml of 95% cold-buffered methanol (2% ammonium acetate) containing 0.05 mg L^{-1} trans- β -apo-8'-carotenal as an internal standard. The samples were sonicated for 5 min in an ice-water bath, placed at -20°C for 1 h, and then centrifuged at 1,100 g for 5 min at 3°C. The supernatant was filtered through Fluoropore PTFE membrane filters (0.2 μm pore size) to remove the extract from the remains of the filter and cell debris. Immediately prior to injection, 1,000 μL of sample was mixed with 400 μL of Milli-Q water in 2.0 ml amber glass sample vials and placed in the HPLC cooling rack (4°C). The pigment extracts were analysed using a Shimadzu HPLC constituted by a solvent distributor module (LC-20AD) with a control system (CBM-20A), a photodiode detector (SPD-M20A) and a fluorescence detector (RF-10AXL). The chromatographic separation of the pigments was performed using a monomeric C8 column (SunFire; 15 cm long; 4.6 mm in diameter; 3.5 μm particle size) at a constant temperature of 25 °C. The mobile phase (solvent) and respective gradient followed the method developed by Zapata et al. (2000), discussed and optimized by Mendes et al. (2007), with a flow rate of 1 ml min^{-1} , injection volume of 100 μL , and 40 min runs. The pigments were identified from both absorbance spectra and retention times, and the concentrations were calculated from the signals in the photodiode array detector. The peaks were integrated using LC-Solution software, and all of the peak integrations were checked manually and corrected when necessary. The HPLC system was previously

calibrated with pigment standards from DHI (Institute for Water and Environment, Denmark). For correction losses and volume changes, the concentrations of the pigments were normalized to the internal standard.

Photosynthetic efficiency: The photosynthetic efficiency was measured on days 2, 7 and 14 using the pulse amplitude modulated (PAM) technique and a Phyto-PAM fluorometer (Walz GmbH®, Effeltrich, Germany). The PSII maximum quantum efficiency (F_v/F_m) was calculated as:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (1)$$

where F_v is the variable fluorescence, F_m is the maximum fluorescence and F_0 is the minimum fluorescence. Samples were kept in the dark for 30 min (Schreiber et al. 1995) before transfer to a cuvette for the measurement of F_0 and, after a saturating pulse (0.3 s; 2600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the measurement of F_m . The background fluorescence was corrected in the samples using the same procedure.

Lipids: Cells growing in HL (450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on day 14 were stained with Nile red and observed under a fluorescent inverted microscope (Zeiss Axiovert 135) at 400x final magnification and excitation blue light (Ex. 365 and Em. 397) for the qualitative analysis of intracellular lipids (Wu et al. 2014). Images were taken using the Zen software 2012. A new culture of *A. sanguinea* was established in HL under the same conditions (see Methods) after finishing the experiment to confirm the results.

Statistical analysis: The effect of irradiance on the growth rate and pigments composition of the species was evaluated by an analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey test respectively with significance level $\alpha < 0.05$ using Statistica software 7 (Stat Soft. 2004; Zar 1996).

Results

Growth rate

The three species showed a similar trend for both light treatments with an exponential growth phase followed by a decrease in the growth rate (stationary phase) (Fig. 1). The beginning of the senescent phase was only observed for *P. micans*, which also reached the stationary phase earlier (day 9) than *A. sanguinea* (day 13) and *S. trochoidea* (day 10 for LL; day 12 for HL). The growth rate of *A. sanguinea* ($\mu = 0.26\text{--}0.33 \text{ d}^{-1}$) and *P. micans* ($\mu = 0.25\text{--}0.31 \text{ d}^{-1}$) did not differ between LL and HL, and the maximum density was observed after 11 days (*A. sanguinea*) and 9 days (*P. micans*) of culture in both treatments. In the stationary phase, *A. sanguinea* showed a more marked decline in LL. The growth rate of *S. trochoidea* was higher in HL ($\mu = 0.29 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$; $P < 0.001$) than in LL ($\mu = 0.23 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), but the time to reach the maximum cell density was similar in both treatments (14 days).

Cell Volume

The average cell volume of *A. sanguinea* (50x32 μm in length and width; 24,263 μm^3) was approximately four and seven times larger than respectively the average volumes of *P. micans* (35x21 μm ; 5,808 μm^3) and *S. trochoidea* (25x18 μm ; 3,366 μm^3) (Fig. 2). Comparing both light treatments, *A. sanguinea* was always larger ($P < 0.001$) in LL (26,375 \pm 1,036 μm^3) than in HL (22,150 \pm 1,251 μm^3) (Fig. 2A) due to the increase in both length and width. *P. micans* presented a similar cell size under LL and HL (5,658 \pm 247 and 5,957 \pm 224 μm^3 , respectively); however, the average volume increased in both treatments ($P < 0.05$) from the beginning (day 2; 5,493 \pm 235) to the end (day 14; 6,086 \pm 314) of the experiment due to increases in both cell length and width (Fig. 2B). The cell volume of *S. trochoidea* was similar in both irradiances (3,238 \pm 276 and 3,494 \pm 314 μm^3 , respectively for LL and HL) and during the incubation period (Fig. 2C).

Photosynthetic and photoprotective pigments

Peridinin (Perid) was the main carotenoid pigment of the three dinoflagellates, while Diatoxanthin (Diato) was, in general, below the method's detection limit (Table 1). The Perid:Chl *a* ratio showed only slight differences between species, while the Diadinoxanthin:Chl *a* ratio was at least two-fold higher in LL than in HL for all of the species in this study (Table 1).

A. sanguinea: The specific concentrations of the photosynthetic pigments Chl *a* and Perid ($\text{pg } \mu\text{m}^{-3}$) were three and two times higher, respectively, in LL when compared to HL (Fig. 3 a, b). The photoprotective pigments Diadino+Diato were more concentrated in HL at the beginning of the experiment (day 2), reversing the pattern at the end (day 14) (Fig. 3 c). Comparing the growth phases, the pigments/cell volume ratio did not differ in LL except for Diadino+Diato, which was smaller on day 2 (Fig. 3c). The Perid:Chl *a* ratio of *A. sanguinea* was similar in HL and LL and throughout the growth phases (Table 1). The ratio of the other pigments, such as Chl c_2 :Chl *a*, was stable along the culture period, but often higher in LL. The ratios of photo-protective pigments Diadino:Chl *a* and Dino:Chl *a* were higher in HL ($P < 0.01$) at days 2 and 7, reversing the pattern at the end (day 14) (Table 1).

P. micans: The specific concentrations of the photosynthetic pigments Chl *a* and Perid ($\text{pg } \mu\text{m}^{-3}$) didn't show differences between the irradiances or over time, as well as, photo-protective pigments (Diadino+Diato) (Fig. 4 a, b, c). The pigment:cell volume ratio of *P. micans* along the culture period was similar to *A. sanguinea*, with a significant decrease (except Perid, MgDVP and $\beta\beta$ -Car) in HL between days 2 and 7 (Table 1). The Perid:Chl *a* ratio was similar in LL and HL, but in HL it decreased during the culture period ($P < 0.01$). The Dino:Chl *a* ratio increased between the growth phases for both irradiances (Table 1).

S. trochoidea: The specific concentrations of photosynthetic pigments Chl *a* and Perid ($\text{pg } \mu\text{m}^{-3}$) were always more than double in LL, and Diadino+Diato showed large variations (Fig. 5 a, b). The photoprotective pigment Diato was lower than the detection limit, without differences between the irradiances or over time (Table 1). The Perid:Chl *a* ratio was higher and increased over culture time in HL ($P < 0.01$), while in LL, the ratio was constant throughout the experiment. Differences in Chl c_2 :Chl *a* ratio were found between the growth phases in both irradiances and were higher in HL (Table 1).

Photosynthetic efficiency

In general, the average photosynthetic efficiency of *A. sanguinea* ($F_v/F_m = 0.21 \pm 0.09$) was much lower and more variable than to the average values of *S. trochoidea* ($F_v/F_m = 0.52 \pm 0.10$) and *P. micans* ($F_v/F_m = 0.50 \pm 0.09$) (Fig. 6 a, b, c). The photosynthetic efficiency of *P. micans* was always higher in LL ($F_v/F_m = 0.56 \pm 0.02$) than HL ($F_v/F_m = 0.43 \pm 0.01$; $P < 0.03$), decreasing from day 2 to day 14 in both treatments ($P < 0.01$). *S. trochoidea* showed higher photosynthetic efficiency in LL ($F_v/F_m = 0.54 \pm 0.03$) than HL ($F_v/F_m = 0.50 \pm 0.01$) on days 2 and 7 ($P < 0.01$), reversing the pattern at the end of the stationary phase (day 14; $P < 0.001$) (Fig. 6 c).

Lipid droplets: Under the microscope, lipids were visible as yellow droplets in the cells stained with Nile red. The three species showed an increase in intracellular lipid droplets in HL during the experiment, mainly on day 14 (Fig. 7). Lipid droplets were more evident in *A. sanguinea* as seen in Fig. 7, than in *P. micans* and *S. trochoidea*, probably because the cellulose theca hindered their visualization in the latter.

Discussion

Cell size and growth rate

In general, the size of organisms is inversely related to their growth rate. This rule also applies to autotrophic prokaryotes (e.g., cyanobacteria) and unicellular microalgae (Banse 1976; Geider et al. 1986; Nielsen 2006). In this study, we compared the growth rate, pigment composition, pigment:Chl *a* ratio and photosynthetic efficiency of three dinoflagellates differing in size (cell volume) by a factor of four and seven. Despite these differences, the growth rate of the three species was similar in HL ($\mu = -0.28 \text{ d}^{-1}$), but *S. trochoidea* grew more slowly in LL. The cell size range of the three dinoflagellates used in this study did not expressively influence their growth rate under constant temperature and without nutrient limitation.

However, light intensity influenced the cell size. The larger cell size of *A. sanguinea* in LL, when compared to HL, coincided with an increase in the specific content of the photosynthetic pigments chlorophyll *a* and peridinin. These results differed from those reported by Garcia and Purdie (1992), which found a decrease in the cell volume and carbon content with an increase in Chl *a* (absolute concentration) in *Gyrodinium cf. aureolum* growing in low irradiance ($< 100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Also for *P. micans* our results differed from previous work, where it increased in cell volume and carbon in high irradiance ($600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Falkowski et al. 1985). In our experiment, the specific Chl *a* content increased in LL for *A. sanguinea* and, in both irradiances, cells of *P. micans* were significantly smaller at the beginning of the culture (day 2). The physiological mechanisms involved in cell volume changes caused by irradiance are still unknown and apparently are species-specific. Low values of the ratio Chl *a* to phytoplankton volume have been associated with high light and temperature in an oligotrophic lake when dinoflagellates were predominant (Felip and Catalan 2000). Under limited light,

the cellular Chl *a* content increased in cultures but also promoted a decrease in cell volume, while the amount of Chl *a* per volume increased in natural populations (Senger and Fleischhacker 1978; Perry et al. 1981; Felip and Catalan 2000). It can be assumed that light conditions affected the pigment content; however, the relationship between light and dinoflagellates cell size still needs elucidation.

A. sanguinea and *P. micans* showed similar growth rate in high (470 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and low (approximately 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) irradiances and thus were not photo-inhibited in the tested irradiance. For *A. sanguinea*, Matsubara et al. (2007) found saturated growth at ca. 114 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ without photo-inhibition at 204 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vertical migration enabled cells of *A. sanguinea* to reach the subsurface layer where light was near the saturation intensity for photosynthesis (250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Cullen and Horigan 1981). This ability to reach an optimum light level for photosynthesis provides a great advantage over non-motile forms, being recognized as a bloom triggering mechanism (Smayda 1997). For *P. micans*, the growth rate was relatively low (average $\mu = 0.27 \text{ d}^{-1}$) in both irradiances, coinciding with results of Falkowski et al. (1985), who tested five irradiances (30-600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\mu = 0.08\text{--}0.18$) without photo-inhibition. However, Uchida (1981) reported a higher growth rate ($\mu = 0.56 \text{ d}^{-1}$) in low irradiance (approximately 33 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 116 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for *P. micans* under different culture media and light/dark cycles. In summary, we can assume that *A. sanguinea* and *P. micans* were both able to grow in a wide range of irradiances and tolerate high light without suffering photo-inhibition at ca. 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Unlike the previous species, *S. trochoidea* grew faster in HL ($\mu = 0.29 \pm 0.02$) without any change in cell volume, even though the Chl *a* content increased up to three-fold in LL. Most of the 15 *S. trochoidea* strains isolated from the Gulf of Naples and tested at five different irradiances (50-500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) did not grow at 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, but showed the highest growth rates ($\mu = 0.37\text{--}1.14 \text{ d}^{-1}$) at 250 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Montresor et al. 2003). The growth rate obtained in our experiment in HL was similar to the mean value at 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observed by Montresor et al. (2003). Irradiances between 350-400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ would be growth saturating for this species (Montresor et al. 2003; Deng et al. 2004). Zhuo-Ping et al. (2009) evaluated the combined effect of irradiance and iron availability on *S. trochoidea*, which attained higher growth rate ($\mu = 0.22 \text{ d}^{-1}$) at 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and was consistent with our results in LL ($\mu = 0.23 \text{ d}^{-1}$). In short, *S. trochoidea* is better adapted to higher irradiances when compared to the other tested species.

Pigments and Photosynthetic efficiency

The concentration of photosynthetic pigments generally increases from the exponential to stationary phase, whereas photo-protective pigments are related to the prevention of photo-oxidative damage of microalgae cells (Ruivo et al. 2011). The specific photosynthetic pigment content of the three dinoflagellates tested was higher in LL, while photo-protective pigments were more variable and did not present the expected increasing trend in HL and weren't significantly different between LL and HL. Furthermore, *A. sanguinea* and *P. micans* showed similar patterns of reducing their concentrations of Chl *a*, Perid and Diadino+Diato at the exponential growth phase, especially in LL, possibly be due to cell

division. The Perid/Chl *a* ratio remained stable in the tested irradiances and growth phases for *A. sanguinea* and *P. micans*, indicating similar variations in both pigments (Fig. 3 a, b) and a high energy transfer efficiency of Perid, the main accessory pigment of dinoflagellates (Prézélin 1987). On the contrary, irradiance affected the Perid/Chl *a* ratio of *S. trochoidea*, which showed up to 3 times more Chl *a* and Perid when grown in LL than in HL.

In general and independent of irradiance, photosynthetic pigments varies together with Chl *a*, leading to a consistency in pigment/Chl *a* ratios and photoprotective pigments tend to increase in HL, acting as a protection mechanism to prevent photo-oxidative damage in microalgae (Ruivo et al. 2011). In our study, the ratio between photoprotective pigments and Chl *a* was always low (including Diato) and often below the detection limit, indicating that photo-protection was not relevant in the tested HL intensity. The low ratio of photo-protective pigments to Chl *a*, is possibly explained by photo-acclimation of cells with changes in the macromolecular composition and ultrastructure of the photosynthetic apparatus (MacIntyre et al. 2002). Although the concentrations were generally low, the Diadino:Chl *a* ratio was markedly higher in HL for *P. micans* and *S. trochoidea* (Table 1). The photo-protection physiological mechanism can be evaluated by the pigment ratio, LL/HL >1 and <1 being expected, respectively in photosynthetic and photoprotective pigments (Rodríguez et al. 2006). As expected, Chl *a* and Perid exhibited values of LL/HL ≥ 1 for *A. sanguinea* and *P. micans*, but the *S. trochoidea* ratios were <1. The ratio of photo-protective carotenoids Diadino, Diato and Dino to Chl *a* increased throughout the incubation time for *A. sanguinea*, with values LL/HL >1 on day 14. For *P. micans* and *S. trochoidea*, these ratios were always <1 for Diadino and Diato, indicating their photoprotective functionality. MgDVP showed photosynthetic functionality for *A. sanguinea* and $\beta\beta$ -car for *S. trochoidea*. Our results emphasized that light responses were species-specific and did not always follow the same pattern, as observed for *S. trochoidea* (Chl *c*₂ and Perid LL/HL <1) (Table 1). In addition, photosynthetic and photoprotective functionality could not always be explained by the ratio LL/HL <1 or ≥ 1 . However, it was clear that the higher irradiance tested did not lead to physiological stress and, therefore, a significant investment in synthesis of photoprotective pigments.

A. sanguinea showed significantly lower photosynthetic efficiency when compared to *P. micans* and *S. trochoidea*. Higher values in LL for *A. sanguinea* can be explained by increased pigmentation in the cells, except in the stationary phase (day 14) when photo-protective pigments increased. However, the pigment/biovolume ratio of *A. sanguinea* was comparable to the other species, especially *P. micans*. Under nutrient-replete growth conditions, photosynthetic efficiency varies among algae taxa: low values of F_v/F_m (0.3-0.4) and high values (> 0.6) were observed, respectively, for small (<20 μm) and larger (>20 μm) eukaryotes (Suggett et al. 2009). However, in other studies differences in F_v/F_m among phytoplankton species did not evidence a link of those variations to phytoplankton size (Dijkman and Kromkamp 2006; Key et al. 2009). F_v/F_m differences may be due to other factors, not necessarily related to cell size like the package effect and nutrient stress, and Dijkman and Kromkamp (2006) argued that small differences were often significant, and would represent true species characteristics and not caused by stochastic processes affecting all species more or less equally.

The low photosynthetic efficiency in the large *A. sanguinea* could be related to its mixotrophic ability. This species is able to ingest bacteria by phagotrophy and dissolved organic matter by osmotrophy (Jeong et al. 2005). In fact, all harmful algae species examined thus far in organic substrate- and prey-rich habitats of eutrophic estuarine and marine coastal waters (Burkholder et al. 2008) are capable of mixotrophy, in varying degree. Three types of protistan mixotrophs have been recognized: Type I, “ideal” mixotrophs that use phototrophy and phagotrophy equally well; Type II, predominantly phototrophic species, including many of the harmful estuarine and coastal marine microalgae that thrive in eutrophic habitats; and Type III, predominantly heterotrophic “algae” (Stoecker 1998). In our study, the low photosynthetic efficiency of *A. sanguinea* together with relatively high growth rate, could be an indication of bacterial ingestion and that different mixotrophy degrees among the species studied can be reflected in F_v/F_m magnitude. A common maximum value for F_v/F_m cannot be assigned to all algae, due to species differences even within the same taxonomic group (Suggett et al. 2004). High photosynthetic efficiency values ($F_v/F_m > 0.5$) were observed mainly in the exponential phase at LL for *P. micans* and both irradiances for *S. trochoidea*. The lower photosynthetic efficiency (at both irradiances) at the end (day 14) for *S. trochoidea* and *P. micans* could be associated with nutrient limitation at the stationary phase of the culture (MacIntyre et al. 2002; Napoleón et al. 2013).

The relationship between increased irradiance and the presence of lipids droplets found in the three species throughout the incubation period is of interest. Light intensity influences algal lipid metabolism and composition and causes significant alterations in both storage and structural lipids. All eukaryotic microalgae examined to date produce oil as energy storage, either prior to a forthcoming dormancy period or when subjected to unfavourable environmental conditions (Hu et al. 2008). Increasing knowledge about the presence of lipid droplets has revealed other functions beyond energy storage (Goold et al. 2014). The increased content of unsaturated fatty acids in microalgae has been associated with lower temperature (Dalsgaard et al. 2003) and increasing salinity (Morgan-Kiss et al. 2006). In our study, the synthesis of a large amount of lipid was observed in high light cultures of all three species, even though cells apparently did not present photo-inhibition stress, as suggested from the low content of photo-protective pigments. Light stimulates the production of algal biomass and typically low light intensity induces the formation of structural lipids, particularly the membrane structural lipids associated with the chloroplast, whereas high light intensity decreases total structural lipid content with a concomitant increase in the amount of neutral storage lipids, mainly triacylglycerols - TAGs (Hu et al. 2008 and references therein). In many algal species examined, an increase in TAGs is observed during stationary phase (Hu et al. 2008)

Conclusions

The three dinoflagellates tested *A. sanguinea*, *P. micans* and *S. trochoidea* grow well and tolerate high light intensities. However, the three species presented distinct physiological responses when cultivated under LL and HL. The growth rate of *A. sanguinea* and *P. micans* was similar at the irradiances tested, whereas *S. trochoidea* grew best in HL. An effect of irradiance on cell volume was recorded: *A.*

sanguinea cells were always larger in LL than HL, due to the increase in both cell length and width; *P. micans* presented similar cell sizes in LL and HL but its volume increased in both treatments throughout the 14 days experiment. The photosynthetic pigments of the three species were higher when they were grown in LL, and the synthesis of photo-protective pigments was not pronounced in HL, indicating the absence of photo-inhibition, also confirmed in the growth curves of all three species. The irradiance tested did not affect the Perid/Chl *a* ratio in *A. sanguinea* and *P. micans*, and this should be taken into account when applying chemotaxonomic tools using pigment ratios on natural phytoplankton communities. Photosynthetic efficiency was high in *P. micans* and *S. trochoidea*, and much lower in *A. sanguinea*, possibly related to the mixotrophic ability of the latter.

Acknowledgements

This study is part of the Brazilian Long Term Ecological Program (PELD) financed by CNPq, Brazilian Ministry of Sciences and FAPERGS. CA Islabão and ADPG Russo were funded by a PhD grant from CAPES. C Odebrecht benefits from CNPq fellowship (PQ 2) and CRB Mendes was funded by a Postoc grant from CAPES.

References

- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280: 694–696.
- Banse K (1976) Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size- A review. *J. phycol* 12: 135- 140.
- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM (2008) Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8: 77- 93.
- Cullen JJ, Horrigan SG (1981) Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Mar Biol* 62: 81–89.
- Dalsgaard J, John MST, Kattner G, Müller-Navarra DC, Hagen W (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology* 46: 225–340.
- Deng G, Li YG, Hu HJ, Qi YZ, Geng YH, Li ZK (2004) Effects of temperature, light and pH on photosynthesis, and of Light-dark cycle on growth rate and biomass of *Scrippsiella trochoidea* and *Alexandrium tamarense*. *Journal of Wuhan Botanical Research* 22: 129- 135.
- Dijkman NA, Kromkamp JC (2006) Photosynthetic characteristics of the phytoplankton in the Scheldt estuary: community and single-cell fluorescence measurements. *Eur. J. Phycol* 41: 425–434.

- Falkowski PG, Gan R, Wyman K (1985) Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30: 311–321.
- Faust MA, Gullede RA (2002) Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium* 42;1-144.
- Felip M, Catalan J (2000) The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial. *J Plankton Res* 22: 91–105.
- Garcia VMT, Purdie DA (1992) The influence of irradiance on growth, protosynthesis and respiration of *Gyrodinium aureolum*. *J Plankton Res* 14: 1251- 1265.
- Geider RJ, Platt T, Raven JA (1986) Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: a synthesis. *Marine Ecol-Progr Ser* 30: 93- 104.
- Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y (2014) Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep.* doi:10.1007/s00299-014-1711-7.
- Gushina IA, Harwood JL (2013) Algal lipids and their metabolism. In: Borowitzka MA and Moheimani NR (eds.). *Algae for biofuels and energy, developments in applied phycology 5*. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp 284.
- Guillard RRL, Hargraves PE (1993) *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycology* 32: 234-6.
- Henriksen P, Riemann B, Kaas H, Sørensen HM, Sørensen HL (2002) Effects of nutrient- limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *J. Plankton Res* 24: 835–858.
- Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol* 35: 403–424.
- Hu Q, Sommerfeld M, Javes E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J* 54: 621- 639.
- Huot Y, Babin M (2010) Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, *Developments in Applied phycology*. In: Suggett DJ, Prášil O and Borowitzka MA (eds.), pp 31–74.
- Jeffrey SW, Simon WW, Zapata M (2011) Microalgal classes and their signature pigments. In: Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds.) *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, pp 845.

Jeong HJ, Yoo YD, Park JY, Song JY, Kim ST, Lee SH, Kim KY, Yih WH (2005). Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquat Microb Ecol.* 40: 133–150.

Johnsen G, Sakshaug E (1993) Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloomforming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol* 29: 627-642.

Jessup DA, Miller MA, Ryan JP, Nevins HM, Kerkering HA, Mekebri A, Crane DB, Johnson TA, Kudela RM (2009) Mass stranding of marine birds caused by a surfactant-producing red tide. *PLoS One* 4: 1- 8.

Key T, McCarthy A, Campbell DA, Six C, Roy S, Finkel ZV (2009) Cell size trade-offs govern light exploitation strategies in marine phytoplankton. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02046.x

Matsubara T, Nagasoe S, Yamasaki Y, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T (2007) Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *J Exp Mar Biol Ecol* 342: 226–230.

MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider R (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38: 17-32.

Mendes CR, Cartaxana P, Brotas V (2007) HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. *Limnol Oceanogr: Methods* 5: 363-370.

Montresor M, Sgrosso S, Procaccini G, Kooistra WHCF (2003) Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species. *Phycologia* 42: 56–70.

Morgan-Kiss RM, Priscu JC, Pockock T, Gudynaite-Savitch L, Huner NP (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 222–252.

Napoléon C, Raimbault V, Claquim P (2013) Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLoS One* 8: 1- 9.

Nielsen SL (2006) Size-dependent growth rates in eukaryotic and prokaryotic algae exemplified by green algae and cyanobacteria: comparisons between unicells and colonial growth forms. *J. Plankton Res* 28: 489– 498.

- Olenina I, Hajdu S, Edler L, Andersson A, Wasmund N, Bush S, Göbel J, Gromisz S, Huseby S, Huttunen M, Jeanus A, Kokkonen P, Ledaine I, Niemkiewicz E (2006) Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. HELCOM Baltic Sea Environmental Proceedings. No. 106. pp 144.
- Perry MJ, Talbot MC, Alberte RS (1981) Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar Biol* 61:1- 61.
- Prézélin BB (1987) Photosynthetic physiology of dinoflagellates. In: Taylor FJR (ed.) *The biology of dinoflagellates*, Blackwell, pp 174- 223.
- Richardson BYK, Beardall J, Raven JA (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol* 93: 157–191.
- Ryther JH (1956) Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity. *Limnol Oceanogr* 1: 61- 70.
- Ruivo M, Amorim ANA, Cartaxana P (2011) Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: implications for chemotaxonomy in coastal waters. *J Plankton Res* 33: 1012- 1022.
- Rodríguez F, Chauton M, Johnsen G, Andresen K, Olsen LM, Zapata M (2006) Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Mar Biol* 148: 963- 971.
- Senger H, Fleishchacker PH (1978) Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions. *Physiologia Pl* 43: 35- 42.
- Schreiber U, Hormann H, Neubauer C, Klughanlner C (1995) Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *Aust J Plant Physiol* 22: 209-220.
- Smayda TJ (2002) Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as “pelagic seed banks”. *Harmful Algae* 1: 95-112.
- Smayda TJ (1997) Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *LimnolOceanogr* 42: 1137–1153.
- Steidinger KA, Tangen K (1995) Dinoflagellates. In: Tomas C (ed.). *Identifying marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press. California, USA, pp 387-584.
- Stoecker DK (1998) Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *Eur. J. Protistol* 34: 281–290.

Sugget DJ, Oxborough K, Baker NR, MacIntyre HL, Kana TM, Geider RJ (2003) Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll a fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton. *Eur J Phycol* 38: 371- 384.

Sugget DJ, MacIntyre HL, Geider RJ (2004) Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnol Oceanogr Methods* 2: 316- 332.

Sugget DJ, Moore CM, Hickman AE, Geider RJ (2009). Interpretation of fast repetition rate (FRR) fluorescence: signatures of phytoplankton community structure versus physiological state. *Mar Ecol Prog Ser* 376: 1- 19.

Uchida T (1981) The relationships between *Prorocentrum micans* growth and its ecological environment. *Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science Hokkaido University* 7: 17–76.

Wong CK, Wong CK (2009) Characteristics of phytoplankton community structure during and after a bloom of the dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* by HPLC Pigment Analysis. *J. Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research)* 8: 141-149.

Wood AM, Everroad RC, Wingard LM (2005) Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R [ed.] *Algal Culturing Techniques*. Oxford: Elsevier Academic Press. pp 269- 285.

Wu S, Zhang B, Huang A, Huan L, He L, Lin A, Niu J, Wang G (2013) Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricoratum* using Nile red and BODIPY 505/515. *J Appl Phycol* 26: 1659–1668.

Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 29-45.

Zapata M, Fraga S, Rodríguez F, Garrido J (2012) Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar Ecol Progr Ser* 465: 33–52.

Zhuo-Ping C, Wei-Wei H, Min A, Shun-Shan D (2009) Coupled effects of irradiance and iron on the growth of a harmful algal bloom-causing microalga *Scrippsiella trochoidea*. *Acta Ecologica Sinica* 29: 297–301.

Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall. pp 663.

Figure captions

Fig. 1. Growth curves for *A. sanguinea* (A), *P. micans* (B) and *S. trochoidea* (C). Arrows indicate sampling at three phases of growth (days 2, 7 and 14) for pigment analysis and photosynthetic efficiency measurements.

Fig. 2: Mean values of biovolume (μm^3) of (A) *A. sanguinea*, (B) *P. micans* and (C) *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions: LL ($87\text{-}90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL ($450\text{-}490 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between growth phase indicated by letters.

Fig. 3: Mean values and standard deviations of the ratios pigment/ biovolume of *A. sanguinea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) in LL ($87\text{-}90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL ($450\text{-}490 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between days indicated by letters. Different letters (uppercase or lowercase) indicate different treatments.

Fig. 4: Mean values and standard deviations of ratios pigment/ biovolume of *P. micans* at three growth phases (days 2, 7 and 14) in LL ($87\text{-}90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL ($450\text{-}490 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between days indicated by letters.

Fig. 5: Mean values of Pigment/Biovolume of *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions LL and HL. Significant differences between LL and HL are indicated by symbols.

Fig. 6: Mean values of photosynthetic efficiency (F_v/F_m) of (A) *A. sanguinea*, (B) *P. micans* and (C) *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions LL ($87\text{-}90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL ($450\text{-}490 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols and between the phases of growth are indicated by letters, LL (uppercase) and HL (lower case).

Fig. 7: *A. sanguinea* cells in LL (a), HL (b), and HL stained with Nile red (c), showing an increase in intracellular lipids at HL.

Fig. 1. Growth curves for *A. sanguinea* (A), *P. micans* (B) and *S. trochoidea* (C). Arrows indicate sampling at three phases of growth (days 2, 7 and 14) for pigment analysis and photosynthetic efficiency measurements.

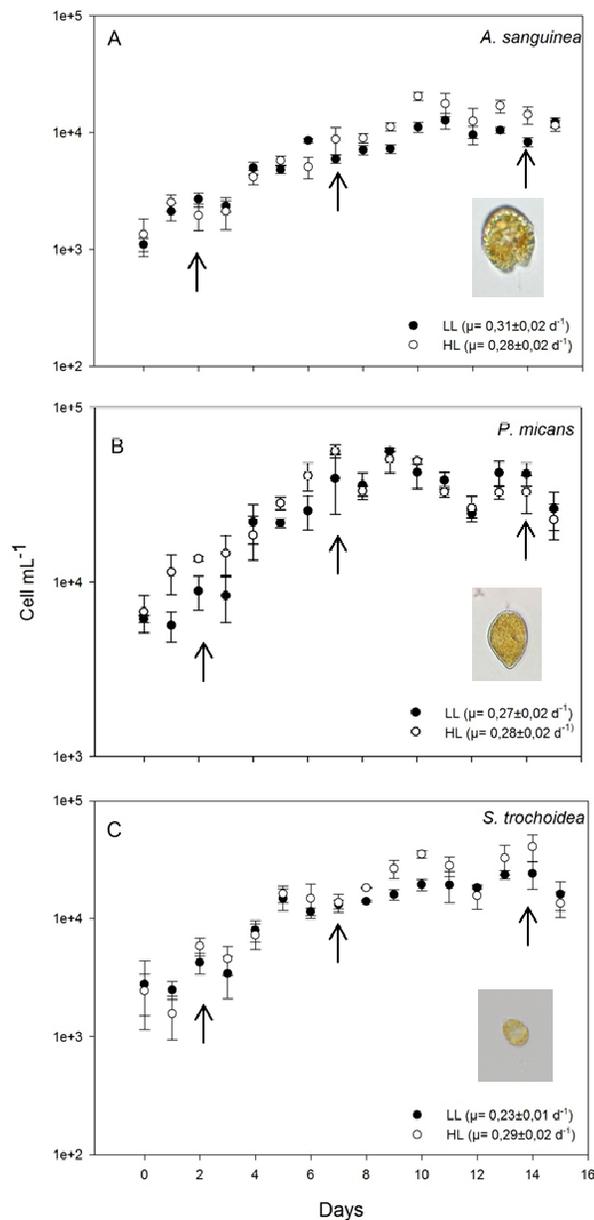


Fig. 2: Mean values of biovolume (μm^3) of (A) *A. sanguinea*, (B) *P. micans* and (C) *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions: LL

(87-90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL (450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between growth phase indicated by letters.

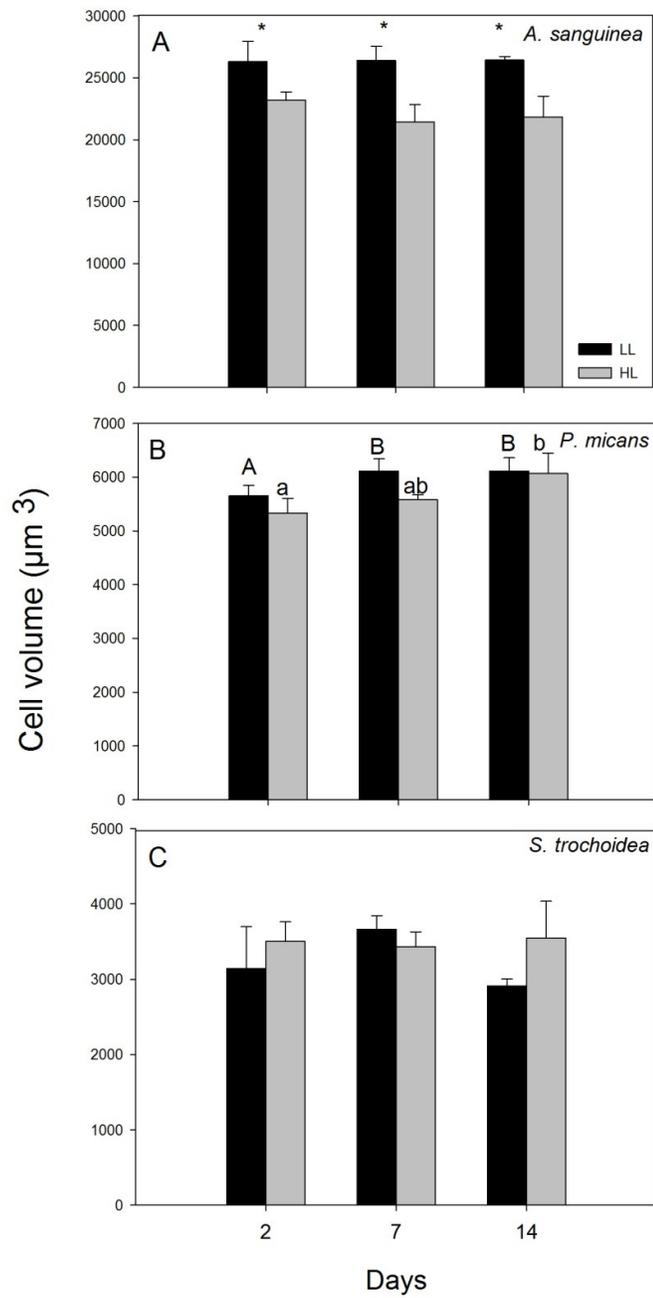


Fig. 3: Mean values and standard deviations of the ratios pigment/ biovolume of *A. sanguinea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) in LL (87- 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL (450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between days indicated by letters. Different letters (uppercase or lowercase) indicate different treatments.

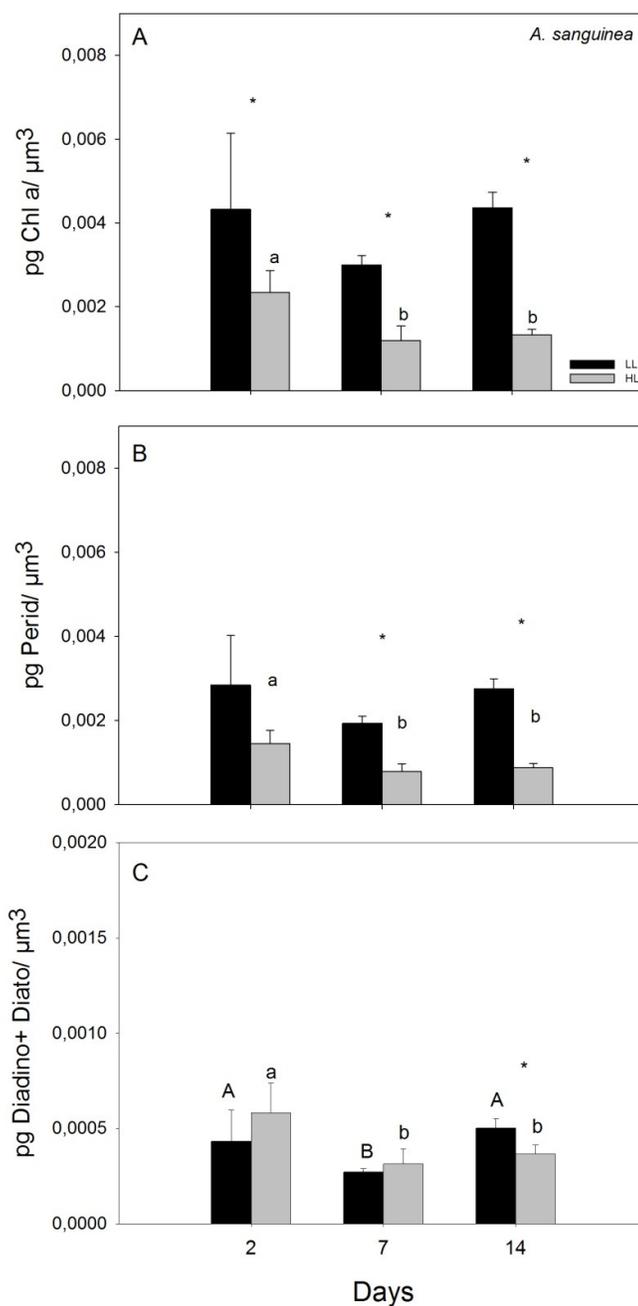


Fig. 4: Mean values and standard deviations of ratios pigment/ biovolume of *P. micans* at three growth phases (days 2, 7 and 14) in LL (87- 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL (450-490 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols. Significant differences between days indicated by letters.

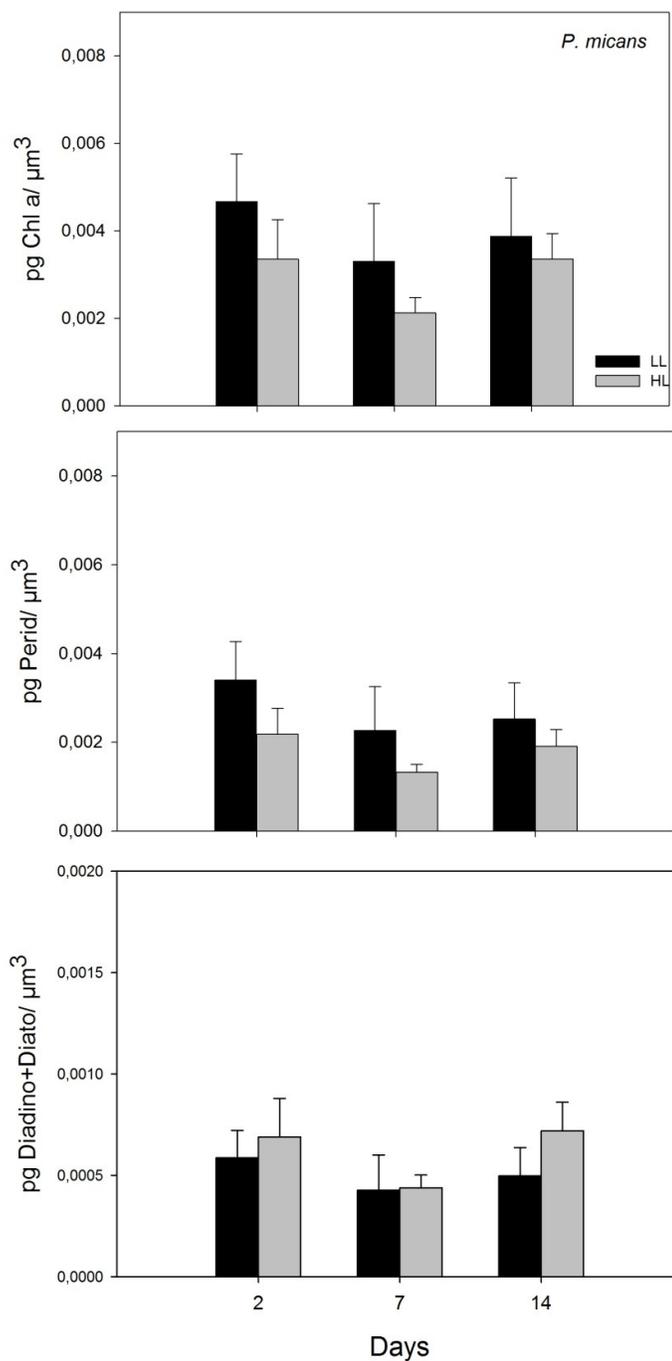


Fig. 5: Mean values of Pigment/Biovolume of *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions LL and HL. Significant differences between LL and HL are indicated by symbols.

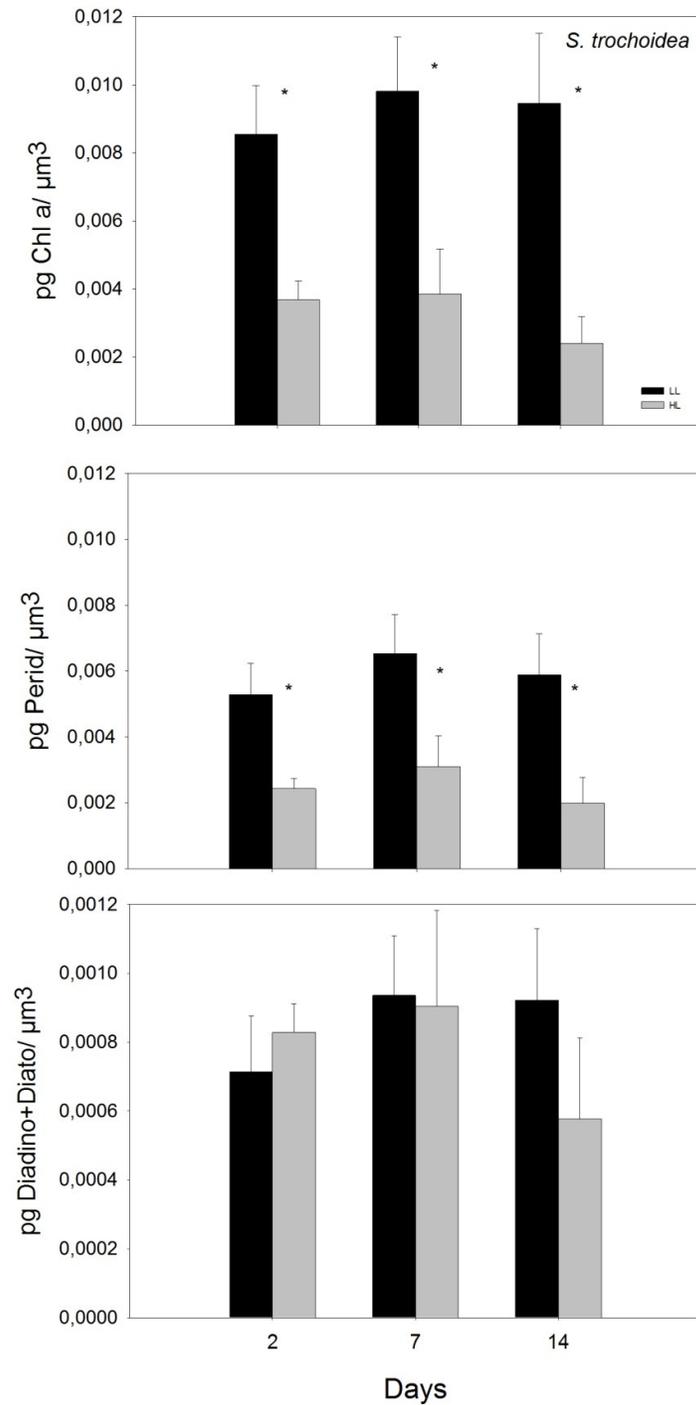


Fig. 6: Mean values of photosynthetic efficiency (F_v/F_m) of (A) *A. sanguinea*, (B) *P. micans* and (C) *S. trochoidea* at three growth phases (days 2, 7 and 14) for different light conditions LL ($87-90 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and HL ($450-490 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Significant differences between LL and HL are indicated by symbols and between the phases of growth are indicated by letters, LL (uppercase) and HL (lower case).

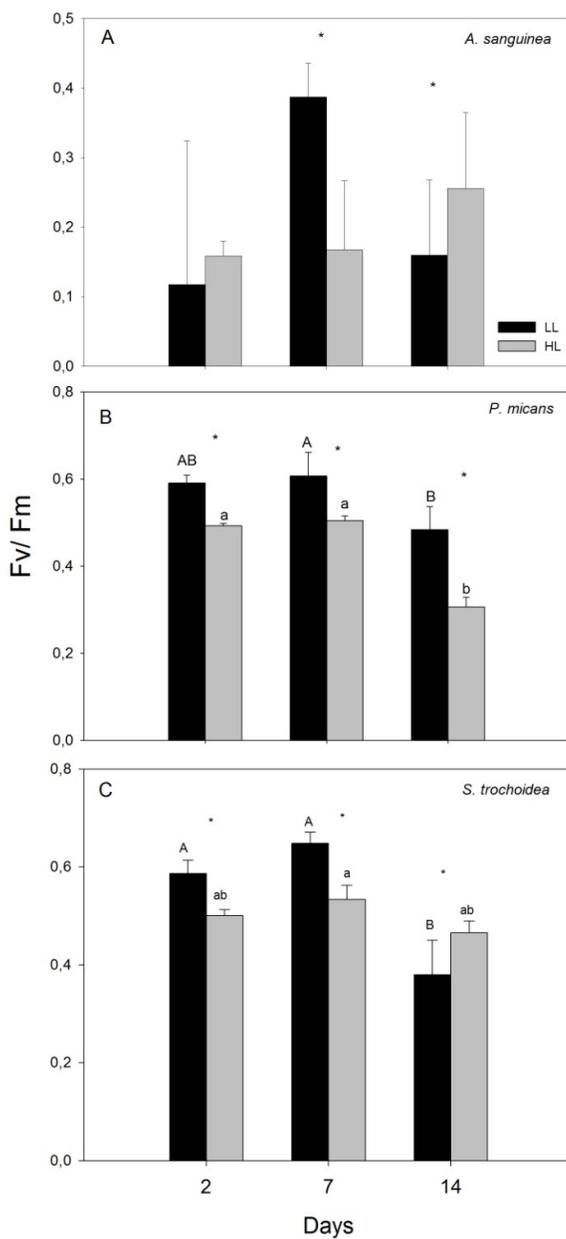


Fig. 7: *A. sanguinea* cells in LL (a), HL (b), and HL stained with Nile red (c), showing an increase in intracellular lipids at HL.

