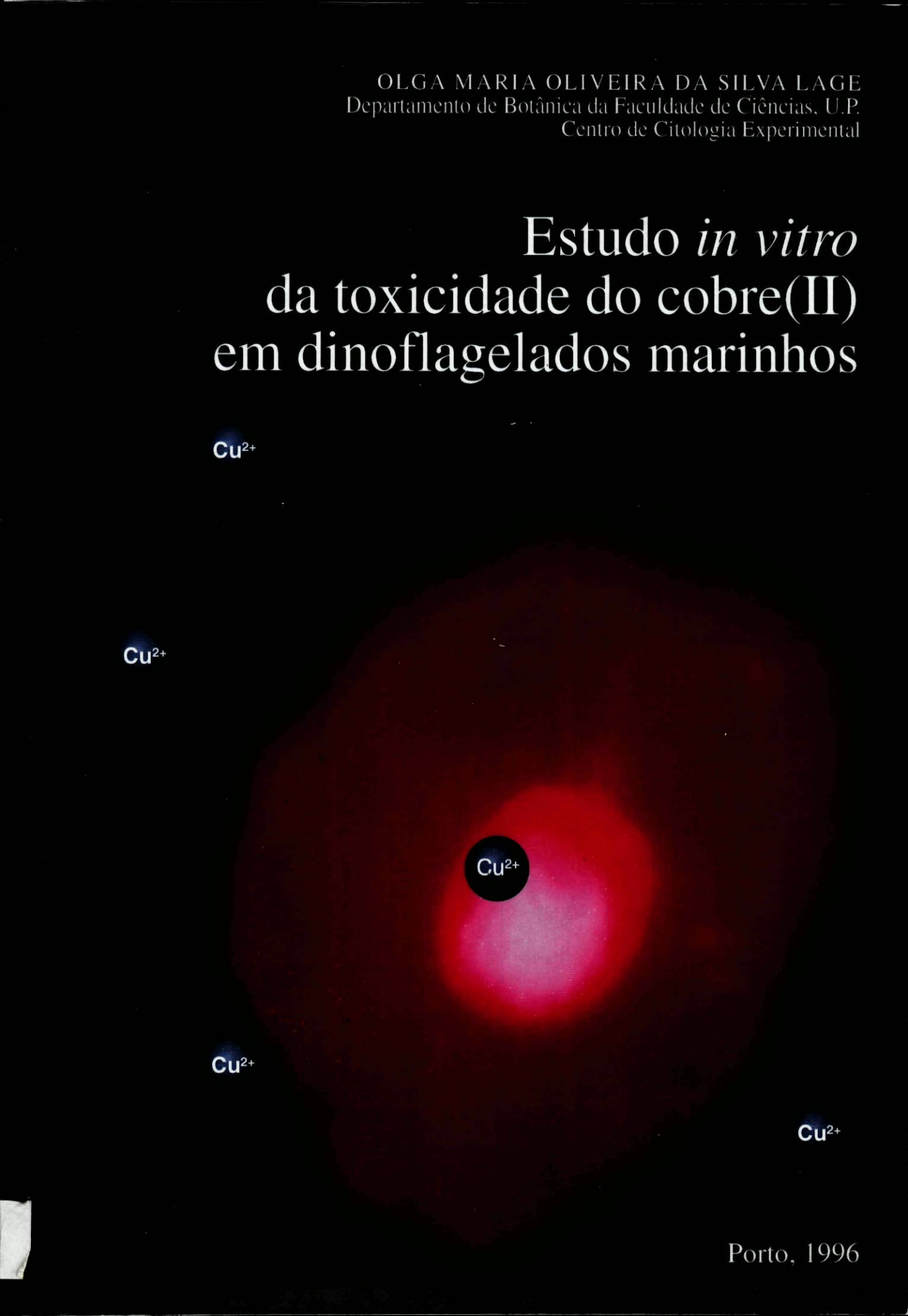
OLGA MARIA OLIVEIRA DA SILVA LAGE
Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências, U.P.
Centro de Citologia Experimental

Estudo *in vitro* da toxicidade do cobre(II) em dinoflagelados marinhos



Porto, 1996

Olga Maria Oliveira da Silva Lage

Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências

Centro de Citologia Experimental

Universidade do Porto

ESTUDO *IN VITRO* DA TOXICIDADE DO COBRE(II) EM DINOFLAGELADOS MARINHOS

Porto

1996

Olga Maria Oliveira da Silva Lage

Assistente de Botânica da Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Orientador - Professora Doutora Ana Maria Parente Delgado

Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências

Centro de Citologia Experimental

Univerdidade do Porto

Porto

1996

Dedico este trabalho aos meus Pais como testemunho da minha profunda gratidão

"As 'obras de arte' são de uma solidão infinita: para as abordar, nada pior do que a crítica. Só o amor pode prendê-las, conservá-las, ser justo para elas."

Rainer Maria Rilke

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ana Maria Parente e minha Orientadora, singelamente, agradeço todo o apoio científico e moral, os ensinamentos, a transmissão de uma atitude científica e ética correcta, a compreensão e a paciência que me dedicou durante estes anos de trabalho. É a ela que eu devo o ter alcançado este ponto.

À Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos, que eu considero a minha segunda Orientadora, agradeço a colaboração prestimosa, indispensável para a complementação química dos trabalhos realizados, os ensinamentos, a disponibilidade constante, as horas (por vezes menos convenientes) dispensadas comigo, as palavras de incentivo e a amizade.

Ao Doutor Filipe Sansonetty e ao Professor Doutor Enrique O'Connor agradeço a colaboração e disponibilidade, o terem-me revelado o mundo sensasional da citometria de fluxo, "as longas secções citométricas e cinéticas", o sentido de profissionalismo, os ensinamentos, os contactos com importantes investigadores e a amizade.

Ao Professor Doutor Roberto Salema, para além do apoio científico, agradeço as disponibilidades facultadas no Centro de Citologia Experimental e no Departamento de Botânica que permitiram a realização do trabalho experimental.

Às Doutoras Estela Sousa e Silva e Susana Franca e suas colaboradoras (particularmente à D. Lúcia Pinto) agradeço a colaboração que me dispensaram na fase inicial do meu traballho e a cedência das culturas de dinoflagelados. Ao Professor Doutor J. D. Dodge também agradeço a cedência de culturas de dinoflagelados e o estágio efectuado no seu laboratório.

Ao Doutor Antony Davies agradeço a colaboração, o apoio e a amizade. Às investigadoras e 'experts' em dinoflagelados, Professoras Doutoras Maria A. Faust e Utsa Pollingher, agradeço as palavras de encorajamento e incentivo na fase inicial da minha carreira.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos que, de alguma forma, ao longo destes anos, me ajudaram, apoiaram, incentivaram, aturaram e demonstraram a sua amizade.

Agradeço o apoio técnico da D. Andreia Costa (excelente técnica de fotografia), da D. Rosa Maria Santos, da D. Irene Roseira, da D. Ernestina Queijo e da D. Ondina Mota e demais funcionários do Centro de Citologia Experimental e do Departamento de Botânica.

Ao José Ernesto Osswald agradeço a colaboração no 'design' gráfico da capa.

Ao Miguel, aos meus Pais e restante família agradeço o apoio e a compreensão pelas longas horas em que estiveram privados da minha atenção e companhia.

Ao abrigo do disposto no número dois do Artigo oitavo do Decreto-Lei nº 388/70, foram incluidos nesta Dissertação os seguintes artigos publicados:

Lage, O.M., Parente, A.M. & Salema, R. 1994. Electrophoretic analysis of polyptides of *Prorocentrum micans* Ehrenberg exposed to toxic levels of copper. Rev. Paleob. Palyn. 84: 107-112.

Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. & Salema, R. 1994. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. Eur. J. Phycol. 29: 253-260.

Lage, O.M., Parente, A.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Gomes, C.A.R. & Salema, R. 1996. Potential tolerance mechanisms of *Prorocentrum micans* to sublethal toxic levels of copper. J. Phycol. 32: 416-423.

Lage, O.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Soares, H.M.V.M., Osswald, J.M., Sansonetty, F., Parente, A.M. & Salema, R. 1996. Suitability of the pH buffers 3-[N-bis(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid and N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid for *in vitro* copper toxicity studies. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 199-205.

em publicação:

Lage, O.M., Osswald, J.M., Parente, A.M. & Salema, R. 1996. Influence of several buffers in the growth of *Amphidinium carterae* Hulburt and *Prorocentrum micans* Ehr. in batch cultures. Anais Fac. Ciências. (em publicação).

Lage, O.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D., Parente, A.M. & Salema, R. 1996. Toxicity effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium caterae*: influence of metal speciation. Eur. J. Phycol. 31 (em publicação).

submetidos para publicação:

Lage, O.M., Parente, A.M. & Salema, R. Ultrastructural alterations induced by copper(II) on marine dinoflagellates. (Submetido para publicação à revista Phycology).

Lage, O.M., Sansonetty, F., Osswald, J.M., Parente, A.M. & Salema, R. Differences in fluorescein labelling of *Amphidinium carterae* as an indication of encystment. (Submetido para publicação à revista Eur. J. Phycol.).

Lage, O.M., Sansonetty, F., Osswald, J.M., Parente, A.M. & Salema, R. "Copper toxicity on *Amphidinium carterae*. Evaluation by cell esterase activity by flow cytometry". (submetido para publicação à revista Cytometry).

ÍNDICE

Resumo VIII

Abstract IX

Capítulo 1. Introdução 1
1. Dinoflagelados 3
1.1. Caracterização geral 3
1.2. Posicão taxonómica e descrição geral de *A. carterae* e *P. micans* 7
1.3. Aspectos estruturais de *A. carterae* e *P. micans* 12
1.4. Reprodução de *A. carterae* e *P. micans* 20
1.4.1. Ciclo celular 20
1.4.2. Reprodução sexual 22
1.4.3. Enquistamento 22
1.5. Aspectos fisiológicos de *A. carterae* e *P. micans* 23
1.5.1. Crescimento *versus* luz, temperatura, salinidade e substâncias inibitórias 23
1.5.2. Estratégias nutricionais 25
1.5.3. Pigmentos 26
1.5.4. Metabolismo do carbono 27
1.5.5. Metabolismo do azoto 28
1.5.6. Outros nutrientes 30
1.5.7. Fotorrespiração 31
1.5.8. Proteínas, enzimas e esteróis 31
1.6. Marés vermelhas e toxicidade 32
1.7. Mobilidade, tropismos e migrações 33
1.8. Filogenia 34
2. Metais pesados - o cobre 36
2.1. Aspectos gerais 36
2.2. Interacções com as comunidades biológicas aquáticas 37
2.3. O cobre 38
2.4. Caracterização química 41
2.5. Biodisponibilidade 44
2.6. Importância fisiológica e ligação a moléculas biológicas 46
2.7. Absorção 48
2.8. Toxicidade 50
2.8.1. Avaliação da toxicidade 51
2.8.2. Efeitos a nível celular 52
2.9. Sinergismo *versus* antagonismo 59
2.10. Tolerância 60
3. *A. carterae* e *P. micans* como modelos biológicos em estudos de toxicidade 65
4. Referências 68

Capítulo 2. Ojectivos e organização do trabalho apresentado nesta Dissertação 94
Referências 103

Capítulo 3. Trabalhos publicados ou em publicação 104
Trabalho 1. Alguns efeitos do cobre nos dinoflagelados *Amphidinium carterae* e *Prorocentrum micans* em cultura em sistema fechado 105
Trabalho 2. Efeitos de toxicidade do cobre(II) no dinoflagelado marinho *Amphidinium carterae*. Influência da especiação do metal 106
Trabalho 3. Influência de vários tampões no crescimento de *Amphidinium carterae* Hulburt e de *Prorocentrum micans* ehr. em cultura em sistema fechado 107
Trabalho 4. Adequação dos tampões de pH ácido 3-[N-bis(hidroxietil)-amino]-2-hidroxipropanossulfónico e ácido N-2-hidroxietilpi-perazina-N'-etanossulfónico para estudos *in vitro* de toxicidade pelo cobre 108
Trabalho 5. Toxicidade do cobre em *Amphidinium carterae*. Avaliação através da actividade esterásica celular medida por citometria de fluxo 109
Trabalho 6. Diferenças na marcação em fluoresceína em *Amphidinium carterae* como uma indicação de enquistamento 110
Trabalho 7. Análise electroforética de polipétidos de *Prorocentrum micans* Ehr. exposto a níveis tóxicos de cobre 111
Trabalho 8. Potenciais mecanismos de tolerância de *Prorocentrum micans* (Dinophyceae) contra níveis subletais de cobre 112
Trabalho 9. Alterações ultraestruturais induzidas pelo cobre(II) em dinoflagelados marinhos 113

Capítulo 4. Discussão geral e conclusões 114
1. Efeitos do cobre(II) na biologia de *A. carterae* e de *P. micans* 115
2. Efeitos do cobre(II) na estrutura celular de *A. carterae* e de *P. micans* 118
3. A importância da labilidade do cobre(II) 120
4. Tampões de pH e toxicidade do cobre(II) 121
5. Mecanismos de tolerância ao cobre(II) em *A. carterae* e *P. micans* 122

Anexo 1. Avaliação do efeito agudo do cobre em *A. carterae* através de ensaios cinéticos por citometria de fluxo 125

Anexo 2. Explosão oxidativa em *Amphidinium carterae* induzida pelo cobre. Medição de H_2O_2-DCF e $O_2^{\cdot-}$-FCLA por citometria de fluxo 136

Anexo 3. Crescimento de *Amphidinium carterae* e variação do pH das culturas em meio ESAW na presença de vários tampões de Good 143

RESUMO

Nesta Dissertação são abordados vários aspectos da toxicidade do cobre(II) em duas espécies unicelulares de dinoflagelados marinhos comuns na costa portuguesa, *Amphidinium carterae* e *Prorocentrum micans*. Todos os estudos foram realizados *in vitro*. Consideraram-se (1) a problemática da especiação química do cobre, (2) a simulação de duas situações experimentais correspondentes a diferentes ocorrências na Natureza, (3) a toxicidade do cobre em presença de diferentes tampões de pH, (4) alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais induzidas pelo cobre e (5) mecanismos relacionados com a tolerância ao metal. O estudo foi realizado em colaboração com investigadores de outras áreas científicas, o que permitiu uma interpretação interdisciplinar dos resultados.

Os resultados obtidos apoiam a evidência crescente de que, para além do ião cobre(II) livre, também pode interactuar com as algas metal ligado a compostos não directamente assimiláveis. Para tal, basta que o tempo de contacto e as concentrações das espécies bióticas e abióticas intervenientes sejam suficientes para perturbar o equilíbrio inicial no sentido da dissociação destes compostos. Nas interacções cobre-alga, a importância dos aspectos cinéticos das reacções químicas e do pH na toxicidade do cobre são evidenciados.

Para se proceder ao ajuste do pH do meio de cultura, foram estudados, comparativamente, os tampões ácido 3-[N-bis(hidroxietil)-amino]-2-hidroxipropanossulfónico (HEPES) e ácido N-2-hidroxietilpi-perazina-N'-etanossulfónico (DIPSO), tendo-se verificado que não interferiam com o crescimento das microalgas. Porém, na presença de 25 mM do tampão HEPES a toxicidade do cobre(II) em *A. carterae* foi potenciada, efeito que poderá estar relacionado com as propriedades surfactantes que este tampão apresentou. O tampão DIPSO, que se verificou ser um forte complexante do cobre(II) e também surfactante, reduziu drasticamente a acção tóxica do cobre(II) em *A. carterae*. Estes resultados sugerem que o DIPSO poderá ser usado simultaneamente como tampão de pH e do catião cobre(II), em estudos realizados em meios de cultura.

O cobre(II), numa gama de concentrações subletais, interfere com a biologia de ambas as espécies estudadas. Induz uma fase de latência em culturas em crescimento exponencial, diminui a taxa de crescimento, da biomassa e do teor total em proteínas solúveis (verificando-se um aumento ou uma diminuição relativos de certas proteínas), interfere com a mobilidade celular, leva à perda de potássio intracelular devido a uma alteração da

permeabilidade celular e aumenta os níveis celulares de peróxido de hidrogénio e do anião superóxido (efeitos indicativos de explosão oxidativa). As alterações metabolico-fisiológicas são acompanhadas por alterações estruturais, principalmente em três centros metabólicos importantes, o cloroplasto, os dictiossomas e as mitocôndrias. Ambos os organismos demonstraram capacidade de recuperação após a fase inicial de exposição ao metal. Em concentrações de cobre inibitórias do crescimento ocorre morte celular. Contudo, em *A. carterae* e nestas condições, a maioria das células enquistam (tornam-se esféricas e imóveis e formam agregados), conservando a integridade do plasmalema e a estrutura celular inalterada e sofrendo um aumento intracelular do pH. O cobre induz uma resposta aguda muito rápida, possivelmente através de uma acção directa na face externa do plasmalema, interferindo com o antiporte Na^+/H^+. A importância da citometria de fluxo em estudos de citotoxicidade foi bem evidenciada neste trabalho.

A adsorção/absorção do cobre nas primeiras horas de contacto com o metal são significativas mas diminuem nos dias posteriores sugerindo um controlo celular dos mesmos. Como mecanismos de tolerância ao cobre(II) foram observados em *P. micans* a ligação do metal às placas tecais celulósicas e ao amido, a síntese de uma proteínas de 25 kDa (possivelmente será uma proteína de "stress") e efluxo do metal. Em *A. carterae* parece ocorrer a síntese de uma proteína de baixa massa molecular correspondente a uma fitoquelatina, efluxo do metal e a formação de cistos como resposta a concentrações excepcionalmente elevadas de cobre(II).

ABSTRACT

In this Thesis, several aspects of the toxicity of copper(II) on two unicellular species of marine dinoflagellates common in portuguese coastal waters, *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans*, are studied *in vitro*. The main points considered were (1) the chemical speciation of copper, (2) experimental designs that simulate two different naturally occurring situations, (3) the toxicity of copper in the presence of different pH buffers, (4) biochemical, physiological and structural alterations induced by copper, and (5) the tolerance mechanisms towards copper toxicity. The study was developed in collaboration with researchers of other scientific areas, fact that enable an interdisciplinary interpretation of the results.

The results obtained support the increasing evidence that, besides the free copper(II) ion, also metal bound to compounds not directly assimilated can interact with the algae. In this regarding, the period of contact and the concentrations of the participant biotic and abiotic species have to be long or high enough to disturb the initial equilibrium towards the dissociation of these compounds. In the interactions copper-algae, the importance of the kinetic aspects of chemical reactions and of the pH on copper toxicity are emphasized.

To achieve the pH buffering of culture medium, 3-[N-bis(hydroxy-ethyl) amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid (HEPES) and N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane-sulfonic acid (DIPSO) were studied comparatively. Both pH buffers do not interfere with the growth of the microalgae. Copper(II) toxicity on *A. carterae* was enhanced by 25 mM HEPES, probably because of the surface active properties that this buffer presented. DIPSO, that showed to be a strong copper(II) complexant and also a surfactant, reduced drastically the toxic effect of copper(II) on *A. carterae*. These results suggest that DIPSO may be used simultaneously as a pH and a copper(II) buffer in studies *in vitro* .

In a range of sublethal concentrations, copper(II) interferes with the biology of both species. It induces a lag phase in exponential growing cultures, decreases the growth rate, the biomass and the total soluble protein content (a relative enhance or decrease of some proteins was observed), interferes with the cell motility, induces leakage of intracellular potassium due to alteration of cell permeability, and increases the cellular levels of hydrogen peroxide and of the superoxide anion (effects indicative of oxidative burst). The metabolic and physiological alterations are associated with structural alterations, specially at three

important metabolic centers, the chloroplast, the dictyosomes and the mitochondria. Both organisms showed the capability to recover after the initial period of exposure to the metal. In copper concentrations inhibitory of growth cell death occurs. However, under these conditions, the majority of *A. carterae* cells encysts (the cells become spherical and non motile and gather in groups), the plasma membrane integrity remains preserved as well as the cell structure and the cells undergo a rise in the intracellular pH. Copper induces a very rapid acute response, probably by a direct action on the external part of the plasma membrane, interfering with the Na^+/H^+ antiport. This work emphasizes the importance of flow cytometry in cytotoxic studies.

Copper adsorption/absorption in the first hours of contact with the metal were significant but decrease in the subsequent days suggesting a cellular control of these phenomena. As tolerance mechanisms to copper(II), *P. micans* binds the metal to the cellulosic thecal plates and to starch, produces a 25 kDa protein (possibly a stress protein) and efflux the metal. In *A. carterae*, it seems probable to occur the synthesis of a low molecular protein, a phytochelatin, efflux of the metal and the formation of temporary cysts as an answer to exceptionally high copper(II) concentrations.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A superfície da Terra é dominada pelos oceanos que contêm 97% de toda a água existente (Austin, 1988). Pela sua grande importância para o Homem, a conservação e o equilíbrio químico e biológico dos oceanos é fundamental e, nas últimas décadas, tem surgido uma preocupação crescente e uma consciencialização em relação à sua sobre-utilização (exaustão de recursos piscatórios e níveis crescentes de poluição).

A água do mar é quimicamente muito complexa, contendo uma mistura de pelo menos 80 elementos, destacando-se metais (Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}), ligandos inorgânicos (OH^-, Cl^-, SO_4^{2-}, HCO^{3-}, PO_4^{3-}) e orgânicos (ureia, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos húmicos e fúlvicos) em solução. O seu pH situa-se entre 7,5 e 8,5 e a sua salinidade (parâmetro característico por serem componentes dominantes os iões sódio e cloreto) varia entre 32 e 38‰ em alto mar e entre 10 e 32 ‰ em áreas costeiras.

A importância dos organismos aquáticos para a habitabilidade na Terra não pode ser subestimada; três quartos do meio ambiente terrestre são de natureza aquática (Yentsch & Horan, 1989). Apesar da gama de dimensões dos organismos unicelulares variar, aproximadamente, entre 0,2 e 200 μm em diâmetro e a sua concentração entre 10^2 e 10^6 células cm^{-3} em águas costeiras, a sua biomassa representa cerca de 50% da biomassa total do Planeta. Muitos destes organismos são os principais consumidores do CO_2 convertendo-o, através da fotossíntese, em carbono orgânico. Adicionalmente, são eficientes captadores de energia, absorvendo energia radiante que convertem em energia química. O fitoplancton marinho é o produtor mais importante de biomassa no nosso planeta, excedendo a produção de todos os ecossistemas terrestres (Häder, 1995). Situando-se na base da cadeia trófica é, portanto, essencial para a vida na Terra. A maioria dos grupos de algas contribuem com espécies para a flora fitoplanctónica, mas as diatomácias e os dinoflagelados são os grupos mais abundantes em águas marinhas.

Devido à importância dos dinoflagelados nos sistemas aquáticos e aos níveis crescentes de metais poluentes, nesta Dissertação foram estudados vários aspectos da toxicidade induzida pelo cobre(II) em duas espécies de dinoflagelados marinhos pelo que, de seguida, se procede a uma resenha bibliográfica alargada explanando aspectos fundamentais para uma melhor compreensão do trabalho apresentado.

1. DINOFLAGELADOS

1.1. Caracterização geral

Os dinoflagelados constituem um grupo de organismos eucarióticos com várias características muito peculiares e apresentam uma grande diversidade morfológica, nutricional e de hábitos de vida. Estão extremamente bem adaptados ao seu meio ambiente como é demonstrado pela sua longa existência, que alguns investigadores especulam remontar à base da evolução eucariótica.

A designação de dinoflagelados tem origem no movimento característico destes organismos (*dinos* - rotação). São considerados por certos autores como pertencentes à divisão Pyrrophyta cuja designação advem da cor que a maioria destes organismos possui (*pyrrhos* - cor de fogo).

Este grupo de organismos tem suscitado um interesse crescente. Aspectos da sua biologia, taxonomia e paleontologia têm sido compilados nas últimas décadas em diversos trabalhos podendo-se referir Sarjeant (1974), Spector (1984a), Dodge (1982; 1985), Lage (1986), Taylor (1987c) e Fensome *et al.* (1993). Um elevado número de publicações surgem regularmente em revistas científicas de áreas diversificadas.

Os dinoflagelados são seres essencialmente unicelulares. É um grupo que possui uma grande diversidade morfológica, podendo certos organismos apresentarem modificações altamente bizarras e elaboradas. As células flageladas apresentam uma forma básica característica (Figs 2, 11, 15 e 16). Possuem dois flagelos heteromórficos e heterodinâmicos distintos: um transversal em forma de fita, ondulado com um batimento para o lado esquerdo da célula imprimindo um movimento rotacional (Fig. 16), e um longitudinal com batimento posterior propulsionando a célula para a frente (Figs 15 e 16). Encontram-se geralmente inseridos em dois sulcos (transversal - *cingulum* (Figs 15 e 22) e longitundinal - *sulcus* (Fig. 15), respectivamente). Na maioria dos dinoflagelados esta célula biflagelada (mastigoto) é a fase principal do seu ciclo de vida haplonte, embora em alguns seja uma fase transitória e curta. Podem também no seu ciclo de vida incluir fases cocóides, filamentosas, coloniais, amebóides, cenocíticas, enquistadas ou simbióticas.

O revestimento celular é complexo e variável em estrutura. A célula é rodeada pela membrana celular (plasmalema) para o interior da qual se localiza uma camada de

vesículas(Fig. 27) (vesículas anfiesmais ou tecais) podendo ainda mais internamente surgirem microtúbulos (Dodge, 1984). Estas vesículas podem conter placas celulósicas de espessura variável, as placas tecais (Figs 7-10, 13, 17, 23, 24 e 30), sendo estas espécies designadas por tecadas ou "armadas", ou não possuirem placas tecais, sendo então designadas por atecadas ou nuas. Existe uma relação aproximadamente inversa entre o número de vesículas anfiesmais, e a presença (e espessura relativa) ou ausência das placas tecais.

Todos os dinoflagelados com excepção dos membros da subdivisão Syndinea (Fensome *et al.*, 1993) possuem um dinocário, isto é, um núcleo caracterizado pelos cromossomas não possuirem histonas e permanecerem condensados entre as divisões celulares (Figs 6, 22 e 23) e em todos a membrana nuclear permanece intacta durante a mitose (mitose fechada), sendo por isso o fuso mitótico extranuclear.

Os dinoflagelados encontram-se na maioria dos ambientes aquáticos. As espécies marinhas formam um grupo antigo e bem sucedido de microrganismos adaptados a "habitats" pelágicos e bênticos desde os mares boreais aos tropicais. Muitas espécies são cosmopolitas e provavelmente representam variedades geográficas de complexos de espécies. São dos grupos que mais vulgarmente originam explosões populacionais ("blooms") que, devido à coloração que originam, são designadas por "marés vermelhas". A eutrofização de numerosas áreas, principalmente costeiras, parece suportar e ter induzido um aumento significativo de "blooms" de dinoflagelados (Taylor, 1987a). Várias espécies produzem toxinas de diferentes tipos, sendo das mais potentes actualmente conhecidas. Estas marés tóxicas possuem um grande impacto pela mortalidade piscícula que causam, por problemas de saúde pública devido a intoxicações alimentares com casos de mortalidade humana, por problemas económicos de comercialização de marisco, e ainda por problemas na indústia hoteleira. Certas espécies originam cistos que possuem valor como indicadores fósseis bioestratigráficos.

A posição filogenética e sistemática dos dinoflagelados tem sido controversamente discutida por vários autores (Eaton, 1980; Tappan, 1980; Taylor, 1980; Bujak & Williams, 1981; Bujak & Davies, 1983, Loeblich III, 1984; Evitt, 1985; Goodman, 1987; Fensome *et al.*, 1993). Segundo Fensome *et al.* (1993), parece não existir grande dúvida que os dinoflagelados representam uma linhagem antiga de protistas. Estes autores consideram como protistas os organismos unicelulares eucarióticos, englobando tanto algas como protozoários, atribuindo a esta designação uma função biológica e não botânica ou zoológica. Como outros eucariotas, e contrariamente aos procariotas, os dinoflagelados contêm esteróis que presumivelmente funcionam como componentes estruturais das suas membranas (Vanderheuvel, 1965; Bloch, 1976). Contudo, peculiaridades ultraestruturais e bioquímicas deste grupo reforçam o conceito de que os dinoflagelados ocupam uma posição perto da base da separação eucariótica e são também um grupo altamente especializado (Loeblich III, 1976; Taylor, 1980). Pensa-se que tenham divergido no Precâmbrico posterior. Comparações

Fig. 1 - *A. carterae* e *P. micans* em microscopia óptica de epifluorescência. *P. micans* surge a vermelho devido à autofluorescência e *A. carterae* apresenta o núcleo fortemente marcado pelo DAPI, sendo perceptível o seu contorno celular. A sobreposição das duas imagens permite comparar a diferença significativa de tamanho entre as duas espécies. Ampliação: 2 000x

Fig. 2 - *A. carterae* em microscopia óptica de contraste de fase. Na célula distingue-se o epicone (e), o hipocone (h), o cloroplasto localizado perifericamente (Cl) e o núcleo (N) na região posterior da célula. Ampliação: 4 000x

Fig. 3 - *A. carterae* em microscopia óptica de epifluorescência marcado pelo DAPI onde se observa o núcleo ovóide claramente destacado (N). Ampliação: 2 000x

Fig. 4 - *A. carterae* em microscopia óptica de epifluorescência marcado pelo DAPI onde, para além do núcleo (N), está evidenciado o pirenóide (Pi). Ampliação: 1 600x

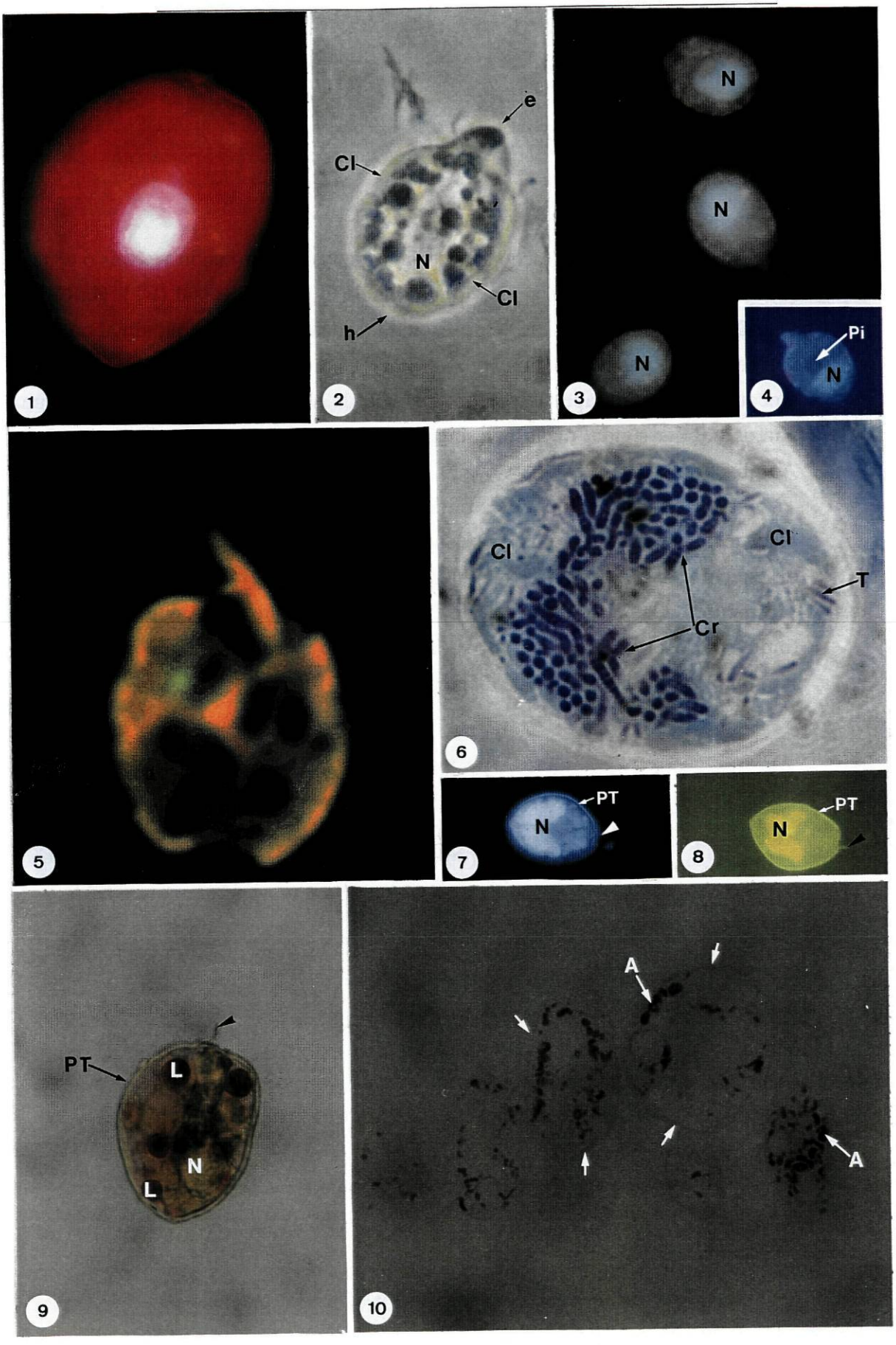
Fig. 5 - *A. carterae* em microscopia óptica de confocal visualizando-se a estrutura reticulada e periférica do cloroplasto. A autofluorescência celular foi adquirida em vários planos do organismo e posteriormente efectuou-se a reconstituição tridimensional do cloroplasto. Ampliação: 6 200x

Fig. 6 - Secção transversal (corte semifino) de *P. micans* em microscopia óptica de campo claro corada pelo azul de azur + azul de metileno. O cloroplasto (Cl), corado de azul claro, localiza-se perifericamente enquanto, a azul mais forte, se distinguem os cromossomas (Cr) individualizados no interior do núcleo em forma de V e os tricocistos (T). Ampliação: 4 000x

Figs. 7 e 8 - *P. micans* em microscopia óptica de epifluorescência marcado pelo DAPI (Fig. 7) e pelo laranja de acridina (Fig. 8). Distingue-se o núcleo, com a forma em V característica, localizado na parte posterior da célula e as placas tecais (PT) - valvas, incluindo a pequena placa apical em forma de espículo (ponta de seta). Ampliação: 800x

Fig. 9 - *P. micans* em microscopia óptica de campo claro corado pelo vermelho neutro, distinguindo-se quatro gotas lipídicas (L) de grandes dimensões, o núcleo (N) as valvas (PT) e a pequena placa apical em forma de espículo (ponta de seta). Ampliação: 1 600x

Fig. 10 - Secção transversal (corte semifino) de *P. micans* em microscopia óptica de campo claro corada pelo ácido periódico-reagente de Schiff estando realçado o amido (A) a rosa forte e com uma leve coloração rosa as placas tecais celulósicas (setas). Ampliação: 1 600x


1
2
e
Cl
N
Cl
h
3
N
N
N
4
Pi
N
5
6
Cl
Cl
T
Cr
7
PT
N
8
PT
N
9
PT
L
N
L
10
A
A

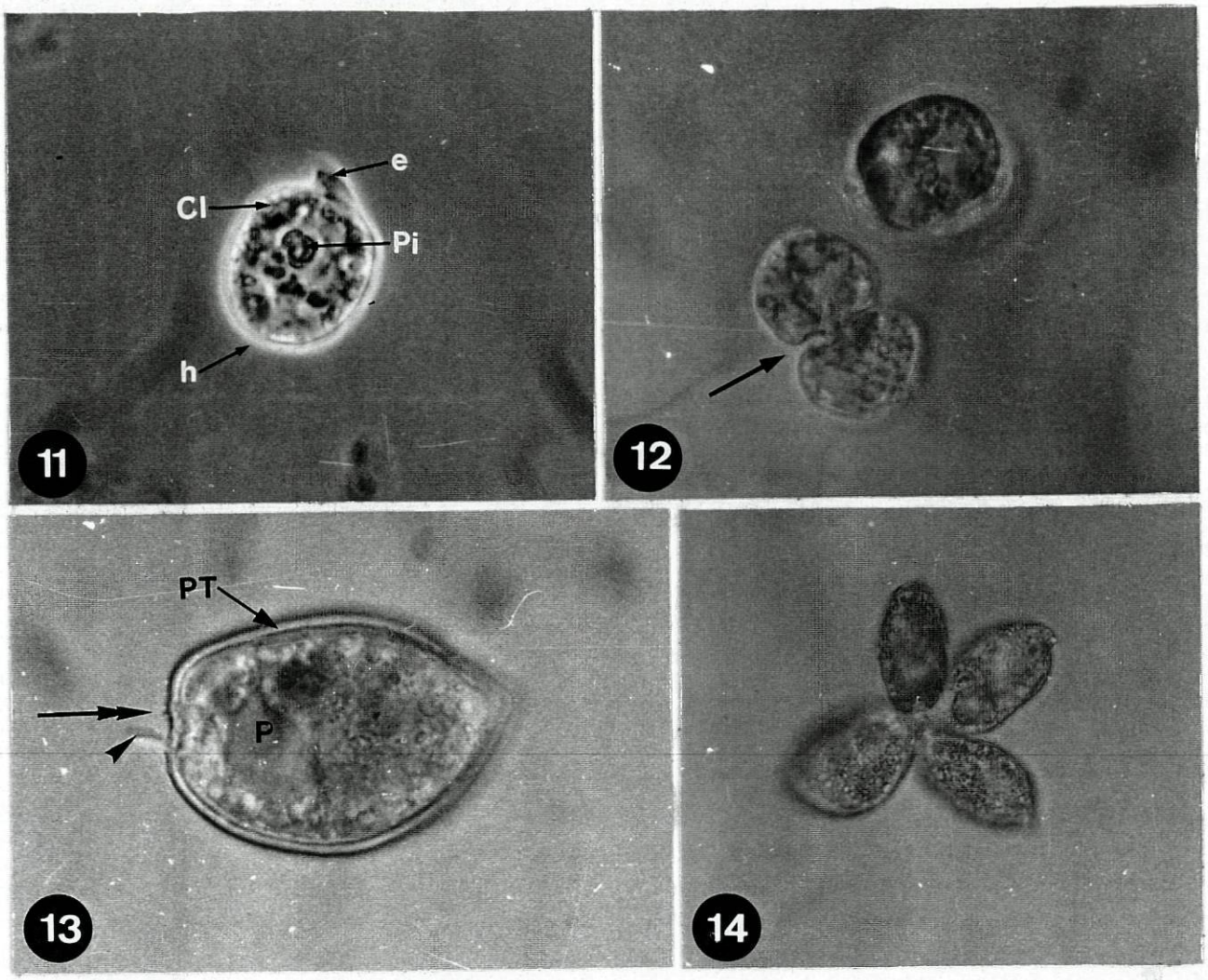


Fig. 11 - *A. carterae* em microscopia óptica de contraste de fase distinguindo-se o epicone (e) e o hipocone (h), porções periféricas do cloroplasto (Cl) e o pirenóide (Pi) de localização central. Ampliação: 3 500x

Fig. 12 - *A. carterae* em microscopia óptica de campo claro onde são visíveis duas células (seta) provavelmente em fusão gamética. Ampliação: 3 500x

Figs 13 e 14 - *P. micans* em microscopia óptica de campo claro visualizando-se (Fig. 13) as valvas (PT), a pequena placa em forma de espículo (ponta de seta) na extremidade apical (dupla seta) da célula e a púsula (P) e (Fig. 14) uma tétrada de *P. micans* em final de divisão sexual. Ampliação: 1 800x e 900x

moleculares e ultraestruturais indicam que os dinoflagelados estão intimamente relacionados com os ciliados e os apicomplexa e, juntamente com estes grupos de protistas, constituem um grupo irmão das algas cromófitas (diatomácias, silicoflagelados e outras).

Recentemente, num esforço conjunto de neontologistas e paleontologistas, Fensome *et al.* (1993) desenvolveram um esquema segundo o qual a divisão Dinoflagellata é dividida em duas subdivisões e três classes com base na estratégia nuclear; em cinco subclasses com base no tipo geral de tabulação; em catorze ordens, em dez subordens e em cinquenta e seis famílias.

Neste estudo, foram usadas duas espécies de dinoflagelados como modelo biológico, pelo que seguidamente se procederá a uma descrição mais detalhada destes organismos efectuando-se uma compilação de vários aspectos focados em estudos realizados até à data por diferentes investigadores. Esta descrição será documentada com diversos aspectos morfo-estruturais de ambas as espécies apresentados nas Figuras 1 - 32.

1.2. Posição taxonómica e descrição geral de *A. carterae* e de *P. micans*

Amphidinium carterae Hulburt

É sistematicamente classificado segundo Fensome *et al.* (1993) como pertencente a:
Classe - Dinophyceae
Subclasse - Gymnodiniphycidae
Ordem - Gymnodiniales
Subordem - Gymnodiniineae
Família - Gymnodiniaceae

O género *Amphidinium* deve a sua designação a Claparède & Lachmann (1859) e é caracterizado por estes dinoflagelados serem nus, com um epicone muito reduzido (Figs 2, 11, 15, 16, 22 e 27) e o *cingulum* (Figs 15, 22 e 27) situado perto da extremidade anterior da célula (Dodge, 1982).

Amphidinium carterae foi inicialmente descrito por Carter (1937) e englobado na espécie *A. klebsi*. Em 1957, observando organismos da região de Woods Hole, Hulburt criou uma nova espécie para este organismo com base no tamanho e tipo de cloroplasto. Posteriormente, Dodge & Crawford (1968) fizeram uma descrição detalhada da sua estrutura.

A. carterae é um dinoflagelado marinho pequeno medindo entre cerca de 11 a 24 μm de comprimento e 6 a 17 μm de largura (Fig. 1) (Hulburt, 1957). É uma espécie muito comum em águas temperadas pouco profundas como poças nas rochas, áreas arenosas molhadas e charcos salgados. É uma espécie bêntica intersticial e pode migrar durante as horas de dia para a coluna de água. Foi descrita a sua existência em muitas partes do mundo (Taylor, 1971) como, por exemplo, à volta das Ilhas Britânicas (Dodge, 1982), na comunidade epi-bêntica de um recife de coral na Polinésia francesa (Fukuyo, 1981) e em viveiros de peixes no Estuário do Rio Sado (Sampayo, 1985) onde se verificam explosões populacionais sazonais.

O corpo é achatado dorsoventralmente, oval em vista ventral e com um epicone pequeno, assimétrico, direccionado para a esquerda (Figs 2, 11, 15 e 16). O *cingulum* rodeia o epicone à excepção de uma pequena área no lado esquerdo, apresentando-se baixo e em forma de V em vista ventral e alto em vista dorsal (Fig. 15). É no hipocone arredondado que se localiza o *sulcus* que, deslocando-se ligeiramente para a direita, se prolonga, alargando, desde o *cingulum* até à base (Fig. 15). Os dois flagelos (Figs 15 e 16), um cercando o epicone e o outro projectando-se longitudinalmente, emergem antapicalmente na face ventral de poros flagelares diferentes (flagelação dinoconte). O flagelo longitudinal possui 1,5 vezes o comprimento da célula. A célula é revestida por cerca de 150 unidades poligonais (geralmente de seis lados) sem placas tecais, as vesículas anfiesmais, recobertas externamente pelo plasmalema (Fig. 27, encaixe **a**). Subjacente às vesículas, existe um citoesqueleto de microtúbulos dispostos em grupos de dois ou quatro envolvendo a célula (Fig. 27, encaixe **b**). Galleron (1979) referiu que o revestimento desta célula é muito resistente e que as suas membranas possuem grande permeabilidade. *A. carterae* é considerado um organismo bastante resistente e que cresce rapidamente em cultura *in vitro*.

Prorocentrum micans Ehrenberg

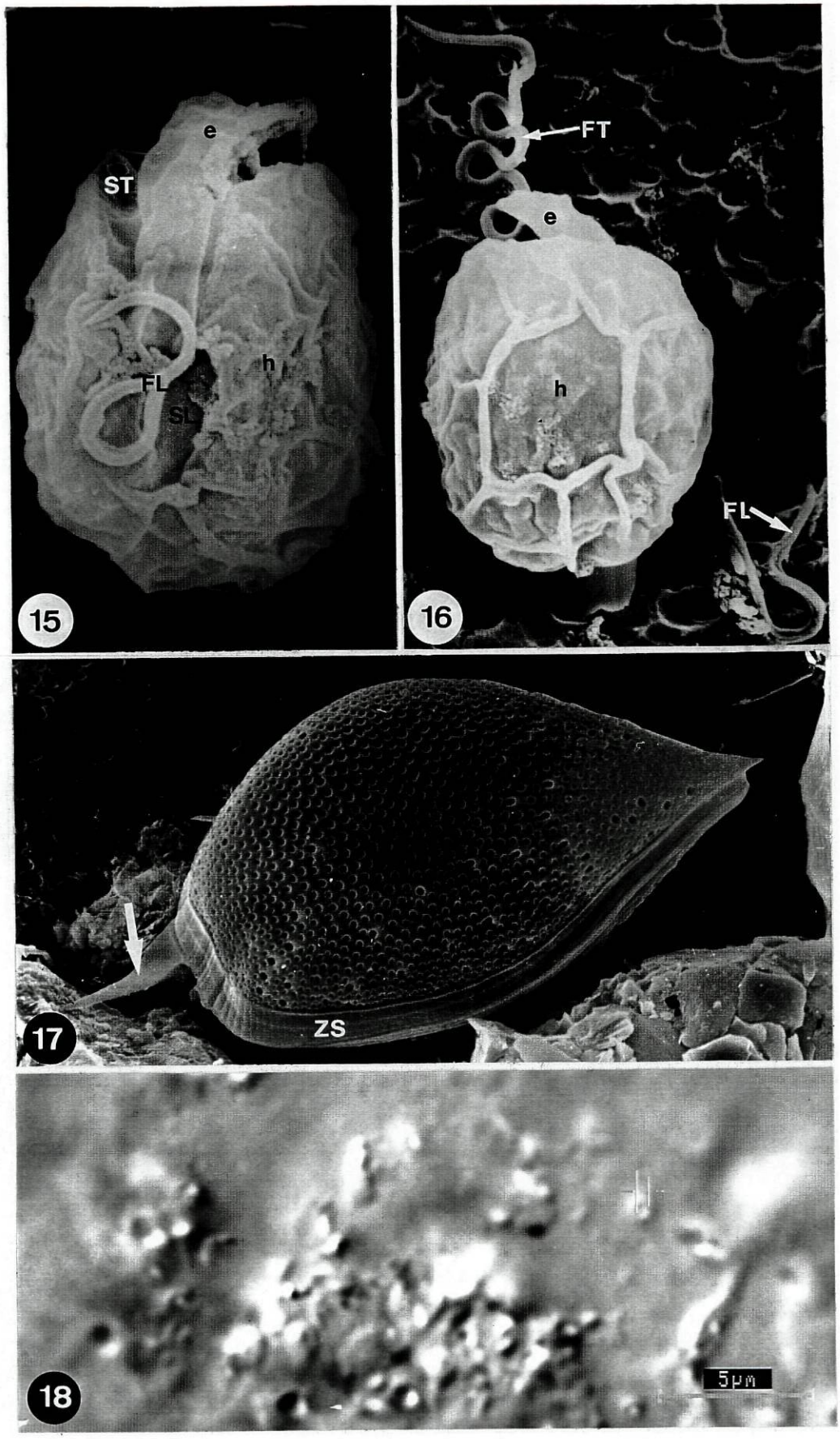
É sistematicamente classificado segundo Fensome *et al.* (1993) como pertencente a:
Classe - Dinophyceae
Subclasse - Prorocentrophycidae
Ordem - Prorocentrales
Família - Prorocentraceae

Tanto o género *Prorocentrum* como o restritivo específico "*micans*" foram atribuidos pelo grande taxonomista e microscopista Christian Gottfried Ehrenberg (1834). A primeira descrição de *P. micans* deve-se a G. A. Michaelis em 1830 em que o autor o refere como um "Cercarien" num trabalho em que ilustra vários organismos que seriam fontes de

Figs 15 e 16 - *A. carterae* em microscopia electrónica de varrimento sendo visíveis o epicone (e), o hipocone (h) e os flagelos longitudinal (FL) e transversal (FT). Na Fig. 15 visualiza-se a face ventral da célula estando evidente o sulco longitudinal ou *sulcus* (SL) e o sulco transversal ou *cingulum* (ST). Como se trata de uma espécie nua ou atecada é revestida apenas por um sistema de membranas, não possuindo uma parede celular rígida, razão pela qual se observa um certo enrugamento celular. Ampliações: 9 200x e 6 200x

Fig. 17 - *P. micans* em microscopia electrónica de varrimento destacando-se uma grande placa tecal perfurada por numerosos poros de tricocistos, a pequena placa em forma de espículo (seta) e a zona de sutura (ZS) entre as duas valvas. Ampliação: 4 600x

Fig. 18 - Pormenor da superfície exterior de *P. micans* em microscopia óptica de confocal onde se observam vários poros. O pequeno poro assinalado pelas barras longitudinais mede 0,39 μm de diâmetro.


e
ST
h
FL
SL
15
FT
e
h
FL
16
ZS
17
5µm
18

luminiscência no mar Báltico. Contudo, *P. micans* não é conhecido como emitindo bioluminiscência.

Este género é caraterizado pelas suas células serem arredondadas, elípticas, cordiformes ou lanceoladas em vista valvar, possuirem duas placas tecais principais, as valvas (Figs 7-9, 13, 17 e 23), perfeitamente unidas pelas suas extremidades através da sutura sagital (Fig. 17). Na região apical do poro flagelar, onde emergem os dois flagelos típicos (flagelação desmoconte), existe uma série de pequenas placas tecais (Fig. 23).

P. micans apresenta a extremidade anterior arredondada e a posterior ponteaguda, de forma ovóide, sendo mais largo na parte anterior e geralmente mais comprido que largo (Figs 9, 13, 17 e 23) (entre 35 e 70 μm de comprimento e 20 e 50 μm de largura (Fig. 1)). A tabulação de *P. micans* é do tipo prorocentróide em que a teca é formada pelas duas valvas e 12 placas periflagelares pequenas. Uma das valvas é mais escavada devido à zona do poro flagelar tendo sido designada como a valva direita por Bütschli (1885) e a outra a valva esquerda. Possui uma placa anterior proeminente em forma de espícula (Figs 7-9, 13, 17, 19 e 23) e as placas tecais são perfuradas por numerosos poros tubulares, geralmente dispostos em filas radiais, por onde emergem os tricocistos (Figs 17, 18 e 30). O flagelo transversal (ondulado), enrolado fortemente sobre a superfície celular, curva-se inicial e invariavelmente para a valva esquerda, mas só se encontra ligado à célula na sua origem. Ambos os flagelos saem de um só poro. O tipo de batimento e a estrutura dos flagelos é semelhante à dos dinoflagelados com flagelação dinoconte.

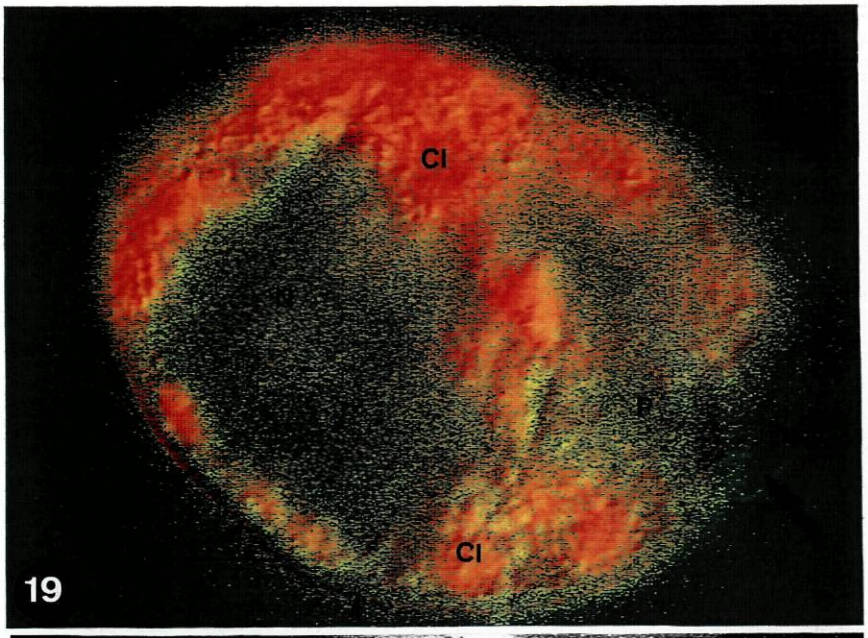
P. micans é uma espécie nerítica, cosmopolita, representada praticamente em todas as partes do mundo entre as latitudes 60 °N e 60 °S (Braarud & Rossavik, 1951) com uma ampla distribuição geográfica e, desde cedo, tem sido objecto de estudos diversificados por numerosos investigadores (ex: Bütschli, 1885; Schütt, 1892; Gross, 1937; Braarud & Rossavik, 1951; Bursa, 1959; Silva, 1959, Kowallik, 1969; Dodge & Bibby, 1973; Dodge, 1975; Bhaud *et al.*, 1988). A sua presença em águas costeiras portuguesas está bem documentada (Moita, 1993) e é um organismo geralmente presente em colheitas de fitoplancton efectuadas na região do Porto. Foi uma espécie considerada endémica da lagoa de Óbidos (Silva, 1952, 1968) encontrando-se praticamente presente durante todo o ano. Em certas épocas surgiu em abundância mas, raramente, foram observadas grandes densidades (2 a $3x10^6$ células dm^{-3}) (Silva, 1980). Em cultura, pode apresentar variações consideráveis na forma (Braarud & Rossavik, 1951; Bursa, 1959; Silva, 1959), aspecto que foi igualmente observado nas culturas usadas nos trabalhos apresentados nesta Dissertação.

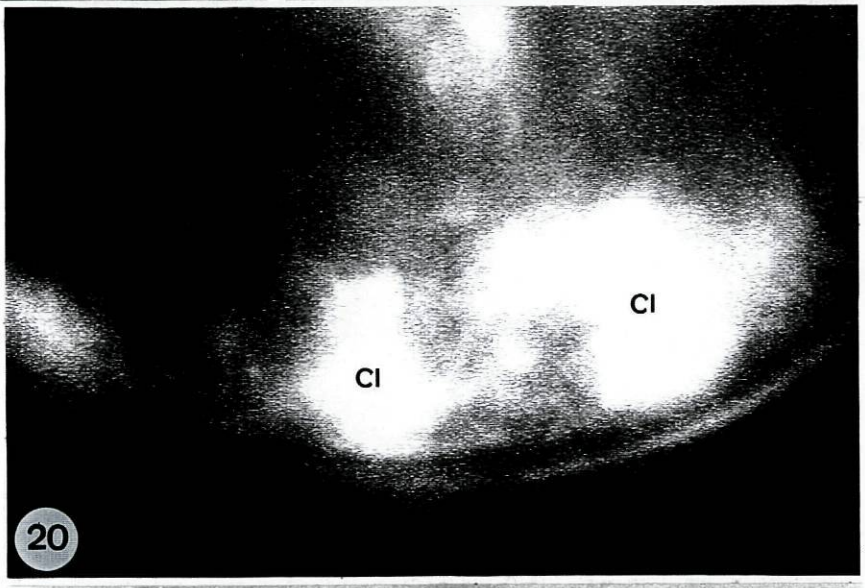
Figs 19 à 21 - Imagens de *P. micans* onde se realça a natureza glicoproteica da superfície celular.

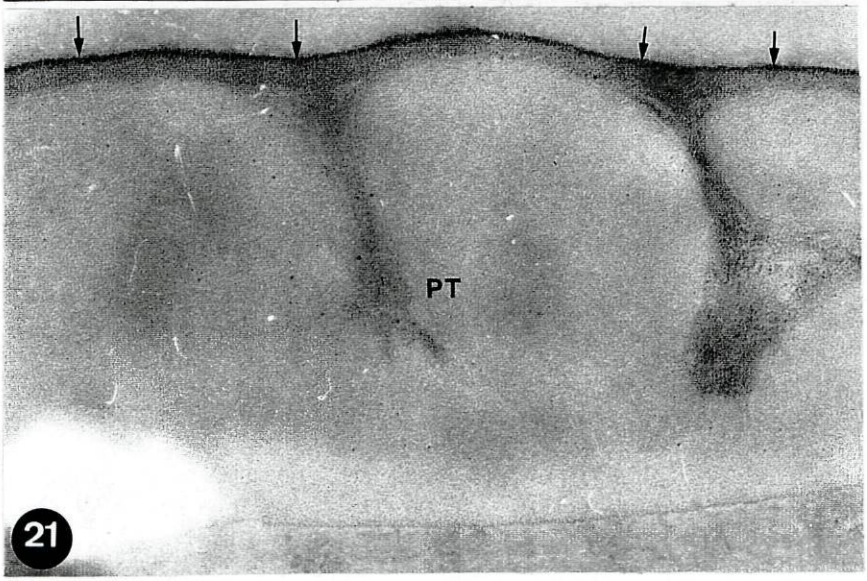
Fig. 19 - O cloroplasto (Cl) destaca-se no interior da célula devido à emissão da autofluorescência das clorofilas. As regiões do núcleo (N) e da púsula (P) localizam-se nas áreas intracelulares a fundo verde pois não emitem autofluorescência. A placa tecal não apresenta autofluorescência como se pode verificar no espículo (seta) e pela existência de uma camada não fluorescente exteriormente ao cloroplasto (pontas de seta). Externamente existe uma fina região autofluorescente que corresponde ao glicocálice. Microscopia de confocal ($\lambda_{excitação}$ = 488 nm). Ampliação: 4 300x

Fig. 20 - Porção celular em que se distingue bem o cloroplasto (Cl) intensamente fluorescente, a camada não fluorescente que corresponde à placa tecal e externamente o glicocálice fluorescente. Microscopia de confocal. ($\lambda_{excitação}$ = 488 nm) Ampliação: 9 200x

Fig. 21 - Pormenor da placa tecal (PT) após tratamento com Thiéry observando-se a presença de marcação à superfície, indicativa da natureza glicosídica do glicocálice (setas). Microscopia electrónica de transmissão (TEM) Ampliação: 58 100x


Cl
Cl
19


Cl
Cl
20


PT
21

1.3. Aspectos estruturais de *A. carterae* e de *P. micans*

O citoplasma de ambas as espécies é bastante rico em ribossomas (Figs 22-23, 25-26 e 29-32), vários organelos como mitocôndrias com cristas tubulares e formas bizarras (Figs 22--26 e 28-32), um cloroplasto (Figs 2, 6, 11, 19, 22-26 e 28-30), retículo endoplasmático liso e rugoso (Figs 26, 29 e 31), tricocistos (Figs 6, 23-24, 28, 30 e 32) (estudados em *P. micans* por Bouck & Sweeney, 1966), púsula (Figs 13, 19, 22 e 27-28) e vacúolos (Figs 22-23 e 31), e inclusões como grãos de amido (Figs 10, 22, 26 e 30) e gotículas lipídicas (Figs 9, 22-23, 28 e 31).

Em ambas as espécies o cloroplasto reticulado encontra-se localizado à periferia da célula (Figs 2, 5, 11 e 24). Caracteristicamente, os tilacóides dispõem-se em grupos de três e o invólucro cloroplastideal é composto por três membranas. *A. carterae* possui um grande pirenóide central envolto por material polissacarídico de reserva (Figs 4, 11 e 25) enquanto que *P. micans* possui dois grandes pirenóides laterais, situados opostamente (Figs 24, 26 e 29), tendo a sua ultraestrutura sido descrita por Kowallik (1969). Kowallik & Haberkorn (1971) verificaram a presença de numerosos genóferos espalhados pelo cloroplasto de *P. micans*.

O complexo de Golgi localiza-se no centro da célula, dispondo-se os vários dictiossomas num semi-círculo designado por esfera arcoplásmica (Figs 22-24, 26 e 30-31). A face *trans* dos dictiossomas de *A. carterae* é geralmente caracterizada pela presença de vesículas hipertrofiadas e perfis vesiculares mais pequenos, medindo 70 ± 5 nm de diâmetro, e a face *cis* está intimamente associada com elementos do retículo endoplasmático através de vesículas de transição (Oliveira & Huynh, 1989).

O aparelho vacuolar de *A. carterae* é formado por dois compartimentos principais (Fig. 22) que são distintos e independentes da púsula. Um é constituido pelos vacúolos localizados perifericamente, enquanto o outro é formado por perfis de vacúolos centrais. Oliveira & Huynh (1989) observaram que esta espécie quando cultivada na presença de nitrato como fonte de azoto, os vacúolos periféricos se apresentavam bem desenvolvidos e práticamente sem inclusões membranosas e que os microcorpos eram raros. Estes aspectos foram igualmente observados em *A. carterae* usado nos estudos apresentados nesta Dissertação.

Segundo a classificação de Dodge (1972), as duas púsulas de *A. carterae* (Figs 22 e 27) são do tipo simples no qual as cerca de 40 vesículas abrem directamente para o canal flagelar (Dodge & Crawford, 1968), enquanto que a púsula de *P. micans* (Fig. 28) é do tipo púsula-

-saco formada por numerosas invaginações num extenso sistema reticulado adjacente às bases flagelares. Tem sido observada uma íntima relação entre a púsula e as mitocôndrias, os dictiossomas e numerosas vesículas revestidas. O conteúdo da púsula pode ser variável consistindo em material granular, tubular ou vesicular. A morfologia da púsula de *P. micans* varia em resposta a diferentes níveis de salinidade e temperatura (Klut *et al.*, 1985b). Klut e colaboradores (1987) descreveram o modelo do sistema canal flagelar - púsula em *A. carterae*. Neste, o revestimento celular estende-se para o canal flagelar e parece terminar na região do colar flagelar. Abaixo deste colar a membrana citoplasmática continua para formar uma grande câmara flagelar que abre para a púsula composta por numerosas unidades vesiculares. Cada uma destas unidades possui uma constrição, o pescoço, rodeada por um colar fibrilar pusular. O canal flagelar é revestido por material aniónico polissacarídico, aparentemente semelhante ao da superfície celular (Klut *et al.*, 1985a).

Roberts e colaboradores (1995) estudaram detalhadamente as estruturas do aparelho e do canal flagelar em *P. micans* elaborando uma reconstituição esquemática do aparelho flagelar e do complexo canal do poro flagelar/canal do poro acessório, incluindo o pedúnculo e porções do aparelho flagelar. Heimann *et al.* (1995) estudaram o desenvolvimento do aparelho flagelar de *P. micans*. Nas diferentes algas estudadas até à data, foram observados quatro mecanismos diferentes de desenvolvimento da raiz flagelar. No caso de *P. micans* este desenvolvimento apresenta características dos quatro mecanismos observados. Roberts (1987) relacionou a configuração do corpo basal de vários dinoflagelados, incluindo *A. carterae* e *P. micans*, com a evolução do aparelho flagelar neste grupo. O ângulo entre os corpos basais nos dinoflagelados pode variar entre aproximadamente paralelo em *Prorocentrum* a anti-paralelo (160-180°) em *Amphidinium*. Aspectos da inserção dos flagelos e do complexo sistema radicular que os interliga foram descritos por Dodge & Crawford (1968).

A superfície celular de ambas as espécies, externamente ao plasmalema, é revestida por uma substância de natureza aniónica polissacarídica descrita por Klut e colaboradores (1985a, 1989). Esta camada foi designada por glicocálice e nas Figuras 19 a 21 a sua presença está evidenciada por diferentes técnicas em *P. micans*.

Schnepf & Winter (1990) observaram a presença em *P. micans* de um cesto microtubular, o pedúnculo, constituido por uma fila de microtúbulos formando um cilindro que engloba pequenas vesículas electronotransparentes ou electronodensas, sendo a sua extremidade distal rodeada por um colar de material electronodenso designado por esfíncter. A sua extremidade proximal é contígua ao canal flagelar. Esta estrutura é geralmente usada para os organismos captarem a sua presa por sucção (Schnepf & Deichgräber, 1984).

Fig. 22 - Secção longitudinal de *A. carterae* em TEM. A célula apresenta uma porção do flagelo transversal (FT) no respectivo sulco (seta), uma extensa região vacuolizada (V) na sua periferia e perfis dispersos no citoplasma, várias porções do cloroplasto (Cl) reticulado, o núcleo (N) com cromossomas (Cr), mitocôndrias (M), dictiossomas (D), o sistema pusular (P), corpo de acumulação (CA), corpo fibroso (CF), reservas lipídicas (L), amido (A) e numerosos ribossomas dispersos no citoplasma. Ampliação: 11 000x

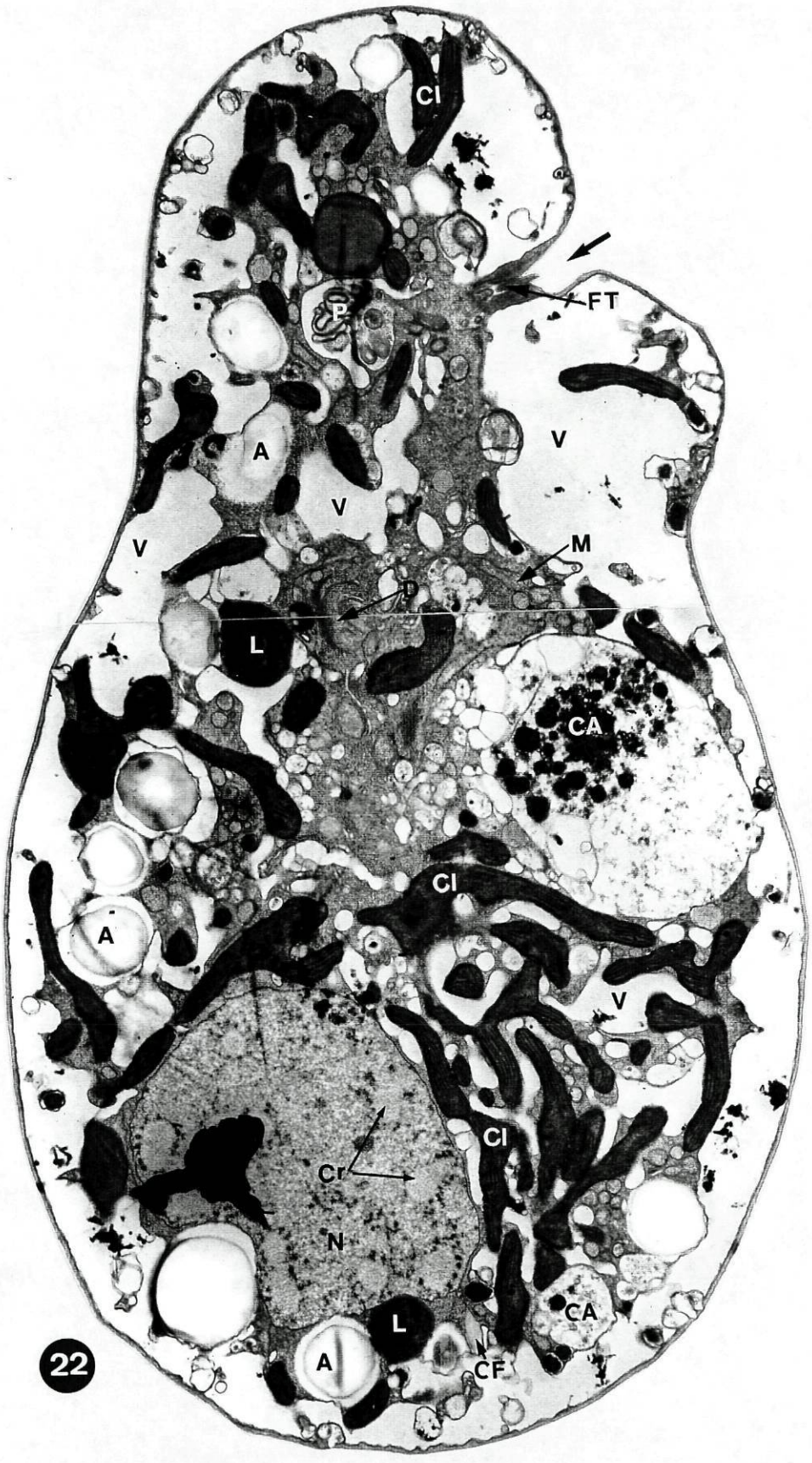
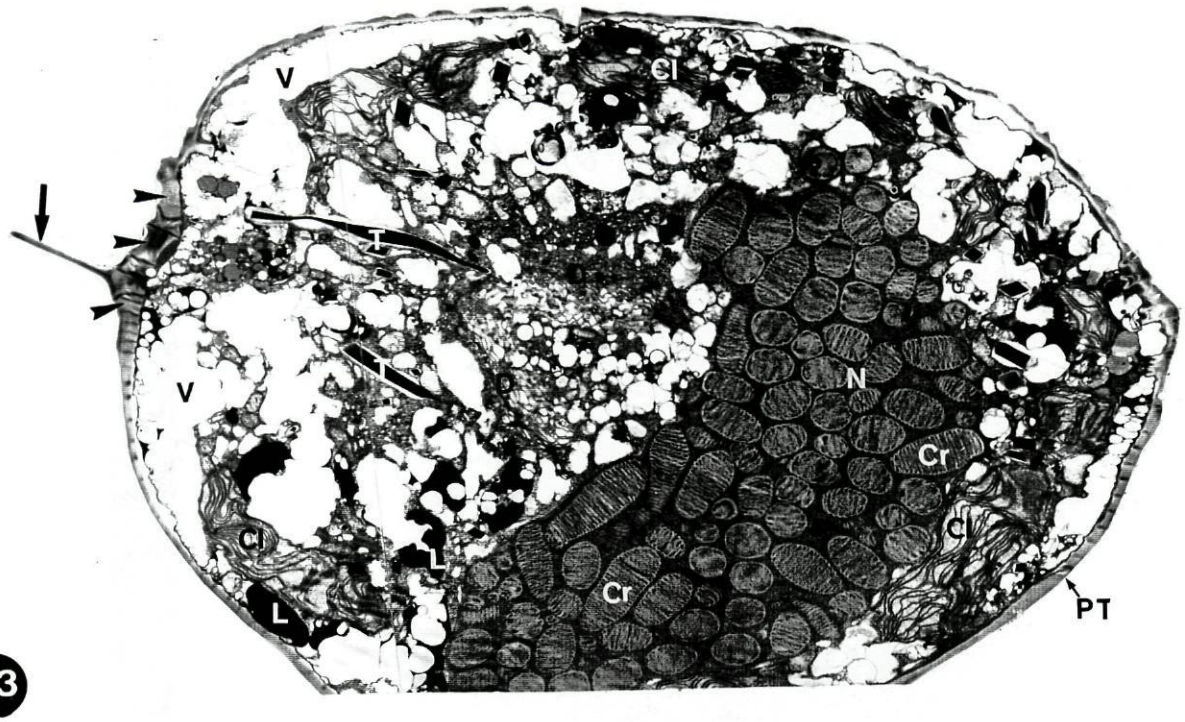
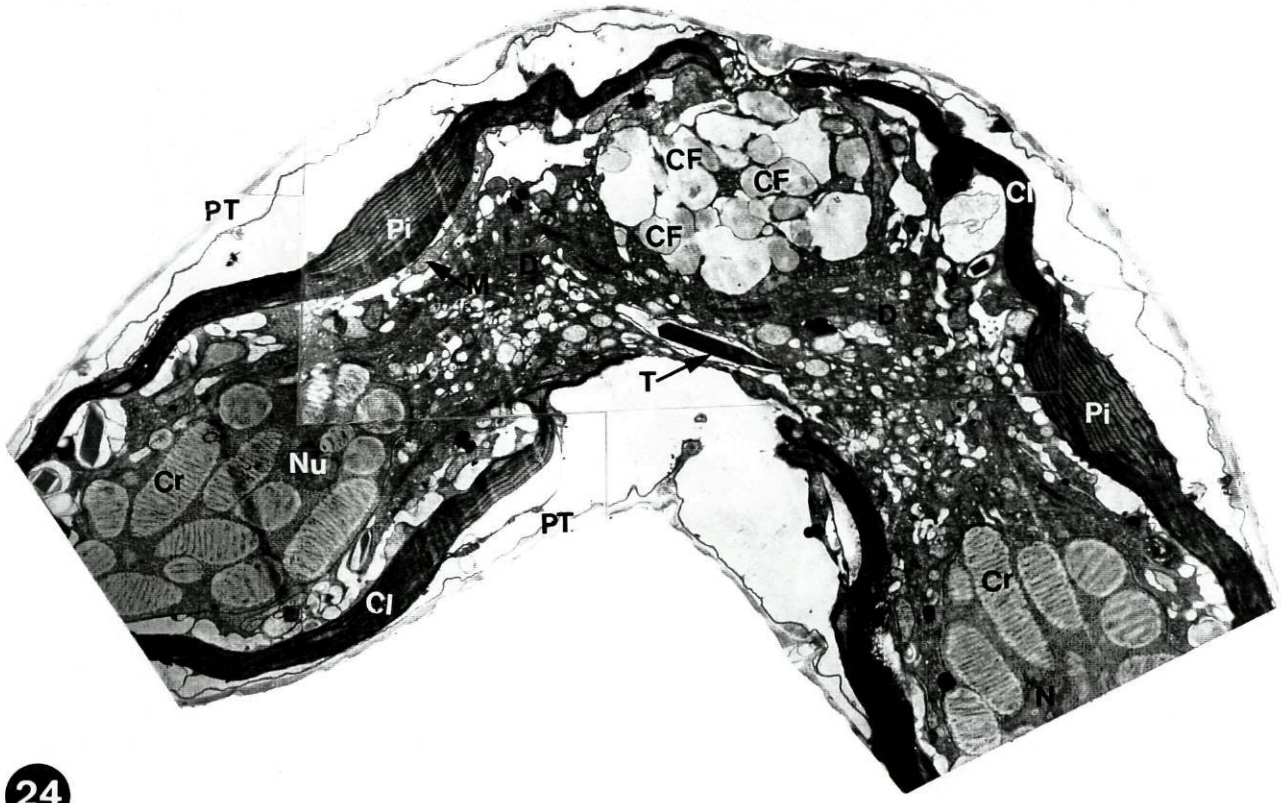

Cl
FT
P
A
V
V
V
M
D
L
CA
Cl
A
V
Cl
Cr
N
L
A
CA
CF
22

Fig. 23 - Secção longitudinal de *P. micans* em TEM. A célula possui no seu revestimento as duas grandes placas tecais (PT), as valvas, e as pequenas placas apicais (pontas de seta) incluindo a que possui forma de espículo (seta) na região onde emergem os dois flagelos. O cloroplasto (Cl) é parietal e reticulado. Centralmente, encontra-se o complexo de Golgi, formado por vários dictiossomas (D) dispostos em semicírculo. Dispersos no citoplasma podem observar-se ribossomas, mitocôndrias (M), tricocistos (T), vacúolos (V) e lípidos (L). O núcleo (N), localizado na extremidade posterior da célula, possui numerosos cromossomas (Cr) permanentemente condensados. Ampliação: 5 800x

Fig. 24 - Secção longitudinal de parte de uma célula de *P. micans* em final de divisão celular. A separação das duas células filhas inicia-se pela porção posterior, como se observa nesta célula, faltando apenas a separação da região apical. CF - corpo fibroso; Cl - cloroplasto; Cr - cromossoma; D - dictiossoma; M - mitocôndria; N - núcleo; Nu - nucléolo; Pi - pirenóide; PT - placa tecal; T - tricocisto.
Ampliação: 5800x



23



24

Em ambas as espécies foram descritos corpos fibrosos (Figs 22, 24 e 30). Em *A. carterae* foi observado um corpo fibroso de composição e função desconhecidas, que parece formar-se no espaço perinuclear destacando-se posteriormente para o citoplasma (Dodge & Crawford, 1968). A presença, nesta espécie, de corpos fibrosos percursores dos pelos flagelares foram referidos por Spector (1984b). Bouck & Sweeney (1966) observaram em *P. micans* corpos rodeados por uma membrana, medindo entre 100 a 300 nm de diâmetro e contendo fibras de aproximadamente 3 nm de diâmetro cuja composição e função são também desconhecidas. Dodge & Bibby (1973) observaram igualmente estes corpos fibrosos. Por vezes observam-se corpos de acumulação (Figs 22 e 28).

O núcleo dinocariótico é ovóide em *A. carterae* (Fig. 3) e em forma de V e de grandes dimensões em *P. micans* (Figs 6-8). O núcleo desta espécie foi estudado entre outros por Dodge (1963a,b) e Kowallik (1971).

Em material criofixado, Soyer (1981) observou no nucleoplasma de *P. micans* a presença de 'cabos' helicoidalmente torcidos de 20-45 nm não digeridos por RNases nem DNases. Foram encontrados na proximidade ou em contacto com os cromossomas e geralmente encontravam-se agrupados em pequenos feixes. Soyer (1981) propôs para este complexo subestrutural nuclear um papel na conservação da estrutura nuclear e no movimento cromossómico durante a mitose. Este tipo de 'cabos' nunca foram referidos em material processado segundo as fixações convencionais (glutaraldeído-tetróxido de ósmio) ou em qualquer outro dinoflagelado.

O invólucro nuclear de *P.micans* é perfurado por numerosos poros (Fig.29) com uma distribuição regular hexagonal (Wecke & Giesbrecht, 1970; Soyer & Escaig, 1980).

P. micans pode possuir de 1 a 7 nucléolos (Figs 24 e 29) de tamanho variável (Li, 1983), número que varia com o estado nutricional ou a fase de crescimento da cultura, e diminui progressivamente com o envelhecimento da mesma.

O ciclo nucleolar de *P. micans* foi estudado por Geraud *et al.* (1989). O nucléolo activo dos dinoflagelados é constituido por: (1) uma parte desenrolada do cromossoma previamente compactado; (2) uma área fibrilar (rDNA); e (3) uma área fibrilogranular contendo rRNA e proteínas argirófilas (Michel-Salamin *et al.*, 1989) rodeada por uma área perirribossómica granular. Vários cromossomas compactados podem conjuntamente participar na elaboração de um nucléolo. A génese nucleolar compreende tanto regiões cromossómicas teloméricas como laterais.

Em *A. carterae* os cromossomas são curtos (Fig. 22), e em média num número de 32 por núcleo (Dodge & Crawford, 1968). Os de *P. micans* são longos (Figs 6 e 23-24) e em média o seu número por núcleo é de 68 segundo Dodge (1963a) e de 100 segundo Herzog & Soyer (1981). Nos cromossoma de *P. micans* foi observado um elevado número de fibrilas e

como as extremidades dos cromossomas se apresentavam sempre arredondadas e intactas foi considerado que cada cromossoma era constituido por um elevado número de cromátides circulares as quais estavam normalmente entrelaçadas (Haapala & Soyer, 1973). O DNA de *P. micans*, num único cromossoma, é circular e muito enrolado possuindo mais de 100 μm de comprimento (Haapala & Soyer, 1974). Kearns & Sigee (1979) observaram a presença, para além de fósforo, de elevados níveis dos metais de transição ferro, níquel, cobre e zinco nos cromossomas de *A. carterae* e de *P. micans*. A presença de cálcio foi detectada tanto nos cromossomas como no nucleoplasma. As grandes quantidades de cálcio observadas poderão ser importantes na natureza permanentemente condensada dos cromossomas. Em média, a cada par de nucleotídeos parece estar associado um catião divalente. O cobre forma um complexo específico com a guanina e a citosina (Kearns & Sigee, 1980).

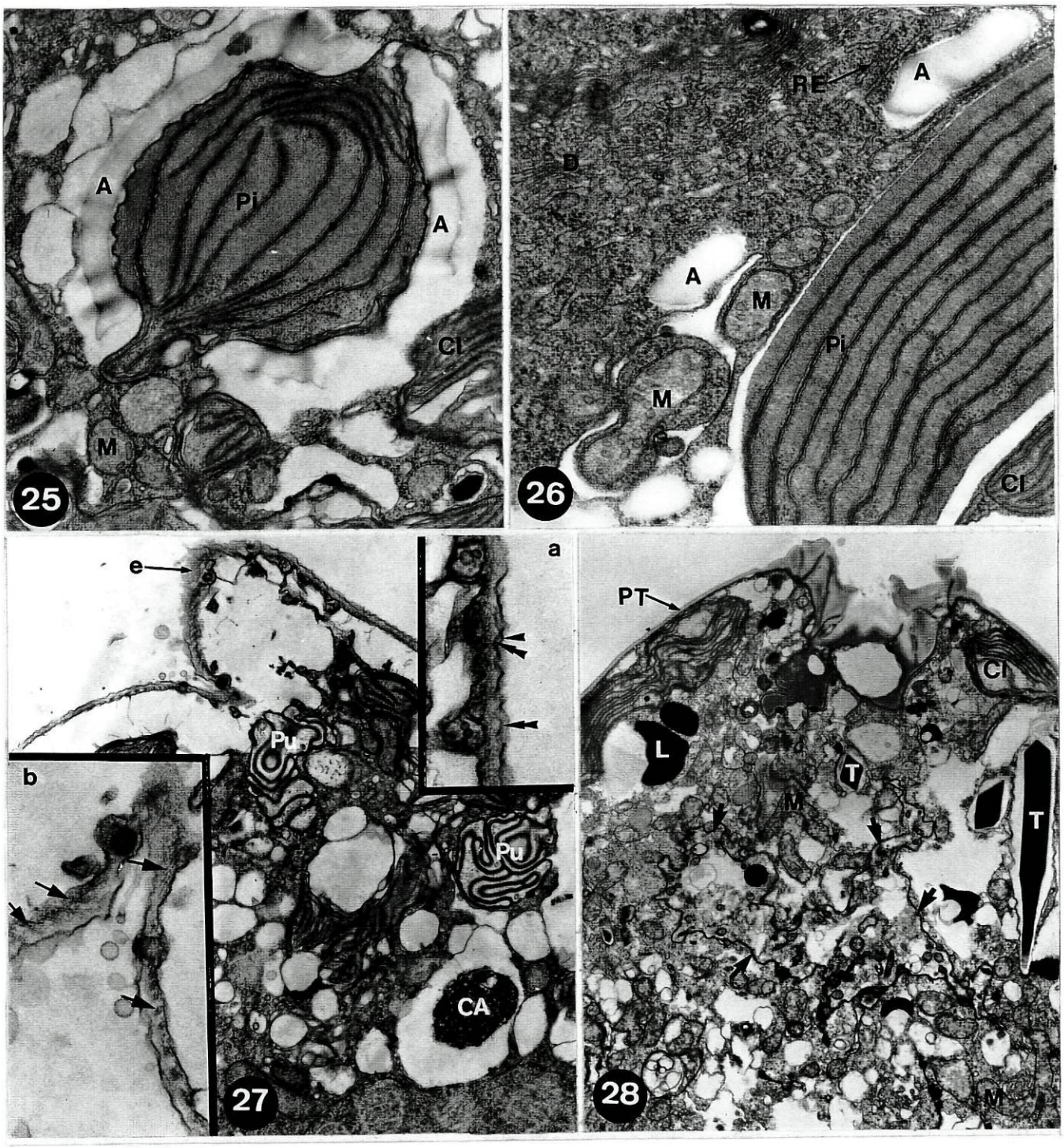
A ausência de nucleossomas (subunidades regularmente repetitivas de cromatina) foi demonstrada em *P. micans* (Hamkalo & Rattner, 1977; Livolant & Bouligand, 1980; Herzog & Soyer, 1981). Contudo, um estudo bioquímico em núcleos isolados de *P. micans* revelou a presença de duas proteínas principais semelhantes a histonas com massas moleculares de 12 kDa e 13 kDa (Herzog & Soyer, 1981). Como noutros dinoflagelados a quantidade de proteínas básicas nucleares observada foi reduzida sendo a razão proteínas básicas/DNA inferior a 0,1, mas a razão proteínas ácido-insolúveis/DNA comparável à de outros núcleos eucarióticos e igual a 1. Na cromatina de *A. carterae* também foram identificadas histoquimicamente proteínas básicas (Chen *et al.*, 1983).

Em *A. carterae* o conteúdo celular em DNA é de 2,2 pg segundo Galleron & Durrand (1978) e de 3,6 pg segundo Holm-Hansen (1969) e em *P. micans* é de 42,0 pg (Haapala & Soyer, 1974). Quanto à composição em bases, o DNA de *A. carterae* é composto por 39,8% de guanina + citosina (Steele & Rae, 1980) e o de *P. micans* é composto por 57% de guanina + citosina (Herzog & Soyer, 1982). Ambos possuem níveis elevados de uma base modificada, apenas observada em dinoflagelados, a 5-hidroximetiluracilo (HOMeU). A percentagem de substituição da timina por HOMeU é de 62% em ambas as espécies. Esta base representa segundo Rae & Steele (1978) um vestígio de algum mecanismo não mais em funcionamento, e portanto sem qualquer significado funcional no presente. Em *P. micans* foi observada uma distinção clara entre DNA geneticamente inactivo, denominado DNA estrutural, e DNA geneticamente activo (Sigee, 1983). Foi observado em *A. carterae* a presença de DNA satélite e conseguido o isolamento de um híbrido DNA-RNA a partir da cromatina a qual possui pequenas quantidades de RNA (Galleron & Durrand, 1978).

Figs 25 e 26 - Aspectos ultrastruturais do pirenóide (Pi) de *A. carterae* (Fig. 25) e de *P. micans* (Fig. 26). Segundo a classificação de Dodge & Crawford (1971) o pirenóide de *A. carterae* é do tipo complexo multipedunculado suportado por duas ou mais projecções do invólucro cloroplastidial e revestido por uma baínha de amido (A). O pirenóide de *P. micans* é do tipo interlamelar composto e não é revestido por uma baínha de amido. Cl - cloroplasto; D - dictiossoma; M - mitocôndria; RE - retículo endoplasmático. Ampliação: 20 300x e 27 100x

Fig. 27 - Aspecto ultraestrutural de parte de uma célula de *A. carterae* em TEM. Notar uma pequena porção do epicone (e), as duas púsula (Pu) de tipo simples em que as vesículas abrem directamente para o canal flagelar, a existência do plasmalema (ponta de seta) a recobrir externamente a célula e, para o seu interior, de vesículas anfiesmais (a membrana externa da vesícula indicada por duas pontas de seta - encaixe **a**) e a presença de microtúbulos à periferia celular (seta - encaixe **b**). CA - corpo de acumulação. Ampliação: 12 800x; encaixe **a** e **b** - 33 100x

Fig. 28 - Aspecto ultraestructural de parte de uma célula de *P. micans* em TEM. De realçar uma porção da púsula (setas) do tipo púsula-saco formada por uma estrutura enrolada com numerosas invaginações, existindo na sua proximidade um elevado número de mitocôndrias (M). Cl - cloroplasto; L - lípidos; PT - placa tecal; T - tricocisto. Ampliação: 6 600x


A
Pi
A
Cl
M
25
RE
A
D
A
M
Pi
M
26
Cl
e
a
Pu
b
Pu
CA
27
PT
Cl
L
T
M
T
28
M

Figs 29 à 32 - Aspectos ultraestruturais de *P. micans* em TEM.

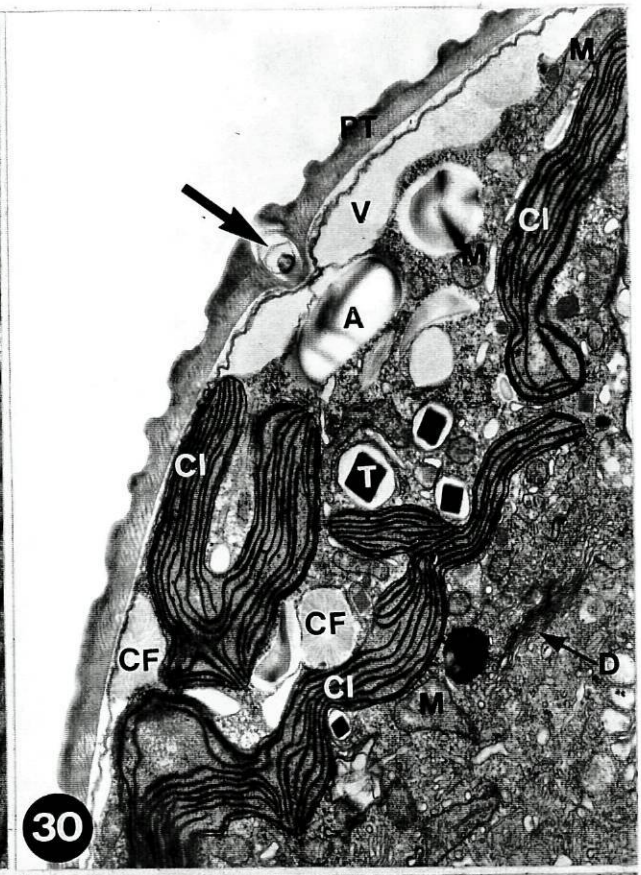
Fig. 29 - Porção celular em que se visualizam o cloroplasto (Cl) com o pirenóide (Pi), mitocôndrias com cristas tubulares (M), ribossomas dispersos no citoplasma, retículo endoplasmático (RE) e o núcleo (N) com cromossomas (Cr), nucléolo (Nu) e o invólucro nuclear com vários poros (pontas de seta). Ampliação: 28 000x

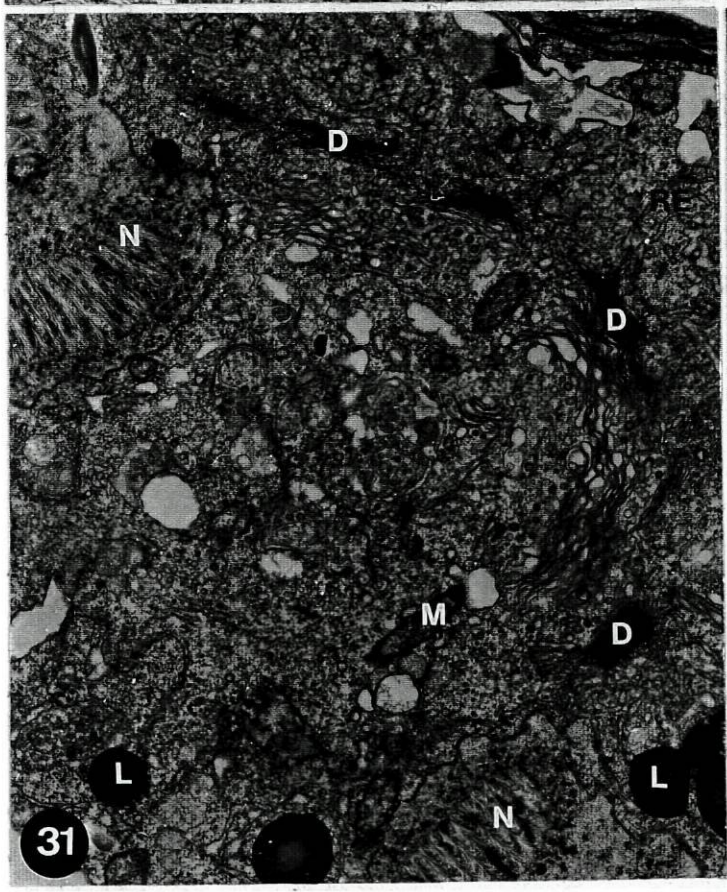
Fig. 30 - À periferia da célula destaca-se uma espessa placa tecal (PT) perfurada por um poro de tricocisto (seta) e, no seu interior, porções do cloroplasto (Cl), mitocôndrias (M), tricocistos (T), um dictiossoma (D), amido (A), vacúolos (V) e corpos fibrosos (CF). Ampliação: 10 700x

Fig. 31 - Aspecto da região central da célula onde se localiza a esfera arcoplásmica constituida por vários dictiossomas (D), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE), lípidos (L) e duas porções do núcleo (N). Ampliação: 11 800x

Fig. 32 - Pormenor das mitocôndrias características dos dinoflagelados com cristas tubulares que com certa frequência se dispõem concentricamente como as observadas. Podem-se ainda observar dois tricocistos seccionados em diferentes partes da sua estrutura: o pescoço constituido por fibras levemente torcidas e o corpo principal formado por um eixo de estrutura paracristalina composta por grânulos proteináceos. Em ambos se observa a membrana que rodeia este organelo. Ampliação: 49 600x


Nu
M
Cl
N
RE
Pi
Cr
M
29


M
PT
V
Cl
M
A
Cl
T
CF
CF
Cl
M
D
30


D
N
D
M
D
L
L
N
31


T
T
32

1.4. Reprodução de *A. carterae* e de *P. micans*

1.4.1. Ciclo celular

O ciclo celular da maioria das células eucariotas é constituido por um período de síntese de DNA, a fase S, que é precedido pela fase G_1 e seguido pela fase G_2. Após esta fase ocorre a mitose (fase M). Em contraste ao que acontece nos eucariotas, em muitos procariotas, a síntese de DNA é contínua.

Ao longo do ciclo celular de *A. carterae*, Galleron & Durrand (1979) verificaram a existência de uma fase G_1 muito curta, de uma fase S discreta apesar de ocorrer síntese contínua de DNA e das fases G_2 e M. Em *P. micans*, Filfilan & Sigee (1977) consideraram que a síntese de DNA é um processo contínuo, apesar de observarem também um período máximo de síntese de DNA em núcleos interfásicos.

Karentz (1983) obteve uma taxa de divisão de 2,08 divisões por dia para *A. carterae*. Este autor refere que variações na cinética do ciclo celular foram por vezes evidentes na mesma cultura, mas acontecem frequentemente entre diferentes séries de observações. Alterações da cinética do ciclo celular geralmente envolvem uma mudança temporal no início do período de divisão da obscuridade para a luz. Variações no padrão de crescimento das culturas de *A. carterae* foram observadas por Galleron (1976) e Galleron & Durrand (1979). Parece que o mecanismo do relógio biológico desta espécie é facilmente alterado, afectando não só a duração da divisão, mas também a taxa de crescimento diária da população. Wheeler *et al.* (1983) também referem que o ciclo celular de *A. carterae* é fortemente determinado pelo fotociclo e que o máximo da taxa de divisão é observado durante o período de obscuridade. O controlo da progressão do ciclo celular em culturas de *A. carterae* deficientes em azoto ou expostas a baixas intensidades luminosas foi demonstrado ocorrer apenas durante a fase G_1 (Olson & Chrisholm, 1986). Na ausência de azoto ou de luz o ciclo celular permanece em G_1 indicando que a duplicação do DNA e a divisão da célula, uma vez iniciadas, são independentes do fornecimento de azoto e de luz.

Bhaud & Soyer-Gobillard (1986) verificaram que a duração de um ciclo celular de *P. micans* era de 5,5 dias demorando a fase G_1 5 dias e a replicação do DNA e a mitose apenas 12h. Quando cultivado em luz artificial num regime de 12h luz - 12h obscuridade, *P. micans* mostrou dividir-se imediatamente após o meio dia (Sweeney, 1959).

Aspectos da mitose em *A. carterae* foram primeiramente estudados por Oakley & Dodge (1974, 1976) e por Matthys-Rochon (1979). Barlow & Triemer (1988) estudaram pormenorizadamente o aparelho mitótico em *A. carterae*. Verificaram que o fuso extranuclear é formado por 2 a 4 feixes de microtúbulos dispostos em dois semi-fusos interdigitados. Contrariamente ao que foi referido acontecer na dinomitose, os feixes do fuso convergem nos pólos. Estes feixes de microtúbulos inserem-se num corpo vesiculado, multilobado, contendo material amorfo electronodenso. Este corpo polar do fuso possui ribossomas associados e é contínuo com o retículo endoplasmático, sendo sugerido tratar-se de uma porção deste organelo. Placas electronodensas, as placas do cinetocoro, aparecem no lado citoplasmático do invólucro nuclear nos locais de ligação dos cromossomas e ligam-se a microtúbulos direccionados para polos opostos. Uma vez estabelecida esta associação, o alongamento do fuso associado com a divisão da placa do cinetocoro separa os cromossomas. O comprimento dos microtúbulos do cinetocoro permanece constante ao longo da divisão assim como a distância dos cromossomas ao pólo.

A mitose foi estudada em *P. micans* por Soyer (1977). Microtúbulos formam um fuso mitótico nos canais nucleares em adição a um fuso adicional, o qual se dispõe aproximadamente em paralelo ao primeiro e extende-se através das esferas arcoplásmicas. Ambos os fusos terminam nos complexos dos corpos basais localizados em lados diferentes do núcleo. Soyer sugeriu que ambos os complexos microtubulares participassem na mitose, não tendo definido o papel de cada um. Foi, também, sugerido um papel mais activo das esferas arcoplásmicas no alongamento nuclear. Os cromossomas de *P. micans* ao longo da mitose ligam-se ao folheto interno do invólucro nuclear sem intervenção de um cinetocoro (Refs).

A citocinese, estudada em *P. micans* por Schnepf *et al.* (1990), dá-se pela formação de um sulco de clivagem que se desenvolve a partir do pólo basal da célula (Fig. 24) e por uma invaginação menos profunda também na região apical que se desenvolve mais tardiamente. Ao longo do sulco vão surgindo vesículas conspícuas, as vesículas de clivagem, e junto às vesículas tecais que se vão formando surgem estruturas fibrilares de actina F. Durante a divisão são visíveis dois arranjos microtubulares, um que se extende das bases flagelares para os flancos das células e um outro formado por bandas de microtúbulos que se dispõem paralelamente entre si e perpendiculares ao plano de divisão na região nuclear correspondendo ao fuso mitótico. Schnepf *et al.* (1990) verificaram que a citocalasina, que afecta os processos contrácteis devidos à actina, é eficaz na inibição da citocinese de *P. micans* actuando na segunda fase da divisão e não na sua iniciação. Assim originam-se células siamesas. A actina parece ser efectiva principalmente na conclusão da divisão celular uma vez que está presente ao longo do sulco de clivagem. Exceptuando no ápice celular, *P. micans* praticamente não possui microtúbulos periféricos, contrariamente ao observado em dinoflagelados nus (Barlow

& Triemer, 1988). Na divisão celular cada célula filha retem uma parte da teca, formando-se gradualmente a outra metade à medida que as células filhas se separam (Silva, 1959).

1.4.2. Reprodução sexual

A existência de reprodução sexual em *A. carterae* foi referida por Cao Vien (1967, 1968) e na Fig. 12 são visíveis duas células provavelmente em fusão gamética.

Na maioria das espécies de dinoflagelados onde foi observada reprodução sexual, esta foi induzida por deficiência em azoto (Pfiester, 1984). Contudo, em *P. micans*, a indução de sexualidade foi conseguida após transferência dos organismos para um meio de cultura com composição diferente ou através de variações da temperatura (tanto aumento como diminuição acentuados) (Bhaud *et al.*,1988). Estes autores estudaram a reprodução sexual e esquematizaram o ciclo de vida desta espécie. As células vegetativas de *P. micans* são haplóides (n) e, à partida, todas podem potencialmente ser gâmetas que não diferem morfologicamente das células vegetativas. Porém, os isogâmetas não se fundem mas formam um tubo de fertilização através do qual a célula dadora (masculina) injecta o seu núcleo na célula receptora (feminina). Forma-se assim um zigoto diplóide (2n), biflagelado que, após duplicação do DNA, contem o quádruplo do material genético das células vegetativas. Divisão meiótica leva à formação de uma tétrada (Fig. 14) e, consequentemente, de quatro células vegetativas haplóides.

1.4.3. Enquistamento

Vários tipos funcionais de cistos podem ser produzidos pelos dinoflagelados e a suas terminologias e definições não estão bem estabelecidas. Em ambas as espécies, a produção de cistos temporários, induzidos por condições ambientais desfavoráveis foram observadas. Em culturas em fase exponencial de *A. carterae*, um aumento da temperatura em cerca de 10 °C (para 28-30 °C) e da salinidade em 15‰ (para 40-45‰) foram determinantes na formação de cistos (Sampayo, 1985). As células móveis perdem a sua resposta fototáctil e a flutuabilidade, depositando-se em agregados. Silva (1959) observou a formação de cistos em *P. micans* em condições de cultura não favoráveis e, particularmente, em culturas velhas. Enquistamento ocorreu mesmo em culturas jovens quando a temperatura subiu para valores de 30-32 °C. Este processo consiste essencialmente, na concentração e densificação do protoplasma que se separa, por contracção, das placas tecais. Subsequentemente, as duas valvas separam-se e libertam o cisto (Silva, 1959).

1.5. Aspectos fisiológicos de *A. carterae* e de *P. micans*

1.5.1. Crescimento versus *luz, temperatura, salinidade e substâncias inibitórias*

De um modo geral, níveis de radiação de 15 a 300 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ em ciclos de luz:obscuridade (L:O) induzem um aumento de pigmentação em dinoflagelados em cultura. No limiar superior de intensidade luminosa capaz de induzir alteração de pigmentos, tanto a fotossíntese como a divisão celular atingem o limiar máximo. Se os níveis baixarem para cerca de 100 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, a fotossíntese é limitada, enquanto a taxa de crescimento permanece elevada. Efectivamente, Chan (1978) verificou que o crescimento de *A. carterae* era máximo quando exposto a irradiações baixas como 50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ e que a sua taxa de crescimento se mantinha constante (cerca de 1 divisão por dia) exposto a irradiações até 250 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ ou superiores.

Humphrey (1979) comparou o crescimento e as características fotossintéticas de *A. carterae* em ciclos de L:O, em que a extensão do período de luz variou entre 4 a 24 h, sendo a irradiância constante (80 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$). As taxas de crescimento das culturas em ciclos de 12:12 h L:O foram aproximadamente iguais às das culturas em iluminação contínua (0,9 e 0,7 divisões por dia, respectivamente) e as células continham o dobro da pigmentação e apresentavam taxas fotossintéticas sob saturação de luz com o dobro da magnitude das células a crescerem sob iluminação constante. Por sua vez, Samuelsson & Richardson (1982) demonstraram que uma descida nos níveis de radiação, quando em ciclos de L:O constantes, induzia alterações fotossintéticas semelhantes às observadas por Humphrey (1979) em *A. carterae*. Estas observações indicam que as respostas fotoadaptativas dos dinoflagelados podem ser induzidas por alterações na radiação diária total, independentemente da diminuição na iluminação ser devida a níveis mais baixos de luz ou dias mais curtos. Em fotoperíodos inferiores a 12 h, a pigmentação de *A. carterae* começava a diminuir, assim como o potencial fotossintético.

Os dinoflagelados não possuem grande capacidade para sobreviverem em obscuridade contínua, a não ser que enquistem, provavelmente e em parte, devido às suas elevadas taxas respiratórias. Contudo, muitas espécies conseguiram sobreviver 2 a 3 semanas (Richardson & Fogg, 1982). Num estudo de 31 espécies de algas efectuado por Antia (1976) *A. carterae* foi uma das espécies que menor capacidade apresentou para sobreviver em condições de obscuridade contínua.

Fotoinibição em culturas a crescer em baixas intensidades luminosas, após 2 h de exposição a níveis elevados de luz, foi observada em *A. carterae* (Samuelsson & Richardson, 1982). Este fenómeno era reversível se os níveis de luz fossem diminuídos num período de 4 h. Esta rápida fotoinibição foi acompanhada por fotodegradação das clorofilas e uma perda de fluorescência variável, indicativas de um desemparelhamento da actividade do fotossistema II.

Humphrey (1983) verificou que radiações de baixo comprimento de onda (centradas em cerca de 435 nm e denominadas violeta) exerciam um efeito benéfico no crescimento de *A. carterae* em irradiação contínua, num nível de aproximadamente 5% da luz total do dia. Regimes de vermelho e verde diminuiam a taxa de crescimento comparativamente ao controlo (luz fluorescente branca), ao regime no violeta ou a outro regime com pico a 510 nm que pretendia simular a radiação costeira debaixo de água.

Na presença de luz azul-verde (radiação marinha) foi verificado um aumento de clorofila **a** + clorofila $\mathbf{c_2}$ (Cl **a** + Cl $\mathbf{c_2}$) de 35% em *A. carterae* e de 19% em *P. micans* assim como um acentuado aumento no número de tilacóides e redução da área de estroma (Vesk & Jeffrey, 1977). Estes resultados sugerem um papel ecológico importante deste tipo de luz na regulação da capacidade fotossintética.

A temperatura é um factor de importância ecológica marinha devido ao seu efeito directo nas taxas metabólicas e ao seu efeito indirecto na estabilidade vertical da coluna de água. Como ambas as espécies são cosmopolitas conseguem viver e adaptar-se a temperaturas variadas. *A. carterae* foi aclimatado a 30 °C em 45 dias, mas após esta adaptação foi incapaz de crescer a 12 °C (Wilson *et al.*, 1984). Dois clones de *P. micans* isolados em Oslofjord demonstraram uma temperatura óptima de crescimento de 20 °C (Braarud, 1961), enquanto Barker (1935) com organismos isolados da costa de Califórnia obteve um óptimo a 25 °C.

Sendo *P. micans* uma espécie planctónica não tolera salinidades inferiores a 15‰, com um valor óptimo de 25‰ e um limite superior de mais de 40‰ (Kain & Fogg, 1960). Os dois clones de *P. micans* isolados em Oslofjord apresentaram baixas taxas de crescimento em salinidades de 10‰, um aumento apreciável a partir de 15-20‰ e um declínio lento da taxa de crescimento a partir de 40‰ (Braarud, 1961).

Os dinoflagelados podem libertar substâncias para o meio de cultura à medida que o seu crescimento se processa. Várias experiências têm sido realizadas para verificar o efeito dessas substâncias no crescimento de outras espécies fitoplanctónicas. Elbrächter (1976) verificou que *P. micans* não crescia no filtrado de uma cultura de *Gymnodinium sanguineum*, provavelmente devido à libertação de um factor inibitório para o meio. Por sua vez, filtrados

obtidos a partir de culturas de *P. micans* podem inibir o crescimento das diatomácias *Skeletonema costatum* e *Chaetoceros didymus* na presença do ião amónio, mas não de nitrato (Uchida, 1981). Numa outra série de experiências, verificou-se não haver estimulação ou inibição das taxas de crescimento quando *Ceratium horridum* e *P. micans* cresciam conjuntamente com as diatomácias *Coscinodiscus concinnus* ou *Biddulphia regia*, sendo a redução da produção celular atribuida a competição por nutrientes e não à libertação de metabolitos (Elbrächter, 1976). Kayser (1979) fez um estudo da competição interespecífica de *P. micans* com outras espécies de dinoflagelados, *Scrippsiella faeroense* e *Gymnodinium sanguineum*. Isoladamente, obteve um tempo de duplicação de 1,6 ± 0,1 dias, valor inferior ao obtido por Elbrächter (1976, 1977). O efeito competitivo das espécies em sistema fechado dependeu geralmente da relação inicial do número de células. Em cultura contínua, o crescimento das espécies apenas dependeu das respectivas taxas de crescimento. Kayser verificou ainda que extractos de culturas de *P. micans* em fase estacionária induziram o aparecimento de uma fase de latência e a diminuição do número total de células obtido. Estes resultados indicaram que os extractos possuiam uma substância inibitória. O mesmo não foi verificado com extractos de culturas em fase exponencial.

1.5.2 Estratégias nutricionais

A. carterae é um organismo fotossintético auxotrófico porque, apesar das suas funções celulares serem suportadas essencialmente pela fotossíntese, necessita de pequenas quantidades de alguns compostos orgânicos específicos do exterior, especificamente cianocobalamina, biotina e tiamina (Loeblich, 1966; Carlucci & Bowes, 1970; Provasoli & Carlucci, 1974; Hastings & Thomas, 1977). Assim como *A. carterae, P. micans* também é um organismo fotossintético auxotrófico que necessita de cianocobalamina (Iwasaki, 1979), de biotina e de outras substâncias não especificadas (extracto de solo) (Loeblich III, 1966; Hastings & Thomas, 1977).

A. carterae apresentou um certo grau de actividade heterotrófica facultativa (anfitrofia) ao aumentar o seu crescimento na presença de luz e de glicerol 50 mM quando a fotossíntese foi inibida pelo 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil ureia (DCMU) (Cheng & Antia, 1970; Morril & Loeblich III, 1979). O extracto de solo também estimulou o crescimento assim como o glicerol em concentrações inferiores a 50 mM, mas em condições não inibitórias da fotossíntese. Por sua vez, *P. micans* em obscuridade contínua foi incapaz de crescer na presença de glucose (Droop, 1957, 1974; Kain & Fogg, 1960). A importância da anfitrofia para estas espécies nos ecossistemas naturais é questionável porque, nos estudos acima referidos, foram usadas concentrações muito elevadas dos enriquecedores orgânicos.

Quando, em obscuridade contínua, concentrações semelhantes às existentes na natureza (10 μM) de glucose, glicerol e acetato foram ensaiadas, o crescimento ou o aumento da sobrevivência de culturas axénicas de *A. carterae* não se verificaram (Richardson & Fogg, 1982). Em culturas de *A. carterae* com bactérias o crescimento foi estimulado por adição de substâncias orgânicas. Os resultados obtidos por Richardson & Fogg (1982) estão em contradição com os de Cheng & Antia (1970) e os de Morril & Loeblich III (1979).

A. carterae e *P. micans* tratados com soluções de peroxidase de rabanete, ferritina e lectina cationizadas e aglutinina da semente de trigo incorporaram estas moléculas via canal flagelar as quais se acumularam na púsula (Klut *et al.*, 1985b, 1987). Em *P. micans* estas macromoléculas foram também observadas no interior de pequenas vesículas já não conectadas com a púsula, sendo portanto uma prova de uma incorporação endocítica. Estes autores sugerem que a púsula seja um sistema regulatório envolvido na absorção celular e actividades metabólicas relacionadas.

Como previamente referido, em *P. micans* foi observada a presença de um cesto microtubular (Schnepf & Winter, 1990). Como esta estrutura é geralmente usada para os organismos sugarem a sua presa (Schnepf & Deichgräber, 1984), foi levantada a hipótese de *P. micans* se poder alimentar também por mizocitose.

1.5.3. Pigmentos

O sistema dos pigmentos fotossintéticos dos dinoflagelados é único. Para além dos sistemas clorofila **a**-clorofila $\mathbf{c_2}$-carotenóides que são também característicos de outros grupos de algas como as diatomácias, os dinoflagelados são únicos por possuirem um tipo de clorofila $\mathbf{c_2}$ e geralmente conterem peridinina em vez de fucoxantina como principal carotenóide captador de luz. São conhecidos três sistemas captadores de luz, o complexo peridinina-Cl **a**-proteína (PCP), o complexo Cl **a**-Cl $\mathbf{c_2}$-proteína e o complexo P_{700}-Cl **a**--proteína do fotossistema I.

Em 1975, Jeffrey e colaboradores verificaram que *A. carterae* possuía clorofila **a** (663 nm), clorofila $\mathbf{c_2}$ (630 nm), ß-caroteno (450 nm), peridinina (472 nm), diadinoxantina (446 nm), dinoxantina (441 nm), neoperidinina e dois pigmentos não identificados, um laranja amarelado e outro rosa (464 nm). Johansen *et al.* (1974) determinaram a composição em carotenóides de *A. carterae* isolado a partir de dois locais distintos tendo obtido as seguintes percentagens: ß-caroteno - 0,4% e 9%; peridinina - 67,9% e 85,5%; diadinoxantina - 25,8% e 3,8%; dinoxantina - 0% e 0,5%; pirroxantina - 4,6% e 0%; diatoxantina - 0% e 7,3%; peridiniol - 0,1% e 1,7%; P-457 - 1% e 0%; pigmento desconhecido - 0,2% e 0,3%. Em

duas estirpes diferentes de *A. carterae* a razão peridinina/clorofila **a** determinada foi de 0,4 e 0,5 e a razão carotenóides totais/clorofila **a** foi de 0,62 e 0,74 (Jeffrey *et al.*,1975).

O complexo PCP de *A. carterae* possui nove moléculas de peridinina em associação com duas moléculas de clorofila **a** unidas a uma única apoproteína de 31 kDa (Haxo *et al.*, 1976; Siegelman *et al.* 1977). Esta razão de 9:2:1 não é consistente com outras análises do complexo PCP purificado desta espécie, que sugerem apenas um cromóforo contendo clorofila **a** monomérica e 4 peridininas de igual simetria por apoproteína (Koka & Song, 1977). Em *P. micans* a razão molar de peridinina:clorofila **a** é de 4:1 (Hata *et al.*, 1982).

1.5.4. Metabolismo do carbono

Nos dinoflagelados a principal via fixadora de carbono parece ser a carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato no ciclo de Calvin-Benson: a via em "C3" (Morris, 1980; Kremer, 1981). Contudo, como num certo número de outras algas e plantas superiores, *A. carterae* apresentou uma via adicional de fixação de carbono, ß-carboxilação, a via em "C4" (dando origem a aspartato e malato como produtos iniciais), em adição à via clássica, produzindo 3--fosfoglicerato como um produto inicial (Taylor, 1987a). *A. carterae* contem como enzima de ß-carboxilação a piruvato carboxílase (E.C.6.4.1.1), não tendo sido detectada actividade da fosfoenolpiruvato (PEP) carboxílase (E.C.4.1.1.31) nem da PEP carboxicínase (E.C.4.1.1.49) (Appleby *et al.*, 1980). A piruvato carboxílase foi isolada e Appleby e colaboradores verificaram que continha biotina, um massa molecular de 340 kDa e era inibida parcialmente pela avidina e completamente por iões Mn (2 mM). Contrariamente ao observado noutros organismos, não necessita de acetil-CoA para a sua actividade assemelhando-se por isso à piruvato carboxílase da bactéria *Pseudomonas citroneliolis*. Actividade da enzima foi observada nas várias fases de crescimento de *A. carterae*. Quando isolada, a enzima necessitou de piruvato, HCO_3^-, Mg^{2+} e ATP para a sua actividade e levou à produção de oxaloacetato. A capacidade de *A. carterae* em cultura axénica absorver CO_2 foi verificada tendo sido determinada uma constante de semi-saturação de $2,8 \pm 0,3$ µg CO_2 dm^{-3}, valor que é inferior ao encontrado para as populações naturais de fitoplancton (Caperon & Smith, 1978).

A enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxílase-oxigénase (RuBisco) dos dinoflagelados apresenta características muito particulares e surpreendentes que as distinguem da Rubisco de outras algas e plantas superiores (Palmer, 1996). Contrariamente à forma mais vulgar desta enzima (denominada forma I), os dinoflagelados possuem a forma II da Rubisco que é constituida somente por sub-unidades maiores e é codificada pelo DNA nuclear e não pelo cloroplastidial (Morse *et al.*, 1995). Whitney & Yellowlees (1995) estudaram a Rubisco de *A.*

carterae cuja sub-unidade maior possui uma massa molecular de 56 kDa. Qualquer aumento da temperatura causa uma rápida perda de actividade nos extractos deste dinoflagelado. A perda da actividade após lise celular poderá ser devida a instabilidade da estrutura quaternária da enzima. Os resultados obtidos indicaram que a actividade carboxilásica era óptima entre pH 7,8 e 8,1 e que a enzima necessitava de activação com Mg^{2+} e HCO_3^- para uma actividade máxima. A actividade máxima da carboxílase detectada foi de 9,7 ± 5,2 nmol CO_2 fixado min^{-1} (mg proteina)$^{-1}$ ou 0,31 ± 0,09 nmol CO_2 fixado min^{-1} (10^7 células)$^{-1}$. A taxa fotossintética estimada através do consumo de oxigénio foi entre 47 e 68 nmol O_2 produzido min^{-1} (10^7 células)$^{-1}$. Esta discrepância de cerca de 100 vezes entre a fixação de CO_2 dependente da Rubisco e a taxa de fotossíntese medida pela produção de oxigénio deve estar relacionada com a rápida perda de actividade. Whitney & Yellowlees (1995) verificaram que as sub-unidades maiores (LSus) da Rubisco parecem ser imunologicamente distintas das LSus de plantas superiores e de outras algas cromófitas. Um soro anti-Rubisco produzido contra a Rubisco da diatomácia *Chaetoceros gracilis* também não reconheceu a Rubisco de 3 dinoflagelados, incluindo a de *A. carterae* (Orellana & Perry, 1992). Contudo, contrariamente ao acima descrito, Plumley *et al.* (1986) verificaram que anticorpos para a Rubisco de uma diatomácia mas não de uma clorófita, reconheceram a LSus de *A. carterae*.

Bidwell (1957) num estudo da fotossíntese de *A. carterae* verificou a ausência de formação de carbohidratos solúveis de baixo peso molecular, em tempos curtos. Os principais produtos solúveis em álcool identificados foram apenas glicosídeos da glucose e manitol (mas não dissacarídeos de glucose e manitol). Com base nestes resultados, Bidwell especulou que os intermediários na síntese do amido poderiam ser diferentes nos dinoflagelados em relação às plantas superiores.

Numa comparação entre duas diatomácias e os dinoflagelados *P. micans* e *Gymnodinium simplex*, Chan (1980) verificou que todos apresentavam taxas fotossintéticas máximas semelhantes por unidade de clorofila **a** mas que as diatomácias possuiam maior teor em clorofila e portanto uma maior taxa fotossintética por unidade de carbono.

1.5.5. Metabolismo do azoto

O azoto pode ser usado pelos dinoflagelados nas formas oxidadas, nitrato e nitrito, ou nas formas reduzidas como ureia e, principalmente, o ião amónio. Contudo, todas têm de ser convertidas em amónia antes de serem incorporadas em aminoácidos. A forma preferencialmente absorvida é o ião amónio. O nitrato é aparentemente absorvido activamente pelos dinoflagelados mas Falkowski (1975) não foi capaz de demonstrar a mesma actividade enzimática em *A. carterae* como observou noutras espécies fitoplanctónicas.

In vitro, *P. micans* cresceu igualmente bem em nitrato, amónia ou ureia como fontes de azoto (Eppley *et al.*, 1971). *A. carterae* cresceu em meio com nitrato ou com amónia como fontes de azoto e demonstrou possuir uma grande capacidade de armazenar azoto inorgânico (Dortch *et al.*, 1984). Hersey & Swift (1976) observaram actividade da nitrato redutase - NR (enzima que reduz o nitrato a nitrito) em *A. carterae* e verificaram que esta enzima apresentava uma periodicidade diária. A sua actividade, influenciada pela luz, pelas concentrações externas de NH_4^+ e de NO_3^- e pela taxa de crescimento, era ao meio dia o dobro da observada durante a noite. *A. carterae* também cresceu fototroficamente na presença de ureia ou hipoxantina como únicas fontes de azoto (em vez de NH_4^+ ou NO_3^-) mas apenas quando na presença de níquel (Oliveira & Antia, 1986a) (mixotrofia). Este facto sugere que a hipoxantina é convertida em ureia através da conhecida via metabólica aeróbica do catabolismo das purinas. Por sua vez, a utilização da ureia faz-se através da urease, uma enzima que necessita de níquel como cofactor para a sua actividade (Oliveira & Antia, 1986b). Os resultados obtidos mostraram que esta alga consegue utilizar tanto a ureia como a hipoxantina tão eficazmente como o nitrato para o crescimento. Modificações citológicas relacionadas com a degradação da purina incluem a proliferação do retículo endoplasmático, onde se localiza a alantoínase (nas culturas com hipoxantina, foi detectada a produção de alantoína), e um grande aumento do número de microcorpos, onde tem sido demonstrada citoquimicamente a actividade da uricase e da catalase (Oliveira & Huynh, 1989; 1990).

Verificou-se que *A. carterae* foi capaz de utilizar os aminoácidos alanina, arginina, asparagina, ácido glutâmico, glicina e metionina como fontes de azoto orgânico (Antia *et al.*, 1975; Taylor, 1987a) enquanto que *P. micans* não utilizou nem a arginina nem o ácido glutâmico como fontes orgânicas de azoto para o crescimento (Eppley *et al.*, 1971).

Wheeler *et al.* (1983) estudaram o efeito do fotociclo e da adição periódica de NH_4^+ na absorção e assimilação desta fonte de azoto por *A. carterae* em condições de deficiência azotada. A depleção de NH_4^+ do meio é rápida (entre 2 a 4 h), mas é mais rápida se a adição deste ião for feita no início do período de luz do que no de obscuridade. Em iluminação contínua, o ciclo de divisão celular pode ser induzido por uma adição súbita de azoto. Contudo, se ambos os estímulos forem aplicados simultaneamente, o fotoperíodo é o factor determinante da sincronização. Sob condições de limitação de azoto, o fotociclo tem relativamente pouco efeito no metabolismo do azoto. A divisão celular permanece regulada pelo fotociclo independentemente do tempo de adição do azoto. Portanto, as culturas deficientes em azoto absorvem e assimilam muito rapidamente o azoto disponível, mas não entram em divisão celular até que cheguem ao momento "correcto" do fotociclo.

Uma vez absorvido, o ião amónio pode ser assimilado através de duas vias, a da glutamato desidrogénase (GDH) ou a do sistema em que estão envolvidas a glutamina sintetase (GS)/glutamato sintetase (GOGAT). Nos dinoflagelados parece que existem as duas

vias de metabolização. Em *A. carterae*, praticamente não foi observada actividade da via da metabolização da amónia envolvendo a GDH (Ahmed *et al.*, 1977) o que poderá ter sido devido a uma grande sensibilidade da enzima à sua manipulação. Como a enzima GS tem uma maior afinidade para o NH_4^+ do que a enzima GDH, o sistema GS/GOGAT poderá conferir uma vantagem aos dinoflagelados em ambientes deficientes em amónia (Falkowski & Rivkin, 1976).

Provasoli & McLaughlin (1963) verificaram que o sulfato de amónio era tóxico para *A. carterae* em níveis entre 70 e 1400 μM e níveis elevados de NH_4^+ induziram uma redução invulgar dos níveis de clorofila $\mathbf{c_2}$ relativamente à clorofila **a** em *P. micans* (Zgurovska & Kustenko, 1968).

1.5.6. Outros nutrientes

A. carterae é capaz de armazenar polifosfato em meio rico em fósforo (Sakshaug *et al.*, 1983).

O enxofre é um macronutriente relativamente abundante na água do mar e por isso não costuma ser limitativo. De nove algas testadas, pertencentes a cinco grupos, *A. carterae* mostrou ser a que possuia uma maior necessidade de enxofre, não crescendo em 0,024 g dm^{-3} de sulfato (adicionado como sulfato de magnésio) e atingindo apenas 20% do crescimento máximo em 0,045 g dm^{-3} (Lewin & Busby, 1967). Os autores atribuiram este resultado a um possível uso do enxofre para a produção de polissacarídeos mucilaginosos contendo enxofre. *A. carterae* sendo um organismo que vive em poças nas rochas e na areia, situa-se em ambientes naturalmente ricos em enxofre. Deane & O'Brien (1981) verificaram que *A. carterae* foi capaz de usar cisteína, metionina ou taurina como fontes orgânicas de enxofre, utilizando um mecanismo activo de transporte. Ishida (1968) observou que *A. carterae* produzia H_2S como principal composto volátil de enxofre.

Ryther & Kramer (1961) estudaram a absorção de ferro férrico quelatado por vários organismos fitoplanctónicos, incluindo *A. carterae*, tendo verificado estimulação até 65 μg dm^{-3}, com possível supressão do crescimento em concentrações superiores. Um bioensaio com culturas senescentes de *A. carterae* foi usado para a reciclagem do ferro metabolizado a partir de extractos desta mesma espécie (Frey & Small, 1979). Nesta experiência, a adição de ferro isoladamente permitiu um desenvolvimento da cultura para níveis de produtividade máximos indicando ter sido esta a substância limitativa do crescimento. Os extractos celulares, principalmente se levemente acidificados, quando adicionados às culturas senescentes induziam também um novo crescimento de *A. carterae*.

1.5.7. Fotorrespiração

Apesar de pouco se saber sobre todo o mecanismo da fotorrespiração nos dinoflagelados, os dados disponíveis apoiam a ausência da oxídase do glicolato nos microcorpos (Burris, 1977) sugerindo que o metabolismo do glicolato seja iniciado pela desidrogénase do glicolato. Esta enzima não pode transferir electrões directamente para o oxigénio, portanto não se forma H_2O_2 durante a oxidação do glicolato. Nas algas, a desidrogénase do glicolato está localizada nas mitocôndrias em vez de nos microcorpos (Stabenau, 1984). A falta de catalase nos microcorpos foi interpretada como sendo indicativo de uma correspondente falta da oxídase do glicolato (Klut *et al.*, 1984).

1.5.8. Proteínas, enzimas e esteróis

A análise da composição em aminoácidos de vários dinoflagelados incluindo *P. micans* (Chau *et al.*, 1967) demonstrou que os aminoácidos predominantes eram o ácido glutâmico, a alanina, a leucina e o ácido aspártico.

O conteúdo proteico de *A. carterae* foi determinado através da medição do conteúdo em azoto com posterior multiplicação pelo factor de conversão 6,25, tendo sido verificado que era de 28% do peso seco, enquanto que através de determinação colorimétrica foram obtidos valores de 53% do peso seco (Parsons *et al.*, 1961).

Em *A. carterae*, Lichfield & Hood (1964) detectaram a presença de uma anidrase carbónica intracelular e Antia (1967) detectou actividade da frutose-difosfato aldolase tipo II. Segundo a classificação de Rutter (1964), a aldolase do tipo II é caracterizada por necessitar para a sua actividade de iões metálicos divalentes e grupos -SH, pela inibição com agentes quelantes de metais e por uma gama estreita de pH óptimo. O tipo de aldolase observado em *A. carterae* é mais primitivo, como o das bactérias e dos fungos.

Em extractos de *A. carterae* não foi detectada actividade da enzima do metabolismo dos hidratos de carbono da via glicolítica Embden-Meyerhof, enolase (2-fosfo-D-glicerato hidro-ligase - E.C.4.2.1.11) (Antia *et al.*,1966) o que sugere uma organização enzimática única. Também não foi detectada actividade da fosforilase (lecitinase C) (Antia & Bilinski, 1967).

Nas últimas décadas um grande número de esteróis com estruturas novas foram isoladas a partir de dinoflagelados (Withers, 1987). Vários desses esteróis invulgares foram

encontrados em *A. carterae* (Kokke *et al.*, 1980): '8(14)-dehidrodinosterol' (**10i**) (12%), '4α-metil-24(Z)-etileno-5α-colest-8(14)-en-3ß-ol' (**10q**) (1,3%), '4α-metil-24-metileno colest-8(14)-en-3ß-ol' (**10f**) - anfisterol (43-58%) e é o principal esterol no género *Amphidinium* (Withers *et al.*, 1979), '4α-metil-5α-coleste-7-en-3ß-ol' (**9g**) - lofenol (0,9%), '4α-metil-5a-coleste-8(14)-en-3ß-ol' (**10a**) (20-27%), '(24Z)-stigmasta-5,24(28)-dien-3ß-ol' (**2q**) - isofucosterol que conjuntamente com o fucosterol (**2r**) representam 6%. *A. carterae* não possui dinosterol.

1.6. Marés vermelhas e toxicidade

A. carterae é uma das espécies de dinoflagelados que produz toxinas. Thurberg & Sasner (1973) verificaram que extractos de *A. carterae* eram tóxicos para peixes e confirmaram a toxicidade desses extractos em ratinhos. Estes extractos induziram uma acção tipo colinérgica excitando o coração de crustáceos de um modo semelhante à acetilcolina. A presença de vários compostos de colina, incluindo dois ésteres de colina, em *A. carteare* foi observada por Ikawa & Taylor (1972) e em 1960, Wangersky & Guillard detectaram a presença de um análogo da acetilcolina libertado para o meio de cultura por este dinoflagelado. Nessa altura, os compostos contendo colina foram considerados como podendo ser produtos de excreção, agentes de protecção contra a predação pelo zooplancton, agentes de transporte de sulfato ou agentes osmorreguladores. Ikawa & Sasner (1975) e Nakajima *et al.* (1981) demonstraram nas toxinas de *A. carterae* actividade hemolítica em eritrócitos de ratinho e ictiotoxicidade levando à morte de peixes. *A. carterae* isolado a partir de um coral de recifes produziu cinco hemolisinas denominadas de 1 a 5 (Yasumoto, 1990). A composição das hemolisinas-1 e -2 foi determinada como sendo α-ß-D-galactopiranosil-(1-1)-3-α-octadeca-tetraenoil-D-glicerol e α-α-D-galactosil-(1-6)-3-α-ß-D-galactopiranosil-(1-1)-3-α-octadecate-traenoil-D-glicerol. As hemolisinas-3 a -5, de estrutura desconhecida, foram bastante mais potentes que as -1 e -2. Recentemente, num estudo dos efeitos tóxicos do extracto de *A. carterae* em diferentes linhas celulares humanas, Fessard *et al.* (1994) verificaram que um isolado desta espécie induzia efeitos semelhantes aos provocados pela maitotoxina, uma ictiotoxina produzida por *Gonyaulax toxicus*.

Marés vermelhas ocasionadas por *P. micans* na costa oeste dos USA, em La Jolla Bay, foram descritas por Allen (1938, 1946) e mais tarde por Holmes *et al.* (1967). Em 1955 e 1987 foram observada marés vermelhas devidas a *P. micans* na lagoa de Óbidos (Sampayo, 1989). Durante uma maré vermelha desta espécie, os extractos do bivalve *Ceratoderma edule* L. induziam toxicidade em ratinhos (Pinto & Silva, 1956). Correlação entre um número elevado de *P. micans* e toxicidade de *Mytilus edulis* L. foi, também, observada na costa

nordeste britânica por Ayres (1971). Em 1983, Lembeye & Campodonico (1984) observaram descoloração das águas provacada por uma maré vermelha de *P. micans* (concentrações máximas entre 11 200 e 38 600 células cm^{-3}), um dinoflagelado bastante comum em águas chilenas. Durante esta maré vermelha não foram observados efeitos de toxicidade em humanos. Contudo, ocorreram mortalidade de peixes e problemas de asfixia devido à acumulação de *P. micans* nas guelras dos peixes.

P. micans tem sido frequentemente associado como um co-dominante em explosões populacionais de goniaulacóides, apesar de em número muito menor. Acompanhou, por exemplo, uma maré vermelha causada por *Gonyaulax reticulatum*, causando morte de fauna marinha perto de Cape Town em 1961 (Grindley & Taylor, 1964). Foi co-dominante num "bloom" tóxico de *Protogonyaulax tamarensis* na lagoa de Óbidos em 1959 (Silva, 1963) e acompanhou um "bloom" de *Gonyaulax grindleyi* ao largo da costa oeste da África do Sul em 1974, o qual foi associado com toxicidade de marisco e paralisia dos próprios mexilhões (Horstman, 1981).

Foi observado existir uma correlação entre as populações de espécies de *Prorocentrum* e o envenenamento de humanos, por ingestão de marisco, ao longo da costa holandesa no Mar do Norte (Kat, 1979). As intoxicações foram acompanhadas por vómitos, dores abdominais e diarreia. Apesar de ter sido verificado que marisco em cultura alimentado com *P. micans* e *P. minimum* não causou doença em animais, é possível que em condições naturais estes organismos produzam toxinas. Contudo, extractos de *P. micans* em cultura com potenciais toxinas solúveis em ácido conduziram a resultados negativos. A possibilidade de *P. micans* ser uma espécie tóxica é controversa.

1.7. Mobilidade, tropismos e migrações

P. micans é o desmoconte mais bem estudado. Os seus flagelos livres batem com um movimento invulgar, da ponta para a base, impulsionando a célula. O flagelo enrolado possui um movimento rotacional e um produz um batimento do tipo chicotear na sua extremidade livre (Kamykowski, 1995). *P. micans* desloca-se a uma velocidade entre 7 e 20 mm min^{-1} segundo Kamykowski (1981) ou entre 15 e 37,5 mm min^{-1} segundo (Kamykowski (1986) e em*A. carterae* foram observados valores entre 2 a 18 mm min^{-1} (Gittleson *et al.*, 1974).

Foto e gravitaxia são a base para as migrações verticais dos organismos fitoplanctónicos (Häder, 1995). Muitos dinoflagelados, provavelmente todas as formas fotossintéticas, apresentam uma resposta à luz positiva. Para avaliar os pigmentos envolvidos na recepção do estímulo foram obtidos espectros de acção da resposta de paragem e/ou fototaxia em várias

espécies dinocônticas e na espécie desmocôntica *P. micans* (Halldal, 1958). Contrariamente às espécies dinocônticas que apresentaram um pico a cerca de 280 nm e na região dos 450-475 nm (resultados que sugerem ser um carotenóide - peridinina ou uma rodopsina o pigmento responsável por esta resposta), *P. micans* evidenciou um pico a 570 nm. Foster & Smyth (1980) compararam este resultado com o de uma crisófita e sugeriram que em ambos os casos estavam envolvidos pigmentos acessórios. *A. carterae* mostrou possuir uma gravitaxia negativa e não apresentar uma variação diária óbvia do seu gravitropismo (Häder, 1995). Não foi verificado existir qualquer correlação entre a orientação em resposta à luz e a intensidade luminosa ou a idade da cultura.

P. micans do Adriático norte apresentou uma periodicidade de migração vertical diária, acumulando-se a uma profundidade de 5 m durante o dia para evitar as águas superficiais e estabilizando entre os 10 a 13 m com a diminuição da intensidade luminosa (Filipic, 1985). Esta migração parece estar relacionada com a disponibilidade em fosfatos. Staker & Bruno (1980) estudaram a migração vertical diurna de *P. micans* na região de New York e em experiências em laboratório. *P. micans* apresentou uma migração estatisticamente significativa com uma variação média de 3,9 m, preferindo águas mais profundas durante o dia e migrando com uma velocidade de 36,6 mm min^{-1}.

1.8. Filogenia

O posicionamento filogenético do género *Prorocentrum* permanece enigmático apesar dos numerosos estudos efectuados. Aspectos peculiares da sua morfologia externa, a inserção "apical" dos flagelos, a aparente inexistência de sulcos transversal e longitudinal e um número reduzido de placas tecais, têm levado a considerar este género como um membro primitivo dos Dinophyceae (Loeblich III 1976; Taylor, 1980, 1987c; Bujak & Williams, 1981; Herzog & Soyer, 1981). Contudo, outros dados e observações suscitam hipóteses diferentes. A autotrofia não é provavelmente o único modo de nutrição neste género dada a presença por exemplo de um cesto microtubular (Schnepf & Winter, 1990) que é considerado ser homólogo do pedúnculo ou tubo de alimentação de outros Dinophyceae (Schnepf & Winter, 1990). O facto de tanto *A. carterae* como *P. micans* apresentam o mesmo nível elevado de substituição de timina por HOMeU opõe-se ao conceito de que dinoflagelados considerados mais "primitivos" como os do género *Prorocentrum* possuissem uma menor substituição de bases do que as espécies mais evoluidas. Roberts & Matese (1990) consideram que as relações espaciais dos componentes do aparelho flagelar nos dinoflagelados e os resultados obtidos em *P. micans* apoiam as sugestões de Loeblich III (1976), Taylor (1980) e Honsell &

Talarico (1985) de que as valvas esquerda e direita podem representar uma epi e hipoteca reduzidas. Roberts & Matese (1990) e Roberts *et al.* (1995) propõem uma orientação da célula de *P.micans* diversa da usualmente considerada em que as regiões anterior e posterior são respectivamente, ventral e dorsal, e a metade correspondente à valva esquerda como a metade superior e vice-versa.

Roberts *et al.* (1995) consideram que as observações efectuadas apoiam a ideia de que os prorocentróides devem ser considerados um grupo evolutivamente derivado dos Dinophyceae. Filogenias baseadas em estudos moleculares (Lenaers *et al.*, 1989, 1991; Gajadjar *et al.*, 1991; Sadler *et al.*, 1992) também apoiam esta conclusão.

2. METAIS PESADOS - O COBRE

2.1. Aspectos gerais

A classificação de metal pesado aplica-se, segundo uma definição clássica, a elementos que possuem uma massa específica superior a 5 g cm^{-3}. Incluem-se neste caso um total de sessenta e nove elementos. Contudo, hoje em dia, o termo é restrito, frequentemente, a metais comummente considerados poluentes, mesmo que alguns destes possam ser essenciais para o metabolismo em concentrações vestigiais (Förstner & Wittmann, 1979).

Os metais pesados são componentes naturais do solo e das rochas onde, geralmente, existem em formas muito estáveis e, por isso, não originam riscos para os organismos vivos. Contudo, actividades antropogénicas têm mobilizado metais das suas fontes naturais, acabando por os introduzir no meio ambiente em níveis prejudiciais a todos os organismos vivos. Por exemplo, foi estimado que 2,6 x 10^6 Kg de 262 químicos tóxicos diferentes foram libertados para o meio ambiente nos Estados Unidos da América apenas durante o ano de 1989 (U.S. EPA, 1991). Quatro metais encontravam-se entre os 25 poluentes químicos mais frequentes: compostos de zinco (75 x 10^3 Kg), compostos de manganésio (54 x 10^3 Kg), compostos de cobre (24 x 10^3 Kg) e compostos de crómio (23 x 10^3 Kg).

Como são quimicamente indestrutíveis, grande parte dos metais pesados que entram no meio ambiente acabam por atingir as massas de água dos ecossistemas aquáticos. Porém, a Natureza dispõe de vários sistemas de remoção de metais pesados que reduzem as concentrações das formas fisico-químicas assimiláveis pelos seres vivos. Estes mecanismos de remoção podem ser divididos em duas grandes categorias, bióticos e abióticos. As reacções químicas em que os metais participam no meio aquático e os processos fisico-químicos (diluição, adsorção e sedimentação) promovem a remoção parcial destes poluentes e a purificação natural das massas de água. Os organismos vivos, sendo capazes de assimilar, concentrar ou modificar as formas químicas de metais pesados, desempenham também um papel crucial na remoção dos poluentes metálicos dos sistemas aquáticos.

Apenas nas últimas décadas, e com o desenvolvimento de técnicas "ultralimpas" e de novos métodos analíticos sensíveis, foi possível obter dados de confiança sobre os padrões de distribuição dos metais vestigiais no mar. A aplicação destas técnicas revelou que muitos metais surgem em concentrações mais baixas do que previamente se pensava. As

concentrações de muitos metais aumentam, muitas vezes drasticamente, na transição das águas oceânicas para as costeiras devido à afluência de fontes continentais. Normalmente, a poluição devida a metais é pequena em mar alto e aumenta progressivamente com a proximidade das águas costeiras e estuarínicas. Os estuários podem ser considerados zonas de deposição de metais devido a velocidades de fluxo reduzidas, alterações no pH e floculação de partículas carregadas negativamente e agregados coloidais de óxidos de ferro e matéria orgânica na interface da água doce com a água do mar (Moore & Ramamoorthy, 1984). Para além dos gradientes horizontais, existem muitas vezes grandes aumentos nas concentrações dos metais (Zn, Fe, Cu, Ni) com a profundidade, simulando perfis verticais na concentração de nutrientes. A existência de uma correlação estreita entre as distribuições verticais de metais vestigiais específicos e as de macronutrientes sugerem um controlo biológico das concentrações dos metais vestigiais no mar.

2.2. Interacções com as comunidades biológicas aquáticas

Os metais afectam as algas em dois níveis de organização: (i) inibindo vários processos fisiológicos e bioquímicos em organismos individuais; (ii) alterando a estrutura e o funcionamento da comunidade de algas. A nível da comunidade, os efeitos que os metais provocam são a soma dos efeitos induzidos em cada organismo. Porém, a interacção entre os metais e a comunidade biológica marinha é recíproca, isto é, não só os metais afectam os organismos, mas por sua vez estes tem um efeito profundo na química dos metais. Os metais e os outros nutrientes são absorvidos pelos organismos na zona eufótica, são levados para fora da camada superficial com o afundamento de partículas biogénicas, como partículas fecais ou células mortas, e são regenerados em profundidade com a remineralização microbiana destas partículas ou células. Para além deste processo, outros mecanismos afectam a forma fisico-química dos metais vestigiais (i.e. a especiação), levando, frequentemente, à redução da biodisponibilidade de metais tóxicos ou a um aumento da biodisponibilidade de metais em concentrações limitativas. A produção e libertação de ligandos orgânicos solúveis pelas algas pode ser vista como um processo de condicionamento biológico da água do mar, isto é, uma alteração da química dos metais em água do mar mediada biologicamente e que tem como efeito um aumento da produtividade biológica.

As grandes diferenças espaciais e temporais existentes nas concentrações dos metais e na especiação química da água do mar parecem influenciar tanto a produtividade como a composição em espécies das comunidades marinhas de algas. As algas marinhas, contudo, desenvolveram diferenças marcantes nas suas capacidades para crescer em concentrações baixas de nutrientes metálicos ou para resistirem à toxicidade por metais. Devido à grande

gama de sensibilidade das diferentes espécies de algas à toxicidade pelos metais (Gavis *et al.*, 1981; Brand *et al.*, 1986) a influência mais importante dos metais no mar pode ser, essencialmente na composição das espécies. Assim, diferenças acentuadas na disponibilidade dos metais parecem desempenhar um papel importante no delineamento da barreira na especiação fitoplanctónica nerítica/oceânica e terem desempenhado um efeito marcante na evolução e distribuição destas espécies (Brand *et al.*, 1983). É portanto de realçar que os metais vestigiais têm tido uma influência profunda na evolução e funcionamento das comunidades fitoplanctónicas marinhas, e que estas comunidades são uma força dominante na distribuição e química dos metais vestigiais na água do mar (Sunda 1988/1989). Um exemplo demonstrativo desta importância foi observado por Meador e colaboradores (1993). Neste estudo, a recuperação, após tratamento com cobre (31,5 μM total), de um microcosmo constituido pela alga *Oocystis pusilla* e *Daphnia magna* foi iniciada por processos biológicos que alteraram a biodisponibilidade do metal tóxico. Isto contrasta com um mecanismo fisico-químico (ex; fotólise, hidrólise, precipitação, etc.). A recuperação iniciou-se com o crescimento de uma comunidade resistente de algas que alterou a dinâmica química do sistema e consequentemente o perfil da especiação do metal. As concentrações das formas tóxicas foram reduzidas sem alterar a concentração total do metal, permitindo restabelecer o ciclo normal predador-presa.

2.3. O cobre

O conhecimento da presença do cobre tanto nos Reinos Vegetal como Aninal remonta a 1816 (Buchholtz, 1816). É um micronutriente necessário numa série de processos metabólicos tanto em procariotas como eucariotas. É um catalizador importante de processos biológicos redox e pode estar envolvido na catálise da transferência de electrões e na oxidação redução dos substratos (Hughes & Poole, 1989). O papel mais importante do cobre na fisiologia das algas é o de servir como cofactor para um certo número de enzimas. Actua também no transporte de electrões e na oxidação catalítica de um número de moléculas orgânicas. A oxídase do citocromo c interveniente no transporte mitocondrial de electões e a oxídase ascórbica que actua na oxidação-redução do ácido ascórbico são exemplo de enzimas onde o cobre desempenha estas funções. As amino oxidases de plantas superiores e protistas também contêm cobre.

Apesar do cobre ser um elemento essencial, em concentrações superiores às fisiologicamente necessárias, pode tornar-se tóxico. A produção anual de cobre assim como os níveis de cobre no meio ambiente têm vindo a aumentar em áreas geográficas localizadas, essencialmente como resultado de actividades humanas (de 5,8 x 10^9 kg em 1968 (Förstner &

Wittmann, 1979) para 8,3 x 10^9 kg em 1985 (Bowen, 1985) a nível mundial). São exemplo de actividades relevantes a fundição, a exploração mineira, indústrias variadas (chapeamento de metais, trabalhos em aço, refinarias), a emissão de lixos domésticos e a aplicação de fertilizantes, algicidas, fungicidas e moluscolicidas (Fleming & Trevors, 1989).

Os níveis de cobre na água do mar são variáveis como se pode constatar na Tabela 1. As concentrações mais elevadas são observadas em águas costeiras e em águas profundas. Os níveis de cobre nos sedimentos são elevados actuando estes como reservatório.

LOCAL	VALORES (M)	REFERÊNCIA
Mar alto Águas costeiras	$4{,}72 \times 10^{-8}$ $1{,}57 \times 10^{-7}$	Steelmann Nielsen & Wium-Andersen (1970)
Mar alto Águas costeiras poluidas	$2{,}36 \times 10^{-9}$ $1{,}57 \times 10^{-8}$	Hodson *et al.* (1979)
Águas superficiais Águas profundas	$4{,}7 \times 10^{-10}$ - $3{,}6 \times 10^{-9}$ $3{,}2 \times 10^{-9}$ - $1{,}1 \times 10^{-8}$	Bowen (1985)
Água do mar	1×10^{-9} - 1×10^{-8}	Taylor (1987a)
Norte do Oceano Pacífico	4×10^{-10} - $1{,}4 \times 10^{-9}$	Bruland (1980); Martin *et al.* (1989)
Mar do Sargasso Água costeira Massachussetts	$1{,}2 \times 10^{-9}$ $4{,}1 \times 10^{-9}$	Bruland & Franks (1983)
Baía de Narragansett	$3{,}7 \times 10^{-9}$ - $2{,}6 \times 10^{-7}$	Mills & Quinn (1984)
Águas superf. (Sul Nova Zelândia)	$9{,}8 \times 10^{-10}$ - $3{,}3 \times 10^{-9}$	Boyle & Edmond (1975)
Águas estuarínicas Águas costeiras	$6{,}6 \times 10^{-9}$ - $1{,}6 \times 10^{-8}$ $6{,}3 \times 10^{-9}$ - $8{,}7 \times 10^{-9}$	Anderson *et al.* (1984)
Águas estuarínicas (Holanda)	1×10^{-8} -$1{,}5 \times 10^{-7}$	van den Berg *et al.* (1987)

Tabela 1. Valores de cobre total referidos por diferentes autores em diferentes tipos de águas naturais.

O cobre é um dos metais vestigiais cuja abundância em águas naturais pode limitar o crescimento das algas por insuficiência, mas na água do mar encontra-se geralmente em quantidades não inibitórias. Contudo, em águas de afloramento ou poluídas o teor em cobre pode ser suficientemente elevado para inibir as espécies mais sensíveis a este metal (Steelmann Nielsen & Wium-Andersen, 1970; Brand *et al.* 1986).

Muitos estudos, alguns dos quais remontam ao início do século (Moore & Kellerman, 1904), têm sido efectuados sobre os efeitos do cobre nas algas. Estudos comparativos do

efeito inibitório do cobre em espécies de fitoplancton focaram as concentrações extracelulares de cobre que reduziram a taxa de crescimento. A partir destes estudos verificou-se que o cobre não é igualmente tóxico, que certas classes de fitoplancton têm diferentes sensibilidades ao cobre, e que o fitoplancton desenvolve resistência a elevadas concentrações do metal. Huntsman & Sunda (1980) consideraram os dinoflagelados e as cianobactérias como os grupos planctónicos mais sensíveis ao ião cúprico, apesar de em 1975 Saward e colaboradores terem considerado as diatomácias como o grupo mais sensível. Num estudo de numerosas espécies de vários grupos fitoplanctónicos, Brand *et al.* (1986) verificaram que as cianobactérias eram as mais sensíveis ao cobre, as diatomácias as menos sensíveis, que os cocolitoforídeos e os dinoflagelados possuíam uma sensibilidade intermédia e que as diferenças em sensibilidade entre diatomácias e dinoflagelados eram muito mais pronunciadas para o cobre do que para o cádmio. Os seus resultados também indicaram que as clorófitas são possivelmente o grupo do fitoplancton mais tolerante a concentrações extracelulares elevadas de cobre e de outros metais, facto confirmado por Takamura *et al.* (1989) em algas de água doce. Hawkins & Griffiths (1982) em *A. carterae* confirmam a maior sensibilidade dos dinoflagelados ao cobre comparativamente às clorófitas. Elevadas sensibilidades ao cobre foram observadas nos dinoflagelados *Kryptoperidinium* (*Glenodinium*) *foliaceum* (sensibilidade comparável à da cianobactéria *Coccochloris elabans*) (Mandelli, 1969), *Ptychodiscus* (*Gymnodinium*) *brevis* (Collier *et al.*, 1969) e *Protogonyaulax tamarensis* que apresenta, contudo, uma necessidade relativamente elevada de cobre (Anderson & Morel, 1978; Schenk, 1984).

A problemática do controlo das explosões populacionais de algas em lagos e reservatórios pela aplicação de compostos contendo cobre foi objecto de especial atenção na fase inicial do estudo da toxicidade do cobre para as algas (Hodson *et al.*, 1979). Sulfato de cobre foi largamente usado como algicida (Mackenthun & Cooley, 1952; Horne & Goldman, 1974; McKnight, 1981). Nos primeiros 80 anos deste século o Lago Monona, Wisconsin, recebeu um total de $1,8 \times 10^5$ kg de cobre (Fleming & Trevors, 1989). Para além de ter causado uma redução substâncial da biomassa das algas, este procedimento introduziu alterações na estrutura da comunidade biológica, levando à eliminação de cianobactérias e favorecendo as clorófitas (Effler *et al.*, 1980; Elder & Horne, 1978). As primeiras tentativas para controlar marés vermelhas na década de 30 foram realizadas pela adição de sulfato de cobre à água do mar onde experiências com pérolas de cultura estavam a ser realizados (Oda, 1935). Na altura, este procedimento foi aceitável e com poucos efeitos nefastos para as ostras. Uma maré vermelha de *Gymnodinium breve* foi efectivamente controlada em 2 semanas pela aplicação de 180 μg cobre dm^{-3} (Rounsfell & Evans, 1958). Concentrações de sulfato de cobre entre 0,215 e 0,25 mg dm^{-3} foram usadas para matar dinoflagelados parasitas em peixes (Dempster 1955). Devido ao grande espectro de efeitos de toxicidade induzidos pelo cobre,

actualmente este método não é admissível para controlar "blooms" nefastos de algas e bactérias, apesar da grande sensibilidade de certos grupos, como dinoflagelados e cianobactérias, comparativamente a muitos outros organismos.

O destino e os efeitos do cobre nos sistemas aquáticos não é ainda bem compreendido, especialmente a recuperação do sistema após um forte "stress" provocado por este metal. Apesar de existir uma grande quantidade de informação sobre a sua toxicidade aguda em estudos de laboratório, pouco se sabe sobre os efeitos na totalidade dos ecossistemas e como estes respondem quando perturbados pelo cobre (Meador *et al.*, 1993).

2.4. Caracterização química

O cobre é um elemento de transição com três estados de oxidação: "zero" (Cu°, metal sólido), "mais um" [Cu^{+} ou Cu(I), ião cuproso] e "mais dois" [Cu^{2+} ou Cu(II), ião cúprico]. Para além de ser considerado um elemento vestigial, isto é, existir em quantidades inferiores a 0,1 mg kg^{-1} na crosta terrestre (Fleming & Trevors, 1989), também é um metal pesado pois possui uma massa específica superior a 5 g cm^{-3}.

A maioria dos sais de cobre dissolvem-se rapidamente em água dando origem ao catião cúprico (Cu(II)) na forma hidratada (ião aquoso) [$Cu(H_2O)_6^{2+}$] (Leckie & Davies, 1979), que muitas vezes se designa por forma livre. O cobre(II) forma complexos estáveis com numerosos ligandos inorgânicos e orgânicos e na forma livre catiónica apresenta uma grande tendência para a hidrólise. Os iões metálicos como o cobre(II) actuam como ácidos de Lewis por aceitarem pares de electrões de ligandos. Segundo a classificação de Lewis, o cobre é um ácido intermediário, altamente reactivo com bases fortes e fracas (Linnik & Nabivanets, 1983). Na série de Irving Williams o cobre(II) é o catião metálico que forma complexos mais estáveis.

Na natureza, o cobre pode encontrar-se basicamente em três fases: aquosa (forma iónica livre ou em complexos solúveis); sólida (particulado, coloidal, no solo ou nos sedimentos); ou biológica (adsorvido ou incorporado em organismos vivos). Em solução, os níveis do cobre, a sua conversão nas várias formas, a sua mobilidade nos meios aquáticos e a sua disponibilidade para os seres vivos são controlados basicamente por três processos fisico-químicos: complexação, precipitação e adsorção.

1) Complexação

A complexação do cobre por ligandos inorgânicos na água do mar tem sido bem caracterizada através do uso de modelos termodinânicos (Byrne *et al.*, 1988). Os dois principais ligandos complexantes inorgânicos são os iões hidroxilo (OH^{-}) e carbonato (CO_3^{2-}) sendo $CuOH^{+}$, $CuOH_2^{\circ}$, $Cu_2(OH)_2^{2+}$, $CuCO_3^{\circ}$, $Cu(CO_3)_2^{2-}$ os complexos com cobre

predominantemente formados (Stiff, 1971a; Sylva, 1976; Turner *et al.*, 1981). A especiação inorgânica do cobre(II) na água do mar é dominada por $CuCO_3^\circ$ e a espécies ternária, $CuCO_3OH^-$, tem uma importância substancial (Byrne & Miller, 1985). A predominância destas espécies químicas depende do pH e da dureza da água, e um aumento da dureza (aumento de CO_3^{2-}/HCO_3^-) reduz fortemente a toxicidade do cobre para os organismos aquáticos por precipitação do metal (Hodson *et al.*, 1979). Outras espécies inorgânicas possíveis complexantes incluem HS^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, Cl^-, F^- e NH_3 (Stiff, 1971b; Leckie & Davis, 1979; Turner *et al.*, 1981).

Nos sistemas marinhos os ligandos orgânicos desempenham um papel mais importante que os ligandos inorgânicos na química e complexação do cobre dissolvido (Sunda, 1988/1989). Nestes incluem-se produtos de excreção nitrogenados de organismos superiores, aminoácidos, polifenois, metabolitos de baixo peso molecular, exsudados de algas assim como ácidos fúlvicos e húmicos. Pensa-se que os ácidos húmicos provenientes de terra tenham um efeito benéfico para os dinoflagelados devido às suas actividades de complexação de metais e tem sido sugerido terem uma acção importante na promoção de marés vermelhas (Prakash & Rashid, 1968; Collier *et al.*, 1969; Doig & Martin, 1974). A estabilidade dos complexos depende da natureza química do ião metálico e da energia de ligação do grupo funcional do ligando. O ião cobre(II) forma complexos fortes com os grupos dadores de electrões (O, N e S) nos compostos orgânicos. Anderson & Morel (1978) verificaram que *Protogonyaulax tamarensis* crescia bem em águas pouco profundas de pequenos lagos costeiros, onde presumiram que as células estariam protegidas pela complexação do cobre por matéria orgânica natural. Contudo, apesar de *P. tamarensis* ter desenquistado nas águas ao largo de Cape Cod, Massachussetts, o seu desenvolvimento posterior foi inibido provavelmente pela falta de protecção contra o cobre.

Geralmente mais de 99% do cobre(II) existente nas águas marinhas costeiras e superficiais encontra-se complexado com ligandos orgânicos (van den Berg, 1984; Moffett and Zika 1987; Sunda & Hanson, 1987; Coale & Bruland, 1990; Sunda & Huntsman, 1991). Esta complexação varia com a natureza e a concentração dos ligandos orgânicos, a qual está relacionada com a produtividade biológica, a fonte primária destes compostos. Supõe-se que os ligandos orgânicos sejam produzidos biologicamente por existir uma covariância entre estes e o cobre na camada de água. O facto de num estudo recente se ter verificado que a cianobactéria oceânica, *Synechococcus* sp. (clone DC2), produz um quelante extracelular de elevada afinidade para o cobre cuja constante de estabilidade ($10^{12,8}$ M^{-1}) é semelhante às determinadas para a complexação do cobre na água do mar (Moffett *et al.*, 1990), apoia esta suposição. Curiosamente, esta espécie é particularmente sensível à toxicidade do cobre, como o são muitas cianobactérias (Brand *et al.*, 1986). A complexação do cobre nos oceanos é geralmente mais elevada na proximidade da produtividade máxima, e diminui uma a três

ordens de grandeza com a profundidade abaixo da camada vernal de mistura (Coale & Bruland, 1988, 1990; Moffett *et al.*, 1990).

O cobre ligado a compostos orgânicos fortemente complexantes (ex: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), tris(hydroximetil)amino metano (Tris)) está menos disponível e, portanto, é menos tóxico para os organismos aquáticos. Contrariamente, outros ligandos podem aumentar a toxicidade do metal como o Cu-citrato (Steelmann Nielsen & Wium-Andersen, 1970; Jardim & Pearson, 1985) e complexos do metal com ligandos orgânicos hidrofóbicos lipossolúveis como a 8-hidroxiquinolina (Florence & Stauber, 1986; Robinson *et al.*, 1992; Phinney & Bruland, 1994).

2) Precipitação

A precipitação de compostos minerais de cobre tem sido considerada a principal via na redução dos níveis de cobre solúvel em águas naturais (Elder & Horne, 1978; Stiff, 1971b). Os precipitados de cobre incluem o hidróxido de cobre [$Cu(OH)_2$], tenorite [CuO], malaquite [$Cu_2(OH)_2(CO_3)$] e azurite [$Cu_3(OH)_2(CO_3)_2$]. Em certas águas poluídas os fosfatos de cobre insolúveis também são importantes (Stiff, 1971b). As formas precipitadas de cobre (como os óxidos, fosfatos e carbonatos) são geralmente considerados não biodisponíveis e por isso não tóxicas.

3) Adsorção

A adsorção do cobre a organismos vivos ou a matéria particulada não viva é também significativa na remoção do cobre dissolvido em águas superficiais poluídas assim como nos sedimentos, devido à grande capacidade reactiva deste metal com respeito à formação de complexos. Verifica-se adsorção à superfície de óxidos hidratados de manganésio, ferro e alumínio, minerais de argila, matéria orgânica, células vivas e mortas. Os factores que influenciam os processos de adsorção/desadsorção incluem o pH, as concentrações de cobre e do adsorvente, tipo e concentrações de ligandos e a competição de outros catiões (Fleming & Trevors, 1989).

Em meios aquáticos, metais como o cobre e o zinco podem ser ligados e removidos da água por sedimentos orgânicos, os quais efectivamente reduzem a concentração total do ião metálico em solução. De entre os compostos orgânicos merecem destaque os ácidos húmicos e fúlvicos e as proteínas. Os ácidos húmicos e fúlvicos são especialmente importantes e tem sido especificado que praticamente todos os aspectos da química dos metais nos solos, sedimentos e águas naturais está relacionada de alguma forma com a formação de complexos com substâncias húmicas (Benes *et al.*, 1976).

2.5. Biodisponibilidade

Para ser acessível aos sistemas biológicos o cobre tem de estar presente numa forma solúvel e rapidamente disponível. As formas químicas (especiação) em que se pode encontrar o cobre (livre, complexada solúvel e precipitada), e consequentemente a sua biodisponibilidade, dependem de factores ambientais como o pH (Byrne *et al.*, 1988), o potencial redox (E_h), a temperatura (Byrne *et al.*, 1988), o tipo de solo e sedimento, a dureza da água e o conteúdo em substâncias orgânicas (Fleming & Trevors, 1989). Estes factores variam no meio ambiente dando origem a possíveis condições de deficiência ou de toxicidade.

A concentração do ião hidrogénio (pH) tem um efeito considerável na disponibilidade e consequentemente, na toxicidade do cobre num dado meio ambiente. Na generalidade, a pHs ácidos os metais existem como catiões iónicos livres devido à protólise de ligandos orgânicos complexantes do metal, mas a um pH alcalino precipitam sob a forma de hidróxidos ou óxidos insolúveis. Como o cobre tem mais do que um estado de valência a forma mais oxidada (cobre(II)) é a favorecida por um pH elevado. Os hidróxidos de cobre(II) são menos solúveis do que os da forma reduzida, cobre(I), e precipitam a valores relativamente baixos de pH. É, portanto, de importância fundamental por exemplo para estudos de biodisponibilidade que o pH de um meio seja estável para minimizar alterações na especiação dos metais em solução. O pH da água do mar está tamponado a cerca de 8,1 pela elevada concentração de bicarbonato (2,1 mM) e em menor extensão por borato.

Nos oceanos, as concentrações totais de metal dissolvido podem variar pelo menos duas a três ordens de grandeza, tanto horizontal como verticalmente (Martin & Gordon, 1988; Coale & Bruland, 1990) como já previamente referido. O cobre está fortemente quelatado em águas superficiais (na zona eufótica) por um ligando orgânico natural (ou grupo de ligandos) que possui uma constante global condicional de estabilidade de $\sim 10^{13}$ M^{-1} (Coale & Bruland, 1988, 1990; Moffett *et al.*, 1990; Sunda & Huntsman, 1991). Sem esta quelatação, a concentração do ião cúprico livre (entre $10^{-10,3}$ e $10^{-9,3}$ M, correspondentes a concentrações de cobre total entre 10^{-9} e 10^{-8} M para um pH de 8,2 (Sunda. 1988/1989)) seria suficiente para ser tóxico para muitas espécies de fitoplancton (Brand *et al.*, 1986). A quelatação do cobre diminuiu a concentração do ião cobre(II) livre para níveis não tóxicos nas águas superficiais ($\sim 10^{-11}$M, Anderson *et al.*, 1984 ou $10^{-13,9}$ a $10^{-12,7}$ M, Coale & Bruland, 1990) o que é, portanto, altamente benéfico para a comunidade fitoplanctónica. Apesar da identidade

destes ligandos ser desconhecida, mas provavelmente de origem biológica (Cole & Bruland, 1990), são agentes complexantes fortes, semelhantes aos produzidos pelo fitoplancton em cultura (Moffett *et al.*, 1990) e, possivelmente, desempenham um papel fundamental no ciclo dos metais nas águas naturais. A regulação biológica da especiação dos metais é assim um mecanismo possível pelo qual a disponibilidade dos metais vestigiais é controlada. Num estudo recente, Sunda & Huntsman (1995) obtiveram dados que evidenciam claramente que a absorção do cobre pelo fitoplancton e a regeneração do metal em profundidade representam os processos dominantes que regulam a concentração do cobre nos nutriclinos de regiões oceânicas remotas.

A introdução de agentes quelantes artificiais, principalmente EDTA, na composição dos meios de cultura de algas por Hutner e colaboradores (1950) permitiu aos investigadores definir a especiação dos metais em solução e possibilitou o estudo da fisiologia dos mesmos no fitoplancton. Sunda & Guillard (1976) e Anderson & Morel (1978), através do uso de sistemas modelo em que a especiação química pode ser sistematicamente controlada por cálculo do equilíbrio termodinâmico e cinético, demonstraram que a disponibilidade biológica do cobre usualmente é determinada pela actividade do ião livre, e não pela sua concentração total ou pela concentração de complexos orgânicos específicos. Este facto tem sido também confirmado para outros metais (Zn, Fe, Mn, Cd), em presença de diferentes ligandos complexantes, organismos e respostas biológicas (absorção, toxicidade e limitação de nutrientes).

Duas noções frequentemente mal interpretadas são (i) o significado de ião livre como a única espécie biologicamente disponível e (ii) a de que os complexos metálicos como tal são "não disponíveis", não participando, portanto, directamente nas reações de absorção do metal. Em estudos com ferro, observações de Hudson & Morel (1990) indicaram não existir uma situação de verdadeiro equilíbrio entre o metal ligado aos locais dos transportadores na membrana e os locais complexantes no meio externo. Por sua vez, a velocidade de transporte parece estar cineticamente controlada pela concentração de espécies metálicas inorgânicas dissolvidas (espécies inorgânicas lábeis - iões metálicos livres aquosos e complexos inorgânicos dissolvidos) as quais apresentam cinéticas de dissociação suficientemente rápidas e concentrações suficientemente elevadas para permitir a troca do metal com os ligandos transportadores na membrana. Por sua vez, complexos metálicos (ex: Fe e Cu) com quelantes sintéticos como o EDTA não têm dissociações ou cinéticas de troca suficientemente rápidas para permitir tal troca, o que explica porque é que a formação destes complexos diminui a absorção biológica. Para além do EDTA, outros ligandos que formam complexos estáveis com o cobre, como a cisteína, diminuem grandemente a toxicidade do cobre em *Pseudomonas syringae*, mas ligandos orgânicos complexantes fracos ou moderados de cobre como acetato, succinato, prolina ou lisina também induzem toxicidade, mas com uma eficiência menor

comparativamente ao ião livre (Azenha *et al.*, 1995). Estes autores sugerem que parte do cobre complexado é deslocado pelas bactérias ou alternativamente, que complexos cobre-ligando-célula se formem. Assim, não apenas os complexos inorgânicos mas também os complexos orgânicos dissolvidos podem ser biodisponíveis, desde que sejam lábeis.

Porém, as águas superficiais marinhas são essencialmente um meio iónico constante a um pH constante, e sob estas condições, a concentração do metal livre, a actividade do ião livre ou a concentração de espécies cineticamente lábeis estão relacionados entre si por razões constantes. De um ponto de vista prático para a determinação ou previsão da disponibilidade biológica dos metais na água do mar, é irrelevante qual destes parâmetros determina directamente a absorção do metal.

Com o uso de tampões metálicos, como é o caso do EDTA, em culturas laboratoriais, os metais pesados (geralmente > 95%) estão presentes na forma de complexos do quelante adicionado e apenas uma pequena fracção está presente na forma de ião livre, de complexos inorgânicos ou ligado às células. Efectivamente, os tampões metálicos permitem a manutenção de concentrações extremamente baixas de iões metálicos livres e complexos inorgânicos, tal como acontece na água do mar, e, por outro lado, mantêm as concentrações totais a níveis elevados que são mais facilmente quantificados e não rapidamente alterados por contaminação ocasional. O uso destes tampões também nos permite calcular as concentrações iniciais dos iões livres e dos complexos inorgânicos no meio de cultura em condições de equilíbrio químico, uma vantagem importante uma vez que técnicas adequadas para a medição directa destes parâmetros químicos não estão ainda geralmente disponíveis. Finalmente, como estes tampões quelantes formam virtualmente complexos com todos os metais biologicamente importantes podem ser usados para simultaneamente controlar e quantificar as concentrações em ião livre de vários outros metais. Esta é uma capacidade fundamental porque interacções entre metais podem ser extremamente relevantes na determinação dos efeitos biológicos totais.

Florence & Stauber (1986) verificaram que ligandos solúveis em água diminuiam a toxicidade do cobre, enquanto que complexos de cobre lipo-solúveis eram altamente tóxicos para a alga marinha *Nitzschia closterium* em cultura. Nestas condições, tanto o metal como o ligando podem exercer toxicidade uma vez que ambos penetraram nas células (Stauber & Florence, 1987). Contudo, não existe evidência de que este tipo de compostos existam e por isso desempenhem um papel importante na água do mar.

2.6. Importância fisiológica e ligação a moléculas biológicas

A natureza do envolvimento do cobre nos processos metabólicos é determinada pelas suas propriedades fisico-químicas. (i) Os iões de cobre reagem com aminoácidos, proteínas e

outros biopolímeros, produzindo complexos estáveis. Neste aspecto, o cobre é mais activo que outros metais. (ii) Os iões de cobre possuem propriedades catalíticas que são aumentadas após ligação do ião à molécula proteica. (iii) Os iões de cobre libertam e aceitam rapidamente um electrão, o que permita ao cobre ser tanto um dador com um aceitador de electrões.

A sua importância fisiológica reside, predominantemente, no facto de ser constituinte de um certo número de proteínas e enzimas, principalmente de oxidação-redução. A mais estudada destas proteínas com cobre é a oxídase do citocromo c devido ao seu papel importante tanto na respiração como na fotossíntese. Um papel polifuncional do cobre foi demonstrado num número de oxídases (oxídase do ascorbato, oxídase da diamina, oxídase do o-difenol) e uma diminuição ou aumento da sua actividade foram observados devido, respectivamente, a deficiência ou o excesso de cobre (Lidon & Henriques, 1991a). Uma outra enzima fundamental que contem cobre é a superóxido dismútase.

As concentrações intracelulares de metais que limitam e inibem o crescimento do fitoplancton são determinadas pela fisiologia celular e pela especiação química. Com raras excepções, as espécies de fitoplancton contêm concentrações de metais notavelmente semelhantes (Price & Morel, 1994). Esta constância na composição, em representantes de grupos fitoplanctónicos tão diversos como cianobactérias e clorófitas, deve certamente reflectir uma função bioquímica universal que cada metal desempenha no fitoplancton como cofactor de enzimas e em outras proteínas. É, também, sugerido que o conteúdo em metais do fitoplancton deve ser mais um reflexo do metabolismo metálico intracelular do que do papel que os metais desempenham em vias bioquímicas. A cinética de incorporação dos metais nas enzimas e outras proteínas pode ser relativamente lenta de tal modo que o fitoplancton é obrigado a manter concentrações intracelulares elevadas dos metais (ver Price & Morel, 1991). O metal celular deve portanto estar dividido numa fracção metabólica e numa não metabólica.

As concentrações de cobre fisiologicamente necessárias para os dinoflagelados são bastante baixas. *Gonyaulax tamarensis* foi limitado por actividades do ião cobre(II) inferiores a 10^{-13} M (Schenck, 1984) e inibição da taxa de divisão da espécie oceânica, *Thoracosphaera heimii*, ocorreu a concentrações do ião cobre(II) de 10^{-12} M (Brand *et al.*,1986). *Prorocentrum* sp. e *Peridinium* sp. mostraram ainda uma maior sensibilidade (Brand *et al.*,1986).

A função biológica de um metal está intimamente ligada com a natureza dos ligandos presentes na esfera de coordenação. As três principais classes de biopolímeros, proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, possuem locais aos quais os metais se podem ligar. Nestes, incluem-se grupos carregados negativamente como carboxilato, tiolato ou fosfato, e grupos como a função amina que se coordena com o centro do metal através de um par isolado de electrões. Devido à sua localização na escala de Irving-Williams, o cobre tem uma

forte tendência para formar complexos com proteínas e péptidos (ligação aos resíduos de histidina, cisteína e metionina - Hughes & Poole, 1989) e ácidos nucleicos. Através da formação destes complexos pode tornar as macromoléculas não funcionais (Coale & Bruland, 1990). Para além dos ligandos envolventes, o pH intracelular também desempenha um papel importante na coordenação do cobre. O ião cobre(II) compete com os protões pelos ligandos, e por isso liga-se menos bem a pH baixos uma vez que o potencial grupo dador estará protonado numa maior extensão (Hughes & Poole, 1989).

2.7. Absorção

A incorporação do cobre por um organismo pode ser descrita por dois processos, a ligação rápida do metal à superficie celular (plasmalema, parede celular, camadas mucosas) - adsorção, e a subsequente e mais lenta passagem através da membrana citoplásmica levando à internalização do metal - absorção. Apesar de muitos trabalhos sobre o estudo destes fenómenos terem sido realizados com diferentes metais, o conhecimento actual sobre o cobre é incompleto, existindo apenas dados dispersos para vários metais. Por isso, seguidamente, a análise do fenómeno da absorção será abordado para a generalidade dos metais, incidindo-se sempre que possível em dados relativos ao cobre.

A capacidade da superfície dos organismos ligarem iões metálicos a partir do meio circundante é um fenómeno amplamente reconhecido que tem um número de aplicações importantes. As superfícies celulares possuem um mosaico de locais de troca catiónicos e aniónicos (ex: grupos amino, fosforilo, sulfidrilo e carboxilo (Gonzalez-Davila *et al.*, 1995)) com um balanço de cargas dependente dos aniões e catiões. Os metais formam assim complexos de coordenação com os ligandos presentes na superfície celular. A adsorção à superfície pode ocorrer tanto em células mortas como vivas mantidas a baixas temperaturas (<4 °C), resultado que é indicativo de este fenómeno não necessitar de energia metabólica (mecanismo passivo). Em microalgas, a quantidade do metal ligado à parede celular pode ser elevada, atingindo valores de cerca de 50 a 80% do total de metal fixado durante um curto período de tempo de exposição à solução metálica (Reed & Gadd, 1990).

A ligação dos iões metálicos à superfície de células vivas é seguida por uma absorção lenta, muitas vezes irreversível e variável com a temperatura (podendo demorar horas a saturar), em que os iões metálicos são transportados através da membrana celular para o citoplasma (Huang *et al.*, 1990; Harris & Ramelow, 1990; Xue *et al.*, 1988). Esta absorção dependente do metabolismo constitui um mecanismo activo (Rai *et al.*, 1981) e determina, em larga extensão, a acumulação de metais no citoplasma e organelos. Contudo, Gnassia-Barelli & Härdstedt-Roméo (1982), contrariamente ao que observaram para o cádmio, sugerem

apenas um processo de absorção passiva do cobre por *Cricosphaera*, uma vez que este fenómeno foi independente da presença ou ausência de luz.

Os metais têm primeiro que formar complexos com locais de transporte especializados no plasmalema, e o transporte do metal para a célula é determinado por um balanço entre a especiação do metal no meio e as reacções de troca nos locais de ligação. As membranas com os dois folhetos lipídicos são virtualmente impermeáveis a espécies carregadas ou polares, e usualmente os iões metálicos são absorvidos para o interior das células pela ligação a ligandos transportadores especializados associados com o plasmalema. Após a ligação do ião metálico ao ligando transportador, o metal pode dissociar-se para o meio ou ser transportado através da membrana e transferir-se para ligandos no citoplasma. De acordo com este mecanismo, o transporte dos iões metálicos para a células deve seguir a equação clássica da cinética de saturação para transporte facilitado ou activo como tem sido observado experimentalmente em fitoplancton para a absorção de ferro (Anderson & Morel, 1982; Harrison & Morel, 1986; Hudson & Morel, 1990), manganésio (Sunda & Huntsman 1985, 1986) e cádmio (Hart *et al.*, 1979). As cinéticas de absorção dos metais são assim descritas pela equação de Michaelis-Menten, em que a velocidade de absorção celular de um metal está relacionada com a velocidade máxima de absorção, a concentração extracelular do substracto e a metade da constante de saturação para a absorção. A absorção depende do metal a ser absorvido e da actividade do seu ião livre e do estado de crescimento e metabolismo do organismo. Elevadas concentrações reactivas do metal promovem rápidas velocidades de transporte e vice-versa. Pensa-se que o ião metálico estabeleça um rápido equilíbrio com o complexo transportador na membrana, explicando portanto, a aparente correlação entre a actividade do ião metálico livre e a velocidade de transporte do metal. A actividade do ião metálico é simplesmente uma medida da reactividade do metal e não é equivalente à concentração do ião metálico livre. Price & Morel (1994) realçaram que a concentração de espécies cineticamente lábeis controlam a velocidade de transporte do metal como observado por Hudson & Morel (1990) para espécies de hidróxidos férricos. Esta observação complica a interpretação do transporte dos metais. Certas espécies metálicas, como as que são cineticamente lentas, contudo, não são capazes de reagir directamente com as proteínas de transporte celular e são portanto biologicamente inactivas. Estas incluem metais coloidais (Wells *et al.*, 1983; Rich & Morel, 1990) e as fortemente complexadas por ligandos orgânicos (Anderson & Morel, 1982). A velocidade máxima de transporte dos metais pelo fitoplancton está sob regulação fisiológica. Concentrações de metais limitativas do crescimento também induzem um aumento na velocidade máxima de transporte pela promoção do aumento da densidade dos locais de transporte do metal nas membranas celulares do fitoplancton (ver Harrison & Morel, 1986). Se não houver uma regulação da velocidade do transporte ou se a sua regulação estiver desacoplada, as concentrações intracelulares do metal podem aumentar para tal quantidade que

causam uma redução na taxa do crescimento celular e possivelmente inibição da divisão celular.

Segundo George (1991) os organismos desenvolveram sistemas de transporte de elevada afinidade para a absorção de metais não-alcalino e alcalino-terrosos devido à baixa disponibilidade destes metais (ocorrência em níveis vestigiais devido a complexação, no caso do cobre(II), ou a insolubilidade, no caso do ferro(III)). Como foi observado em células de raízes de plantas superiores, uma ou mais redutases presentes no plasmalema destas células possuem a capacidade de transferir electrões do citosol para aceitadores de electrões exógenos, provavelmente desempenhando um papel essencial nos processos de transporte de iões através desta membrana (Rensch & Boettger, 1992). O sistema enzimático que se pensa estar envolvido na absorção do Fe é o da redutase quelante-Fe(III). Welch *et al.* (1993) sugerem que o sistema inductível da redutase do plasmalema da raíz de ervilheira não é apenas uma redutase para o Fe(III), mas desempenha um papel mais geral na regulação da absorção de catiões como o cobre, possivelmente via redução de grupos sulfidrilo em proteínas de transporte envolvidas no transporte de catiões divalentes ("canais de catiões divalentes") através do plasmalema das células radiculares. Redutases capazes de reduzir o cobre na forma de cobre(II)-quelatos ou cobre(II) em cobre(I) foram observadas por Jones & Morel (1988) no plasmalema da diatomácia *Thalassiosira* e por Lesuisse & Labbe (1992) na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Alguns metais podem ser absorvidos por um mecanismo diferente do previamente referido. É o caso de espécies organometálicas lipofílicas que se difundem através do plasmalema e se acumulam intracelularmente. O significado da via de difusão na acumulação de metais pelo fitoplancton em águas naturais é desconhecido. Está fundamentalmente depende das concentrações relativas das espécies metálicas solúveis em lípidos e das espécies metálicas iónicas reactivas.

De referir, a finalizar, que as espécies de algas mais sensíveis ao cobre apresentam uma maior absorção do metal relativamente às espécies tolerantes (Fleming & Trevors, 1989), possivelmente por não possuirem mecanismos suficientemente eficazes contra o excesso do metal.

2.8. Toxicidade

Os efeitos do cobre na biologia das algas e de outros organismos bem como os factores que regulam a toxicidade têm sido objecto de um elevado número de estudos.

Os metais induzem toxicidade quando complexam não especificamente com locais de coordenação de moléculas biológicas importantes como enzimas e, portanto, alteram o

funcionamento metabólico normal. Frequentemente, estes locais de coordenação são os normalmente ocupados por metais essenciais e verifica-se inibição da funcionalidade quando o nutriente metálico é substituido por outro metal que não possui os mesmos atributos químicos necessários para conferir actividade bioquímica, isto é, possui o raio iónico, a geometria de coordenação, a carga, a cinética de associação/desassociação ou o potencial redox não adequados.

O cobre é bastante tóxico nos ecossistemas aquáticos embora seja relativamente pouco tóxico para os mamíferos. Os limites toxicológicos de tolerância nos mamíferos são geralmente 10 a 100 mais elevados que nos peixes e crustáceos (Förstner & Wittmann, 1979), e 1000 vezes superiores aos das algas (Hodson *et al.*, 1979). A grande sensibilidade apresentada pelas algas é o resultado da elevada razão superfície/volume.

A taxa de crescimento dos organismos é óptima numa gama intermediária de concentrações do ião metálico livre e é reduzida devido a toxicidade ou limitação do nutriente para cima ou para baixo desta gama. Concentrações intracelulares elevadas de metais que são tóxicas para o fitoplancton são tipicamente 10 a 100 vezes superiores às necessárias para suportar o crescimento limitado pelo metal a 90% da velocidade máxima (Price & Morel, 1994).

Vários factores bióticos influenciam grandemente a sensibilidade ao cobre incluindo-se a fase de crescimento celular (Braam & Klapwijk, 1981; Gibson, 1972), o estado nutricional (Sato *et al.* 1986), injúrias celulares prévias (Domek *et al.*, 1984), a produção de uma cápsula mucilaginosa (Bitton & Freihofer, 1978; Mittleman & Geesey, 1985), adaptação fisiológica e genética (Murphy *et al.*, 1982) e a concentração celular da população (Steelmann Nielsen & Wium-Andersen, 1970).

2.8.1. Avaliação da toxicidade

A toxicidade dos metais para a vida aquática pode ser estudada segundo duas prespectivas temporais: os efeitos imediatos - toxicidade aguda ou os efeitos a mais longo prazo - toxicidade crónica.

Existem vários parâmetros que permitem avaliar as respostas das algas aos metais poluentes. Nestes incluem-se a : (a) número de células - densidade da população, volume celular compactado, densidade óptica; (b) clorofila - fluorescência de extractos ou quantidade de clorofila **a**; (c) fotossíntese - fixação de $^{14}CO_2$ ou carbono orgânico total; (d) nucleótidos adenilados - ATP ou carga energética; (e) peso - fresco ou seco; (f) conteúdo proteico ou em ácidos nucleicos; (g) colorações vitais; e (h) alterações morfológicas.

A quantificação da toxicidade pode ser efectuada através (i) das concentrações letais, (ii) das concentrações que reduzem a 50% a capacidade de sobrevivência do organismo (LC_{50}),

embora este parâmetro possa não ser uma boa medida da sensibilidade de outras actividades celulares, (iii) da concentração para a qual uma função biológica (crescimento, metabolismo, reprodução) é reduzida em 50% (IC_{50} ou EC_{50} ou ED_{50}), sendo estes valores considerados uma melhor avaliação do decréscimo potencial do "estado" de uma população.

Quanto à avaliação do estado de poluição da água, os critérios começaram por se basear nas concentrações totais do agente poluente por causa das possíveis alterações fisico-químicas que este pode sofrer nos sistemas aquáticos (U. S. EPA, 1987). Actualmente, é reconhecida a importância da especiação química.

2.8.2. Efeitos a nível celular

Quando em concentrações superiores às necessárias para uma biologia celular normal, o cobre induz alterações celulares a vários níveis interferindo, por exemplo, com a fisiologia, a bioquímica, a morfologia e a reprodução.

Alterações de crescimento induzidas pelo cobre são as mais documentadas. O cobre provoca uma diminuição do crescimento das culturas (redução da taxa de crescimento) e da biomassa total produzida. Verifica-se também o aparecimento de uma fase de latência. Em algumas espécies de algas a forte inibição da densidade populaçional pode diminuir à medida que a cultura envelhece. Esta recuperação do crescimento pode apenas reflectir o aumento em locais celulares de ligação, à medida que a densidade de população aumenta. O cobre é um metal altamente reactivo com os grupos sulfidrilo (Lehninger, 1970) e estes grupos são importantes na regulação da divisão celular (Stern, 1956). Fisher *et al.* (1981) sugeriram que o cobre ao ligar-se a grupos sulfidrilo poderia interferir com várias vias metabólicas, sendo possível que uma ou mais dessas vias fossem essenciais para uma divisão celular normal. A apoiar esta hipótese, Fisher & Jones (1981) verificaram existir uma correlação entre toxicidade provocada por vários metais e a reactividade desses metais com o enxofre. Davies (1976) sugeriu que tanto o cobre como o mercúrio poderiam inibir a produção de metionina, a qual é necessária para a divisão celular. Um outro mecanismo proposto é o da ligação do metal a grupos tiol reactivos da tubulina, molécula importante na formação do fuso mitótico (ver Stauber & Florence, 1987). Por sua vez, estes autores consideraram que o cobre ao reagir com a glutationa reduzida (GSH) e, portanto, diminuindo a razão GSH:GSSG (glutationa oxidada), provocava supressão da mitose.

Efeitos de toxicidade pelo cobre no crescimento foram observados, por exemplo, em *Chlorella pyrenoidosa* (Steeman Nielsen & Wium-Andersen, 1970), *Chlorella sorokiniana* (Cedeno-Maldonado & Swader, 1974), *Chlorella vulgaris* (Foster, 1977), *Chlorella saccharophila* (Rachlin *et al.*, 1982b), *Scnedesmus subspicatus* (Baunemann & Höfner, 1991), *Nitzschia palea* (Steeman Nielsen & Wium-Andersen, 1970), *Nitzschia closterium*

(Rachlin *et al.*, 1983b; Stauber & Florence, 1986), *Asterionella japonica* (Fisher *et al.*, 1881), *Asterionella glacialis* (Stauber & Florence, 1987), *Navicula incerta* (Rachlin *et al.*, 1983a), *Selenastrum capricornutum* (Bartlett *et al.*, 1974), *Thalassiosira pseudonana* (Erickson 1972), *Cladophora* sp. (Betzer & Kott, 1969), *Skeletonema costatum* (Berland *et al.*, 1977), em 11 espécies de fitoplancton marinho (Gavis *et al.*, 1981) *Amphora coffeaeformis* (Robinson *et al.*, 1992), *Kryptoperidinium* (*Glenodinium*) *foliaceum* (sensibilidade comparável à da cianobactéria *Coccochloris elabans*) (Mandelli, 1969), *Ptychodiscus* (*Gymnodinium*) *brevis* (Collier *et al.*, 1969), *Protogonyaulax* (*Gonyaulax*) *tamarensis* (crescimento limitado a pCu de 12,5) (Anderson & Morel, 1978; Schenk, 1984).

O crescimento celular não acompanhado de divisão celular inibida pelo cobre, leva à formação de células de maiores dimensoes que o normal, como observado em *Thalassiosira pseudonana* (Erickson, 1972), *Scenedesmus quadricauda* (Khobot'yev *et al.*,1975), *Chlorella vulgaris* (Foster, 1977), *Asterionella japonica* (Fisher *et al.*, 1881), *Protogonyaulax* (*Gonyaulax*) *tamarensis* (Anderson & Morel, 1978), *Plectonema boryanum* (Rachlin *et al.*, 1982a) *Amphora coffeaeformis* (Robinson *et al.*, 1992). Outros desenvolvimentos morfológicos anormais induzidos pelo cobre têm sido descritos incluindo um aumento da lise celular em *Cladophora* sp. (Betzer & Kott, 1969), alongamento de filamentos, aumento da frequência em heterocistos e perda de conteúdo das células apicais do filamento (ver Hodson *et al.*, 1979). Anormalidades no padrão de crescimento de esporófitos jovens foram observadas em *Laminaria saccharina* (Brinkhuis & Chung, 1986).

O cobre induz alterações estruturais celulares como redução do número de corpos de polifosfato em *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Sicko-Goad & Stoermer 1979), aumento do volume vacuolar e diminuição do volume do cloroplasto em diatomácias (Sicko-Goad, 1982), diminuição da área dos tilacóides na cianobactéria *Anacystis cyanea* (Sicko-Goad, 1982), redução do conteúdo lipídico celular em *Plectonema boryanum* (Rachlin *et al.*, 1982a) e de amido em *Tetraselmis suecica* (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991), alterações estruturais dos cloroplastos (*e.g.* dilatação dos tilacóides) em *Laminaria saccharina* (Brinkhuis & Chung, 1986).

O cobre pode ter um forte efeito na mobilidade celular provocando a sua diminuição até 100% em função da concentração, como observado em *Protogonyaulax* (*Gonyaulax*)*tamarensis* (Anderson & Morel, 1978). A redução de poder energético atribuida directamente aos metais, é provavelmente a causa da redução da mobilidade.

Diminuição do conteúdo em clorofilas das algas, da razão clorofilas **a/b** e dos níveis de feofitina são efeitos induzidos pelo cobre, mas, por sua vez, os níveis de protoclorofila e as razões carotenóide/clorofila na maioria dos casos aumentam. Em vista do elevado potencial redox de muitos metais, a explicação mais simples consistente com estas observações é a de que os metais inibem passos redutores na via biossintética dos pigmentos fotossintéticos. Em

adição, a enzima chave redutase da protoclorofilide, a qual está envolvida na redução da protoclorofila a clorofila, é inibida pelos metais pesados. Vários destes aspectos foram observados em *Scenedesmus quadricauda* e *Anabaena variabilis* (Khobot'yev *et al.*,1975) e em populações de fitoplancton marinho (Saward *et al.*, 1975). Alva (1993) observou em laranjeiras sintomas de clorose por deficiência em ferro a qual foi provocada por excesso de cobre.

O cobre é um potente inibidor da fotossíntese quer a nível da cadeia fotossintética de transporte de electrões e fotofosforilação quer nas reacções de obscuridade. A toxicidade pelo cobre leva a uma inibição das reacções fotoquímicas dos cloroplastos por um efeito negativo directo no fotossistema II, pela ligação a grupos tiol do factor "coupling" inactivando-o, ou por induzir alterações ultrastructurais nas membranas internas do cloroplasto tornando-as ineficazes (Fernandes & Henriques, 1991). Contudo, como geralmente se verifica uma simultânea diminuição no conteúdo em clorofila, a razão fotossíntese/mg clorofila apresenta um valor elevado (De Filippis & Pallaghy, 1994). A inibição directa pelo cobre do transporte de electrões no fotossistema I ocorre, pelo menos em parte, na ferredoxina. No fotossistema I e no passo final antes da redução do NADP a enzima interveniente, a ferredoxina NADP-oxidoredutase, possui grupos sulfidrilo e é portanto susceptível à inibição pelos metais (De Filippis & Pallaghy, 1994). O fotossistema II é fortemente inibido pelo cobre (Rai *et al.*, 1991) não sendo bem conhecido o local exacto da acção deste metal (Lidon & Henriques, 1993b; De Filippis & Pallaghy, 1994). Singh & Singh (1987) sugeriram que em *Anacystis nidulans*, a inibição pelo cobre do transporte fotossintético de electrões estava localizado antes do local sensível ao DCMU, ao nível dos citocromos. Contudo, o local de acção do cobre no fotossistema II permanece um tópico de grande controvérsia (Arellano *et al.*, 1995; Barón *et al.*, 1995). Sabe-se que o cobre está localizado no complexo captador de luz do fotossistema II e está ligado anti-ferromagneticamente a este centro de reacção (Droppa & Horvath, 1990). Lidon & Henriques (1991b; 1993b) verificaram que em *Oryza sativa* tratada com cobre, o decréscimo da actividade da carboxílase/oxigénase da ribulose-1,5-bisfosfato era o efeito dominante deste metal no aparelho fotossintético. Esta diminuição de actividade estava relacionada ou com a diminuição da síntese ou com o aumento da degradação da enzima e não com qualquer alteração estrutural da enzima.

Efeitos tóxicos do cobre na fotossíntese foram referidos por exemplo em *Chlorella pyrenoidosa* (Steeman Nielsen *et al.*,1969), *Chlorella sorokiniana* (Cedeno-Maldonado & Swader, 1974), *Nitzschia palea* (Steeman Nielsen & Wium-Andersen, 1972), *Thalassiosira pseudonana* (Erickson 1972), *Asterionella glacialis* e *Chlorella pyrenoidosa* (Stauber & Florence, 1987), *Amphora coffeaeformis* (Robinson *et al.*, 1992), *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum* (Overnell, 1975) em várias algas marinhas (Overnell, 1976), em *Gonyaulax tamarensis* (Anderson & Morel, 1978), em populações de fitoplancton marinho

(Saward *et al.*, 1975). Fisher *et al.* (1881), contrariamente ao atrás descrito, observaram que *Asterionella japonica* exposta a níveis relativamente elevados de cobre fotossintetizava a uma taxa praticamente normal com base no teor em clorofila, e acima do normal quando expressa por célula. Stauber & Florence (1986) também verificaram que, apesar do crescimento já estar inibido pelo cobre, a fotossíntese em *Nitzschia closterium* continuava não afectada.

Uma molécula produzida durante a fotossíntese e que pode ser altamente tóxica para o crescimento dos organismos é o peróxido de hidrogénio. Esta molécula é um agente oxidante fraco e pode inactivar directamente algumas enzimas, usualmente pela oxidação de grupos tiol essenciais, sendo a frutose bisfosfatase de cloroplastos de espinafre um exemplo (Halliwell & Gutteridge, 1985). É biologicamente vantajoso para as células controlarem a quantidade de peróxido de hidrogénio formada e dois tipos de enzimas, as catalases e as peroxidases, procedem à sua remoção. O peróxido de hidrogénio pode desempenhar um papel importante na toxicidade induzida pelo cobre (Robinson *et al.*, 1992) porque este metal inibe a enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogénio, impedindo assim que as células se consigam livrar a acção nefasta desta espécie de oxigénio. Inibição de enzima catalase pelo cobre foi também observada por Stauber & Florence (1986, 1987).

A respiração geralmente é diminuida pelos metais. Alterações na estrutura mitocondrial e redução da actividade de pelo menos quatro enzimas do ciclo de Krebs (TCA) por alguns metais foi referida por De Filippis & Pallaghy (1994). Diminuição da respiração por excesso de cobre foi observado em *Chlorella sorokiniana* (Cedeno-Maldonado & Swader, 1974), *Amphidinium carterae* (Samuel, 1976) e *Amphora coffeaeformis* (Robinson *et al.*, 1992). Porém, Stauber & Florence (1987) não observaram qualquer efeito do cobre quer a nível da respiração quer do transporte mitocondrial de electrões em *Nitzschia closterium* e *Asterionella glacialis.*

Os metais têm um efeito marcado nos níveis dos nucleótidos adenilados. Os níveis de AMP são afectados muito ligeiramente, os níveis de ADP mantêm-se inalteráveis ou um pouco aumentados, mas os níveis de ATP diminuem significativamente. A carga de energia (definida pela razão [ATP + 0,5 ADP] / [ATP + ADP + AMP] diminui bruscamente com o tratamento com metais pesados, recuperando apenas lentamente com a idade das culturas, mas raramente recuperando para níveis observados no controlo (De Filippis, 1989). Esta interferência com a disponibilidade de fosfato rico em energia pode potencialmente retardar todos os processos dependentes de ATP, como a fixação de carbono. Stauber & Florence (1987) não observaram efeito do cobre na produção de ATP por *Nitzschia closterium* e *Asterionella glacialis.*

Alterações dos níveis de DNA, RNA e proteínas dependentes do estado de crescimento das células podem ser induzidos pelo cobre. É provavel que o elevado nível de proteínas observado em alguns casos possa, em parte, ser explicado pela indução dos polipéptidos

quelantes de metais, as fitoquelatinas. Um aumento da quantidade total de proteínas solúveis foi observado em *Saccharomyces cerevisiae* na presença de cobre (Galiazzo *et al.*, 1988). Lidon & Henriques (1993b) observaram alterações significativas dos padrões electroforéticos de polipéptidos dos cloroplastos de *Oryza sativa* provocados por excesso de cobre e também uma diminuição da concentração proteica (Lidon & Henriques, 1993c).

O cobre pode aumentar a permeabilidade das membranas, nomeadamente do plasmalema e induzir a perda celular de catiões, particularmente potássio. A perda de potássio é quase, mas não totalmente, independente da luz e parece estar relacionada com a interacção do cobre com os grupos sulfidrilo, levando à quebra de barreiras na permeabilidade celular. A perda de potássio não está relacionada com o mecanismo de absorção de protões como já tem sido sugerido (De Filippis & Pallaghy, 1994). Perda de potássio associada a toxicidade pelo cobre foi observada em *Chlorella vulgaris* (McBrien & Hassal, 1965), *Dunaliella tertiolecta* (Overnell, 1975) e *Pseudomonas syringae* (Cabral, 1989). Aumento da permeabilidade de membranas associado a um aumento da actividade da RNAse ácida por acção do cobre foi observado em *Oryza sativa* (Lidon & Henriques, 1993a,c)

Sandmann & Böger (1980) observaram que *Scenedesmus acutus* quando sujeito a concentrações tóxicas de cobre(II) passava por um período transitório de inibição de crescimento, devido, aparentemente, a processos de peroxidação que afectavam o aparelho fotossintético. A reacção de peroxidação dos lípidos das membranas foi acompanhada pela produção de etano e de etileno e degradação da clorofila.

Como já pontualmente mencionado, o cobre interfere com a actividade de várias enzimas tendo sido propostos dois possíveis mecanismos explicativos do seu efeito tóxico: (a) a substituição de um ião metálico essencial formando a parte central e funcional da proteína enzimática; (b) a interferência com grupos sulfidrilo que muitas vezes determinam a estrutura secundária e terciária (e também a função) da enzima (van Assche & Clijsters, 1990). Estas interacções muito provavelmente só ocorrem quando a capacidade de tamponamento metálico intracelular é excedida. Assim, ao reagir com os grupos tiol e outros grupos redutores de compostos celulares o cobre pode desviar a activação de oxigénio para uma maior produção de O_2^- e H_2O_2. Esta alteração do metabolismo do oxigénio pode resultar por sua vez num aumento adaptativo da actividade de enzimas antioxidativas que ajudam na remoção de O_2^- e H_2O_2 como a Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD), a oxídase do citocromo c, a peroxídase da glutationa e a catálase (Galiazzo *et al.*, 1988). Uma vez que no seu estudo estes autores verificaram que outros iões (Mn(II) e Co(II)) não induziam este efeito, propuseram para o cobre um papel geral como regulador das actividades das principais enzimas envolvidas na activação biológica do oxigénio. Contrariamente, Buckley (1994) observou uma redução da actividade da Cu,Zn-SOD com o aumento de cobre em *Lemna minor* e, como previamente

referido, inibição da catalase pelo cobre foi também observada por Stauber & Florence (1986, 1987) e Robinson *et al.* (1992).

Ectoenzimas, isto é, enzimas ligadas à superfície celular com locais catalíticos orientados extracelularmente, podem ser particularmente sensíveis aos metais os quais se podem ligar aos locais catalíticos, afectando o funcionamento normal. Uma destas enzimas, a fosfatase alcalina, verificou-se ser inibida pelo cobre (Rueter, 1983) em concentrações que não inibiam a taxa de crescimento do organismo (Brand *et al.*, 1986), quando o ortofosfato era a fonte de fósforo. A actividade desta enzima é, portanto, um indicador mais sensível do "stress" provocado pelo cobre do que, por exemplo, o crescimento celular, e é uma resposta imediata à adição de cobre devido à sua localização extracelular. Em águas doces e em certos meios marinhos onde o fósforo está pouco disponível e as moléculas orgânicas dissolvidas (MOD) são a maior fonte de fósforo, níveis baixos de cobre podem alterar o catabolismo dos macronutrientes através de interferência com a fosfatase alcalina. Um mecanismo de toxicidade pelo cobre pode portanto estar relacionado com a incapacidade das células adquirirem fósforo a partir das MOD, resultando numa deficiência celular de fósforo. Uma forma tão subtil de toxicidade por metais é pouco provável que resulte em morte celular mas pode reduzir as taxas de crescimento e alterar a estrutura da comunidade fitoplanctónica de um modo aparentemente mais relacionado com a nutrição do fósforo que com toxicidade do cobre *per se* (Price & Morel, 1994). A actividade da H^+-ATPase dependente de vanadato e localizada no plasmalema é inibida pelo cobre (Burzynski & Buczek, 1994). Esta enzima medeia o mecanismo electrogénico de efluxo de protões o qual mantem em grande parte o potencial e o gradiente de protões através das membranas. Assim, o cobre através de inibição de enzimas do plasmalema como a H^+-ATPase pode causar despolarização da membrana citoplasmática.

À excepção do zinco, todos os metais do primeiro período do bloco d da Tabela Periódica contêm electrões desemparelhados e são portanto classificados como radicais. Entende-se por "radical livre" qualquer espécie química capaz de existência independente e que contem um ou mais pares de electrões desemparelhados (Halliwell & Gutteridge, 1985). Deste ponto de vista, a característica mais importante dos elementos metálicos de transição é a sua variabilidade de valência, a qual lhes permite alterarem o estado de oxidação envolvendo um electrão. Sob condições apropriadas, por exemplo, o cobre tanto pode aceitar electrões, como dar electrões ao radical superóxido O_2^-,

$$Cu^{2+} + O_2^- \text{ ------ } Cu^+ + O_2$$
$$Cu^+ + O_2^- \text{ ------ } Cu^{2+} + O_2^{2-}$$
$$O_2^{2-} + 2H^+ \text{ ------ } H_2O_2$$

reacção final:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \text{ ------ } H_2O_2 + O_2$$

O cobre, alterando a sua valência, leva à combinação de dois radicais O_2^- e dois iões H^+ formando H_2O_2 e O_2. Actua, portanto, como um catalizador e permanece inalterável em quantidade e natureza química no final da reacção apenas aumentando enormemente a sua velocidade. O cobre no estado de valência (I) também reage com o H_2O_2 formando radicais hidroxilo:

$$Cu^+ + H_2O_2 \text{ ----- } Cu^{2+} + OH^* + OH^-$$

Através da formação destas espécies químicas muito reactivas que levam a alterações bioquimico-fisiológicas importantes, o cobre de uma forma indirecta provoca toxicidade. De seguida, apresentam-se vários exemplos de toxicidade induzidos por estas espécies químicas referidos por Halliwell & Gutteridge (1985). A reacção do radical livre OH^* com a lecitina (importante fosfolípido das membranas biológicas) pode levar à destruição da membrana. O ataque de açúcares como a desoxirribose (existente no DNA) pelo OH^* origina produtos que podem ser mutagénicos em sistemas bacterianos. A reacção do OH^* com estruturas contendo aneis aromáticos, como as bases púricas e pirimídicas presentes no DNA e RNA, induz alterações severas das bases e também dos açúcares provocando ruptura das cadeias. Foi observado que misturas de cobre(I) e H_2O_2 danificavam várias proteínas.

Em resposta à deficiência de um metal, o fitoplancton aumenta a sua taxa de transporte desse metal limitativo do crescimento através do aumento da quantidade dos ligandos de transporte. Nestas condições, outros metais não limitativos podem acumular-se em concentrações intracelulares elevadas. Isto pode acontecer se os metais não limitativos estiverem presentes em elevadas concentrações e competirem com o metal limitativo para o mesmo local de transporte. Metais não limitativos podem também acumular-se se a sua velocidade de transporte permanecer a mesma e a taxa de crescimento celular for reduzida devido à limitação do metal. A toxicidade do fitoplancton por metais vestigiais é evidente em regiões oceânicas de afloramento (Sunda *et al.*, 1981). Uma elevada concentração de cobre inorgânico nestas águas pensa-se que pode exercer o seu efeito tóxico interferindo com o metabolismo do manganésio. Como a concentação de cobre aumenta, a concentração celular de manganésio diminui e a taxa de crescimento é reduzida. Aumentando a concentração de manganésio verifica-se o reverso deste efeito.

Em resumo, os mecanismos de toxicidade do cobre(II) incluem as interacções deste com enzimas, outras proteínas, ácidos nucleicos e metabolitos tanto a nível da parede e do plasmalema como intracelularmente.

2.9. Sinergismo *versus* antagonismo

Os efeitos de toxicidade de certos metais incluindo o cobre podem ser aumentados ou diminuidos pela coexistência de outros metais. Surgem assim fenómenos de sinergismo ou antagonismo respectivamente. Estes fenómenos dependem dos metais e das espécies biológicas. A competição entre metais por locais moleculares pode reflectir-se nas respostas fisiológicas ao nível celular. Uma vez que um nutriente metálico que está ligado ao seu local funcional numa enzima pode ser substituido competitivamente por um certo número de outros metais, dependendo das suas constantes de afinidade, concentrações do ião livre e cinéticas de reacção, um grande número de interacções entre nutrientes metálicos e metais competidores inibitórios (frequentemente referidos como metais antagonistas) são possíveis. Como muitos metais são altamente reactivos, os mecanismos de homeostasia celular evoluiram para controlarem as concentrações de metal livre. A semelhança das propriedades dos ligandos dos metais (ex: S-coordenação do Cu, Cd, Hg e Zn) resultam em muitas interacções competitivas para a absorção e metabolismo, assim como toxicidade por destruição de funções normais (actividade enzimática, estrutura das membranas, etc.). Nem todas as interacções entre metais nutrientes e competidores são deletérias. Em alguns casos dois ou mais metais competem para o mesmo local e ambos os metais têm os atributos químicos necessários para conferir actividade a esse local. Bruland *et al.* (1991) destacaram a importância das interacções sinérgicas e antagónicas entre múltiplos metais vestigiais nos oceanos e em particular o antagonismo entre o cobre e os metais potencialmente biolimitativos (ferro, manganésio e zinco).

Hutchinson (1973) verificou que o cobre e o níquel actuavam sinergisticamente em *Haematococcus capensis* assim como a prata e o cobre em *Chlorella vulgaris* (Young & Lisk, 1972). A toxicidade do cobre foi antagonizada pelo ferro(III) em *Chlorella pyrenoidosa* e *Nitzschia palea* (Steeman Nielsen & Wium-Andersen, 1970). Os catiões cálcio, magnésio e potássio actuaram mitigando a toxicidade do cobre em *Phaeodactylum tricornutum* (Overnell, 1976), provavelmente devido a competição e/ou complexação e coprecipitação. O cobre e o zinco actuaram antagonisticamente em *Phaeodactylum tricornutum* mas sinergisticamente em *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* e *Amphidinium carterae* (Braek *et al.*, 1976). Isoladamente, o cobre foi mais tóxico para as 4 espécies do que o zinco. O cobre, por competição, inibe a absorção de manganésio por *Thalassiosira pseudonana* e reduções da taxa

de crescimento estão directamente relacionadas com a resultante diminuição da concentração celular em manganésio. Interacções sinérgicas entre cádmio e cobre e cobre e cobalto e antagónicas entre cádmio, cobre e cobalto foram observadas em *Chlorella vulgaris* (Rachlin & Grosso, 1993). Como estes autores não conseguiram detectar incorporação intracelular destes catiões, sugerem que a toxicidade seja exercida ao nível da membrana citoplasmática. Stauber & Florence (1987) discutiram o efeito benéfico do alumínio, manganésio, cobalto, ferro, crómio, níquel e zinco na toxicidade do cobre em algumas algas, e concluiram que estes metais podem formar uma camada de hidróxidos de catiões de carga (III) à volta das células, ligando cobre e reduzindo a sua penetração na célula. Interacções entre cobre e manganésio (Sunda *et al.*, 1981; Sunda & Huntsman, 1983), cobre e ferro (Murphy *et al.*, 1984) e cobre e zinco (Rueter & Morel, 1981) foram observadas ocorrer no fitoplancton.

Os aniões são capazes de reduzir a toxicidade devida a metais, por precipitação. Para além do ião hidroxilo, os iões fosfato, tiossulfato, carbonato e bicarbonato podem formar precipitados com metais pesados dependendo das suas concentrações e do pH da solução. Contudo, em *Chlorella vulgaris* a respiração foi inibida quando o anião fluoreto e catiões cobre foram aplicados conjuntamente, mas individualmente os iões tiveram pouco efeito (Hassall, 1967).

2.10. Tolerância

Como previamente referido, os organismos necessitam para o seu normal funcionamento de metais essenciais como o cobre em certos níveis - níveis fisiológicos. Para conseguirem sobreviver e se reproduzirem quando sujeitos a níveis superiores destes metais ou a certos níveis de metais não essenciais - níveis tóxicos, os organismos têm de possuir mecanismos que lhes permitam superar os efeitos nefastos causados pela interferência com o metabolismo ou a danificação de estruturas celulares sensíveis. Esta capacidade pode depender de adaptação genética com o tempo (mutação, troca genética, selecção ou alterações bioquímicas ou fisiológicas) e passar a ser um carácter geneticamente estável (Takamura *et al.*, 1989) ou ser fenotipicamente adquirida. Os mecanismos de tolerância podem ser constitutivos (presentes na maioria dos fenótipos) ou adaptativos (presentes apenas em fenótipos tolerantes) (Meharg, 1994). O objectivo fundamental de ambos os mecanismos é o de limitar a perturbação da homeostasia celular após exposição a metais para que o funcionamento fisiológico normal seja restabelecido.

Nos mecanismos gerais de tolerância podem-se considerar três categorias gerais: desintoxicação bioquímica, compartimentalização do metal na célula e limitação da absorção do ião tóxico. Mais especificamente, pode-se considerar a ligação de grandes quantidades de

metais nas paredes celulares, a ligação dos iões metálicos à superfície celulare e complexação externa com exsudados, o efluxo activo dos metais do interior das células, a ligação e precipitação no citoplasma e/ou em organelos, a existência de enzimas tolerantes ao metal em vias metabólicas chave, e a ligação a proteínas ou polipéptidos ou outros compostos orgânicos com capacidade de quelatarem metais. A tolerância ao "stress" metálico pode ser conseguida através de um ou mais destes mecanismos.

A acumulação de cobre na parede celular tem sido observada em organismos de grupos distintos: em esporos de fungos resistentes ao cobre (Somers, 1963), nas células radiculares de *Agrostis tenuis* (Turner, 1970), em *Chlamydomonas* (Button & Hostetter, 1977), em acinetos de *Pithophora oedogonia* (Pearlmutter & Lembi, 1986), nas células radiculares de *Zea Mays* e *Glicine max* (Allan & Jarrel, 1989), em *Tetraselmis suecica* (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991). A parede celular pode ser assim uma barreira para a entrada de metais uma vez que os quelata evitando a sua passagem para o interior celular. Por sua vez a ligação de metais à superfície celular pode ser especialmente importante em organismos produtores de mucosidades ou para aqueles que crescem numa matriz extracelular, actuando estes materiais como uma "barreira impermeável". Brown *et al.* (1988) sugeriram que a diatomácia *Amphora coffeaeformis* restringe a entrada de cobre iónico para a célula através da sua ligação no exterior, possivelmente a mucilagens exsudadas ou à superfície celular.

A exclusão de metais específicos é importante mesmo em concentrações externas elevadas do metal e é dependente das espécies de algas. Os mecanismos de exclusão celular podem ter uma base genética (De Filippis & Pallaghy, 1994) e existem evidências de que estes mecanismos operam a nível da membrana celular em algas resistentes (Hall, 1981). Regulação do transporte do cobre e capacidade para sua exclusão foram observados *Chlorella vulgaris* (Foster, 1977) e *Ectocarpus siliculosus* (Hall *et al.*, 1979) tolerantes ao cobre. Limitação da absorção do metal pelo organismo também ocorreu numa espécie de *Scenedesmus* tolerante ao cobre (Mierle & Stokes, 1976).

Através da libertação de metabolitos que complexem o cobre, as algas podem, em princípio, modificar a especiação do metal no meio e controlar efectivamente a disponibilidade do metal no meio externo e consequentemente a sua toxicidade. Tem sido demonstrado que várias cianobactérias apresentam esta capacidade. *Anabaena cylindrica* controlou a toxicidade provocada pelo cobre através da libertação de polipéptidos (Fogg & Westlake, 1955). Jardim & Pearson (1984) verificaram que uma estirpe da cianobactéria *Plectonema boryanum* tolerante ao cobre produzia grandes quantidades de compostos complexantes de cobre e *Synechococcus* sp., uma espécie oceânica, também produz quelantes extracelulares de elevada afinidade para o cobre (Moffett *et al.*, 1990). McKnight & Morel (1979) observou que para além de cianobactérias, algas de diferentes grupos taxonómicas (clorófitas, diatomácias e crisófitas) também excretam para o meio compostos orgânicos complexantes de cobre.

Diminuição da acumulação de cobre através da libertação de exsudados foram também observados na haptófita *Cricosphaera elongata* (Härdstedt-Roméo & Gnassia-Barelli, 1980) e na diatomácia *Amphora coffeaeformis* (Brown *et al.*, 1988).

Algumas algas apresentam processos internos de desintoxicação do cobre. É o caso da formação de inclusões intranucleares observadas numa espécie de *Scenedesmus* tolerante ao cobre, diminuindo assim a concentração de cobre no citoplasma (Silverberg *et al.*, 1976), da coprecipitação com prata, chumbo, cálcio e fósforo em vesículas osmiofílicas lipídicas em *Tetraselmis suecica* (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991), da coprecipitação com fósforo e cálcio em corpos de polifosfato localizados no interior de vacúolos em *Amphora veneta* (Daniel & Chamberlain, 1981), da sequestração em grânulos electronodensos de polifosfato no citoplasma da diatomácia *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Sicko-Goad & Stoermer, 1979) e na cianobactéria *Plectonema boryanum* (Jensen *et al.*, 1982; Rachlin *et al.*, 1982a). Análises de raio-X em *Plectonema boryanum* revelaram complexos de coprecipitação de metais com cálcio, fósforo e enxofre (Jensen *et al.*, 1982). A acumulação de metais em corpos de polifosfato cuja função primária é a do armazenamento de fósforo como fonte de energia, confere à célula a vantagem de ter desenvolvido um mecanismo em que metais essenciais como o cobre estão armazenados, podendo posteriormente ser utilizados numa fase de crescimento activo.

Em alguns casos a tolerância aos metais pode estar associada a uma diminuição da susceptibilidade de certas enzimas à inibição pelo metal. Cox & Hutchinson (1980) demonstraram que a actividade da fosfatase ácida radicular de um clone tolerante ao cobre de *Deschampsi caespitosa* era menos sensível à inibição pelo cobre do que a enzima de clones não tolerantes.

Como o plasmalema é o primeiro alvo de toxicidade para o ião metálico e não é protegido pelos mecanismos de desintoxicação intracelulares, a manutenção da integridade da membrana pode também desempenhar um papel importante na tolerância assim como a protecção da função de proteínas associadas ao plasmalema como transportadores, canais e bombas de protões (Meharg, 1993)

As fitoquelatinas são os principais péptidos intracelulares das plantas, algas e alguns fungos com capacidade de quelatarem metais (Grill *et al.*, 1985; Rauser, 1990). As fitoquelatinas são polipéptidos com a seguinte estrutura geral em aminoácidos (g-glutamina-cisteína)$_n$-glicina, n = 2 a 11 (Grill *et al.*, 1985). A enzima, fitoquelatina sintétase, faz a união da g-glutamina-cisteina da uma glutationa com outra glutationa (originando n=2) ou a outra cadeia de fitoquelatina aumentando em mais um, o número de unidades n. Cadeias mais longas têm a capacidade de ligarem mais fortemente os metais *in vitro* (Loeffler *et al.*, 1989), mas o seu papel celular é ainda desconhecido. A fitoquelatina sintétase é activada *in vitro* pela presença de uma grande gama de metais (Grill *et al.*, 1985) e desactivada quando os metais

estão ligados pelas fitoquelatinas sintetizadas de novo (Grill *et al.*, 1989; Loeffler *et al.*, 1989). A extensão da activação da enzima fitoquelatina sintétase após exposição a um metal (e a concentração de fitoquelatinas resultante) vai depender não só na concentração celular do metal mas também da natureza do metal em particular e da fracção que é sequestrada na membrana ou se localiza no citoplasma da célula. Após exposição aos metais, a grande quantidade de glutationa intracelular é convertida rapidamente em fitoquelatinas como confirmado em *Thalassiosira weissflogii* (Ahner & Morel 1995). As fitoquelatinas quelatam metais através da coordenação com os grupos sulfidrilo na cisteína. Foi também sugerido para as fitoquelatinas um papel de transportador temporário de enxofre reduzido na via de incorporação do enxofre (Steffens *et al*, 1986).

O cobre, o zinco e em maior extensão o cádmio parecem ser os metais que mais provavelmente induzem concentrações elevadas de fitoquelatinas em algas, em águas naturais (Ahner & Morel 1995). Como o estudo de fitoquelatinas em algas tem sido maioritariamente realizado com cádmio como metal indutor da sua síntese, vários dos dados que seguidamente se referem são relativos ao cádmio, mas, possivelmente, na sua totalidade são transponíveis para o cobre. Ahner *et al.* (1994) verificaram a existência de uma relação dose-resposta clara entre as concentrações de cádmio(II) livre e de fitoquelatina intracelular na diatomácia *Thalassiosira weissflogii*. Ahner *et al.* (1995) demonstraram que todas as espécies de algas examinadas continham fitoquelatinas (mesmo na ausência de cádmio) e que este metal levava à produção de fitoquelatinas na presença de concentrações muito baixas mas ambientalmente relevantes. A observação da presença de fitoquelatinas em todas as células fitoplanctónicas expostas a concentrações muito baixas de metal livre implica para estes compostos um outro papel para além do da desintoxicação. Pensa-se que as fitoquelatinas desempenham um papel fundamental na homeostasia intracelular dos iões metálicos e regulam a concentração iónica no citoplasma (Rauser, 1990; Steffens, 1990). Estes compostos podem representar locais activos não-metabólicos que são uma fonte de metais para a síntese de metaloproteínas essenciais. A transferência de metais dos complexos metal-fitoquelatina para apoenzimas foi demonstrada *in vitro* (Thumann *et al.*, 1991). Das várias espécies de fitoplancton marinho testadas, pertencentes a diferentes grupos de algas, somente o dinoflagelado *Heterocapsa pygmaea* manteve constante a concentração de fitoquelatinas em toda a gama de valores de pCd testados, sugerindo que um mecanismo de desintoxicação alternativo para o cádmio era utilizado por este organismo (Ahner *et al.* 1995). O cádmio foi o metal indutor mais efectivo da produção de fitoquelatinas na diatomácia marinha *Thalassiosira weissflogii* na gama de concentrações metálicas iónicas importantes em águas marinhas naturais (Ahner & Morel, 1995). O mesmo foi verificado para mais duas espécies de algas de grupos diferentes. Outros estudos da produção de fitoquelatinas em fitoplancton têm sido geralmente limitados à indução pelo cádmio. A produção de fitoquelatinas por acção do cobre foi observada em duas

clorófitas, *Scenedesmus* e *Chlorella* (Gekeler *et al.*, 1988). Ahner & Morel (1995) verificaram um pequeno aumento na produção de fitoquelatinas com o aumento da concentração de cobre em *Thalassiosira weissflogii*, mas na concentração mais elevada testada a produção estabilizou. Esta estabilização poderá reflectir uma incapacidade da alga continuar a sintetizar fitoquelatinas, um decréscimo no tamanho celular sob o "stress" de cobre ou um outro mecanismo de tolerância.

Para além das fitoquelatinas outras substâncias orgânicas podem ser produzidas, reduzindo a toxicidade do cobre. O ácido cítrico, produzido por muitas leveduras e outros fungos, pode prontamente quelatar o cobre(II) e proteger os organismos de toxicidade (Ross, 1975). A produção de ácido oxálico tem sido relacionada com a tolerância ao cobre de certos fungos "wood-rotting". Vários trabalhos em plantas indicaram que o conteúdo em poliaminas e a actividade de enzima da biossíntese das poliaminas aumenta em resposta a várias condições de "stress" ambiental (ver Agrawal et al. 1992). Estes autores, verificaram um aumento acentuado do teor das poliaminas putrescina e 1,3-diaminopropano na alga *Chlorogonium elongatum* por acção de mercúrio e um aumento do conteúdo total em glutationa e em glutationa reduzida.

A tolerância a um metal geralmente não confere co-tolerância a outro metal. Como exemplos de co-tolerância incluem-se as diatomácias *Amphora* e *Amphiprora* tolerantes ao cobre e ao zinco (French & Evans, 1988), várias espécies de Chlorophyta tolerantes ao cobre e ao chumbo (Foster, 1982), uma estirpe de *Ectocarpus siliculosus* tolerante ao cobre e resistente ao zinco e ao chumbo (Hall, 1980) e *Chlorella* e *Scenedesmus* tolerantes ao cobre e ao níquel (Stokes *et al.*, 1973). A existência de tolerância múltipla aos metais sugere que alguns mecanismos podem ser comuns a mais do que um metal. A co-tolerância aos metais é um tópico controverso pois vários autores consideram que esta só é adquirida se os organismos forem expostos a uma combinação de metais (Humphreys & Nicholls, 1984).

3. *A. CARTERAE* E *P. MICANS* COMO MODELOS BIOLÓGICOS EM ESTUDOS DE TOXICIDADE

A. carterae e *P. micans* têm sido frequentemente usadas como material biológico em estudos de diferentes substâncias poluentes. Seguidamente, referem-se vários desses estudos e alguns dos resultados obtidos.

A. carterae foi inibido por hidrocarbonetos de baixo peso molecular como benzeno e tolueno em concentrações que geralmente, por serem baixas, até estimulam o plancton (Dunstan *et al.*, 1975). Estes compostos são fracções aromáticas de óleo ou petróleo e para além de serem solúveis na água do mar também são voláteis. Por sua vez, Karydis (1982) estudou o efeito de petróleo bruto foto-oxidado em *A. carterae*. Níveis baixos (10 mg dm^{-3}) estimularam a fotossíntese, aumentaram o conteúdo em clorofila **a** e não interferiram com o crescimento, enquanto que níveis 10 vezes mais elevados diminuiram o crescimento e a fotossíntese.

Stockner & Costella (1976) verificaram que *A. carterae*, em cultura axénica, tolerou níveis relativamente elevados de efluentes de indústria de papel se pré-adaptado por exposição a baixos níveis.

Os herbicidas isopropil-N-fenil carbamato e o 2,4,5-T mostraram ser inibitórios respectivamente para *A. carterae* (provavelmente por actuar nos centros organizadores dos microtúbulos) e para *P. micans* (Matthys-Rochon, 1980; DeBilly & Soyer, 1979). Neste estudo, DeBilly & Soyer (1979) observaram as seguintes perturbações estruturais em *P. micans*: vacuolização importante no citoplasma e entre as duas membranas do invólucro nuclear, alterações das mitocôndrias e dos dictiossomas e aparecimento de lisossomas. *P. micans* após adaptação ao 2-4-5 T conseguiu recuperar o crescimento e a estrutura normal. Prévot & Soyer (1985) estudaram em *P. micans* o efeito do insecticida organofosforado, paratião, e verificaram alterações estruturais nos cloroplastos, diminuição do crescimento e das clorofilas e aumento do consumo de oxigénio, da formação de lisossomas e do aparecimento de numerosas vesículas lipídicas.

Antia e Klut (1981) estudaram o efeito do anião fluoreto em *A. carterae* tendo verificado que esta espécie se adaptava muito gradualmente (66 dias) a 200 μg cm^{-3} do anião fluoreto, concentração letal se o organismo fosse directamente exposto a estes níveis em águas estuarínicas. Das várias espécies estudadas de diferentes grupos taxonómicos *A. carterae* demonstrou ser a mais sensível. Klut *et al.* (1984) estudaram as características de um mutante de *A. carterae* resistente ao anião fluoreto.

O estudo do efeito do acetato de mercúrio em *P. micans* foi efectuado tanto em cultura contínua como em sistema fechado (Kayser, 1976). Tal como observado por Zingmark & Miller (1975) em *A. carterae*, inibição de ambas as espécies foi obtida em concentrações de mercúrio da ordem de 1 $\mu g\ dm^{-3}$. Kayser (1969) também observou efeitos inibitórios em *P. micans* exposto ao efluente de uma fábrica de dióxido de titânio.

O cobre e o zinco actuaram sinergisticamente em *A. carterae* (Braek *et al.*, 1976). Em *P. micans*, baixas concentrações de cádmio e selénio diminuiram a toxicidade de ambos os metais enquanto que, se um dos elementos estivesse presente isoladamente em concentrações elevadas, a toxicidade aumentava (Prévot & Soyer-Gobillard, 1986). *P. micans* demonstrou possuir a capacidade de concentrar grandemente cádmio em águas com baixas concentrações de carbono orgânico dissolvido, tendo o desenvolvimento da população sido afectado (Rabsch *et al.*, 1984) e relações entre o biovolume, a concentração de cádmio na água e a acumulação do metal pelas células foram observadas por Wolter *et al.* (1984). Quanto mais baixo o biovolume e a concentração de cádmio adicionado, maior a bioacumulação. Portanto, a acumulação do metal foi maior a concentrações mais baixas de cádmio, facto também verificado por Kayser & Sperling (1980). O efeito de doses sub-letais de cádmio no crescimento, na absorção e nas alterações celulares de *P. micans* foi estudado por (Prévot & Soyer, 1978).

Berland *et al.* (1976) estudaram a acção tóxica de quatro metais em *A. carterae*. Nas condições experimentais usadas, verificaram que, o mercúrio era o mais tóxico (inibitório para concentrações $<5\ \mu g\ dm^{-3}$ e letal a 25 $\mu g\ dm^{-3}$), seguindo-se o cádmio e o cobre (início de inibição a 25 $\mu g\ dm^{-3}$ e letal a 250 e $>100\ \mu g\ dm^{-3}$ respectivamente) e que o chumbo era o menos tóxico (início de inibição a 250 $\mu\ dm^{-3}$ e letal a $>2000\ \mu g\ dm^{-3}$).

Hawkins & Griffiths (1982) determinaram em 8×10^{-11} M a concentração do ião cobre(II) livre que inibiu em 50% a taxa de crescimento de *A. carterae* e em 2×10^{-10} M a concentração inibitória da divisão celular. Este valor é semelhante ao valor médio da concentração do ião cobre livre nas águas costeiras (Sunda & Guillard, 1976). Nestas águas, crescimento desta espécie será somente possível se o pH e a concentração da matéria orgânica particulada favorecer grandemente a quelatação deste ião metálico. *A. carterae* recuperou da exposição a concentrações de catião cobre(II) livre fortemente inibitórias.

Brand *et al.* (1986) realizaram um estudo intensivo do efeito do cobre e do cádmio nas taxas de divisão de 38 espécies fitoplanctónicas marinhas. As sensibilidades foram avaliadas atendendo à actividade dos iões livres. A espécie de *Prorocentrum* estudada mais sensível aos iões apresentou redução da taxa de crescimento em concentrações de catião cobre(II) livre de 10^{-7} M e, morte em 3×10^{-6} M. Em *P. micans*, 3×10^{-8} M foi a concentrações de ião cádmio livre a partir da qual este organismo demonstrou toxicidade, sendo 3×10^{-7} M uma concentração letal.

Alterações ultraestruturais foram detectadas em *A. carterae* e em *P. micans* como resultado de exposição (i) ao cádmio - vacuolização, aumento do número de lisossomas e alterações severas das mitocôndrias (Soyer & Prévot, 1981), (ii) à acção combinada de cádmio e selénio - vacuolização, aumento do pirenóide e aumento de lípidos, amido e lisossomas (Prévot & Soyer-Gobillard, 1986), (iii) ao fluoreto - cloroplasto (especialmente no pirenóide), mitocôndria e núcleo (Klut *et al.*, 1981), (iv) ao 2,4,5-T (DeBilly & Soyer, 1979) e (v) ao carbamato (Matthys-Rochon, 1980).

4. REFERÊNCIAS

Agrawal, S.B., Agrawal, M., Lee, E.H., Kramer, G.F. & Pillai, P. 1992. Changes in polyamine and glutathione contents of a green alga, *Chlorogonium elongatum* (Dang) France exposed to mercury. Environ. Exp. Biol. 32: 145-151.

Ahmed, S.I., Kenner, R.A. & Packard, T.T. 1977. A comparative study of the glutamate dehydrogenase activity in several species of marine phytoplankton. Mar. Biol. 39: 93-101.

Ahner, B.A., Kong, S. & Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. Limnol. Oceanogr. 40: 649-657.

Ahner, B.A., Price, N.M. & Morel, F.M.M. 1994. Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8433-8436.

Ahner, B.A., & Morel, F.M.M. 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. Limnol. Oceanogr. 40: 658-665.

Allan, D.L. & Jarrell, W.M. 1989. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. Plant Physiol. 89: 823-832.

Allen, W.E. 1938. "Red water" along the West Coast of the United States in 1938. Science 8: 55-56.

Allen, W.E. 1946. "Red water" in La Jolla Bay. Trans. Am. Microscop. Soc. 65: 262-264.

Anderson, D.M., Lively, J.S. & Vaccaro, R.F. 1984. Copper complexation during spring phytoplankton blooms in coastal waters. J. Mar. Res. 42 : 677-695.

Anderson, D.M. & Morel, F.M.M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. Limnol. Oceanogr. 23: 283-295.

Anderson, M.A. & Morel, F.M.M. 1982. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Limnol. Oceanogr. 27: 789-813.

Antia, N.J. 1967. Comparative studies on aldolase activity in marine planktonic algae, and their evolutionary significance. J. Phycol. 3 : 81-85.

Antia, N.J. 1976. Effects of temperature on the darkness survival of marine microplankton algae. Microbiol. Ecol. 3: 41-54.

Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J. & Maestrini, S.Y. 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. J. mar. biol. Ass. UK 55: 519-539.

Antia, N.J. & Bilinski, E. 1967. A bacterial-toxin type of phospholipase (lecithinase C) in a marine phytoplanktonic chrysomonad. J. Fish. Res. Bd. Can. 24: 201-204.

Antia, N.J., Kalmakoff, J. & Watt, A. 1966. Enolase activity in marine planktonic algae. Can. J. Biochem. 44 : 449-454.

Antia, N.J. & Klut, E. 1981. Fluoride addition effects on euryhaline phytoplankter growth in nutient-enriched seawater at an estuarine level of salinity. Bot. Mar. 24: 147-152.

Appleby, G., Colbeck, J., Holdsworth, E.S. & Wadman, H. 1980. ß-carboxylation enzymes in marine phytoplankton and isolation and purification of pyruvate carboxilase from *Amphidinium carterae*. J. Phycol. 16: 290-295.

Arellano, J.B., Lázaro, J.J., López-Gorgé, J. & Barón, M. 1995. The donor side of photosystem II as the copper-binding site. Fluorescence and polarografic studies. Photosynth. Res. 45: 127-134.

Austin, B. 1988. "Marine Microbiology". Cambridge University Press. Cambridge. 222 p.

Ayres, P.A. 1971. Results of the 1971 monitoring programme for mussel toxicity on the north-east coast of Britain. Intern. Couns. Expl. of the Sea, E. 27.

Azenha, M.A., Vasconcelos, M.T. & Cabral, J.P.S. 1995. Organic ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas syringae*. Environ. Toxicol. Chem. 14: 369-373.

Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C. & Amiard-Triquet, C. 1991. Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. Biol. Cell. 72: 103-112.

Barlow, S.B. & Triemer, R.E. 1988. The mitotic apparatus in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Protoplasma. 145: 16-26.

Barker, H.A. 1935. The culture and physiology of marine dinoflagellates. Archiv. Mikrobiol. 6: 156-181.

Barón, M., Arellano, J.B. & López-Gorgé, J. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. Physiol. Plant. 94: 174-180.

Bartlett, L., Rabe, F.W. & Funk, W.H. 1974. Effects of copper zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. Water Res. 8: 179-185.

Baunemann, R. & Höfner, W. 1991. Einfluß von Cd, Cu, Ni und Zn auf die Synthese metallothioneinähnlicher Substanzen in *Scnedesmus subspicatus*. Z. Planzenernähr. Bodenk. 154: 81-85.

Benes, P., Gjessing, E.T. & Steinnes, E. 1976. Interactions between humus and trace elements in fresh water. Water Res. 10: 711-716.

Berland, B.R., Bonin, D.J., Guérin-Ancey, O.J. Kapkov, V.I. & Arlhac, D.P. 1977. Action de métaux lourds à des doses sublétales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée *Skeletonema costatum*. Mar. Biol. 42: 17-30.

Berland, B.R., Bonin, D.J., Kapkov, V.I., Maestrini, S.Y. & Arlhac, D.P. 1976. Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. C.R. Acad. Sc. Paris. 282(série D): 633-636.

Betzer, N. & Kott, Y. 1969. Effects of halogens on algae. II: *Cladophora* sp. Water Res. 3: 257-264.

Bhaud, Y. & Soyer-Gobillard, M.O. 1986. DNA synthesis and cell cycle of a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* E. Protistologica 22: 23-30.

Bhaud, Y., Soyer-Gobillard, M.O. & Salmon, J.M. 1988. Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. J. Cell Sci. 89: 197-206.

Bidwell, R.G.S. 1957. Photosynthesis and metabolism of marine algae. I. Photosynthesis of two marine flagellates compared with *Chlorella*. Can J. Bot. 35: 945-950.

Bitton, G. & Freihofer, U. 1978. Microbiol. Ecol. 4: 119. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Bloch, K. 1976. On the evolution of a biosynthetic pathway. *In* "Reflections on Biochemistry". Kornberg, A., Honecker, B.L., Cornudella, L. & Oro, L. (eds) Pergamon Press, New York. pp. 143-150.

Bouck, G.B. & Sweeney, B.M. 1966. The fine structure and ontogeny of trichocysts in marine dinoflagellates. Protoplasma 61: 205-223.

Bowen, H.J.M. 1985. The natural environment and the biogeochemical cycles. *In*. "The Handbook of Environmental Chemistry". Vol. I, Part D. Hutzinger, D. (ed.). Springer-Verlag. New York. pp. 1-26.

Boyle, E. & Edmond, J.M. 1975. Copper in surface waters south of New Zealand. Nature. 253: 107-109.

Braam, F. & Klapwijk, A. 1981. Water Res. 15: 1093. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Braarud, T. 1961. Cultivation of marine organisms as a means of understanding environmental influences on populations. *In*. "Oceanography". Sears, M. (ed.). Am. Assoc. Adv. Sci. Washington, D.C. Publ. 67, pp. 271-298.

Braarud, T. & Rossavik, E. 1951. Observations on the marine Dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrenb. in culture. Avhandl. Norske Videnskaps-Akad. Oslo. I. Mat. Naturv. Kl. 1: 3-18.

Braek, G.S., Jensen, A. & Mohus, A. 1976. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. III. Combined effects of copper and zinc ions on cultures of four commom species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 25: 37-50.

Brand, L.E., Sunda, W.G. & Guillard, R.R.L. 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. Limnol. Oceanogr. 28: 1182-1198.

Brand, L.E., Sunda, W.G. & Guillard, R.R.L. 1986. Reduction of marine phytoplankton reproductive rates by copper and cadmium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96: 225-250.

Brinkhuis & Chung, 1986. The effects of copper on the fine structure of the kelp *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. Mar. Environ. Res. 19: 205-223.

Brown, L.N., Robinson, M.G., & Hall, B.D. 1988. Mechanisms for copper tolerance in *Amphora coffeaeformis* - internal and external binding. Mar. Biol. 97: 581-586.

Bruland, K.W. 1980. Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel and copper in the North Pacific. Earth Planet. Sci. Lett. 47: 176-198.

Bruland, K.W., Donat, J.R. & Hutchins, D.A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. Limnol. Oceanogr. 1555-1577.

Bruland, K.W. & Franks, R.P. 1983. Mn, Ni, Cu, Zn, and Cd in the Western North Atlantic. *In*. "Trace Metals in Sea Water." Wong, C.S., Boyle, E., Bruland, K.W., Burton, J.D. & Goldberg, E.D. (eds). Plenum. New York. pp. 395-414.

Buchholtz. 1816, citado por Shkolnik, M.YA. 1984. Trace Elements in Plants. Developments in Crop Science (6) Elsevier. Amsterdam. p. 172.

Buckley, J.A. 1994. The susceptibility of superoxide dismutase in *Lemna minor* to systemic copper concentrated from wastewater. Water Res. 28: 2469-2476.

Bujak, J.P. & Davies, E.H. 1983. Modern and fossil Peridiniineae. Amer. Assoc. Strat. Palynol. Contribution Series 13: 1-203.

Bujak, J.P. & Williams, G.L. 1981. The evolution of dinoflagellates. Can. J. Bot. 59: 2077-2087.

Bursa, A. 1959. The genus *Prorocentrum* Ehrenberg. Morphodynamics, protoplasmic structures and taxonomy. Can. J. Bot. 37: 1-31.

Burzynski, M. & Buczek, J. 1994. The influence of Cd, Pb, Cu and Ni on NO_3^- uptake by cucumber seedlings. II. *In vitro* and *in vivo* effects of Cd, Cu, Pb and Ni on the plasmalemma ATPase and oxidoreductase from cucumber seedlings roots. Acta Physiologiae Plantarum 16: 297-302.

Bütschli, O. 1885. Dinoflagellata. *In* "Protozoa". Klass. u. Ordn. des Thierreichs. 1 Bronn, H.G. (ed.), C.F. Winter'sche Verlagshandlung, Leipzig & Heidelberg.

Button, K.S. & Hostetter, H.P. 1977. Copper sorption and release by *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). J. Phycol. 13: 198-202.

Byrne, R. H., Kump, L.R. & Cantrell, K.J. 1988. The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. Mar. Chem. 25: 163-181.

Byrne, R.H. & Miller, W.L. 1985. Copper (II) carbonate complexation in seawater. Geochim. Cosmochim. Acta. 49: 1837-1844.

Cabral, J.P.S. 1989. Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability. Microbios 60: 141-150.

Cao Vien, M. 1967. Sur l'existence de phénomènes sexuels chez un Péridinien libre, l'*Amphidinium carteri*. C.R. Acad. Sc. Paris Ser. D. 264: 1006-1008.

Cao Vien, M. 1968. Sur la germination du zygote et sur un mode particulier de multiplication végétative chez le Péridinien libre *Amphidinium carteri*. C.R. Acad. Sc. Paris Ser. D. 267: 701-703.

Caperon, J. & Smith, D.F. 1978. Photosynthetic rates of marine algae as a function of inorganic carbon concentration. Limnol. Oceanogr. 23: 704-708.

Carlucci, A.F. & Bowes, P.M. 1970. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed cultures. J. Phycol. 6: 393-400.

Carter, N. 1937. New or interesting algae from brackish water. Arch. Protistenk. 90: 1-68.

Cedeno-Maldonado, A. & Swader, J.A. 1974. Studies on the mechanism of copper toxicity in *Chlorella*. Weed Sci. 22: 443-449.

Chan, A.T. 1978. Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. I - Growth under continuous light. J. Phycol. 14: 396-402.

Chan, A.T. 1980. Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. II. Relationship between photosynthesis, growth and carbon/chlorophyll a ratio. J. Phycol. 16: 428-432.

Chau, Y.K., Chuecas, L. & Riley, J.P. 1967. The component combined amino acids of some marine phytoplankton species. J. mar. biol. Assoc. U.K. 47: 543-554.

Cheng, J.Y. & Antia, N.J. 1970. Enhancement by glycerol of phototrophic growth of marine planktonic algae and its significance to the ecology of glycerol pollution J. Fish. Res. Bd Can. 27: 335-346.

Chen, Y.-H., Chow, X.L., Gho, C.K., Chiao, Y.J. & Li, J.-Y. 1983. The investigation of the basic protein of chromatin of *Amphidinium carterae*. Zool. Res. 4. Citado por Loeblich III (1984).

Claparède & Lachmann, J. 1859. Études sur les infusoires et les rhizopodes. Institute national génevois, Mémoires, 6 (Mémoire 1): 261-482, pl.14-24.

Coale, K.H. & Bruland, K.W. 1988. Copper complexation in the Northest Pacific. Limnol. Oceanogr. 33: 1084-1101.

Coale, K.H. & Bruland, K.W. 1990. Spacial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. Deep-Sea Res. 34: 317-336.

Collier, A., Wilson, W.B. & Borkowsi, M. 1969. Responses of *Gymnodinium breve* Davis to natural waters of diverse origin. J. Phycol. 5: 168-172.

Cox, R.M. & Hutchinson, T.C. 1980. The response of root acid phosphatase activity to heavy metal stress in tolerant and non-tolerant clones of two grass species. New Phytol. 86: 359-364.

Daniel, G.F. & Chamberlain, A.H. 1981. Copper immobilization in fouling diatoms. Bot. Mar. 24: 229-243.

Davies, A.G. 1976. An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. J. mar. biol. Assoc. UK. 56: 39-57.

De Filippis, L.F. 1989. Toxicity and resistance of algae to heavy metals. *In* "Plants and Pollutants in Developed and Developing Countries". Öztürk, M.A. (ed.). Ege University Press. Izmir. pp. 19-35.

De Filippis, L.F. & Pallaghy, C.K. 1994. Heavy metals: sources and biological effects. *In.* "Algae and Water Pollution". Rai, L.C., Gaur, J.P. & Soeder, C.J. (eds). Arch. Hydrobiol. 42: 31-77.

Deane, E.M. & O'Brien, R.W. 1981. Uptake of sulphate, taurine, cysteine and methionine by symbiotic and free-living dinoflagellates. Arch. Microbiol. 128: 311-319.

DeBilly, F. & Soyer, M.O. 1979. Effects toxiques et adaptations cellulaires après l'action d'un défoliant, le 2-4-5-T sur le dinoflagellé marin *Prorocentrum micans*: observation en microscopie photonique et électronique. J. Protozool. 26: 53A.

Dempster, R.P. 1955. The use of copper sulphate as a cure for fish diseases caused by parasitic dinoflagellates of the genus *Oodinium*. Zool. (NY) 40: 133-200.

Dodge, J.D. 1963a. Chromosome numbers in some Dinoflagellates. Bot. Mar. 5: 121-127.

Dodge, J.D. 1963b. Chromosome structure in the Dinophyceae. I. The spiral chromonema. Arch. Mikrobiol. 45: 46-57.

Dodge, J.D. 1972. The ultrastructure of the dinoflagellate pusule: a unique osmo-regulatory organelle. Protoplasma. 75: 285-302.

Dodge, J.D. 1975. The Prorocentrales (Dinophyceae). II. Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*. Bot. J. Linn. Soc. 71: 103-125.

Dodge, J.D., 1982. "Marine Dinoflagellates of the British Isles". Her Majesty's Stationery Office. London. 303 p.

Dodge, J.D. 1984. Dinoflagellate Taxonomy. *In* "Dinoflagellates". Spector, D.L. (ed.) Academic Press. Orlando. pp. 17-42.

Dodge, J.D., 1985. "Atlas of Dinoflagellates". Farrand Press. London. 119 p.

Dodge, J.D. & Bibby, B.T. 1973. The Prorocentrales (Dinophyceae). I. A comparative account of fine structure in the genera *Prorocentrum* and *Exuviaella*. Bot. J. Linn. Soc. 67: 175-187.

Dodge, J.D. & Crawford, R.M. 1968. Fine structure of the dinoflagellate *Amphidinium carteri* Hulbert. Protistologica. 4: 231-242.

Doig, M.T. & Martin, D.F. 1974. The effect of naturally occurring organic substances on the growth of a red tide organism. Water Res. 8: 601-606.

Domek M.J., LeChevallier, M.W., Cameron, S.C. & McFeters, G.A. 1984. Appl. Environ. Microbiol. 48: 289. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Dortch, Q., Clayton, J.R. Jr., Thoresen, S.S. & Ahmed, S.I. 1984. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. Mar. Biol. 81: 237-205.

Droop, M.R. 1957. Auxotrophy and organic compounds in the nutrition of marine phytoplankton. J. gen. Microbiol. 16: 286-293.

Droop, M.R. 1974. Heterotrophy of carbon. *In* "Algal Physiology and Biochemistry". Stewart, W.D.P. (ed.) Univ. Calif. Press. Berkeley. pp. 530-599.

Droppa, M. & Horvath, G. 1990. The role of copper in photosynthesis. Crit. Rev. Plant Sci. 9: 111-123.

Dunstan, W.M., Atkinson, L.P. & Natoli, J. 1975. Stimulation and inhibition of phytoplankton growth by low molecular weight hydrocarbons. Mar. Biol. 31: 305-310.

Eaton, G.L. 1980. Nomenclature and homology in peridinialean plate paterns. Paleoontology 23: 667-688.

Effler, S.W., Litten, S., Field, S.D., Tong-Ngork, T., Hale, F., Meyer, M. & Quirk, M. 1980. Water Res. 14: 1489. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Ehrenberg, C.G. 1834. Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. Dritter Beitrag zur Erkenntnis grosser Organisationen in der Richtung des kleinsten Raumes. Königlich Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Abhandlungen, Physikalisch-Mathematische Klasse, 1833, pp. 145-336.

Elbrächter, M. 1976. Population dynamic studies on phytoplankton cultures. Mar. Biol. 35: 201-209.

Elbrächter, M. 1977. On population dynamics in multi-species cultures of diatoms and dinoflagellates. Helgoland wiss. Meeresunters. 30: 192-200.

Elder,J.F. & Horne, A.J. 1978. Environ. Management 2: 17. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Eppley, R.W., Rogers, J.N., McCarthy, J.J. & Sournia, A. 1971. Light/dark peridiocity in nitrogen assimilation of the marine phytoplankters *Skeletonema costatum* and *Coccolithus huxleyi* in N-limited chemost cultures. J. Phycol. 7: 150-154.

Erickson, S.J. 1972. Toxicity of copper to a marine diatom in unenriched inshore seawater. J. Phycol. 8: 318-323.

Evitt, W.R. 1985. Sporopollenin dinoflagellate cysts: their morphology and interpretation. Amer. Assoc. Stratig. Palyn. Monograph Series 1. 333p.

Falkowski, P.G. 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: (nitrate, chloride) activated adenosine triphosphatase from *Skeletonema costatum*. J. Phycol. 11: 323-326.

Falkowski, P.G. & Rivkin, R.B. 1976. The role of glutamine synthetase in the incorporation of ammonium in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 12: 448-450.

Fensome, R.A., Taylor, F.J.R., Norris, G., Sarjeant, W.A.S., Wharton, D.I. & Williams, G.L. 1993. "A Classification of Living and Fossil Dinoflagellates". Micropaleontology Special Publication Number 7. Micropaleontology Press, Hanover, Pennsylvania. 351 p.

Fernandes, J.C. & Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. Bot. Rev. 57: 246-273.

Fessard, V., Diogène, G., Dubreuil, A., Quod, J.P., Durand-Clément, M., Legay, C. & Puiseux-Dao, S. 1994. Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. Nat. Tox. 2: 322-328.

Filfilan, S.A. & Sigee, D.C. 1977. Continuous DNA replication in the nucleus of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* (Ehrenberg). J. Cell Sci. 27: 81-90.

Filipic, B. 1985. Some observations on the vertical migration of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrenberg in the Lim Fjord (Northern Adriatic). Acta Bot. Croat. 44: 40.

Fisher, N.S. & Jones, G.J. 1981. Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulphydryl-binding. J. Phycol. 17: 108-111.

Fisher, N.S., Jones, G.J. & Nelson, D.M. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 51: 37-56.

Fleming, C.A. & Trevors, J.T. 1989. Copper toxicity in the environment: a review. Water Air Soil Pollut. 44: 143-158.

Florence, T.M. & Stauber, J.L. 1986. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. Aquatic Toxicol. 8: 11-26.

Fogg, C.E. & Westlake, D.F. 1955. The importance of extracellular products of algae in freshwater. Proc. Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol. 12: 219-232.

Förstner, U. & Wittmann, G.T.W. 1979. Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag. Heidelberg. 386 p. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Foster, K.W. & Smyth, R.D. 1980. Light antennas in phototatic algae. Microbiol. Rev. 44: 572-630.

Foster, P.L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. Nature 269: 322-323.

Foster, P.L. 1982. Metal resistances of Chlorophyta from rivers polluted by heavy metals. Freshwater Biol. 12: 41-62.

French, M.S. & Evans, L.V. 1988. The effect of copper and zinc on growth of fouling diatoms *Amphora* and *Amphiprora*. Biofouling 1: 3-18.

Frey, B.E. & Small, L.F. 1979. Recycling of metabolized iron by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. J. Phycol. 15: 405-409.

Fukuyo, Y. 1981. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47: 967-978.

Gajadjar, A.A., Marquardt, W.C., Hall, R., Gunderson, J., Ariztia-Carmona, E.V. & Sogin, M.L. 1991. Evolutionary relationships among apicomplexa, dinoflagellates, and ciliates: ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Crypthecodinium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexa, dinoflagellates, and ciliates.Molec. Biochem. Parasit. 45: 145-154.

Galiazzo, F., Schiesser, A. & Rotilio, G. 1988. Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. Biochim. Biophys. Acta 965: 46-51.

Galleron, C. 1976. Synchronization of the marine dinoflagellate *Amphydinium carteri* in dense cultures. J. Phycol. 12: 69-73.

Galleron, C. 1979. Analyse des propriétés physico-chimiques et de la réplication du DNA chez l'*Amphidinium carterae* (Dinoflagellés) en culture synchronisée. These. Université Paris VII.150p.

Galleron, C. & Durrand, A.M. 1978. Characterization of a dinoflagellate (*Amphidinium carterae*) DNA. Biochimie 60: 1235-1242.

Galleron, C. & Durrand, A.M. 1979. Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate. Protoplasma 100: 155-165.

Gavis, J., Guillard, R.R.L. & Woodward, B.L. 1981. Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. J. Mar. Res. 39: 315-333.

Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150: 197-202.

George, S.G. 1991. Cell biochemistry and transmembrane transport of some metals. *In.* "Metals and their Compounds in the Environment". Merian, E. (ed.). VCH, Weinheim. pp. 511-521.

Geraud, M.-L., Soyer-Gobillard, M.-O., Herzog, M. & Lenaers, G. 1989. Nuclear cycle, structure and ribosomic gene localization by *in situ* hybridization in two phylogenetically distant dinoflagellate species. Biol. Cell. 67: 9a.

Gibson, C.E. 1972. J. Appl. Ecol. 9: 513. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Gittleson, S.M., Hotchkiss, S.K. & Valencia, F.G. 1974. Locomotion in the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Hulburt). Trans. am. microscop. Soc. 93: 101-105.

Gonzalez-Davila, M., Santana-Casiano, J.M., Perez-Peña, J. & Millero, F.J. 1995. Binding of copper(II) to the surface and exsudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. Environ. Sci. Technol. 29: 289-301.

Goodman, D.K. 1987. Dinoflagellate cysts in ancient and modern sediments. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp 649-722.

Gnassia-Barelli, M. & Härdstedt-Roméo, M. 1982. Short-term series study of copper and cadmium by *Cricosphaera elongata* (Droop) Braarud. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 61: 287-298.

Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. Science 230: 674-676.

Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcystein dipeptide transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6838-6842.

Grindley J.R. & Taylor, F.J.R. 1964. Red water and marine fauna mortality near Cape Town. Trans. Roy. Soc. S. Afr. 37: 113-130.

Gross, F. 1937. Notes on the culture of some marine plankton organisms. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 21: 753-768.

Haapala, O.K. & Soyer, M.O. 1973. Structure of dinoflagellate chromosomes. Nature (Lond.) New Biology 244: 195-197.

Haapala, O.K. & Soyer, M.O. 1974. Size of circular chromatids and amounts of haploid DNA in the dinoflagellates *Gyrodinium cohnii* and *Prorocentrum micans*. Hereditas. 76: 83-90.

Häder, D.-P. 1995. Influence of ultraviolet radiarion on phytoplankton ecosystems. *In*. Algae, Environment and Human Affairs. W. Wiessner, E. Schnepf & R.C. Starr (eds.). Biopress Limited. Bristol. pp. 41-55.

Hall, A. 1980. Heavy metal co-tolerance in a copper-tolerant population of the marine fouling alga, *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngbye. New Phytol. 85: 73-78.

Hall, A. 1981. Copper accumulation in copper-tolerant and non-tolerant populations of the marine fouling alga, *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngbye. Bot. Mar. 29: 223-228.

Hall, A., Fielding, A.H. & Butler, M. 1979. Mechanisms of copper tolerance in the marine fouling alga, *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngbye. Mar. Biol. 54: 195-199.

Halldal, P. 1958. Action spectra of phototaxis and related problems in Volvocales, *Ulva* gametes and Dinophyceae. Physiol. Plant. 14: 133-139.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford. 346 p.

Hamkalo, B.A. & Rattner, J.B. 1977. The structure of mesokaryote chromosome. Chromosoma (Berl.) 60: 39: 39-47.

Harris, P.O. & Ramelow, G.J. 1990. Environ. Sci. Technol. 24: 220-228. Citado por Gonzalez-Davila *et al.* (1995).

Harrison, G.I. & Morel, F.M.M. 1986. Response of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to iron stress. Limnol. Oceanogr. 31: 989-997.

Härdstedt-Roméo, M. & Gnassia-Barelli, M. 1980. Effect of complexation by natural phytoplankton exudates on the accumulation of cadmium and copper by the Haptophyceae *Cricosphaera elongata*. Mar. Biol. 59: 79-84.

Hart, B.A., Bertram, P.E. & Caife, B.D. 1979. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. Environ. Res. 18: 327-335.

Hassall, K. 1967. An assimetric respiratory response occuring when fluoride and copper ions are applied jointly to *Chlorella vulgaris*. Physiol. Plant. 22: 304-311.

Hastings, J.L. & Thomas, W.H. 1977. Qualitative requirements and utilization of nutrients: algae. *In* "Handbook Series in Nutrition and Food. Section D: Nutritional Requirements". Rechcigl, M.JR. (ed.) CRC Press. Cleveland. Vol. 1, pp 87-163.

Hata, M., Abe, S. & Hata, M. 1982. Occurrence of peridinin-chlorophyll a-protein complex in red tide dinoflagellate *Prorocentrum micans*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 459-461.

Haxo, F.T., Kycia, J.H. Somers, G.F., Bennett, A. & Siegelman, H.W. 1976. Peridinin-chlorophyll a proteins of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Plymouth 450). Plant Physiol. 57: 297-303.

Hawkins, P.R. & Griffiths, D.J. 1982. Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. Bot. Mar. 25: 31-33.

Heimann, K., Roberts, K.R. & Wetherbee, R. 1995. Flagellar apparatus transformation and development in *Prorocentrum micans* and *P. minimum* (Dinophyceae). Phycologia. 34: 323-335.

Hersey, R.L. & Swift, E. 1976. Nitrate reductase activity of *Amphidinium carteri* and *Cachonina niei* (Dinophyceae) in batch culture: diel periodicity and effects of light intensity and ammonia. J. Phycol. 12: 36-44.

Herzog, M. & Soyer, M.-O. 1981. Distintive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans* E. Eur. J. Cell Biol. 23: 295-302.

Herzog, M. & Soyer, M.-O. 1982. A high level of thymine replacement by 5-hydroxymethyluracil in nuclear DNA of the primitive dinoflagellate *Prorocentrum micans* E. Eur. J. Cell Biol. 27: 151-155.

Hodson, P.V., Borgman, U. & Shear, H. 1979. Toxicity of copper to aquatic biota. *In* "Copper in the Environment. Part II: Health Effects". Niagru, J.O. (ed.) John Wiley and Sons. Toronto. pp. 307-372.

Holmes, R.W., Williams, P.M. & Eppley, R.W. 1967. Red water in la Jolla Bay, 1964-1966. Limnol. Oceanogr. 12: 503-512.

Holm-Hansen, O. 1969. Algae: amounts of DNA and organic carbon in single cells. Science. 163: 87-88.

Honsell, G. & Talarico, L. 1985. The importance of flagellar arrangement and insertion in the interpretation of the theca of *Prorocentrum* (Dinophyceae). Bot. Mar. 28: 15-21.

Horne, A.J. & Goldman, C.R. 1974. Supression of nitrogen fixation by blue-green algae in an eutrophic lake with trace additions of copper. Science 183: 409-411.

Horstman, D.A. 1981. Reported red-water outbreaks and their effects on fauna of the west and south coasts of South Africa, 1959-1980. Fish. Bull. S. Afr. 15: 71-88.

Huang, C.P., Huang, C.P. & Morehart, A.L. 1990. Water Res. 24: 433-439. Citado por Gonzalez-Davila *et al.* (1995).

Hudson, R.J.M. & Morel, F.M.M. 1990. Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions. Limnol. Oceanogr. 35: 1002-1020.

Hughes, M.N. & Poole, R.K. 1989. "Metals and Micro-organisms". Chapman and Hall. London. 412 p.

Hulburt, E.M. 1957. The taxonomy of unarmoured dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. Biol. Bull. 112: 196-219.

Humphrey, G.F. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light:dark regimes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 40: 63-70.

Humphrey, G.F. 1983. The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments and photosynthetic rate of unicellular marine algae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 66: 49-67.

Humphreys, M.O. & Nicholls, M.K. 1984. Relationship between tolerance to heavy metals in *Agrostis capillaris* L. (*A. tenuis* Sibth). New Phytol. 98: 177-190.

Huntsman, S.A. & Sunda, W.G. 1980. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth, with emphasis on Fe, Mn and Cu. *In*. "The Physiological Ecology of Phytoplankton." Morris, I. (ed.). Blackwell Scientific Press. Oxford. pp. 285-328.

Hutchinson, T.C. 1973. Comparative studies of the toxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions. Water Pollut. Res. Canada 8: 68-75.

Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A. & Haskins, C.P. 1950. Some approaches to the study of the role of the metals in the metabolism of microorganisms. Proc. Am. Phil. Soc. 94: 152-170.

Ikawa, M. & Sasner, J.J., Jr. 1975. Chemical and physiological studies on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. "Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms". LoCicero, V.R. (ed.) Mass. Sci. Tech. Found. Wakefield, MA. pp. 323-332.

Ikawa, M. & Taylor, R. 1972. Choline and related substances in algae. *In* "Marine Pharmacognosy". Martin, D. & Padilla, G. (eds) Academic Press. N.Y.

Ishida, Y. 1968. Physiological studies on evolution of dimethyl sulfide from unicellular marine algae. Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ. 94: 47-82.

Iwasaki, H. 1979. Physiological ecology of red tide flagellates. *In* "Biochemistry and Physiology of Protozoa". 2nd ed. Levandowsky, M. & Hutner, S.H. (eds). Academic Press. New York. Vol. 1 pp. 356-393.

Jardim, W.F. & Pearson, H.W. 1984. A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. Water Res. 18: 985-989.

Jardim, W.F. & Pearson, H.W. 1985. Microbiol. Ecol. 11: 139. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Jeffrey, S.W., Sielicki, M. & Haxo, F.T. 1975. Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. J. Phycol. 11: 374-384.

Jensen, T.E., Baxter, M., Rachlin, J.W. & Jani, V. 1982. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular compartments, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. Environ. Pollut. 27: 119-127.

Johansen, J.F., Svec, W.A., Liaaen-Jensen, S. & Haxo, F.T. 1974. Carotenoids of the Dinophyceae. Phytochem. 13: 2261-2271.

Jones, G.J. & Morel, F.M.M. 1988. Plasmalemma redox activity in the diatom *Thalassiosira*. A possible role for nitrate reductase. Plant Physiol. 87: 143-147.

Kain, J.M. & Fogg, G.E. 1960. Studies on the growth of marine phytoplankton. III. *Prorocentrum micans* Ehrenberg. J. mar. biol. Ass. U.K. 39: 33-50.

Kamykowski, D. 1981. Laboratory experiments on the diurnal vertical migration of marine dinoflagellates through temperature gradients. Mar. Biol. 62: 57-64.

Kamykowski, D. 1986. Citado por Levandowsky & Kaneta (1987)

Kamykowski, D. 1995. Trajectories of autotrophic marine dinoflagellates. J. Phycol. 31: 200-208.

Karentz, D. 1983. Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. J. Protozool. 30: 581-588.

Karydis, M. 1982. Toxicity of a photooxidised crude oil on two marine microalgae. Bot Mar. 25: 25-29.

Kat, M. 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. *In.* "Toxic Dinoflagellate Blooms". Taylor, D.L. & Seliger, H.H. (eds). Elsevier. North Holland. New York. pp. 215-220.

Kayser, H. 1969. Zuchtungs experimente an zwei marine Flagellaten (Dinophyta) und ihre Anwendung im toxicologischen Abwassertest. Helgol. wiss. Meeresunters. 19: 21-44.

Kayser, H. 1976. Waste-water assay with continuous algal cultures: the effect of mercuric acetate on the growth of some marine dinoflagellates. Mar. Biol. 36: 61-72.

Kayser, H. 1979. Growth interactions between marine dinoflagellates in multispecies culture experiments. Mar. Biol. 52: 357-369.

Kayser, H. & Sperling, K.-R. 1980. Cadmium effects and accumulation in cultures of *Prorocentrum micans* (Dinophyta). Helgoländer Meeresunters. 33: 89-102.

Kearns, L.P. & Sigee, D.C. 1979. High levels of transition metals in dinoflagellate chromosomes. Experientia 35: 1332-1334.

Kearns, L.P. & Sigee, D.C. 1980. The occurrence of period IV elements in dinoflagellate chromatin: an X-ray microanalytical study. J. Cell Sci. 46: 113-127.

Khobot'yev, V.G., Kapkov, V.I., Rukhadze, Y.G., Turrenina, N.V. & Shidlovskaya, N.A. 1975. The toxic effect of copper complexes on algae. Hydrobiol. J. 11: 33-38.

Klut, M.E., Antia, N.J. & Bisalputra, T. 1984. Some properties of a fluoride-resistant mutant of the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Phycologia. 23: 301-310.

Klut, M.E., Bisalputra, T. & Antia, N.J. 1981. Abnormal ultrastructural features of a marine dinoflagellate adapted to grow successfully in the presence of inhibitory fluoride concentration. J. Protozool. 28: 406-414.

Klut, M.E., Bisalputra, T. & Antia, N.J. 1985a. Some cytochemical studies on the cell surface of *Amphidinium carterae* (Dinophyceae). Protoplasma. 129: 93-99.

Klut, M.E., Bisalputra, T. & Antia, N.J. 1985b. Some ultrastructural and physiological observations on the pusule of two marine dinoflagellates. J. Phycol. 21(Suppl.): 17.

Klut, M.E., Bisalputra, T. & Antia, N.J. 1987. Some observations on the structure and function of the dinoflagellate pusule. Can. J. Bot. 65: 736-744.

Klut, M.E., Bisalputra, T. & Antia, N.J. 1989. Some details on the cell surface of two marine dinoflagellates. Bot. Mar. 32: 89-95.

Koka, P. & Song, P.S. 1977. The chromophore topology and binding environment of peridinin-chlorophyll a protein complexes from marine dinoflagellate algae. Biochim. Biophys. Acta 495: 220-231.

Kokke, W.C.M.C., Fenical, W. & Djerassi, C. 1980. Sterol with unusual nuclear unsaturation from three cultured marine dinoflagellates. Phytochem. 20: 127-134.

Kowallik, K.V. 1969. The crystal lattice of the pyrenoid matrix of *Prorocentrum micans*. J. Cell Sci. 5: 251-269.

Kowallik, K.V. 1971. The use of proteases for improved presentation of DNA in chromosomes and chloroplasts of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). Arch. Mikrobiol. 80: 154-65.

Kowallik, K.V. & Haberkorn, G. 1971. The DNA-structure of the chloroplast of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). Arch. Mikrobiol. 80: 252-261.

Kremer, B.P. 1981. Dark reactions of photosynthesis. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 44-54.

Lage, O.M.O.S. 1986. "A Biologia dos Dinoflagelados. Aspectos da sua Morfologia e Fisiologia". Provas de Aptidão e Capacidade Científica. Universidade do Porto. Porto. 58p.

Leckie, J.O. & Davies, J.A. 1979. *In*. "Copper in the Environment. Part I: Ecological Cycling". Nriagu, J.O. (ed.). John Wiley and Sons Inc. New York. pp. 89-121. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Lehninger, A.L. 1970. "Biochemistry". Worth. New York. 833 p.

Lembeye, G. & Campodonico, I. 1984. First recorded bloom of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. in South-Central Chile. Bot. Mar. 27: 491-493.

Lenaers, G., Maroteaux, L. Michot, B. & Herzog, M. 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. J. Molec. Biol. 29: 40-51.

Lenaers, G., Scholin, C., Bhaud, Y., Saint-Hilaire, D. & Herzog, M. 1991. A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrhophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8. J. Molec. Evol.32: 53-63.

Lesuisse, E. & Labbe, P. 1992. Iron reduction and trans-plasmamembrane electron transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiol. 100: 769-777.

Levandowsky, M. & Kaneta, P.J. 1987. Behaviour in dinoflagellates. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed.) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 360-397.

Lewin, J. & Busby, W.F. 1967. The sulfate requirements of some unicellular marine algae. Phycologia 6: 211-217.

Li, J.-Y. 1983. Observations on the nucleoli of the dinoflagellate *Prorocentrum.* Proc. Int. Seaweed Symp. 11: 127.

Lichfield, C.D. & Hood, D.W. 1964. Evidence for carbonic anhydrase in marine and freshwater algae. Verh.-Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 15: 817-828.

Lidon, F.C. & Henriques, F.S. 1991a. Effects of copper on the ascorbate, diamine and o-diphenol oxidases activities of rice leaves. Phyton 52: 97-104.

Lidon, F.C. & Henriques, F.S. 1991b. Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. J. Plant Physiol. 138: 115-118.

Lidon, F.C. & Henriques, F.S. 1993a. Changes in the contents of the photosynthetic electron carriers, RNAse activity and membrane permeability, triggered by excess copper in rice. Photosynthetica 28: 99-108.

Lidon, F.C. & Henriques, F.S. 1993b. Changes in the thylakoid membrane polypeptide patterns triggered by excess Cu in rice. Photosynthetica 28: 109-117.

Lidon, F.C. & Henriques, F.S. 1993c. Copper mediated inhibition on protein synthesis in rice shoots. J. Plant Nutrit. 16: 1619-1630.

Linnik, P.N. & Nabivanets, B.I. 1983. Hydrobiological J. 19: 71. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Livolant, R. & Bouligand, Y. 1980. Double helical arrangement of spread dinoflagellate chromosomes. Chromosoma (Berl.) 80: 97-118.

Loeblich, A.R. III 1966. Aspects of the physiology and biochemistry of the Pyrrhophyta. Phykos. 5: 216-255.

Loeblich, A.R. III. 1976. Dinoflagelate evolution: speculation and evidence. J. Protozool. 23: 13-28.

Loeblich, A.R. III. 1984. Dinoflagellate evolution. *In* "Dinoflagellates". Spector, D.L. (ed). Academic Press. Orlando. p. 481-522.

Loeffler, S., Hochberger, A. Grill, E. Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. FEBS Lett. 258: 42-46.

Mackenthun, K.M. & Cooley, H.L. 1952. The biological effect of copper sulfate treatment upon lake ecology. Trans. Wisconsin Acad. Sci. Arts Lett. 41: 177-187.

Mandelli, E.F. 1969. The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. Contrib. Mar. Sci., Univ. Texas. 24: 47-57.

Martin, J.H. & Gordon, R.M. 1988. Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity. Deep-Sea Res. 35: 177-196.

Martin, J.H., Gordon, R.M., Fritzwater, S.E. & Broenkow, W.W. 1989. VERTEX: phytoplakton/iron studies in the Gulf of Alaska. Deep-Sea Res. 36: 649-680.

Matthys-Rochon, E. 1979. Evolution d'un dinoflagellé libre au cours d'un cycle cellulaire. Biol. Cell 35: 313-320.

Matthys-Rochon, E. 1980. Action de l'isopropyl-N-phényl carbamate sur un dinoflagellé libre: l'*Amphidinium caeterae* Hulburt. Effects sur la croissance et la dinomitose. Cryptog. Algol. 1: 3-17

McBrien, D.C.H. & Hassall, K.A. 1965. Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. Physiol. Pl. 18: 1059-1065.

McKnight, D.M. 1981. Chemical and biological processes controling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: a field study of the $CuSO_4$ treatment of Mill Pond reservoir, Burlington, Massachusettes. Limnol. Oceanogr. 26: 518-531.

McKnight, D.M. & Morel, F.M.M. 1979. Release of weak and strong copper complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr. 24: 823-837.

Meador, J. P., Frieda, B.T. & Thomas A.S. 1993. Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in a standardized aquatic microcosm. Ecol. Appl. 3: 139-155.

Meharg, A.A. 1993. The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiol. Pl. 88: 191-198.

Meharg, A.A. 1994. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptative plant responses to elevated metal concentrations in the environment. Plant Cell Environ. 17: 989-993.

Michaelis, G.A. 1830. Ueber das Leuchten der Ostsee nach eigenen Beobachtungen pp. 52 pls 2. Perthes & Besser. Hamburg.

Michel-Salamin, L., Gautier, A., Geraud, M.-L., Soyer-Gobillard,M.-O. & Maeder, M. 1989. Argyrophilic proteins in three dinoflagellates. Biol. Cell. 67: 14a.

Mierle, G.M., & Stokes, P.M. 1976. Heavy metal tolerance and metal accumulation by planktonic algae. *In* "Trace Substances in Environmental Health X". Hemphill, D.D. (ed.). pp. 113-122.

Mills, G.L. & Quinn, J.G. 1984. Dissolved copper and copper-organic complexes in the Narragansett Bay estuary. Mar. Chem. 15: 151-172.

Mittleman, M.W. & Geesey, G.G. 1985. Appl. Environ. Microbiol. 49: 846. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Moffett, J.W., Brand, L.E. & Zika, R.G. 1990. Distribution of potential sources and sinks of copper chelators in the Sragasso Sea. Deep-Sea Res. 37: 27-36.

Moffett, J.W. & Zika, R.G. 1987. Solvent extraction of copper acetylacetonate in studies of copper(II) speciation in seawater. Mar. Chem. 21: 301-313.

Moita, M.T. 1993. Spatial variability of phytoplankton communities in the upwelling region of Portugal. ICES C.M. 64: 1-20.

Moore, G.E. & Kellerman, K.F. 1904. A method of destroying or preventing the growth of algae and certain pathogenic bacteria in water supplies. Bull. Bur. Plant Ind. U.S. Dept. Agric. 64.

Moore, J.W. & Ramamoorthy, S. 1984. Heavy Metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment. Springer-Verlag. New York.

Morrill, L.C. & Loeblich, A.R. III. 1979. An investigation of heterotrophic and photoheterotrophic capabilities in marine Pyrrhophyta. Phycologia. 18: 394-404.

Morris, 1980. Paths of carbon assimilation in marine phytoplankton. *In*. "Primary Productivity in the Sea". Falkowski, P.G. (ed.). Plenum Press. New York. pp. 139-161.

Morse, D., Salois, P., Markovic, P. & Hastings, J.W. 1995. A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. Science 268: 1622-1624.

Murphy, L.S., Guillard, R.R.L. & Brown, J.F. 1984. The effects of iron and manganese on copper sensitivity in diatoms: differences in the responses of closely related neritic and oceanic species. Biol. Oceanogr. 3: 187-201.

Murphy, L.S., Guillard, R.R.L. & Gavis, J. 1982. *In*. "Ecological Stress and the New York Bight: Science and Management. (Proceedings of a Symposium on the Ecological Effects of Environmental Stress. 1979). Estuarine Res. Fed. Columbia. S.C. pp. 401-412. Citado por Fleming & Trevors (1989).

Nakajima, I., Oshima, Y. & Yasumoto, T. 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47: 1029-1033.

Oakley, B.R. & Dodge, J.D. 1974. Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of a dinoflagellate. J. Cell Biol. 63: 322-325.

Oakley, B.R. & Dodge, J.D. 1976. Mitosis and cytokinesis in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytobios 17: 35-46.

Oda, M. 1935. Red tide of *Gymnodinium mikimotoy* Miyake et Kominami n. sp. (MS) and the effect of copper sulphate on it. Dobutsugaku Zasshi, Zool. Soc. Japan 47: 35-48.

Oliveira, L. & Antia, N.J. 1986a. Nickel ion requirement for autotrophic growth of several marine microalgae with urea serving as nitrogen source. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 2427-2433.

Oliveira, L. & Antia, N.J. 1986b. Some observations on the urea-degrading enzyme of the diatom *Cyclotella cryptica* and the role of nickel in its production. J. Plankton Res. 8: 235-242.

Oliveira, L. & Huynh, H. 1989. Ultrastructure and cytochemistry of the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae* grown on three sources of nitrogen. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 21: 641-651.

Oliveira, L. & Huynh, H. 1990. Phototrophic growth of microalgae with allantoic acid or hypoxanthine serving as nitrogen source; implications for purine-N utilization. Can J. Fish. Aquat. Sci. 47: 351-356.

Olson, R.J. & Chisholm, S.W. 1986. Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. J. Plankton Res. 8: 785-793.

Orellana, M. & Perry, M.J. 1992. An immunoprobe to measure Rubisco concentrations and maximal photosynthetic rates of individual phytoplankton cells. Limnol. Oceanogr. 37: 478-490.

Overnell, J. 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Biol. 29: 99-103.

Overnell, J. 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. Mar. Biol. 38: 335-342.

Palmer, 1996. Rubisco surprises in dinoflagellates. Plant Cell 8: 343-345.

Parsons, T.R., Stephens, K. & Strickland, J.D.H. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Board Can. 18: 1017-1025.

Pearlmutter, N.L. & Lembi, C.A. 1986. The effect of copper on the green alga *Pithophora oedogonia*. Weed Sci. 34: 842-849.

Pfiester, L.A. 1984. Sexual reproduction. *In*. "Dinoflagellates". Spector, D.L. (ed.). Academic Press, Orlando. pp. 181-199.

Phinney, J.T & Burland, K.W. 1994. Uptake of lipophilic organic Cu, Cd and Pb complexes in the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Environ. Sci. Technol. 28: 1781-1790.

Pinto, J.S. & Silva, E.S. 1956. The toxicity of *Cardium edule* L. and its possible relation to the Dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. Notas Est. Inst. Biol. Mar. 12: 1-21.

Plumley, F.G., Kirchman, D.L., Hodson, R.E. & Schmidt, G.W. 1986. Ribulose bisphosphate carboxilase from three chlorophyll c- containing algae. Physical and immunological characterizations. Plant Physiol. 80: 685-691.

Prakash, A. & Rashid, M.A. 1968. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: Dinoflagellates. Limnol. Oceanogr. 13: 598-606.

Prévot, P. & Soyer, M.-O. 1978. Action du cadmium sur un dinoflagellé libre, *Prorocentrum micans* E.: croissance, absorption du cadmium et modifications cellulaires. C.R. Acad. Sci. Paris. 287: 833-836.

Prévot, P. & Soyer, M.-O. 1985. Action of the organophosphorous insecticide parathion on the free-living marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrbg. J. Protozool. 32: 626-633.

Prévot, P. & Soyer-Gobillard, M.-O. 1986. Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, *Prorocentrum micans* Ehrbg. and *Crypthecodinium cohnii* Biecheler. J. Protozool. 33: 42-47.

Prézelin, B.B. 1987. Photosynthetic physiology of dinoflagellates. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed.) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 174-223.

Price, N.M. & Morel, F.M.M. 1991. Colimitation of phytoplankton growth by nickel and nitrogen. Limnol. Oceanogr. 36: 1071-1077.

Price, N.M. & Morel, F.M.M. 1994. Trace metal nutrition and toxicity. *In* "Algae and Water Pollution". Rai, L.C., Gaur, J.P. & Soeder, C.J. (eds). Arch. Hydrobiol. 42: 79-97.

Provasoli, L. & Carlucci, A.F. 1974. Vitamins and growth regulators. *In* "Algal Physiology and Biochemistry". Stewart, W.D.P. (ed.). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 741-787.

Provasoli, L. & McLaughlin, J.J.A. 1963. Limited heterotrophy of some photosynthetic dinoflagellats. *In* "Symposium on Marine Microbiology" Oppenheimer, C.H. (ed.). C.C. Thomas, Springfield. Illinois. pp. 105-113.

Rabsch, U., Wolter, K. & Krischker, P. 1984. Influence of low cadmium and zinc concentrations on batch culture of *Prorocentrum micans* (Dinophyta) containing low levels of dissolved organic carbon. Mar. Ecol. Prog. Ser. 14: 275-285.

Rachlin, J.W. & Grosso, A. 1993. The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. Arch. Envirom. Contam. Toxicol. 24: 16-20.

Rachlin, J.W., Jensen, T.E., Baxter, M. & Jani, V. 1982a. Utilization of morphometric analysis in evaluating the response of (Cyanophyceae) to eight heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 11: 323-333.

Rachlin, J.W., Jensen, T.E. & Warkentine, B. 1982b. The growth response of the green alga (*Chlorella saccharophila*) to selected concentrations of the heavy metals Cd, Cu, Pb and Zn. *In*. "Trace Substances in Environmental Health -XVI 1982. A Symposium". Hemphill, D.D. (ed.) Univ. Missouri. Columbia. pp. 145-154.

Rachlin, J.W., Jensen, T.E. & Warkentine, B. 1983a. The growth response of the marine diatom *Navicula incerta* to selected concentrations of the metals: cadmium, copper, lead and zinc. Bull. Torrey Bot. Club 110: 217-223.

Rachlin, J.W., Warkentine, B. & Jensen, T.E. 1983b. The response of the marine diatom *Nitzschia closterium* to selected concentrations of the divalent cations Cd, Cu, Pb and Zn. *In*. "Trace Substances in Environmental Health -XVII 1983. A Symposium". Hemphill, D.D. (ed.) Univ. Missouri. Columbia. pp. 72-81.

Rae, P.M.M. & Steele, R.E. 1978. Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: an examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. BioSystems 10: 37-53.

Rai, L.C., Gaur, J.P. & Kumar, H.D. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. Bio. Rev. Cambr. Philos. Soc. 56: 99-151.

Rai, L.C., Singh, A.K. & Mallick, N. 1991. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. J. Plant Physiol. 137: 419-424.

Rauser, W. E. 1990. Phytochelatins. Annu. Rev. Biochem. 59: 61-86.

Reed, R.H. & Gadd, G.M. 1990. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. *In* "Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects". Shaw, A.J. (ed.). CRC Press, Boca Raton. pp. 105-118.

Rensch, C. & Boettger, M. 1992. Localization and characterization of proton secretion and redox processes in roots of *Zea mays* L. Mitt. Inst. Allg. Bot. Hambg. 22: 5-18.

Rich, H.W. & Morel, F.M.M. 1990. Availability of well-defined iron colloids to the marine diatom *Thallassiosira weissflogii*. Limnol. Oceanogr. 35: 652-662.

Richardson, K. & Fogg, G.E. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition and survival of marine dinoflagellattes. Phycologia. 21: 17-26.

Roberts, K.R. 1987. Basal body configuration and the evolution of the dinoflagellate flagellar apparatus. J. Phycol. 23(Suppl.): 12.

Roberts, K.R., Heimann, K. & Wetherbee, R. 1995. The flagellar apparatus and canal structure in *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). Phycologia. 34: 313-322.

Roberts, K.R. & Matese, J.C. 1990. Ultrastructure of the flagellar apparatus and allied components in *Prorocentum micans*. (Dinophyceae). J. Phycol. 26(Suppl.): 9.

Robinson, M.G., Brown, L.N., Quenneville, M.L. & Hall, B.D. 1992. Aspects of copper tolerance and toxicity in *Amphora coffeaeformis*. Biofouling 5: 261-276.

Ross, I.S. 1975. Some effects of heavy metals on fungal cells. Trans. Br. Mycol. Soc. 64: 175-193.

Rounsfell, G.A. & Evans, J.E. 1958. Large-scale experimental test of copper sulphate as a control for the Florida red tide. U.S. Dept. Interior, Fish. Wildlife Serv. Spec. Sci. Rep. Fish. 270. 57 p.

Rueter, J.G. 1983. Alkaline phosphatase inhibition by copper: implications to phosphorus nutrition and use as a biochemical marker of toxicity. Limnol. Oceanogr. 28: 743-748.

Rueter, J.G., Jr. & Morel, F.M.M. 1981. The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechanism in *Thalassiosira pseudonana*. Limnol. Oceanogr. 26: 67-73.

Rutter, W.J. 1964. Evolution of aldolase. Federation Proc. 23: 1248-1257.

Ryther, J.H. & Kramer, D.D. 1961. Relative iron requirement of coastal and offshore plankton algae. Ecology 42: 444-446.

Sadler, L.A., McNally, K.L., Nadathur, S.G., Brunk, C.F. & Trench, R.K. 1992. The nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA gene from *Symbiodinium pilosum*, a symbiotic dinoflagellate. Curr. Genetics 21: 409-416.

Sakshaug, E., Andresen, K., Myklestad, S. & Olsen, Y. 1983. Nutrient status of phytoplankton communities in Norwegian waters (marine, brackish and fresh) as revealed by their chemical composition. J. Plankton Res. 5: 175-196.

Sampayo, M.A.M. 1985. Encystment of a portuguese isolate of *Amphidinium carterae* in cultures. *In*. "Toxic Dinofloflagellates". Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (eds). Elsevier. New York. pp. 125-130.

Sampayo, M.A.M. 1989. Red tides off the portuguese coast. *In*. "Red Tides. Biology, Environmental Science, and Toxicology". Okaichi, T. Anderson, D.M. & Nemoto, T. (eds). Elsevier. New York. pp. 89-92.

Samuel, J.C. 1976. The effect of copper on two species of unicellular marine algae. MSc. Thesis. University of Sydney. 125 p.

Samuelsson, G. & Richardson 1982. Citado por Prézelin, B.B. (1987)

Sandmann, G. & Böger, P. 1980. Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. Z. Pflanzenphysiol. 98: 53-59.

Sarjeant, W.A.S. 1974. "Fossil and Living Dinoflagelates". Academic Press. London.

Sato, C., Schnoor, J.L. & McDonald, D. 1986. Environ. Toxicol. Chem. 5: 403. Citado por Fleming & Trevor (1989).

Saward, D., Stirling, A. & Topping, G. 1975. Experimental studies on the effects of copper on a marine food chain. Mar. Biol. 29: 351-361.

Schenk, R.C. 1984. Copper and *Gonyaulax tamarensis*: physiology, toxicity and requirement. Diss. Abstr. Int. P.T.B. - Sci. & Engin. 45: 1-176.

Schnepf, E. & Deichgräber, G. 1984. "Myzocytosis", a kind of endocytosis with implications to compartmentation in endosymbiosis. Naturwissenschaften 71: 218.

Schnepf, E. & Winter, S. 1990. A microtubular basket in the armoured dinoflagellate *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). Arch. Protistenkd. 138: 89-91.

Schnepf, E., Winter, S., Storck, I. & Quader, H. 1990. A complementary experimental study of cell division in the dinoflagellate *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). Eur. J. Protistol. 25: 234-242.

Schütt, F. 1892. Über Organisationverhaltnisse des Plasmaleibes der Peridineen. S. B. Wiss. Akad. 377-384.

Sicko-Goad, L. 1982. A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure. Protoplasma 110: 75-86.

Sicko-Goad, L. & Stoermer, E.F. 1979. A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 15: 316-321.

Siegelman, H.W., Kycia, J.H. & Haxo, F.T. 1977. Peridinin-chlorophyll a proteins of dinoflagellate algae. Brookhaven Nat. Symp. 28: 162-169.

Sigee, D.C. 1983. Structural DNA and genetically active DNA in dinoflagellate chromosomes. BioSystems 16: 203-210.

Silva, E.S. 1952. Estudos de plancton da lagoa de Óbidos. I Diatomáceas e Dinoflagelados. Rev. Fac. Ciên. Lisboa 2ª sér. C (2): 5-44.

Silva, E.S. 1959. Some observations on marine dinoflagellate cultures. I. *Prorocentrum micans* Ehr. and *Gyrodinium* sp. Notas Est. Inst. Biol. Mar. 21: 1-15.

Silva, E.S. 1963. Les "Red waters" à la lagune d'Obidos. Ses causes probables et ses rapports avec la toxicité de bivalves. Notas Est. Inst. Biol. Mar. 27: 265-275.

Silva, E.S. 1968. Plancton da lagoa de Óbidos. III. Abundância, variações sazonais e grandes blooms. Not. Est. Inst. Biol. Mar. 34: 1-87.

Silva, E.S. 1980. As grandes populações de dinoflagelados tóxicos na lagoa de Óbidos. Arq. Inst. Nac. Saúde 4: 253-262.

Silverberg, B.A., Stokes, P.M. & Ferstenberg, L.B. 1976. Intracellular complexes in a copper-tolerant green alga. J. Cell Biol. 69: 210-214.

Singh, D.P. & Singh, S.P. 1987. Action of heavy metals on Hill activity and oxygen evolution in *Anacystis nidulans*. Plant Physiol. 83: 12-14.

Somers, E. 1963. The uptake of copper by fungal cells. Ann. Appl. Biol. 52: 425-437.

Soyer, M.-O. 1977. Mise en évidence et rôle des microtubules paranucléaires chez Prorocentrum micans E. (dinoflagellé libre). C.R. Acad. Sc. Paris, Ser. D, 285: 693-696.

Soyer M.-O. 1981. Presence of intranuclear micro cables in a primitive dinoflagellate protist: morphological description and discussion of their possible evolutionary significance. BioSystems 14: 299-304.

Soyer, M.-O. & Escaig, J. 1980. Les structures nucléaires et leurs modifications au cours de la division chez le dinoflagellé libre *Prorocentrum micans* E. Étude en cryofracture. Protistologica 16: 485-495.

Soyer, M.-O. & Prévot, P. 1981. Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. J. Protozool. 28: 308-313.

Spector, D.L. 1984a. "Dinoflagellates". Academic Press. Orlando. 545 p.

Spector, D.L. 1984b. Unusual inclusions. *In* "Dinoflagellates". Spector, D.L. (ed.) Academic Press. Orlando. pp. 365-390.

Stabenau, H. 1984. Microbodies in different algae. *In* "Compartments in Algal Cells and their Interactions". Wiessner, W., Robinson, D.G. & Starr, R.C. (eds). Springer-Verlag. Berlin. pp. 183-190.

Staker, R.D. & Bruno, S.F. 1980. Diurnal vertical migration in marine phytoplankton. Bot. Mar. 23: 167-172.

Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1986. Reversability of copper-thiol binding in *Nitzchia closterium* and *Chlorella pyrenoidosa*. Aquat. Toxic. 8: 223-229.

Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. Mar. Biol. 94: 511-519.

Steele, R.E. & Rae, P.M.M. 1980. Comparison of DNAs of *Crypthecodinium cohnii*-like dinoflagellates from widespread geographic locations. J. Protozool. 27: 479-483.

Steeman Nielsen, E., Kamp-Nielsen, L. & Wium-Andersen, S. 1969. The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. Physiol. Plant. 22: 1121-1133.

Steeman Nielsen, E. & Wium-Andersen, S. 1970. Copper ions as poison in the sea and freshwater. Mar. Biol. 6: 93-97.

Steeman Nielsen, E. & Wium-Andersen, S. 1972. Influence of copper on photosynthesis of diatoms, with special reference to an afternoon depression. Verh. Int. Verein Limnol. 18: 78-83.

Steffens, J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 533-575.

Steffens, J.C., Hunt, D.F. & Williams, B.G. 1986. Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (∂-glutamyl-cysteinyl)n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. J. Biol. Chem. 261: 13879-13882.

Stern, H. 1956. Sulfhydryl groups and cell division. Science 124: 1292-1293.

Stiff, M.J. 1971a. Water Res. 5: 171. Citado por Fleming & Trevor (1989).

Stiff, M.J. 1971b. Water Res. 5: 585. Citado por Fleming & Trevor (1989).

Stockner, J.G. & Costella, A.C. 1976. Marine phytoplankton growth in high concentrations of pulpmill effluent. J. Fish. Res. Bd. Canada 33: 2758-2765.

Stokes, P.M., Hutchinson, T.C. & Krauter, K. 1973. Heavy metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. Can. J. Bot. 51: 2155-2168.

Sunda, W.G. 1988/1989. Trace metal interactions with marine phytoplankton. Biol. Oceanogr. 6: 411-442.

Sunda, W.G., Barber, R.T. & Huntsman, S.A. 1981. Phytoplankton growth in nutrient rich seawater: importance of copper-manganese cellular interactions. J. Mar. Res. 39: 567-586.

Sunda, W.G. & Guillard, R.R.L. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. J. Mar. Res. 34: 511-529.

Sunda, W.G. & Hanson, A.K. 1987. Measurement of free cupric ion concentration in seawater by a ligand competition technique involving copper sorption onto C18 SEP-PAK cartridges. Limnol. Oceanogr. 32: 537-551.

Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1983. Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. Limnol. Oceanogr. 28: 924-934.

Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1985. Regulation of cellular manganese and manganese transport rates in the unicellular alga *Chlamydomonas*. Limnol. Oceanogr. 30: 71-80.

Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1986. Relationships among growth rate, cellular manganese concentrations and manganese transport kinetics in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. J. Phycol. 22: 259-270.

Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1991. The use of chemiluminescence and ligand competition to measure copper concentration and speciation in seawater. Mar. Chem. 36: 137-163.

Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1995. Regulation of copper concentration in the oceanic nutricline by phytoplankton uptake and regeneration cycles. Limnol. Oceanogr. 40: 132-137.

Sweeney, B.M. 1959. Endogenous diurnal rhythms in marine dinoflagellates. *In* "International Oceanography: Congress Preprints". Sears, M. (ed.) Am. Assoc. Adv. Sci. Washington, D.C. pp. 204-207.

Sylva, R.N. 1976. Water Res. 10: 789. Citado por Fleming & Trevor (1989).

Takamura, N., Kasai, F. & Watanabe, M.M. 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. J. Appl. Phycol. 1: 39-52.

Tappan, H. 1980. "The Paleobiology of Plant Protists". W.H. Freeman and Company. San Francisco.

Taylor, D.L. 1971. Taxonomy of some common *Amphidinium* species. Br. phycol. J. 6: 129-133.

Taylor, F.J.R. 1980. On dinoflagellate evolution. BioSystems 13: 65-108.

Taylor, F.J.R. 1987a. Ecology of dinoflagellates. A. General and marine ecossystems. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed.) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 399-502.

Taylor, F.J.R. 1987b. Taxonomy and classification. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed.) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 723-731.

Taylor, F.J.R. 1987c."The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Blackwell Sci. Publ. Oxford. 785 p.

Thurberg, F.P. & Sasner, Jr., J.J. 1973. Biological activity of a cell extract from the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. Chesapeake Sci. 14: 48-69.

Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E.-L. & Zenk, M.H. 1991. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. FEBS Lett. 284: 66-69.

Turner, R.G. 1970. The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. New Phytol. 69: 725-731.

Turner, D.R., Whitfield, M. & Dickson, A.G. 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 25°C and 1 atm pressure. Geochim. Cosmochim. Acta 45: 855-881.

Uchida, T. 1981. The relationships between *Prorocentrum micans* growth and its ecological environment. Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci. Hokkaido Univ. 7: 17.

U.S. EPA. 1987. Quality Criteria For Water 1986. - EPA report 550/5-86-001. Criteria and Standards Division. Washington, D.C.

U.S. EPA 1991. Toxics in the Community: National and Local Prespectives - The 1989 Toxics Release Inventory National Report. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Toxic Substances. Washington, D.C.

van Assche, F. & Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13: 195-206.

van den Berg, C.M.G. 1984. Determining the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions. Mar. Chem. 15: 1-18.

van den Berg, C.M.G., Merks, A.G.A. & Dursma, E.K. 1987. Organic complexation and its control of the dissolved concentrations of copper and zinc in the Scheldt estuary. Estuarine Coastal Shelf Sci. 24: 785-797.

Vanderheuvel, F.A. 1965. Structural studies of biological membranes: the structure of myelin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 122: 57-76.

Vesk, M. & Jeffrey, S.W. 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. J. Phycol. 13: 280-288.

Xue, H.-B., Stumm, W. & Sigg, L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. Wat. Res. 22: 917-926.

Wangersky, P.L. & Guillard, R.R.L. 1960. Low molecular weight organic bases from the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. Nature (London) 185: 689-690.

Wecke, J. & Giesbrecht, P. 1970. Freeze-etching of the nuclear membrane of dinoflagellates. Electron Microscop. Proc. 7th Int. Cong. pp. 233-234.

Welch, R.M., Norvell, W.A., Schaefer, S.C., Shaff, J.E. & Kochian, L.V. 1993. Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase performs a general role in regulating cation uptake? Planta 190: 555-561.

Wells, M.L., Zorkin, N.G. & Lewis, A.G. 1983. The role of colloid chemistry in providing a source of iron to phytoplankton. J. Mar. Res. 41: 731-746.

Wheeler, P.A., Olson, R.J. & Chisholm, S.W. 1983. Effects of photocycles and periodic ammonium supply on three marine phytoplankton species. II. Ammonium uptake and assimilation. J. Phycol. 19: 528-533.

Whitney, P.M. & Yellowlees, D. 1995. Preliminary investigations into the structure and activity of ribulose bisphosphate carboxylase from two photosynthetic dinoflagellates. J. Phycol. 31: 138-146.

Wilson, M.K., Kelley, G.J. & Jeffrey, S.W. 1984. Interplay between light and temperature in the growth of phytoplankton algae. Abst. 2nd Div. Res. Seminar. CSIRO, Australia.

Withers, N. 1987. Dinoflagellate sterols. *In* "The Biology of Dinoflagellates". Botanical Monographs Vol. 21. Taylor, F.J.R. (ed.) Blackwell Sci. Publ. Oxford. pp. 316-359.

Withers, N.W., Goad, L.J. & Goodwin, T.W. 1979. A new sterol, 4a-methyl-5a-Ergosta-8(14),24(28)-dien-3ß-ol from the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Phytochem. 18: 879-901.

Wolter, K., Rabsch, U., Krischker, P. & Davies, A.G. 1984. Influence of low concentrations of cadmium, copper and zinc on phytoplankton of natural water samples. Mar. Ecol. Prog. Ser. 19: 167-173.

Yasumoto, T. 1990. Marine microorganism toxins - an overview. *In* "Toxic Marine Phytoplankton". Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (eds). Elsevier. New York. pp. 3-8.

Yentsch, C.M. & P.K. Horan. 1989. Cytometry in the aquatic sciences. Cytometry 10: 497-499.

Young, R.G. & Lisk, D.J. 1972. Effect of copper and silver ions on algae. J. Water Pollut. Control Fed. 44: 1643-1647.

Zgurovska, L.M. & Kustenko, N.G. 1968. The effect of ammonia nitrogen on cell division, photosynthesis and pigment accumulation in *Skeletonema costatum* (Grev.) Cl., *Chaetoceros* sp. and *Prorocentrum micans* Ehr. Oceanology 8: 90-98.

Zingmark, R.G. & Miller, T.G. 1975. The effects of mercury on the photosynthesis and growth of estuarine and oceanic phytoplankton. *In* "Physiological Ecology of Estuarine Organisms". Vernberg, F.J. (ed). Univ. S. Carolina Press, Columbia, S. Carolina. pp.45-57.

Capítulo 2

OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO APRESENTADO NESTA DISSERTAÇÃO

O conhecimento actual sobre a interacção entre as comunidades biológicas e o cobre é ainda incompleto em muitos aspectos, apesar do elevado número de estudos efectuados. O trabalho experimental desenvolvido e apresentado nesta Dissertação de Doutoramento constitui um contributo para esta problemática, tendo-se efectuado, fundamentalmente, o estudo da toxicidade do cobre(II) em duas espécies de dinoflagelados marinhos. A abordagem foi multidisciplinar, atendendo-se a vários aspectos da toxicidade do cobre analisados por metodologias diversas.

A importância de estudar o cobre

Portugal apresenta uma extensa zona litoral que nas últimas décadas tem sido submetida a um intenso aumento de população e de diversas actividades antropogénicas (Borrego, 1994). Este fenómeno é bem patente na região do Porto (41°12'N), segunda cidade do país. As águas costeiras ao largo do Porto recebem efluentes de uma refinaria e várias indústrias, descargas de actividades agrícolas, esgotos domésticos e o afluxo das águas de dois rios bastante poluidos, Douro e Leça, que contribuem para um aumento crescente dos níveis de poluição ambiental. A presença do porto de Leixões com um intenso tráfego de navios comerciais e petroleiros é mais uma fonte de desequilíbrio ecológico.

Nos anos de 1987 e de 1988 foram efectuadas colheitas de água superfícial e de plancton (por arrasto, com uma rede de 5 μm de malha) em cinco locais de amostragem: 1 - interior do porto de Leixões; 2 - junto ao terminal de petroleiros; 3 - em frente ao farol de Leça; 4 - perto da saída de um efluente da Petrogal e 5 - em frente à praia da Memória. Posteriormente foram determinadas nas amostras de água por espectroscopia de absorção atómica as concentrações de quatro dos principais metais poluentes (cádmio, chumbo, cobre e mercúrio) em solução. Apesar de haver uma variação temporal e espacial das concentrações dos diferentes metais, o cobre foi o que apresentou concentrações características de águas poluidas, tendo variado entre 7,70 e 130 nM. Valores semelhantes de cobre em solução foram também observados em 1994 e 1995 (Leal *et al.*, 1996). Em face dos resultados inicialmente obtidos, o cobre foi seleccionado para se proceder a estudos de toxicidade, uma vez que se apresentou como um potencial agente causal de desequilíbrio das comunidades aquáticas nesta região.

Este metal apresenta ainda uma característica relevante relativamente aos outros três metais pesquisados. Ao possuir a dualidade de ser um micronutriente e, como tal, fundamental na biologia celular e, por outro lado, ser um tóxico potencial, torna-se ainda um desafio maior a interpretação e compreensão dos mecanismos subjacentes à interacção cobre-organismo.

A importância de estudar dinoflagelados

A escolha dos dinoflagelados como material biológico em múltiplos estudos tem sido preterido, comparativamente, por exemplo, às clorófitas (*e.g. Chlorella* e *Chlamydomonas*), por serem algas de mais dificil cultivo *in vitro* (Keller & Guillard, 1985) devido ao desconhecimento de particularidades nutricionais ou de factores fisico-químicos e, também, pela reduzida biomassa que se consegue obter em cultura. No entanto, apesar de ser um grupo de algas menos estudado relativamente a outros, apresenta variadíssimos aspectos de interesse. Como foi previamente referido no Capítulo 1, são organismos fascinantes com uma grande riqueza a nível de diversidade, abundância, fisiologia, ecologia e filogenia e produtores das mais potentes toxinas conhecidas, aspectos que tem suscitado um interesse crescente do seu estudo.

Amphidinium carterae e *Prorocentrum micans*, são duas espécies de dinoflagelados comuns na zona costeira portuguesa tendo sido observadas em amostras de plancton colhidas na área da cidade do Porto. Na escolha destes dois organismos como material biológico para o estudo efectuado atendeu-se também ao facto de apresentarem algumas características bem distintas que poderiam motivar diferentes comportamentos e respostas biológicas. Assim, destacam-se:

(1) tipo de revestimento celular, sendo uma espécie nua e a outra tecada;

(2) tamanho celular (Fig. 1) e relação superfície/volume;

(3) certa diversidade estrutural intracelular (ex: pirenóide, vacúolos, púsula, conteúdo em DNA);

(4) nicho habitacional, sendo uma bêntica e a outra planctónica;

(5) tempo de duplicação (*A. carterae* ≈ 2,5 dias e *P. micans* - 4,5 a 5 dias);

(6) localização sistemática no Filo.

Por se tratarem de espécies unicelulares, estes organismos apresentam uma maior simplicidade estrutural comparativamente aos multicelulares, o que permite uma facilidade de interpretação dos resultados.

Por outro lado, o facto da totalidade do organismo ser directamente exposta à acção da substância poluente, implica necessariamente uma capacidade de resposta imediata e eficaz, pois, em caso contrário, podem estar irreversivelmente perante uma situação de morte. Este aspecto em termos ecológicos é de uma importância extrema.

Como ambas as espécies são comuns nas regiões costeiras de Portugal os estudos efectuados *in vitro* poderão, posteriormente, ser alargados a estudos *in locu*.

O trabalho efectuado é seguidamente apresentado (Capítulo 3) sob a forma de nove artigos científicos, seis dos quais estão publicados e os restantes submetidos para publicação. No Capítulo 4 são apresentadas as conclusões gerais do trabalho. Em três anexos apresentam-se resultados que se entende serem de relevância como suporte para as conclusões. O conteúdo de dois destes anexos foram recentemente apresentados em comunicações científicas internacionais.

A sequência escolhida para apresentação dos trabalhos não corresponde à sequência temporal de realização dos mesmos. O estudo efectuado sofreu uma evolução à medida que os resultados foram surgindo e que o conhecimento sobre estes assuntos foi alargando, e beneficiou com as colaborações estabelecidas com grupos científicos de áreas diferentes, nomeadamente, com a Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da U.P., o Doutor Filipe Sansonetty do Laboratótio de Anatomia Patológica e Citometria de Fluxo do Hospital de S. João e o Professor Doutor Enrique O'Connor do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Valência. Assim, foi possível em vários trabalhos apresentar um corpo coerente de resultados que permitiram levantar hipóteses ou chegar a conclusões fundamentadas.

Assim, no Trabalho 1, "Alguns efeitos do cobre nos dinoflagelados *Amphidinium carterae* e *Prorocentrum micans* em cultura em sistema fechado", foi estudada a influência do cobre(II) em aspectos da fisiologia e bioquímica celulares (interferência com o crescimento, mobilidade, teor proteico e capacidade de recuperação). A relação dose-efeito foi avaliada atendendo às concentrações iniciais de cobre(II) lábel, determinadas através da especiação computacional do metal. Foi efectuada uma análise comparativa da sensibilidade das duas espécies ao cobre(II). Este trabalho realça a importância do conhecimento da especiação química do cobre e da estabilidade do pH do meio (e portanto da necessidade de tamponamento do meio de cultura) em estudos de toxicidade pelo cobre.

No Trabalho 2, "Efeitos de toxicidade do cobre(II) no dinoflagelado marinho *Amphidinium carterae*. Influência da especiação do metal", foi dada relevância aos aspectos relacionados com a especiação química do cobre(II). Para além de dados de especiação obtidos computacionalmente, o cobre(II) total e o electroquimicamente lábel foram medidos no meio de cultura ao longo dos 10 dias de experiência assim como os níveis celulares de cobre(II). A análise do impacto do metal sobre as células foi avaliada segundo dois modelos experimentais distintos e passsíveis de ocorrer na Natureza: (i) a adição do cobre(II) na forma

livre (aquocomplexo) foi efectuada 2 h após a inoculação; (ii) as células foram inoculadas após 24 h de pré-equíbrio do cobre(II) no meio de cultura. No meio de cultura, o tamponamento metálico e do pH foi assegurado, respectivamente, por EDTA e HEPES. Os resultados obtidos realçam a importância de se atender aos aspectos cinéticos das reacções químicas em estudos de toxicidade e a relação directa existente entre a concentração lábel do metal e a toxicidade induzida. Potenciais mecanismos de tolerância de *A. carterae* foram discutidos.

No Tabalho 3, "Influência de vários tampões no crescimento de *Amphidinium carterae* Hulburt e de *Prorocentrum micans* Ehr. em cultura em sistema fechado" avaliou-se a capacidade de tamponamento e a influência de vários tampões, essencialmente tampões de Good (Good *et al.*, 1966; Ferguson *et al.*, 1980), no crescimento de *A. carterae* e *P. micans*. O objectivo deste estudo era escolher, de um modo fundamentado, um tampão adequado para tamponamento do meio ESAW (Harrison *et al*, 1980). Com efeito, este é um meio sintético de água do mar que permite bons resultados no cultivo das duas espécies de dinoflagelados mas que não é tamponado para o pH. Em meios de cultura de algas para além do bicarbonato, diversos outros tampões de pH têm sido incluidos. O Tris, um tampão que tem sido bastante utilizado, interfere com o crescimento de algumas espécies fitoplanctónicas (Parcker *et al.*, 1961; Harrison *et al.*, 1980) e é um forte ligando complexante do cobre (Gavis *et al.*, 1981). Os tampões de Good têm sido muito menos usados em culturas de algas, a sua capacidade de ligação aos metais é variável, e as suas constantes de estabilidade para complexação de metais não são conhecidas com precisão (Price *et al.*, 1989). Este estudo permitiu verificar que os tampões imidazole e o ácido N-(2-acetoamido)-2-aminoetanosulfónico, ACES, foram tóxicos para ambas as espécies. Os tampões ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanossulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanossulfónico (MOPS) e ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanossulfónico) (PIPES), nas concentrações adequadas, tamponaram adequadamente o meio ESAW e não afectaram o crescimento de ambas as espécies.

Com base nos resultados obtidos no Trabalho 3 e no Anexo 3, foram seleccionados dois tampões, o ácido 3-[N-bis(hidroxietil)amino]-2-hidroxipropanossulfónico (DIPSO) e o HEPES, em concentrações adequadas para permitir bom crescimento das duas espécies e tamponamento do pH na gama desejada. No Trabalho 4, "Adequação dos tampões de pH ácido 3-[N-bis(hidroxietil)amino]-2-hidroxipropanossulfónico e ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanossulfónico para estudos *in vitro* de toxicidade pelo cobre", fez-se o estudo da toxicidade do cobre(II) em *A. carterae* na presença de cada um desses tampões. Apesar do tampão HEPES já ter sido usado em diversos estudos biológicos (Ferguson *et al.*, 1980), nomeadamente cultura de algas e ensaios de toxicidade (Overnell, 1975), nada existe

na literatura sobre a capacidade de interferência destes dois tampões no fenómeno da toxicidade. Com base em valores de crescimento, EC_{50}, actividade esterásica e comportamento químico dos tampões na presença de cobre(II) foi analisada a capacidade destes tampões em estudos de toxicidade pelo cobre. O HEPES aumentou a toxicidade do cobre(II) para *A. carterae* possivelmente pelas capacidades surfactantes que se verificou possuir na concentração usada. Por sua vez, o DIPSO mostrou ser um potente antagonista do cobre(II) apresentando uma forte capacidade complexante deste metal.

No Trabalho 5, "Avaliação dos efeitos do cobre em *Amphidinium carterae* através da quantificação da actividade esterásica por FCM", analisou-se a toxicidade do cobre(II) em *A. carterae* através de um outro parâmetro fisiológico - a actividade esterásica (medida após incorporação celular do diacetato de fluoresceína (FDA) e clivagem enzimática do diacetato com formação de fluoresceína, molécula fluorescente que, como a mobilidade, permite uma rápida informação sobre o estado metabólico celular. A citometria de fluxo (FCM) é uma metodologia analítica relativamente recente que permite, com grande sensibilidade, uma quantificação multiparamétrica de factores biológicos em células isoladas ou em partículas biológicas quando em suspensão num fluido aquoso adequado. A análise por FCM é, normalmente, efectuada a elevada velocidade (milhares de células por segundo) e, os parâmetros biológicos passíveis de avaliação, dependem de factores como a emissão de autofluorescência ou de fluorescência após ligação específica de fluorocromos a estruturas celulares, a acumulação dos fluorocromos em compartimentos subcelulares ou a modificação específica da fluorescência por enzimas. Concomitantemente, a medição da dispersão da luz ("light scatter") fornece informação importante acerca do tamanho e da granulosidade celular. Desde os anos 80 que a análise dos microrganismos marinhos por FCM tem aumentado consideravelmente, como revisto recentemente (Troussellier *et al.*, 1993). Apesar dos estudos estruturais e taxonómicos dos organismos marinhos estarem já bem caracterizados, existe ainda pouca informação acerca de aspectos funcionais e metabólicos (Furuya & Li, 1992), ao contrário do que se verifica para células humanas e de mamíferos. A análise por FCM efectuada foi complementada com observações microscópicas. As concentrações mais baixas de cobre(II) testadas praticamente não afectaram a percentagem de células viáveis, mas estas células apresentaram níveis inferiores de fluorescência da fluoresceína comparativamente com as células controlo. Por sua vez, as células expostas à concentração mais elevada de cobre(II) comportaram-se de uma forma não esperada. Apesar do crescimento da cultura ser nulo, das células permanecerem imóveis durante toda a experiência e de ao fim de 10 dias haver uma população de células não viáveis, os níveis de fluoresceína das restantes células eram muito superiores aos do controlo (aparemente uma maior actividade esterásica). Estas células sofreram alterações morfo-fisiológicas indicativas de enquistamento induzido por condições

ambientais desfavoráveis. A validade e correspondência entre actividade esterásica ou viabilidade celular *versus* níveis de fluoresceína é discutida.

O Trabalho 6, "Diferenças na marcação em fluoresceína em *Amphidinium carterae* como uma indicação de enquistamento", surgiu na sequência dos resultados obtidos no Trabalho 5, tendo-se procedido à análise de culturas já em fase estacionária avançada, onde normalmente, e devido exactamente a condições desfavoráveis, surgem formas císticas. *A. carterae* em fase exponencial de crescimento, após o ensaio com FDA, apresentou um teor homogéneo em fluoresceína (população 1), enquanto que, em situações de stress como o envelhecimento da cultura e a toxicidade pelo cobre(II), foram observadas duas populações, uma com um nível de fluoresceína correspondente ao da população 1 e outra com níveis 6 a 10 vezes superiores. Esta segunda população corresponde às células enquistadas. O aumento na intensidade de fluoresceína nestas células foi interpretado, não como um aumento da actividade esterásica, mas sim como devido a um aumento do pH intracelular. A fluoresceína é uma molécula cuja intensidade de fluorescência é dependente do pH. Dados que apoiam esta hipótese são apresentados no anexo 1.

Todos os estudos envolvendo citometria de fluxo foram apenas efectuados em *A. carterae* como modelo biológico. Esta espécie, contrariamente ao que se verifica com *P. micans*, apresenta boas características para estudos de FCM. *P. micans* possui também o inconveniente de o número de células em cultura ser bastante inferior ao de *A. carterae* e, portanto, as amostragens serem pouco representativas.

No Trabalho 7, "Análise electroforética de polipétidos de *Prorocentrum micans* Ehr. exposto a níveis tóxicos de cobre", procedeu-se à análise quantitativa e qualitativa de proteínas solúveis. A análise qualitativa foi efectuada por comparação do padrão electroforético polipeptídico (entre cerca de 30 e 110 kDa) de *P. micans* após exposição a diferentes níveis de cobre(II). Esta análise foi efectuada em termos relativos, considerando-se um polipéptido mais abundante como referência. Na discussão dos resultados atendeu-se aos níveis totais de cobre(II) adicionado às culturas. Após 14 dias de exposição às duas concentrações de cobre testadas, verificou-se uma diminuição geral do teor em proteínas solúveis e através da análise electroforética demonstrou-se existir uma redução relativa da quantidade de dois polipéptidos e um aumento relativo da quantidade de quatro outros polipéptidos, aspectos que parecem apontar para toxicidade pelo cobre.

No Trabalho 8, "Potenciais mecanismos de tolerância de *Prorocentrum micans* (Dinophyceae) contra níveis subletais de cobre", foram feitas várias abordagens experimentais

numa tentativa de investigar qual ou quais os mecanismos apresentados por esta espécie e que lhe permitem tolerar concentrações intracelulares de cobre(II) relativamente elevadas. Os efeitos de toxicidade foram confirmados por diminuição da taxa de crescimento, indução de uma fase de latência, perda temporária da mobilidade e perda de potássio intracelular assim como o aumento dos níveis intracelulares de cobre. A produção de uma proteína com cerca de 25 kDa foi detectada após 3 h de exposição ao metal, tendo persistido pelo menos nas 48 h posteriores. A nível de mecanismos de tolerância não foi detectada a produção de fitoquelatinas, mas verificou-se, numa fase inicial, ocorrer efluxo de cobre e, através de marcação ultracitoquímica a retenção do metal nas placas tecais, nos grãos de amido e, possivelmente, nos lípidos de reserva. Valores médios elevados de constantes condicionais de estabilidade dos complexos cobre(II)-amido, -amilopectina ou -celulose apoiaram a localização deste metal nos grãos de amido e nas placas tecais.

Conhecimentos prévios da literatura sobre a possibilidade de existir uma relação íntima e recíproca entre as alterações metabólicas e estruturais induzidas pelo cobre(II), levaram a que se efectuasse o estudo apresentado no Trabalho 9, "Alterações ultraestruturais induzidas pelo cobre(II) em dinoflagelados marinhos". Para além das alterações observadas em ambas as espécies após exposição a níveis subletais também se procedeu ao estudo dos cistos de *A. carterae* formados pelo stress induzido pelo cobre(II). Os organelos mais visivelmente afectados em ambas as espécies foram os cloroplastos, os dictiossomas e as mitocôndrias. Em *P. micans*, após 19 dias de exposição ao metal, as células apresentaram sinais de recuperação estrutural. Também se verificou em *P. micans* que, apesar de respostas bioquimico-fisiológicas ao cobre(II) serem muito rápidas como a perda de mobilidade, as alterações estruturais processam-se mais lentamente. Os cistos temporários de *A. carterae* apresentaram uma estrutura semelhante à das células vegetativas apesar de se verificar um aumento de reservas lipídicas e de amido e alterações a nível do invólucro nuclear.

No Anexo 1, usou-se a FCM para avaliar a resposta aguda de *A. carterae* ao cobre(II) através da medição da cinética de absorção do FDA, registando o logaritmo da fluorescência verde em função do tempo. Verificou-se um aumento da velocidade de absorção do FDA quando o cobre foi adicinado durante a absorção celular dessa molécula ou após uma curta exposição das células ao metal. Neste caso, verificou-se existir uma relação dose-efeito directa, também observada nos níveis de fluoresceína atingidos ao fim do mesmo período de tempo. Preincubação das células com NaCl ou com o anti-oxidante, N-acetil-cisteína, evitaram o efeito resultante da adição de cobre durante a absorção do FDA. A adição de um forte lipoperoxidante de membranas, o tert-butil hidroperóxido, durante a absorção do FDA não induziu o mesmo efeito do cobre, mas levou à morte celular. O conjunto dos resultados

obtidos demonstraram o efeito imediato do cobre por uma acção directa extracelular no plasmalema e apontam para uma interferência do cobre com o antiporte Na^+/H^+, levando a alterações da homeostasia iónica intracelular (aumento de pH e consequentemente dos níveis de fluoresceína).

No Anexo 2, apresentam-se resultados preliminares da pesquisa do anião superóxido (O_2^-) e de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em *A. carterae* exposto a diferentes níveis de cobre(II) por FCM e marcação com fluorocromos adequados. Concentrações de cobre lábel previamente caracterizadas como induzindo toxicidade nesta espécie levaram a um aumento semelhante do nível de ambas as espécies de oxigénio. Por sua vez, as células expostas a concentrações de cobre lábel que induzem enquistamento mantiveram os níveis de O_2^- não alterados o mesmo não se tendo verificado com o H_2O_2. Este aumentou de uma forma mais pronunciada do que na outra concentração de cobre e a população celular apresentou uma maior dispersão dos níveis de marcação, correspondendo a uma maior heterogeneidade. Este estudo evidencia a existência de uma explosão oxidativa induzida pelo cobre(II) em *A. carterae.*

No anexo 3, apresentam-se os valores obtidos no estudo da influência de vários tampões de Good no crescimento e no tempo de duplicação de *A. carterae* e na variação máxima de pH das culturas avaliada através da comparação com uma situação controlo (cultura com meio ESAW não tamponado). O objectivo foi complementar os dados apresentados no Trabalho 3, com a finalidade da escolha de tampões de pH adequados para incluir na composição do meio ESAW para posteriores estudos de toxicidade do cobre. Nenhum dos tampões estudados afectou o crescimento de *A. carterae* e, na generalidade, todos foram efectivos no tamponamento das culturas.

REFERÊNCIAS

Borrego, C. 1994. Sustainable development of coastal zones: Why is it important? Littoral 94: 11-23.

Ferguson, W.J., Branschweiger, K.I., Branschweiger, W.R., Smith, J.R., McCormick, J.J., Wasmann, C.C., Jarvis, N.P., Bell, D.H. & Good, N.E. 1980. Hydrogen ion buffers for biological research. Anal. Biochem. 104: 300-310.

Furuya, K. & Li, W.K.W. 1992. Evaluation of photosynthetic capacity in phytoplankton by flow cytometric analysis of DCMU-enhanced chlorophyll fluorescence. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88: 279-287.

Gavis, J., Guillard, R.R.L. & Woodward, B.L. 1981. Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. J. Mar. Res. 39: 315-333.

Good, N.E., Winjest, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. & Singh, R.M.M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry. 5: 467-477.

Harrison, P.J., Waters, R.E. & Taylor, F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol. 16: 28-35.

Keller, M.D. & Guillard, R.L. 1985. Factors significant to marine dinoflagellate cultures. *In.* "Toxic Dinofloflagellates". Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (eds). Elsevier. New York. pp.113-116.

Leal, M.F.C., Vasconcelos, M.T.S.D. & Cabral, J.P. 1996. Níveis de metais pesados em água do mar e algas macroscópicas da zona costeira do grande Porto. A utilização de algas marinhas como bioindicador de poluição por metais pesados. Actas da 5ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Vol. 2: 1429-1439.

Overnell, J. 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum.* Mar. Biol. 29: 99-103.

Parcker, E.L., Hutner, S.H., Cox, D., Mendelow, D., Baker, M.A., Frank, O. & Amsterdam, D. 1961. Use of amine buffers in protozoan nutrition. Ann. New York Acad. Sci. 92: 486-490.

Price, N.M., Harrison, G.I., Hering, J.G., Hudson, R.J., Nirel, P.M.V., Palenik, B. & Morel, F.M.M. 1989. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. Biol. Oceanogr. 6: 443-461.

Troussellier, M. Courties, C. & Vaquer, A. 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. Biol. Cell. 78: 111-121.

Capítulo 3

TRABALHOS PUBLICADOS OU EM PUBLICAÇÃO

Trabalho 1

ALGUNS EFEITOS DO COBRE NOS DINOFLAGELADOS *AMPHIDINIUM CARTERAE* E *PROROCENTRUM MICANS* EM CULTURA EM SISTEMA FECHADO

Lage, O.M., Parente, A. M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T. S.D. & Salema, R. 1994. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. **Eur. J. Phycol**. 29: 253-260

Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture

O. M. LAGE[1], A. M. PARENTE[1], H. M. V. M. SOARES[2*], M. T. S. D. VASCONCELOS[2] AND R. SALEMA[1]

[1]*Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal;*
[2]*Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 4000 Porto, Portugal*

The influence of copper(II) on some aspects of the cell physiology and biochemistry of the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* growing exponentially was examined in batch cultures. The concentration of labile copper (free ion plus that present in labile complexes) in the cultures was estimated taking into account the pH of the medium at the moment of copper addition, and the chemical composition of the medium. The speciation of other metals was also considered. *A. carterae* and *P. micans* exposed to concentrations of labile copper of, respectively, 605 nM and 55 nM, which resulted from the addition of 1·58 μM (100 μg dm^{-3}) of total copper, showed a decrease in the growth of the cultures. Related to the number of cells in the cultures, these labile copper concentrations correspond to, respectively, 3·80 and 19·8 fmol of dissolved copper per cell. Growth of the two species in lower copper concentrations was similar to the growth of the control cultures. Besides a decrease in the growth of the cultures, higher copper concentrations also induced changes in cell motility. At the two highest copper concentrations a decrease in the protein content, only studied in *P. micans*, was observed. In *P. micans*, lethality was achieved with a concentration of labile copper of about 3·16 μM (406 fmol dissolved copper per cell) [resulting from 15·8 μM (1000 μg dm^{-3}) of total copper]; there was both an irreversible loss of cell motility and growth inhibition (over the 21 days considered) and a large reduction in protein. Both species showed a certain ability to recover from sublethal copper doses. Copper effects and the difference in sensitivity of the two dinoflagellates to the metal are discussed.

Key words: *Amphidinium carterae*, copper, dinoflagellates, *Prorocentrum micans*, speciation, toxicity.

Introduction

Environmental toxicity due to metals mobilised by human activities exceeds the combined total toxicity of all radioactive and organic wastes and is, currently, of increasing concern (Nriagu & Pacyna, 1988). The effects of heavy metals on marine ecosystems and, in particular, on the phytoplankton, the base of the food web, are of particular interest because, unlike other pollutants, metals persist in the sediments and can be released back into the water column, becoming available to the marine biota (Visviki & Rachlin, 1991).

The importance of copper to biological systems results from its double role as a micronutrient, essential for the functioning of some enzymes, especially those involved in electron transport (e.g. cytochrome *c* oxidase), and as a toxic agent at higher levels. Copper toxicity is directly related to its free ion (hydrated) (Sunda & Guillard, 1976), but inorganic complexes are also believed to be toxic, although to a lesser extent (Florence, 1982). Strong complexes and species associated with colloidal particles are usually assumed to be non-toxic. In addition to thermodynamic factors, kinetics may dictate the biologically active chemical species (Florence, 1982). The age of the cells and aerobic versus anaerobic conditions may also influence copper uptake (Silverberg *et al.*, 1976).

Usual levels of copper in seawater, which are between 1 and 10 nM, may be inhibitory to some dinoflagellates, a group of organisms considered to have great copper sensitivity (Taylor & Pollingher, 1987). In 1987/8, in coastal seawater north of Porto (41°12′N), Portugal, a site receiving effluents from a refinery and various industries, several determinations of the concentration of dissolved copper were made and values between 7·70 and 130 nM were found.

We present here the first results of a study of the effects induced *in vitro* by copper on some aspects of the physiology and biochemistry of two marine species of dinoflagellates—*Amphidinium carterae* Hulburt and *Prorocentrum micans* Ehrenberg—in batch culture. These two organisms, common in coastal seawater near Porto, were chosen because they differ in size and in the chemical composition and structure of the cell covering, which may be responsible for different responses to exposure to the metal.

A. carterae and *P. micans* have been used in several studies on toxicity of different pollutants, including

*Permanent address: Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, P 4099, Porto Codex, Portugal.

Table 1. Composition of the artificial seawater ESAW (Harrison *et al.*, 1980)

Macrocomponent concentrations	(mmol dm^{-3})	Microcomponent concentrations	(μmol dm^{-3})
NaCl	363	$NaNO_3$	549
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	47·2	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	106
Na_2SO_4	25·0	$NaglyceroPO_4$	21·8
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	9·14	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	5·97
KCl	8·04	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2·42
$NaHCO_3$	2·07	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5.92×10^{-1}
KBr	7.25×10^{-1}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.54×10^{-1}
H_3BO_3	4.34×10^{-1}	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	5.69×10^{-2}
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	8.20×10^{-2}	Thiamine HCl	2.97×10^{-1}
NaF	6.57×10^{-2}	Vitamin B_{12}	1.47×10^{-3}
Na_2EDTA	1.49×10^{-2}	Biotin	4.09×10^{-3}

various metals such as copper (Berland *et al.*, 1976; Kayser, 1976; Prevot, 1978; Matthys-Rochon, 1980; Antia & Klut, 1981; Soyer & Prevot, 1981; Hawkins & Griffiths, 1982; Klut *et al.*, 1981, 1984; Prevot & Soyer, 1985; Prevot & Soyer-Gobillard, 1986), but copper toxicity was not generally evaluated in terms of metal speciation nor based on the ratio of dissolved copper concentration to cell number.

Materials and methods

Organisms and culture conditions

A. carterae (isolate 39) and *P. micans* were kindly supplied, respectively, by Dr Estela Sousa e Silva (Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge) and by Professor J. D. Dodge (Royal Holloway College, London University). The cells were grown in the artificial seawater medium ESAW (Harrison *et al.*, 1980) at 18 ± 1°C, with a 12 : 12 h dark/light regime and a light intensity of about 30 μmol m^{-2} s^{-1}. ESAW medium contains various macro- and micronutrients, including 14·9 μM EDTA and small amounts of cyanocobalamin, biotin and thiamine, but it is not pH buffered (Table 1). The culture medium, and the other solutions, were made with double-distilled, deionised water and *pro analysis* reagents or equivalent, the medium being sterilised by filtration through a cellulose acetate filter with a pore size of 0·45 μm.

Toxicity experiments

To unialgal batch cultures of *A. carterae* and *P. micans* in exponential growth phase, 0·16 mM (10 mg dm^{-3}) copper as copper(II) chloride in 5 mM HCl was added to obtain total copper concentrations in the cultures between 0·16 and 15·8 μM (10–1000 μg dm^{-3}). Cultures to which copper was not added were used as controls. All the experiments were done in duplicate. The manipulation of the cultures was carried out under aseptic conditions, and the quantities of bacteria in the cultures

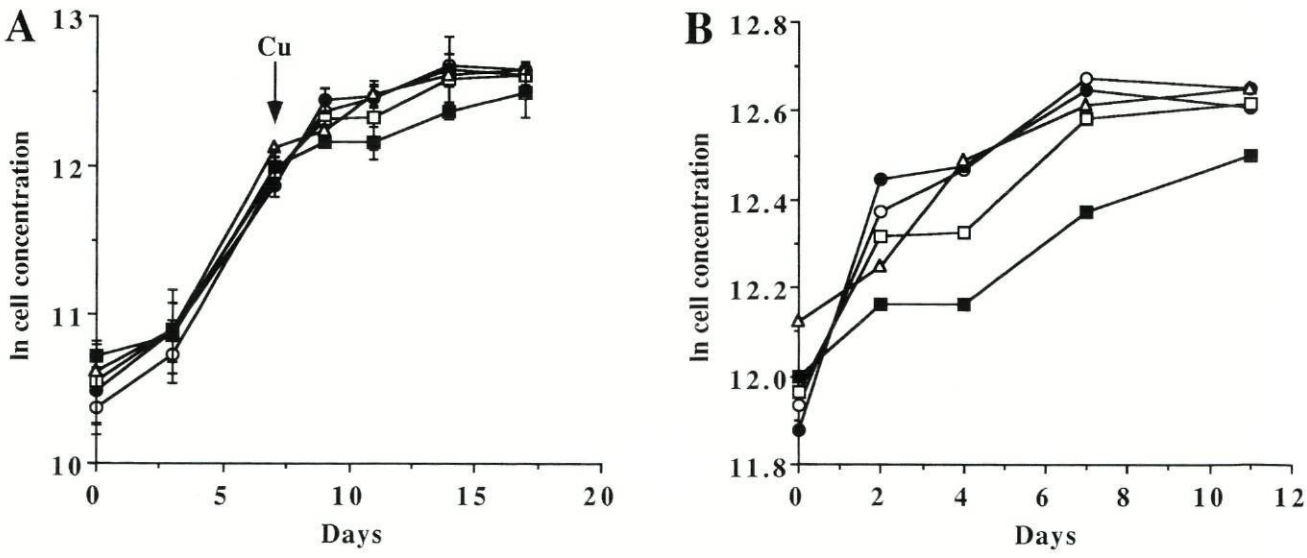


Fig. 1. Influence of copper on the growth of exponential cultures of *Amphidinium carterae*. The metal was added to the cultures after 7 days of growth (arrow). (*B*) Detail of (*A*) after the addition of the metal. All error bars are the standard deviations of determinations from replicate cultures, which are omitted in (*B*) for simplicity. Labile copper concentration (nM): open circles, 0 (control); filled circles, 58; open squares, 605; open triangles, 1640; filled squares, 1940.

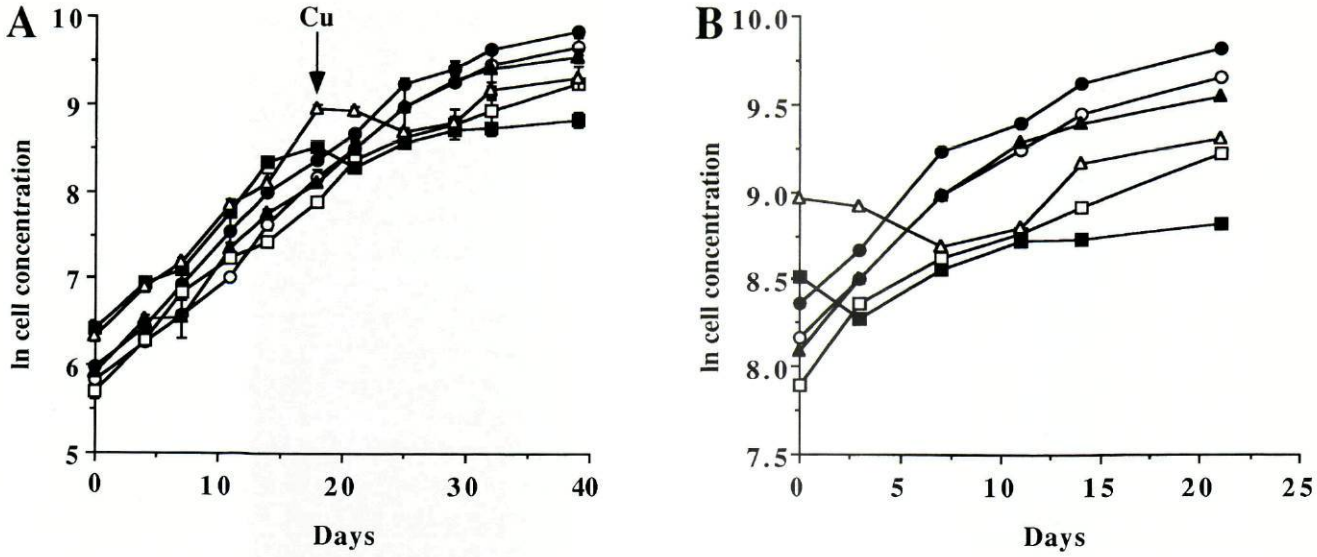


Fig. 2. Influence of copper on the growth of exponential cultures of *Prorocentrum micans*. The metal was added to the cultures after 18 days of growth (arrow). (*B*) Detail of (*A*) after the addition of the metal. Labile copper concentration (nM): open circles, 0 (control); filled triangles, 5; filled circles, 43; open squares, 55; filled squares, 163; open triangles, 3160.

were checked and found to be low. To avoid copper contamination of the culture medium, all glassware was washed with nitric acid and deionised water. Several determinations were performed on samples of the cultures as described below.

Analysis

Cell numbers in neutral formaldehyde-fixed samples of *A. carterae* and *P. micans* cultures were counted with a Coulter counter (Model ZM). The effect of copper on the levels of protein was evaluated only in *P. micans*. Soluble protein content was estimated by the Bradford method (1976), after extraction with 0·3 M NaOH. Absorbance at 595 nm was measured in a Jasco spectrophotometer, model 7800.

Cell motility of *A. carterae* and *P. micans* was estimated by optical microsopic observations on a depression slide, counting all of the motile and non-motile cells in 0·01 cm^3 volumes (a cell was considered motile if showing any kind of visible movement). Several counts were made for each sample. The pH values of the culture medium were monitored by potentiometry with a pH meter WTW 537 and a combined glass electrode of the same brand, type E56.

The data were subjected to descriptive statistical analysis. Each value presented is the mean of determinations from replicate cultures.

Metal speciation

Computational simulations of chemical equilibrium were

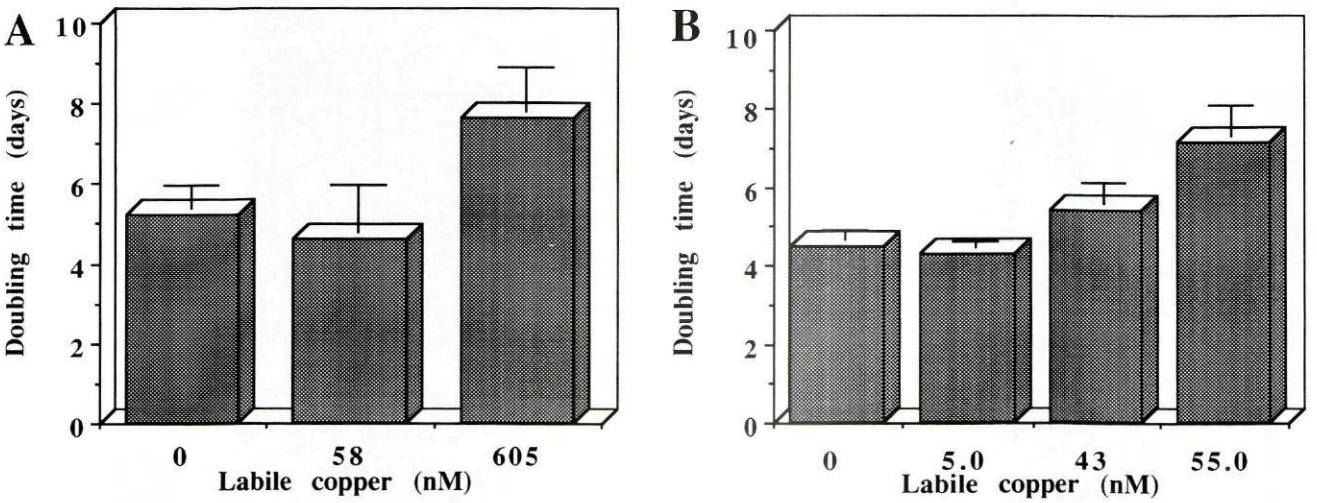


Fig. 3. Effect of copper on the cell doubling time of (*A*) *Amphidinium carterae* and (*B*) *Prorocentrum micans* [calculated using the values of the slopes of the linear equations computed from the values of (ln cell concentration) between, respectively, days 0–4 and 0–7 after the addition of the metal to exponentially growing cultures].

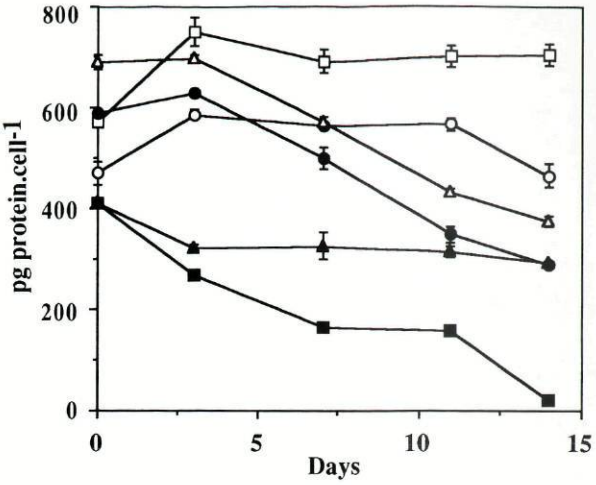


Fig. 4. Cell protein content over time of *Prorocentrum micans* exposed to different copper concentrations. Labile copper concentration (nM): open circles, 0 (control); open triangles, 5; open squares, 43; filled circles, 55; filled triangles, 163; filled squares, 3160.

performed with the speciation computer program MICROQL (Westall, 1979). The calculations were based on the pH of the culture medium at the moment of copper addition and on the initial chemical composition of the medium. Besides the copper–EDTA complexes, the major side equilibria, namely copper–inorganic ligand (OH^-, CO_3^{2-}, Cl^-, NH_3) complexes and complexes of other metals (Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Mn, Zn) with EDTA, were considered. For this purpose, equilibrium data from the literature (Martell & Smith, 1974; Stumm & Morgan, 1981; Hogfeldt, 1982) were used.

Results and discussion

The growth of *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* is typical of batch cultures of microorganisms (Figs 1, 2). The effect of the addition of the metal in the exponential phase (after 7 days in *A. carterae* and 18 days in *P. micans*) on the growth of the cultures was evaluated by the determination of cell concentration (Figs 1, 2), doubling time (Fig. 3), soluble protein content (Fig. 4) and cell motility (Figs 5, 6).

When the copper solution (metal in the free ion form) was added to each culture, almost all the EDTA present in the medium was complexed with alkaline earth and other heavy metals. These complexes are very stable from the kinetic point of view (Turner *et al.*, 1987). Therefore, almost all of the copper added is initially bioavailable. After that, because the copper-EDTA complex is thermodynamically more stable than the other main metal–EDTA complexes (Anderson & Morel, 1978), a significant fraction of the copper is bound by the EDTA. This complex is inert (Gonçalves *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1989; Lund *et al.*, 1990) and causes a dramatic reduction in bioavailable copper. The free and labile (complexes with inorganic ligands) copper, both henceforth designated 'labile fraction', and other heavy metal fractions were estimated by a computer program (see Materials and Methods). Nevertheless, this calculation constitutes only a rough estimation of the speciation of the metals because eventual pH changes in the culture medium during the experiment as well as the amount of metals bound to cells or to cell exudates were not considered. The results of copper speciation presented in Table 2 show that the labile copper concentration and, consequently, the bioavailable metal fraction, was much lower than the total copper in the solution and dependent on the pH of the culture medium. For instance, the 7·87 μM total copper concentration corresponds to 0·163 μM labile copper concentration at pH 7·7 and to 1·94 μM at pH 9·5. Besides, as Table 3 shows, the labile concentrations of heavy metals other than copper were approximately constant throughout different experiments. The exceptions were cobalt and zinc in the cultures of *Prorocentrum*

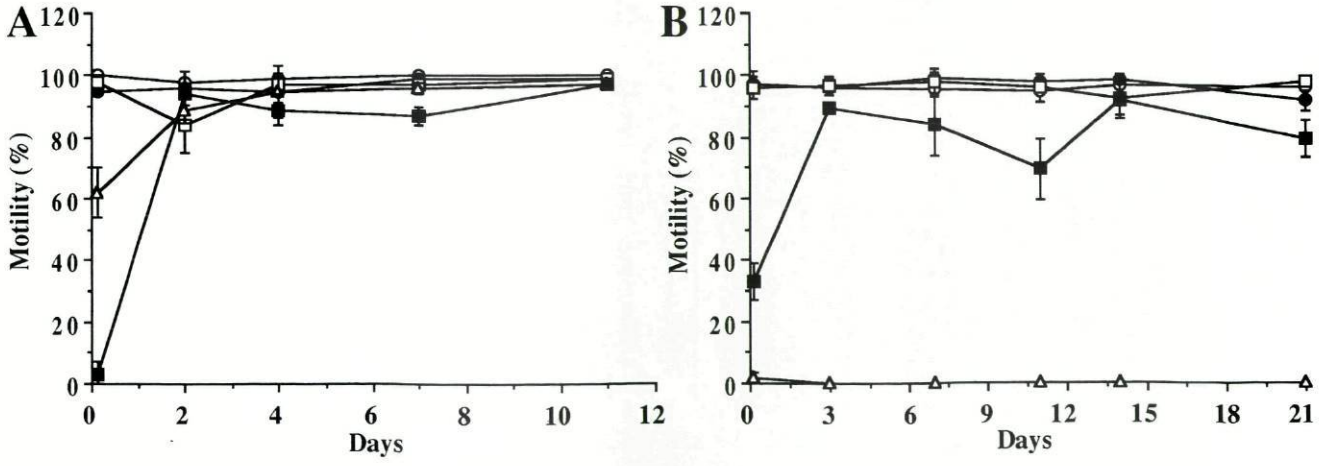


Fig. 5. Effects of copper on the motility of (*A*) *Amphidinium carterae* and of (*B*) *Prorocentrum micans* over time after the addition of the metal to exponentially growing cultures. Labile copper (nM)/total copper (μM): (*A*) open circles, 0 (control); filled circles, 58/0·16; open squares, 605/1·58; open triangles, 1640/3·94; filled squares, 1940/7·87. (*B*) open circles, 0 (control); filled circles, 43/0·79; open squares, 55/1·58; filled squares, 163/7·87; open triangles, 3160/15·8.

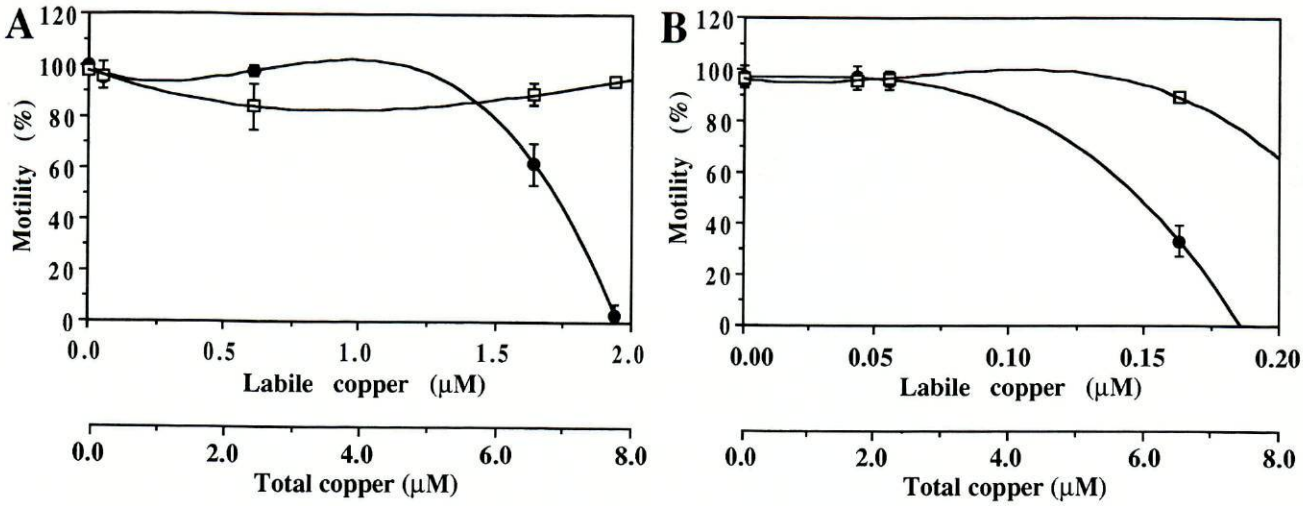


Fig. 6. The stress effect of copper on cell motility of (*A*) *Amphidinium carterae* and (*B*) *Prorocentrum micans* 3 h after the copper addition (filled circles) and showing recovery of cell motility (open squares) after 2 days (*A*) or 3 days (*B*).

micans, the concentrations of which increased 12 times in the most extreme case, i.e. when the copper concentration increased 640 times (from $5{\cdot}0 \times 10^{-9}$ to $3{\cdot}2 \times 10^{-6}$ M). However, as the zinc and the cobalt labile concentrations remained relatively low, even in the most extreme case ($\leqslant 1 \times 10^{-8}$ M), it seems reasonable to attribute only to copper the effects observed on the microorganisms.

As the number of growing cells when copper was added to the cultures differed significantly for the two species of dinoflagellate under investigation, the ratios of dissolved copper concentration (labile and total) to cell concentration (fmol per cell) were also calculated (see Table 2). When *A. carterae* cultures were exposed to 58 nM labile copper concentration (0·40 fmol dissolved labile copper per cell) and *P. micans* cultures were exposed to 5 nM copper concentration (2·0 fmol dissolved labile copper per cell) and to 43 nM labile copper concentration (4·5 fmol dissolved labile copper per cell), the results observed were similar to those obtained with the control cultures (Figs 1, 2).

However, higher copper concentrations limited the growth of cultures of both species. The negative effect on growth increased with the labile copper concentration. The exposure of *A. carterae* to 605 nM labile copper concentration (3·80 fmol dissolved labile copper per cell) induced a reduction of growth comparative to the control culture (Fig. 1) and a 45% increase in the cell doubling time after 4 days (Fig. 3*A*). In the same period of time, in 1·64 μM and 1·94 μM labile copper concentrations (respectively, 8·90 and 11·9 fmol dissolved labile copper per cell), growth was reduced even more.

Berland *et al.* (1976) studied the effects of copper and other heavy metals on 18 species of algae. The authors observed that 25 $\mu g\,dm^{-3}$ (0·39 μM) of total copper concentration caused toxic effects on *A. carterae* and that 100 $\mu g\,dm^{-3}$ (1·57 μM) was the minimum lethal concentration. Their study was carried out in an enriched seawater medium without EDTA. The larger labile copper fraction present in the cultures may explain the differences between these results and ours. Hawkins & Griffiths

Table 2. Total and labile copper concentrations and dissolved metal per cell in the various cultures of *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans*

Total copper					Dissolved copper (fmol per cell)	
($\mu g\,dm^{-3}$)	(μM)	pH	Labile copper (nM)	Cells cm^{-3}	Labile	Total
Amphidinium carterae						
10	0·16	9·8	58	144 046	0·4	1·1
100	1·58	9·8	605	157 244	3·8	10·0
250	3·94	9·8	1640	183 946	8·9	21·4
500	7·87	9·5	1940	163 240	11·9	48·2
Prorocentrum micans						
10	0·16	8·7	5	2 453	2·0	64
50	0·79	8·4	43	4 289	4·5	190
100	1·58	8·7	55	2 800	19·8	562
500	7·87	7·7	163	4 977	32·7	1580
1000	15·8	8·3	3160	7 791	406	2020

Table 3. Computed heavy metal labile fractions in the culture medium (see Table 1 for composition) for the range of total copper(II) concentrations used

Heavy metal	− log [heavy metal (μM)]				
Cu_{total}:	0·16	1·58	3·94	7·87	15·8
Amphidinium carterae					
Cu	7·24	6·22	5·79	5·71	–
Mn	5·82	5·80	5·77	5·72	–
Co	9·53	9·48	9·38	9·16	–
Zn	9·10	9·01	8·91	8·70	–
Fe	5·66	5·63	5·57	5·46	–
Prorocentrum micans					
Cu	8·3	7·4	7·3	6·8	5·5
Mn	5·82	5·81	5·80	5·71	5·64
Co	9·53	9·50	9·47	9·10	8·46
Zn	9·07	9·04	9·01	8·65	8·00
Fe	5·66	5·65	5·63	5·44	5·28

(1982) found a 50% inhibition of the growth rate of *A. carterae* at concentrations of the cupric ion of about 0·08 nM and complete inhibition of cell division at 0·2 nM. These values are much lower than those obtained by us, but as the initial population densities are significantly different (100-fold) the values become of about the same order of magnitude if the ratio of dissolved cupric ion concentration to cell number is considered.

P. micans exposed to 55 nM labile copper concentration (19·8 fmol dissolved labile copper per cell) showed reduced growth (Figs 2, 3*B*) (60% increase in the doubling time after 7 days of exposure to the metal). Labile copper concentrations in the range 0·163–3·16 μM (respectively, 32·7 and 406 fmol dissolved labile copper per cell) caused a pronounced impact on the growth of the cultures (Fig. 2), with an almost total inhibition of growth. The increase in the cell number of the cultures after a long exposure to 0·163 and 3·16 μM of labile copper may be due to experimental errors involved in sampling and, particularly, those inherent in the counting process (the separation of the two thecal plates of *P. micans* due to cell death increases the number of particles counted by the Coulter counter).

An interpretation of these results based on the labile copper concentration in the culture could suggest that the toxic effects of copper occur in *P. micans* at lower levels than in *A. carterae*. However, if the ratio of dissolved labile copper concentration to cell number is considered (currently in the literature this parameter is not analysed), the results are different, because the cell concentration was much higher in *A. carterae* cultures. For instance, similar ratios, of 3·80 fmol dissolved labile copper per cell for *A. carterae* and 4·5 fmol dissolved labile copper per cell for *P. micans*, induced toxic effects only in *A. carterae*. Because the toxicity of a metal is ultimately a function of its amount in and on the cells, which is hyperbolically related to the bioavailable metal in solution, it is also important to evaluate toxicity in terms of the amount of dissolved labile copper per cell. Studies where both the labile copper fraction and the cellular levels of the metal are analysed are under development in our laboratories; these may clarify the significance of this ratio in evaluation of toxicity.

The growth rate reduction of phytoplanktonic organisms grown in the presence of metals has been related mainly to the binding of the metal to the sulphydryl groups of enzymes, which are important for the regulation of cellular division (Fisher *et al.*, 1981).

The effect of the addition of copper on the protein content of *P. micans* (Fig. 4) was particularly evident at labile copper concentrations of 0·163 μM (32·7 fmol dissolved labile copper per cell) and 3·16 μM (406 fmol dissolved labile copper per cell), with a definite reduction in protein. At the other labile copper concentrations studied, the protein content varied between 400 and 700 pg per cell during the 14 days of exposure to the metal. The reduction in protein concentration may be due to copper inhibition of photosynthesis and respiration. The sensitivity of photosynthetic and mitochondrial membranes to heavy metals, especially copper, has been described previously (Sicko-Goad, 1982). Lage *et al.* (1991) observed copper-induced ultrastructural alterations of the photosynthetic and Golgi membranes of *P. micans* as well as, in some cells, an increase in vacuolation and membrane disruption.

The motility response of the two species of dinoflagellate to copper was very similar. *A. carterae* and *P. micans* exposed to labile copper concentrations up to, respectively, 605 nM and 55 nM (both corresponding to 1·58 μM total copper concentration) showed no visible changes in cell motility (*c.* 100% of the cells were motile) (Fig. 5). Higher copper concentrations caused a significant reduction in cell motility after a few hours of exposure to the metal. Three hours after the addition of 3·94 μM total copper (1·64 μM labile copper) and 7·87 μM total copper (1·94 μM labile copper), the motility of *A. carterae* cells decreased by, respectively, *c.* 40% and 100% (Fig. 5*A*). In

P. micans, 7·87 μM total copper concentration (0·163 μM labile copper) caused a 70% reduction in cell motility (Fig. 5*B*). After this initial effect, cell motility increased (Fig. 6). However, the cells showed a lower degree of motility and a greater photosensitivity (losing more quickly their ability to swim) when exposed to the light of the microscope. The 15·8 μM total copper concentration (3·16 μM labile copper, about 20-fold higher than the other concentrations) induced total and irreversible inhibition of motility in *P. micans*.

The high stress response observed after 3 h of exposure of the cells to copper is probably due to the high bioavailability of the metal in the cultures in this initial period of time during which the labile copper fraction may be very similar to the total copper concentration, as the kinetics of copper–EDTA complex formation in seawater are relatively slow (Anderson & Morel, 1978). The formation of this complex reduces the copper bioavailability in the culture, which may contribute to the observed recovery in cell motility.

The present results are in agreement with those obtained by Anderson & Morel (1978). These authors observed that the addition of copper solution (which resulted in a concentration of $2{\cdot}00 \times 10^{-2}$ nM copper(II) ions) to cultures of *Gonyaulax tamarensis* Lebour grown in a medium containing 5×10^{-5} M EDTA caused high cell stress (100% non-motile cells) after 2 h of copper exposure, and a significant decrease in the stress after 24 h. However, similar toxic effects were not found either when the metal was added in a copper–EDTA form or when the chemical equilibrium between copper and the medium had been established for 24 h before inoculation.

None of the copper concentrations tested was lethal to *A. carterae*. The 15·8 μM total copper concentration (*c.* 3·16 μM labile copper; 406 fmol dissolved labile copper per cell) was found to be lethal to *P. micans* as it showed growth inhibition, lack of cell motility and a great reduction in cell protein concentration with no recovery during 21 days.

At 7·87 μM total copper concentration (163 nM labile copper; 32·7 fmol dissolved labile copper per cell), after the large initial effect, *P. micans* recovered its motility (Fig. 6*B*) but not, over the time interval studied, its capacity for division as indicated by the almost constant cell number (Fig. 2) and the unchanging protein content observed (Fig. 4). *A. carterae* exposed to 3·94 and 7·87 μM total copper concentrations (respectively, 1·64 and 1·94 μM labile copper; 8·90 and 11·9 fmol dissolved labile copper per cell) showed an almost total recovery of cell motility (Fig. 6*A*) but only a partial recovery of cell density (Fig. 1). Sandmann & Böger (1980) have referred to physiological evidence of copper adaptation of *Scenedesmus acutus* (Meyen) chad., 24 h after metal exposure.

When exposed to higher sublethal copper levels, some organisms might have lost their thecal plates and it is also probable that, as a consequence of the initial copper impact, some cells died and released various substances and organelles into the culture medium which could have bound the metal and, therefore contributed to the decrease in the labile copper fraction. Reduction of copper bioavailability and cellular adaptation to the metal are plausibly related to the subsequent recovery of the cultures.

It is known that in the natural environment concentrations of metals increase, often dramatically, in coastal waters due to input from continental sources. Thus, some situations could be similar to our experimental assay, with the cells suddenly exposed to very high levels of copper. Although the values of total soluble copper determined in the seawater north of Porto were lower than the concentrations that induced toxic effects in *A. carterae* and *P. micans in vitro*, at the moment of the discharge of the effluents the levels should be much higher and probably capable of inducing comparable toxicity.

Several aspects may explain the difference in sensitivity to copper shown by these two dinoflagellates. The number of amphiesmal vesicles and the presence or absence of thecal plates are the main differences between the cell covering of the two species (Klut *et al.*, 1985, 1989). *A. carterae* is an athecate species while *P. micans* has two thick, prominent thecal plates composed of cellulose-like polysaccharide that can be a barrier to copper absorption as well as a site for its deposition (Lage *et al.*, 1993). Their sizes are also very different, *A. carterae* being much smaller than *P. micans*. Although not quantified, the surface area/volume ratio should not be discounted when comparing the sensitivity of different species to metals. Other mechanisms are also probably involved in the cellular response to the metal, namely detoxifying processes (Hughes & Poole, 1989), which are known to take different pathways in different organisms and are under study in our laboratories.

Acknowledgements

We wish to thank the 'Laboratório de Microbiologia Experimental do Instituto Nacional de Saúde, Dr Richardo Jorge', Lisboa, for the Coulter counter facilities, Dr Teresa Serra for copper quantification in seawater samples and the technical collaboration of the students of the 1991/92 Seminar on Microbiology. We also thank Dr A. Davies for his careful review of the manuscript and helpful criticisms and Professor J. Dodge for reading the manuscript. Financial support for this work was provided by Instituto Nacional de Investigação Científica–INIC.

References

Anderson, D.M. & Morel, F.M.M. (1978). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.*, **23:** 283–295.

Antia, N.J. & Klut, M.E. (1981). Fluoride addition effects on euryhaline phytoplankter growth in nutrient-enriched seawater at an estuarine level of salinity. *Bot. Mar.*, **24:** 147–152.

Berland, B.R., Bonin, D.J., Kapkov, V.I., Maestrini, S.Y. & Arlhac, D.P.

(1976). Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **282:** 633–636.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72:** 248–254.

FISHER, N.S., JONES, G.J. & NELSON, D.M. (1981). Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **51:** 37–56.

FLORENCE, T.M. (1982). The speciation of trace elements in water. *Talanta*, **29:** 345–364.

GONÇALVES, M.L.S., SIGG, L. & STUMM, W. (1987). Possibilities of voltammetric methods for speciation in the presence of particles. *Portugal Electroquim. Acta*, **4:** 15–32.

HARRISON, P.J., ROSEMARY, E.W. & TAYLOR, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.*, **16:** 28–35.

HAWKINS, P.R. & GRIFFITHS, D.J. (1982). Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. *Bot. Mar.*, **25:** 31–33.

HOGFELDT, E. (1982). *Stability Constants of Metal Ion Complexes*, Part A, *Inorganic Ligands*. Pergamon Press, Oxford. p. 217.

HUGHES, M.N. & POOLE, R.K. (1989). *Metals and Micro-organisms*, 1st edition. Chapman and Hall, London.

KAYSER, H. (1976). Waste-water assay with continuous algal cultures: the effect of mercuric acetate on the growth of some marine dinoflagellates. *Mar. Biol.*, **36:** 61–72.

KLUT, M.E., BISALPUTRA, T. & ANTIA, N.J. (1981). Abnormal ultrastructural features of a marine dinoflagellate adapted to grow successfully in the presence of inhibitory fluoride concentration. *J. Protozool.*, **28:** 406–414.

KLUT, M.E., ANTIA, N.J. & BISALPUTRA, T. (1984). Some properties of a fluoride-resistant mutant of the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Phycologia*, **23:** 301–310.

KLUT, M.E., BISALPUTRA, T. & ANTIA, N.J. (1985). Some cytochemical studies on the cell surface of *Amphidinium carterae* (*Dinophyceae*). *Protoplasma*, **129:** 93–99.

KLUT, M.E., BISALPUTRA, T. & ANTIA, N.J. (1989). Some details on the cell surface of two marine dinoflagellates. *Bot. Mar.*, **32:** 89–95.

LAGE, O.M., PARENTE, A.M. & SALEMA, R. (1991). Ultrastructural changes induced by copper in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *Coloquio Franco-Ibérico di Microscopía Electrónica*, Barcelona, pp. 134–135 (abstract).

LAGE, O.M., PARENTE, A.M., LEBRE, M.C. & SALEMA, R. (1993). Ultracytochemical localization of heavy metal in *Prorocentrum micans* Ehr. exposed to toxic levels of copper. *Pollution and the Environment Meeting*, Plymouth. B9 (abstract).

LUND, W., HELBAK, I.A. & SEIP, H.M. (1990). Studies of the complexation properties of aquatic humic material by differential pulse polarography. *Sci. Total Environ.*, **92:** 269–281.

MARTELL, A.E. & SMITH, R.M. (1974). *Critical Stability Constants*, Vol. 1, *Amino Acids*. Plenum Press, New York, pp. 204–207.

MATTHYS-ROCHON, E. (1980). Action de l'isopropyl-*N*-phényl carbamate sur un dinoflagellé libre: l'*Amphidinium carterae* Hulburt. Effects sur la croissance et la dinomitose. *Crypt. Algol.*, **1:** 3–17.

MORRISON, G.M.P., BATLEY, G.E. & FLORENCE, T.M. (1989). Metal speciation and toxicity. *Chemistry in Britain*, **25:** 791–794.

NRIAGU, J.O. & PACYNA, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134–139.

PREVOT, P. (1978). Sensibilité au cadmium d'un dinoflagellé libre: *Prorocentrum micans* E. In *IVes Journées Étud. Pollutions*, 347–350. Antalya, C.I.E.S.M.

PREVOT, P. & SOYER, M.-O. (1985). Action of the organophosphorus insecticide parathion on the free-living marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrbg. *J. Protozool.*, **32:** 626–633.

PREVOT, P. & SOYER-GOBILLARD, M.-O. (1986). Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, *Prorocentrum micans* Ehrbg. and *Crypthecodinium cohnii* Biecheler. *J. Protozool.*, **33:** 42–47.

SANDMANN, G. & BÖGER, P. (1980). Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **98:** 53–59.

SICKO-GOAD, L. (1982). A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure. *Protoplasma*, **110:** 73–86.

SILVERBERG, B.A., STOKES, P.M. & FERSTENBERG, L.B. (1976). Intracellular complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.*, **69:** 210–214.

SOYER, M.-O. & PREVOT, P. (1981). Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *J. Protozool.*, **28:** 308–313.

STUMM, W. & MORGAN, J. (1981). *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. Wiley, New York, pp. 242 and 354.

SUNDA, W. & GUILLARD, R.R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **34:** 511–529.

TAYLOR, F.J.R. & POLLINGHER, U. (1987). Ecology of Dinoflagellates. In *The Biology of Dinoflagellates* (Taylor, F.J.R., editor), 398–529. Blackwell Scientific, Oxford.

TURNER, D.R., VARNEY, M.S., WHITFIELD, M., MANTOURA, R.F.C. & RILEY, J.P. (1987). Electrochemical studies of copper and lead complexation by fulvic acid. II. A critical comparison of potentiometric and polarographic measurements. *Sci. Total Environ.*, **60:** 17–34.

VISVIKI, I. & RACHLIN, J.W. (1991). The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine algae *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20:** 271–275.

WESTALL, J.C. (1979). MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC. Internal Report, EAWAG, Dubendorf.

(Received 12 December 1993; revised and accepted 1 June 1994)

Trabalho 2

EFEITOS DA TOXICIDADE DO COBRE(II) NO DINOFLAGELADO MARINHO *AMPHIDINIUM CARTERAE*: INFLUÊNCIA DA ESPECIAÇÃO DO METAL

Lage,O.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T. S.D., Parente, A. M. & Salema, R. Toxicity effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carerae*: influence of metal speciation. **Eur. J. Phycol.** 32 (em publicação)

Toxicity effects of copper (II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*: influence of metal speciation

O. M. LAGE[1], H. M. V. M. SOARES[2]*, M. T. S. D. VASCONCELOS[2], A. M. PARENTE[1] AND R. SALEMA[1]

[1] *Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal*
[2] *LAQUIPAI, Departamento de Química, Faculdade de Ciências da U.P., Rua do Campo Alegre 687, 4150 Porto, Portugal*

(Received 18 September 1995; accepted 5 July 1996)

The influence of copper(II) concentration and speciation on the growth of *Amphidinium carterae* in batch culture in a modified ESAW medium was evaluated by two different experimental designs: (i) copper(II) was added to the cultures 2 h after cell inoculation and (ii) copper(II) had a 24 h pre-equilibration period in the medium before cell inoculation. To complement the biological data, the following information on the chemical/biological system was obtained: (a) computational speciation of the culture medium under chemical equilibrium conditions: (b) total and electrochemically labile copper concentrations in the culture medium during the toxicity experiments; and (c) cellular levels of copper. The labile fraction of copper was measured by potentiometric stripping analysis (PSA) at a deposition potential (E_d) of − 0·3 V. At this E_d the dissociation of Cu–EDTA complexes was negligible. In both kinds of experiments the effects of copper were more evident after 4 days than after 7 or 10 days of exposure. When compared with situation (ii) pronounced toxic effects were observed under situation (i): (1) *A. carterae* growth rate was affected at lower copper concentration and in a more acute way: (2) the cells were exposed to significantly higher levels of labile copper (2- to 3-fold more than in situation (ii) for 13·4 μM total copper) and (3) after 2 h of exposure to the metal the copper sorbed by the cells was about 2-fold higher. These results provide evidence for the importance of kinetic parameters in toxicity studies. Experimental copper lability together with speciation calculations provided additional evidence that the bioavailable copper and its cellular toxicity are directly related to the labile metal concentration. This is higher than but directly proportional to the initial free metal concentration in the medium, as was experimentally verified. PSA-derived copper lability provided a reasonable indicator of metal bioavailability to *A. carterae* in this synthetic seawater medium. A first response of *A. carterae* to copper toxicity is the release of the metal due to re-equilibration between copper bound to the cell surface and to the ligands in the medium and/or efflux. A different mechanism must subsequently be activated, allowing growth despite the relatively high cellular levels of copper observed.

Keywords: *Amphidinium carterae*, copper(II), potentiometric stripping analysis, speciation, toxicity

Introduction

The coastal seawater near Porto, Portugal (41° 12′ N), has been subjected over the last few decades to increasing levels of pollution as a result of great urban and industrial expansion reported initially by Benoliel in 1981. Effluents from various industries, a refinery, domestic sewage, agriculture, the input of two polluted rivers, the Douro and Leça, and a harbour with a very heavy traffic of commercial ships and oil tankers are sources of ecological disequilibrium in this area. During 1987 and 1988 dissolved concentrations of four heavy metals in seawater were measured at various sampling sites; copper was present at levels characteristic of polluted coastal waters (7·7–130 nM). High levels of dissolved copper were also found in 1994–5, in the same region.

Dinoflagellates, one of the most important primary producer group of the phytoplankton, are generally unicellular organisms that are directly exposed to aquatic pollutants. They are believed to be very sensitive to copper (Taylor & Pollingher, 1987). As a common representative of this group in our coastal waters, a benthic naked dinoflagellate species, *Amphidinium carterae* Hulburt, was chosen as a biological model for assessing the influence of copper(II) speciation on copper toxicity to phytoplankton.

Copper toxicity has been extensively studied in both freshwater and marine phytoplankton (Davies, 1978; De Filippis & Pallaghy, 1994; Price & Morel, 1994). But it was only after the work of Sunda & Guillard (1976) that copper toxicity was functionally related to free cupric ion activity and attention was paid to the chemical speciation of the metal. Although copper toxicity to algae is still considered by some authors to be dependent only on the concentration of the free metal (e.g. Menkissoglu & Lindow, 1991; Morgan & Stumm, 1991; Verweij *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1993), others have pointed out the importance of complexed copper (the labile species) on copper toxicity (e.g. Price *et al.*, 1989; Sunda, 1989;

* Permanent address: Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, P 4099, Porto Codex, Portugal.

Buckley, 1994; Tubbing *et al.*, 1994). As early as 1977, Andrew *et al.* considered the importance of the inorganic ligands in their study of copper toxicity in the water flea *Daphnia magna*. Fisher & Frood (1980) considered that phytoplankters, such as *Asterionella japonica*, respond principally to polarographically labile (i.e. free or weakly complexed) forms of toxic metals in solution. It is now well established that the chemical forms in which the metal occurs in the medium influence its toxicity strongly because the bioavailable fraction depends on the relative affinity of the metal for the different ligands present in the solution and on the surface of the organisms.

In a previous paper (Lage *et al.*, 1994), the effects induced *in vitro* by copper(II) on some aspects of the physiology and biochemistry of *A. carterae* and *Prorocentrum micans* were analysed. Metal speciation was estimated by speciation calculation, attending to the initial composition and the pH of the medium. In the present study more emphasis was given to chemical information as a fundamental complement to biological data related to the toxicity of copper to *A. carterae*. Besides total copper(II) and computational speciation under chemical equilibrium conditions, cellular levels of copper and electrochemically labile copper were determined in the toxicity experiments. Labile copper in the culture medium was measured by potentiometric stripping analysis (PSA), at a deposition potential of − 0·3 V. It was the first time that this technique has been used for this purpose, in spite of its suitability for trace speciation determination in media of high salinity (Soares & Vasconcelos, 1995).

The toxicity of copper was evaluated under two different experimental designs where the chemical impact of copper on the organisms was expected to be different (Anderson & Morel, 1978; Price *et al.*, 1989): (i) copper(II) was added to the cultures 2 h after cell inoculation; (ii) cells were added to the media in which copper(II) had been allowed to pre-equilibrate for 24 h.

Situation (i) may occur in natural environments, particularly in coastal seawater, at the moment of pollutant discharges from different sources. In this situation, the organisms may be exposed to high levels of copper in the free/weakly complexed forms ($Cu(II)_{labile}$), the ligands from their surfaces (L_{cell}) competing directly for the metal with the abiotic complexing agents ($L_{seawater}$) present in the seawater:

$$\begin{array}{rcl} & +\,L_{cell} & \longrightarrow\ Cu(II)L_{cell} \\ Cu(II)_{labile} & & \vdots \\ & +\,L_{seawater} & \longrightarrow\ Cu(II)L_{seawater} \end{array} \qquad (1)$$

L_{cell} and $L_{seawater}$ may be bound to other cations (e.g. Ca^{2+}, Mg^{2+} and heavy metals) at the moment of copper(II) input, and so the speciation of the biotic and abiotic ligands also influences the kinetics of copper uptake by the cells (Eq. 1) and, therefore, the effects of the metal in the organisms. For instance, it is well documented that in seawater EDTA and similar ligands are present mainly as Ca complexes, the dissociation kinetics of which are relatively slow (Anderson & Morel, 1978; Turner *et al.*, 1987; Hering & Morel, 1988, 1989, 1990). Thus, copper complexes are initially formed with the weaker ligands. Final pseudo-equilibrium metal speciation is attained slowly through a series of ligand- and metal-exchange reactions (Hering & Morel, 1989).

Experimental design (ii) roughly simulates a frequent situation in the natural environment when a pseudochemical equilibrium in the seawater is established. In this situation, the majority of the metal is already bound to $L_{seawater}$ when it contacts the cells, and therefore the copper sorption by the organisms implies the following substitution reaction:

$$Cu(II)L_{seawater} + L_{cell} \longrightarrow Cu(II)L_{cell} + L_{seawater} \qquad (2)$$

The extent to which this reaction occurs depends on its kinetic characteristics, on the relative thermodynamic stabilities of the species involved and on their relative concentrations. Recent literature mentions that more than 80% (and usually as much as 99%) of dissolved copper in surface waters is organically complexed (Donat *et al.*, 1994). In the present study, the percentage of free copper (II) was < 0·05% at all copper concentrations tested while copper (II) complexed with EDTA varied between 80·1% and 99·5%.

Materials and methods

All solutions including the culture medium were prepared with double-distilled, deionized water ($bddH_2O$) and *pro analysis* reagents or equivalent. To avoid metal contamination, all material was washed with 1 : 1 nitric acid and $bddH_2O$. The culture medium was sterilized by filtration through a cellulose acetate filter with a pore size of 0·45 μm to prevent possible precipitation during autoclaving.

Organisms and culture conditions

Amphidinium carterae (isolate 39) was kindly supplied by Dr Estela Sousa e Silva (Instituto Nacional de Saúde, Dr Ricardo Jorge). Stock cultures were maintained in a modified ESAW (Harrison *et al.*, 1980) artificial seawater medium, at 19 ± 1 °C, in a 12 : 12 h light/dark regime and a photon flux density of about 30 $\mu mol\, m^{-2}\, s^{-1}$. As silicon is not an essential nutrient for the majority of dinoflagellate species, including *A. carterae*, silicates were omitted from the ESAW composition and 25 mM HEPES was added to stabilize the pH at 8·0 (approximately the value of seawater). Manipulation of the cultures was carried out under aseptic conditions; checks for presence of bacteria in the cultures found the numbers of bacteria to be negligible.

Toxicity experiments

Two experimental procedures were assayed in parallel: (i)

metal solution was added to the cultures 2 h after cell inoculation, henceforth designated 'without pre-equilibration'; (ii) copper(II) was added to the medium 24 h before cell inoculation, here termed 'with pre-equilibration'. In both cases, different volumes of 0·16 mM copper(II) chloride in 5 mM HCl were added to the medium (ii) or to unialgal batch cultures (i) of *A. carterae* in exponential growth phase in order to cover the range of metal concentrations between 0·898 and 15·7 μM. The addition of aliquots of copper(II) chloride in 5 mM HCl did not alter the pH of the buffered medium. As controls, the cells were cultivated in the same medium but without copper. The experiments, with an initial cell concentration of about $1{\cdot}5 \times 10^4$ cells dm^{-3}, were carried out for 10 days in 1-litre polystyrene and polycarbonate bottles to avoid metal adsorption to the glass. All experiments were run in triplicate.

Growth of *A. carterae* cultures was followed by cell counting of neutral formaldehyde-fixed samples in a Coulter counter (model ZM) during the 10 days of the experiment. The initial cell concentration was measured in each sample flask after both cell inoculation and addition of copper. Growth rates (k, divisions per day) were calculated using the initial cell concentration and that at days 4, 7 or 10 of growth.

Chemical determinations

Metal speciation was evaluated in two ways: (a) computational simulations of chemical equilibria in the culture medium before cell inoculation and (b) determination of the levels of electrochemically labile copper in the culture media during the experiments.

Computational speciation simulation was performed with the program MICROQL (Westall, 1979), based on the initial composition and the pH of the medium and the major side equilibria, namely complexes of EDTA with copper and other metals, and copper–inorganic ligand complexes, as previously described (Lage *et al.*, 1994). HEPES buffer, the capacity of which to complex copper is assumed to be negligible (Good & Izawa, 1972), was not considered in the chemical equilibrium calculations. Due to the complexity of the medium, the simulations involved some approximations: (i) some minor equilibria were not considered; (ii) the stability constants used (Martell & Smith, 1974; Stumm & Morgan, 1981; Hogfeldt, 1982) were not determined under identical experimental conditions: (iii) only equilibria in the homogeneous phase (liquid phase) were considered; and (iv) exudates and dead cells which may be potential ligands in the culture medium after cell inoculation were neglected. Therefore, the data obtained through the computational simulations should be considered as an approximate estimate of the speciation of copper in the culture medium.

Electrochemically labile copper was determined by PSA at a deposition potential (E_d) of $-0{\cdot}3$ V versus Ag/AgCl (s) 3 M KCl and a deposition time of 3 min in an Eco Chemie Autolab multimode polarograph, with an IME module connected to a MTEK computer and a Metrohm 663 VA device which included a static mercury drop working electrode. Details of the method have been described previously (Soares & Vasconcelos, 1995). As oxidant for the redissolution phase, 3·15 or 3·78 μM mercury(II) (added as mercury chloride) was used. Labile copper was determined in the culture medium after removal of the cells by centrifugation. The total copper in the culture medium was determined by differential pulse anodic stripping voltammetry at an E_d of $-0{\cdot}7$ V versus Ag/AgCl (s) 3 M KCl, after acidification, with the same instrumentation used for PSA.

Cellular levels of copper were determined by atomic absorption spectroscopy with electrothermal atomization in a Perkin-Elmer 4100 ZL, coupled to an automatic sampler AS-70 of the same brand. For this purpose, 50 cm^3 of culture were filtered under vacuum through a 0·45 μm nitrocellulose filter and the cells retained on the filter were rapidly (a few seconds) washed with 30 cm^3 of bddH_2O. With this quick wash, copper(II) retained in the filtration system was removed and cell lysis was prevented (as was experimentally verified). Otherwise, if any loss of copper occurred due to release from the cells, cellular copper would be underestimated. Subsequently, the filters with the cells were dried at 60 °C and digested, with concentrated nitric acid, in closed vessels by microwaves (Millestone, MLS-1200 Mega system, coupled to an exhaust EM-30) for successive periods of 5 min at 250, 400 and 500 W.

The results of the experimental lability determinations were analysed with ANOVA or Student's paired t-test (Miller & Miller, 1994).

Table 1. Computation of labile metal concentrations in ESAW medium for the different copper levels studied

Total Cu concentration (μM)	Labile metal[a] (nM)		
	Mn	Zn	Cu
0·898	1585	2·09	4·17
3·45	1778	3·09	24·0
7·87	2089	6·31	132
11·8	2344	36·3	1030
13·4	2400	52·5	1730
15·7	2400	77·6	3130

[a]Free metal ion plus metal bound to inorganic ligands.

Results and discussion

Copper speciation

With pre-equilibration. By means of a speciation programme, the percentages of copper and other metallic cations in EDTA complexes, inorganic complexes and the hydrated form were estimated (Table 1). For copper

Table 2. Values of labile copper (μM) both calculated and determined by PSA in ESAW medium where copper(II) was pre-equilibrated for 24 h, and the percentages of dissociated Cu–EDTA complexes

$[Cu]_t$ (μM)	$[Cu]_t$/[EDTA]	$[Cu]_{labile}$ [a] computational	$[Cu]_{labile}$ [b] PSA	% Cu–EDTA dissociated[c]
7·87	0·53	0·13	0.34 ± 0.03	2·7
13·39	0·90	1·73	1·7 ± 0·2	0·0
15·7	1·06	3·13	3·4 ± 0·5	2·0

$[Cu]_t$, total copper concentration. [EDTA], EDTA concentration.
[a]Free metal plus inorganic complexes. [b]Mean values and standard deviations, $n \geq 4$. [c]$([Cu\text{–}EDTA]_{calculated} - [Cu]_{inert\ by\ PSA})/[Cu\text{–}EDTA]_{calculated}$.

concentrations $\leq$ 7·87 μM, almost all the copper (> 98·3%) was complexed by EDTA. For 3·45 μM total copper, the sum of the free metal (49·8 pM) plus that in the inorganic complexes (the estimated labile copper) was only 24 nM (Table 1). Effectively, EDTA (14·9 μM) was in excess in the medium for total copper and for the other metals which form stable complexes with EDTA, namely Fe(III), Mn(II) and Zn(II). In fact, the sum of the total concentrations of these species was only 9·5 μM. For total copper concentrations higher than 7·8 μM, the labile copper fraction increased exponentially with corresponding total copper values (Table 1). It should be noted that the free copper concentration increased proportionally to the respective labile concentration (Fig. 1).

When total copper increased, the competitive effect of this metal for EDTA became progressively more important, displacing other metals complexed with it, thus increasing the respective labile fraction. Nevertheless, the increases in the labile levels of these metals were much less than the increase in levels of labile copper (see the results for Mn(II) and Zn(II) in Table 1).

Electrochemical copper lability was measured in the medium 24 h after copper addition (7·87, 13·4 or 15·7 μM) to the medium but before cell inoculation. The measured labile copper was practically concident with the calculated labile metal (free plus inorganic complexes), i.e. the percentage dissociation of Cu–EDTA complex was negligible (Table 2). These results suggest that PSA copper lability, at − 0·3 V E_d, provides a reasonable indicator of the labile metal in the culture medium. Fig. 2 illustrates, for 13·4 μM total copper, the variation in the electrochemical labile fractions observed during the toxicity experiments. This figure shows that the labile copper concentration remained almost constant throughout the experiment, even before, and 2 h after, cell inoculation ($P \geq 0.01$).

Without pre-equilibration. At the moment of the addition of free copper to the cultures, almost all the EDTA present in the medium was complexed with alkaline earth and other heavy metals and, therefore, the bioavailable copper fraction was relatively high, as discussed above (Eq. 1). As the dissociation kinetics of EDTA complexes are relatively slow (Turner *et al.*, 1987; Hering & Morel, 1988, 1989) it was only after a certain period of time that the equilibrium between copper and EDTA, a very stable complex, was established (Hering & Morel, 1988). Additional experimental support for this interpretation was obtained with the PSA measurements. During the first hour of contact with the metal, the cells were exposed to significantly ($P < 0.01$) higher levels of labile copper (2- to 3-fold greater than those observed with pre-equilibration) and, from the first to the

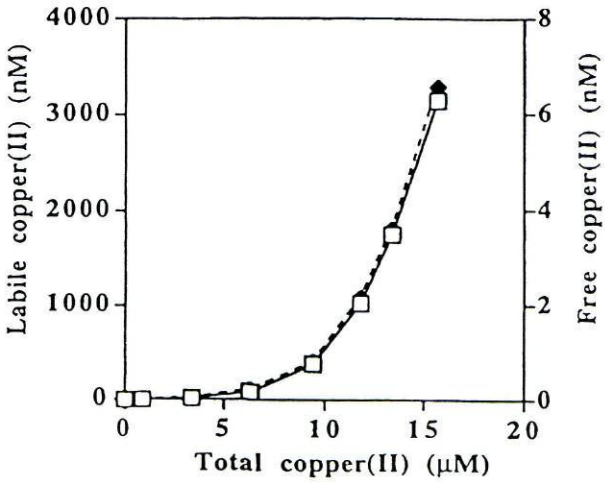


Fig. 1. Variation in calculated labile (squares) and free (diamonds) copper(II) concentrations with the increase in the total copper(II) concentrations assayed.

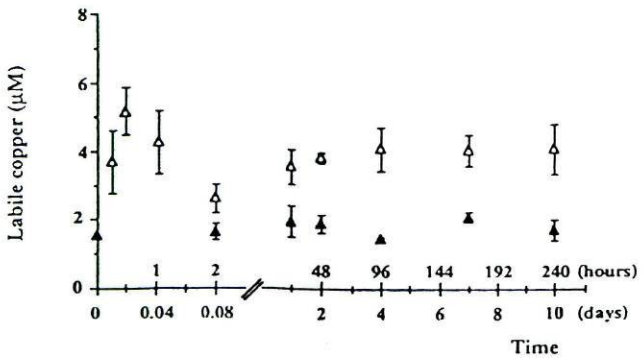


Fig. 2. Variation of labile copper concentrations measured by PSA, at E_d of − 0·3 V, in the culture medium of *A. carterae* exposed to 13·4 μM total copper. Mean values and standard deviations (n = 3) are given. Experimental design: filled triangles, with pre-equilibration; open triangles, without pre-equilibration.

second hour, the labile copper significantly decreased ($P < 0{\cdot}05$). These results are interesting, and a labile copper fraction higher than that observed with pre-equilibration, during the first hour, may be explained by the lack of the above-mentioned chemical equilibrium in the medium. In the subsequent days, the treatment without pre-equilibration showed labile copper levels higher (about 2-fold) than those measured with pre-equilibration ($P < 0{\cdot}05$). The difference in the labile copper fractions between the two experimental designs observed after the initial pseudo-equilibration period may be due to the toxic effect of copper; this may have induced some cells to burst with subsequent release of organic ligands and cell constituents into the medium and/or excretion of cellular exudates. This interpretation implies that copper forms weaker (and more labile) complexes with biological ligands than with EDTA.

Biological effects

The effect of copper in *A. carterae* was evaluated by the analysis of growth rates calculated from the increase in cell concentration after 4, 7 or 10 days of exposure to different levels of the metal. Fig. 3 shows the results obtained at days 4 and 7. The results at day 10 are not shown due to their similarity with those at day 7. Growth rates are expressed as percentages of the controls, to minimize the differences among the various experiments performed on different days. Total copper up to 3·54 μM appeared not to interfere with the growth of *A. carterae*. Effects of copper were evident for concentrations higher than 6·19 μM (without pre-equilibration) or 7·87 μM (with pre-equilibration). Generally, in both type of experiments the effects of copper were more pronounced after 4 days of exposure. After 7 days, a tendency of the growth rate of *A. carterae* to recover was clearly evident except for 15·7 μM total copper and particularly without pre-equilibration. At this concentration, *A. carterae* was observed to form cysts, with a high percentage viability, during the 10 days of exposure to the metal (Lage *et al.*, unpublished results). Growth rates comparable to control levels (near 100%) were obtained after 10 days in all the other copper concentrations assayed.

In previous work (Lage *et al.*, 1994) the importance of relating the levels of labile copper to the number of cells in the culture, that is, the analysis of the amounts of labile copper available per cell, was raised. In Fig. 4, PSA labile copper concentration in the medium, the amount of labile copper available per cell and the growth (percentage of cell number relative to controls on each day of the experiment, i.e. comparative cell yield) are shown. These results were obtained at 13·4 μM total copper concentration. For both experimental designs, the effect of copper on the growth (cell number) of *A. carterae* was also more evident after 4 days of exposure to the metal. The levels of labile copper in the culture remained almost constant throughout the experiment, and thus did not explain the differences in growth observed over time. As

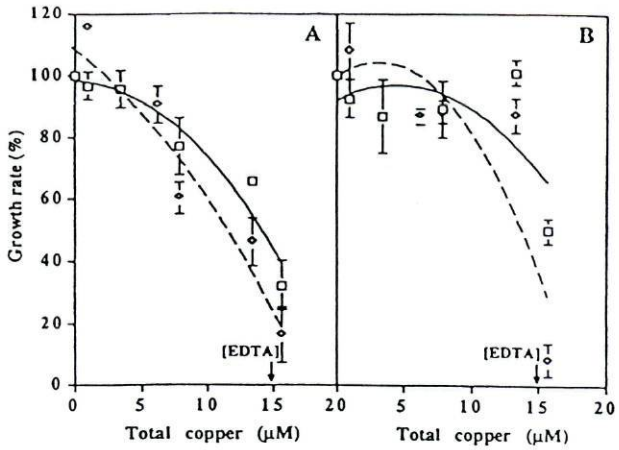


Fig. 3. Influence of copper on the growth rate of *A. carterae* (% relative to the controls) after 4 days (*A*) and 7 days (*B*) of exposure to increasing metal concentrations. The concentration of EDTA in the culture medium is also indicated. The toxic effects of copper were more evident after 4 days of exposure in the situation without pre-equilibration, and occurred even for copper concentrations lower than EDTA concentration. Mean values and standard deviations ($n = 3$) are given. Experimental design: squares, with pre-equilibration; diamonds, without pre-equilibration.

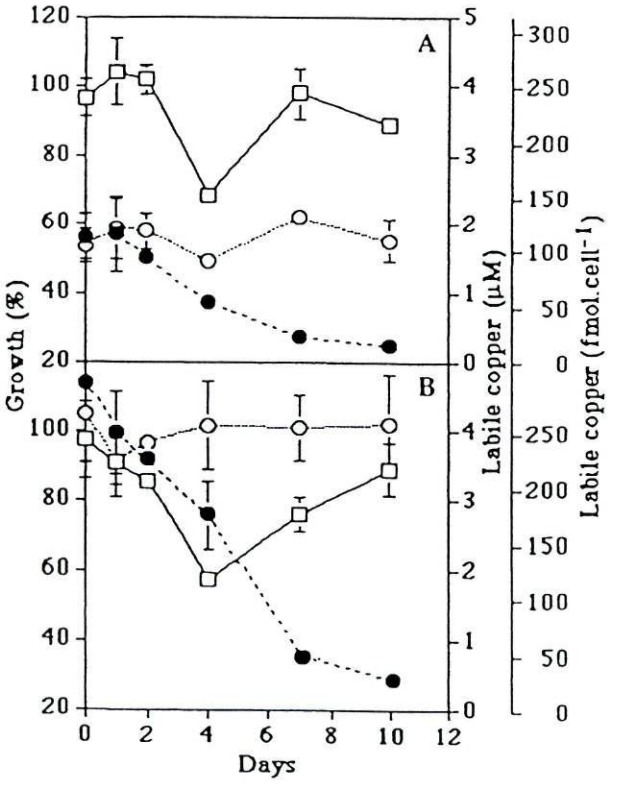


Fig. 4. Relationship between growth (as % of cell number in control culture for each day) of cultures of *A. carterae* (squares) exposed to 13·4 μM total copper and the levels of labile copper measured by PSA, at E_d of − 0·3 V, in the medium, expressed both in μM (open circles) and in fmol per cell (filled circles), in the two situations—(*A*) with pre-equilibration, (*B*) without pre-equilibration—during the 10 days of the experiment. Mean values and standard deviations ($n = 3$) are given.

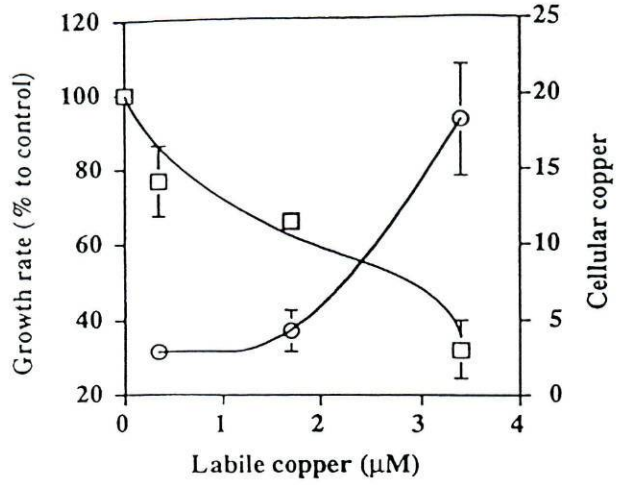


Fig. 5. Relationship between labile copper measured by PSA at E_d of $-0{\cdot}3$ V and the levels of cellular copper (circles) expressed as the ratio of moles of copper per cell between treated and control cells, in the situation with pre-equilibration, 2 h after exposure of the cell to the metal. The initial impact of copper on the growth rate (squares) of *A. carterae* was evaluated after 4 days of exposure to the metal. Mean values and standard deviations ($n = 3$) are given.

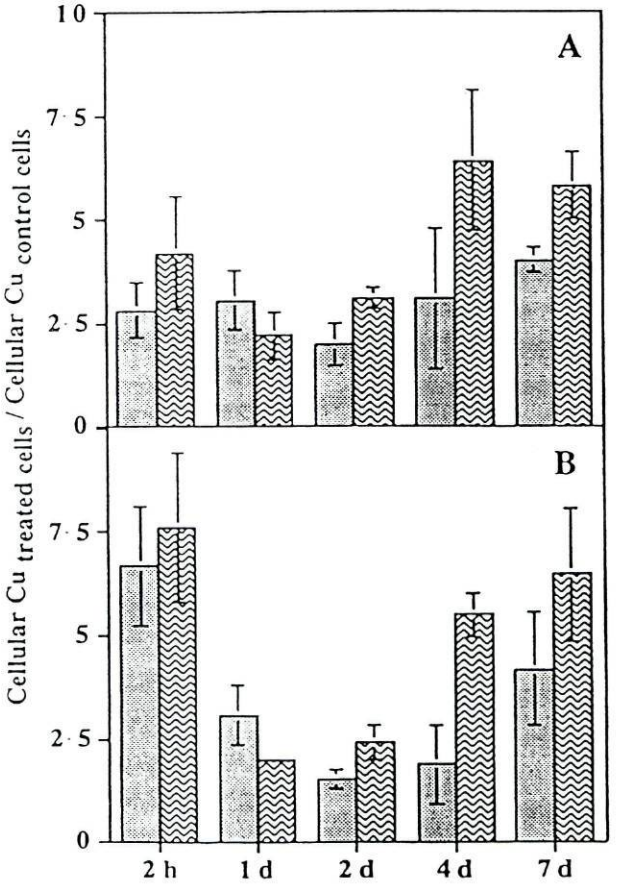


Fig. 6. Cellular levels of copper sorbed per cell of *A. carterae*. The values are the ratios between the levels of copper in cells exposed for 7 days to the metal and the levels in control cells, under the two experimental designs: (*A*) with pre-equilibration and (*B*) without pre-equilibration. Mean values and standard deviations ($n = 3$) are given. Total copper concentrations: stippled columns, 7·87 μM; wavy striped columns, 13·4 μM.

a consequence of culture growth, the amount of labile copper available per cell decreased during the experiment in both situations and, after day 4, i.e. when cells began to recover growth, it was markedly lower than after 2 h of exposure. By days 7 and 10 the amount of copper available per cell was relatively low and of the same order of magnitude in the treatments with and without pre-equilibration; the cultures, in both situations, attained growth levels comparable to controls. Similar results were obtained for 7·87 μM total copper (data not shown). Unfortunately, however, this parameter (labile copper available per cell) does not appear to be a very useful measure of copper toxicity. Indeed, as Fig. 4 shows, with pre-equilibration the labile copper per cell was initially about 120 fmol, decreasing to about 30 fmol by the time the cultures started to grow. In the set up without pre-equilibration the cultures began to grow when the labile copper concentration was about 180 fmol per cell. This concentration is higher than the one that apparently inhibited cell division in the treatment with pre-equilibration.

Fig. 5 shows PSA labile copper in the medium of *A. carterae* cultures and cellular copper (ratio between the levels in/on treated and control cells) after 2 h of exposure to the metal, in the experimental design with pre-equilibration. In order to evaluate, at the biological level, the initial impact of copper, growth rates (% of controls) observed after 4 days of exposure to the metal were also included. As the doubling time of *A. carterae* is approximately 2·5 days, the effects of copper are only clearly visible after 4 days, as previously shown (Fig. 4). Cellular copper increased exponentially with the increase of lability in the culture medium. These increases caused a pronounced reduction of cell growth rates.

Fig. 6 shows the levels of copper in/on the cells obtained in cells exposed to 7·87 and 13·4 μM total copper in both experimental designs. Cellular copper was expressed as a ratio between the levels of copper in treated and control cells on each day, in order to minimize possible errors among the various days of sampling. In the first hours of exposure to the metal, cellular levels of copper were relatively high in both types of experimental design, but higher when copper was added without pre-equilibration (about 2-fold). These results provide evidence that copper was adsorbed and/or absorbed by the cells even when copper concentrations were lower than the total EDTA concentration in the medium (14·9 μM). Consistent with these results is the inhibitory effect of copper on the photosynthesis of *Selenastrum capricornutum* under equimolar solutions of Cu and EDTA (5 μM) observed by Tubbing *et al.* (1994). The present results are compatible with copper speciation data. In fact, the amount of copper sorbed by the cell suspension was much higher than the initial free copper present in the medium and, therefore, implies the dissociation of inorganic complexes. For instance, for 13·4 μM total copper with pre-equilibration, 2 h after cell inoculation the copper linked to the cells corresponded to 57 nM, 16-fold higher than the estimated free copper (3·6 nM) but 30-fold lower

than the calculated initial labile copper (1·73 μM). These results suggest that the biological response to copper is also dependent on factors other than the concentration of free metal, because complexed copper also contributes to the toxicity. A similar relationship has been found recently by Tubbing *et al.* (1994) and Azenha *et al.* (1995) for bacteria in freshwaters. However, as mentioned above, it was verified in the present work that the labile copper fraction (responsible for the biological response) is correlated with the free copper fraction (Fig. 1). This fact renders the present results compatible with the conclusions of other authors (e.g. Sunda & Guillard, 1976; Anderson & Morel, 1978; Verweij *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1993) that copper toxicity is a direct function of free copper. Similarly, the conclusion of Morel (1983) that ionic copper activity provides a measure of the reactivity of the metal in solution, is not inconsistent with the present results. However, it must be stressed that measurement of the free copper, for instance by ion-selective electrode potentionetry, provides an underestimate of the bioavailable metal in solution.

The increase in cellular copper after 2 h of exposure to the metal is to a great extent a result of surface metal binding. This first step in the uptake of copper is very fast, taking only a few minutes as observed in *A. carterae* (data not shown) and also in *Dunaliella tertiolecta* (Gonzalez-Davilla *et al.*, 1995). Although extracellularly bound, copper was found to induce toxicity in *A. carterae* (Lage *et al.*, unpublished results). In a second step, a much slower active uptake occurs, in which the metal ions are transported across the cell membrane and into the cytoplasm (Gonzalez-Davilla *et al.*, 1995).

After 1 and 2 days of exposure, cellular levels of copper decreased significantly in both situations but to a greater extent in the treatment without pre-equilibration, suggesting a release of copper back into the medium. This release is consistent with observations in other species (Mandelli, 1969; Foster, 1977; Anderson & Morel, 1978) and may be due to efflux or, most probably, to a re-equlibration between the metal bound to the cell surface and to the ligands in the medium. After 4 and 7 days, cellular levels of copper increased independent of the recovery of growth to almost normal levels, which suggests development of a mechanism to tolerate or to avoid the toxicity of copper, in spite of the presence of the metal inside the cells. During the first days of exposure to copper a certain percentage of cell death may have occurred, with subsequent cellular lysis and release of organic molecules into the medium. Concomitantly, cells may have excreted organic molecules that could complex the metal outside the cells. *A. carterae* is known to be able to incorporate macromolecules, via the flagellar canal, into the pusular system (Klut *et al.*, 1987). The uptake of organic molecules complexed with copper might have accounted for the increase in cellular levels of copper. Preliminary studies on the mechanisms allowing tolerance of *A. carterae* to copper (results not shown) suggest the formation of a polypeptide of low molecular weight comparable to a phytochelatin. This may be the molecule that allowed *A. carterae* to grow despite the abnormal levels of cellular copper. The synthesis of phytochelatins in response to exposure to metals is a common mechanism in various organisms (Rauser, 1990; Reddy & Prasad, 1990; Ahner & Morel, 1995).

Conclusions

This work clearly shows that even in saline media where strong complexing agents, such as EDTA, are present in excess relative to copper(II) the metal can be taken up by microalgae and induce toxicity. This occurs because chloride, the concentration of which was very high in the medium ($\cong$ 0·5 M), and other inorganic and possibly organic ligands compete with EDTA for copper and other metals in the medium, providing a labile copper fraction much higher than the free fraction. Further, the present work provides additional evidence that not only free copper but also labile copper is bioavailable to algae; similar conclusions have been drawn for other organisms in different media (Buckley, 1994; Tubbing *et al.*, 1994; Azenha *et al.*, 1995). Therefore, because algae take up copper from labile complexes in addition to the free metal, the use of bioassays using algae to measure free copper(II) activity, as previously recommended (e.g. Morgan & Stumm, 1991), may provide overestimates of copper levels. Free copper activity can be used to determine toxicity or bioavailability of the metal only if a constant of proportionality that relates free to labile copper concentrations is known. The present results also demonstrate the great importance of kinetic processes in trace metal–phytoplankton interactions, stressing that they should be considered in toxicity studies.

PSA, used here for the first time in studies of toxicity, may be an advantageous alternative to differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) for lability measurements in highly saline waters, because PSA provides a means for the determination of copper at less negative E_d values (Soares & Vasconcelos, 1995). This characteristic merits interest in its use in speciation studies, where dissociation of kinetically stable metal compounds should be minimized.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica - JNICT, Lisbon (Grant PBIC/CEN/1014/92). The authors would like to thank Prof J. A. Raven, Dr C. A. Maggs and the two anonymous referees for their improvements to the paper.

References

Ahner, B.A. & Morel, F.M.M. (1995). Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals: *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 658–665.

Anderson, D.M. & Morel, F.M.M. (1978). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 283–295.

ANDREW, R.W., BIESINGER, K.E. & GLASS, G.E. (1977). Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Water Res.*, **11**: 309–315.

AZENHA, M., VASCONCELOS, M.T. & CABRAL, J.P.S. (1995). Organic ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas syringae*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**: 369–373.

BENOLIEL, M.J. (1981). *Instalação de uma estação de zoologia marítima no Porto. Avaliação preliminar das características físico-químicas da água no estuário do rio Douro e em Castelo do Queijo*. Instituto Hidrográfico, Lisbon.

BUCKLEY, J.A. (1994). The bioavailability of copper in wastewater to *Lemna minor* with biological and electrochemical measures of complexation. *Water Res.*, **28**: 2457–2467.

DAVIES, A.G. (1978). Pollution studies with marine plankton. II. Heavy metals. *Adv. Mar. Biol.*, **15**: 381–508.

DE FILIPPIS, L.F. & PALLAGHY, C.K. (1994). Heavy metals: sources and biological effects. In *Algae and Water Pollution* (Rai, S.C., Gaur, J.P. & Soeder, C.J., editors) *Arch. Hidrobiol.*, **42**: 31–77.

DONAT, J.R., LAO, K.A. & BRULAND, K.W. (1994). Speciation of dissolved copper and nickel in south San Francisco Bay: a multi-method approach. *Anal. Chim. Acta*, **284**: 547–571.

FISHER, N.S. & FROOD, D. (1980). Heavy metals and marine diatoms: influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection for metal tolerance among four species. *Mar. Biol.*, **59**: 85–93.

FOSTER, P.L. (1977). Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green algae. *Nature*, **269**: 322–323.

GONZALEZ-DAVILA, M., SANTANA-CASIANO, J.M., PEREZ-PEÑA, J. & MILLERO, F.J. (1995). Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, **29**: 289–301.

GOOD, N.E. & IZAWA, S. (1972). Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol.*, **24**(B): 53–68.

HARRISON, P.J., ROSEMARY, E.W. & TAYLOR, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.*, **16**: 28–35.

HERING, J.G. & MOREL, F.M.M. (1988). Kinetics of trace metal complexation: ligand-exchange reactions. *Environ. Sci. Technol.*, **22**: 1469–1478.

HERING, J.G. & MOREL, F.M.M. (1989). Slow coordination reactions in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **53**: 611–618.

HERING, J.G. & MOREL, F.M.M. (1990). Kinetics of trace metal complexation: role of alkaline-Earth metals. *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 242–252.

HOGFELDT, E. (1982). *Stability Constants of Metal Ion Complexes, part A. Inorganic Ligands*, 217, Pergamon Press, Oxford.

KLUT, M.E., BISALPUTRA, T. & ANTIA, N.J. (1987). Some observations on the structure and function of the dinoflagellate pusule. *Can. J. Bot.*, **65**: 736–744.

LAGE, O.M., PARENTE, A.M., SOARES, H.M.V.M., VASCONCELOS, M.T.S.D. & SALEMA, R. (1994). Some effects of copper on the dinoflagellate *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. *Eur. J. Phycol.*, **29**: 253–260.

MANDELLI, E.F. (1969). The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. *Contrib. Mar. Sci.*, **14**: 47–57.

MARTELL, A.E. & SMITH, R.M. (1974). *Critical Stability Constants, vol. 1, Amino Acids*, 204–207. Plenum Press, New York.

MEADOR, J.P., TAUB, F.B. & SIBLEY, T.H. (1993). Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in a standardized aquatic microcosm. *Ecol. Applications*, **3**: 139–155.

MENKISSOGLU, O. & LINDOW, S.E. (1991). Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. *Phytopathology*, **81**: 1258–1263.

MILLER, J.C. & MILLER, J.V. (1994). *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood, New York.

MOREL, F.M.M. (1983). *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley, New York.

MORGAN, J.M. & STUMM, W. (1991). Chemical processes in the environment: relevance of chemical speciation. In *Metals and Their Compounds in the Environment* (Merian, E., editor), 67–103. VCH, New York.

PRICE, N.M. & MOREL, F.M.M. (1994). Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. In *Algae and Water Pollution* (Rai, S.C., Gaur, J.P. & Soeder, C.J. editors). *Arch. Hydrobiol.* **42**: 79–97.

PRICE, N.M., HARRISON, G.I., HERING, J.G., HUDSON, R.J., NIREL, P.M.V., PALENIK, B & MOREL, F.M.M. (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biol. Oceanogr.*, **6**: 443–461.

RAUSER, W.E. (1990). Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**: 61–86.

REDDY, G.N. & PRASAD, M.N.V. (1990). Heavy metal-binding proteins/peptidase: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Environ. Exp. Bot.*, **30**: 251–264.

SOARES, H.M.V.M. & VASCONCELOS, M.T.S.D. (1995). Potentiometric stripping analysis vs differential pulse anodic stripping voltametry for copper(II) analysis at relatively positive deposition potential. *Anal. Chim. Acta*, **303**: 255–263.

STUMM, W. & MORGAN, J. (1981). *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. 242 and 354. Wiley, New York.

SUNDA, W. (1989). Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.*, **6**: 411–442.

SUNDA, W. & GUILLARD, R.R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **34**: 511–529.

TAYLOR, F.J.R. & POLLINGHER, U. (1987). Ecology of Dinoflagellates. In *The Biology of Dinoflagellates* (Taylor, F.J.R., editor), 398–529. Blackwell Scientific, Oxford.

TUBBING, D.M.J., ADMIRAAL, W., CLEVEN, R.F.M.J., IQBAL, M., VAN DE MEENT, D. & VERWEIJ, W. (1994). The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Res.*, **28**: 37–44.

TURNER, D.R., VARNEY, M.S., WHITFIELD, M., MANTOURA, R.F.C. & RILEY, J.P. (1987). Electrochemical studies of copper and lead complexation by fulvic acid. II. A critical comparison of potentiometric and polarographic measurements. *Sci. Total Environ.*, **60**: 17–34.

VERWIJ, W., GLAZEWSKI, R. & DE HAAN, H. (1992). Speciation of copper in relation to its bioavailability. *Chem. Spec. Bioavail.*, **4**: 43–51.

WESTALL, J.C. (1979). MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC. Internal Report, EAWAG, Dubendorf.

Trabalho 3

INFLUÊNCIA DE VÁRIOS TAMPÕES NO CRESCIMENTO DE *AMPHIDINIUM CARTERAE* HULBURT E DE *PROROCENTRUM MICANS* EHR. EM CULTURA EM SISTEMA FECHADO

Lage, O.M., Osswald, J. M., Parente, A. M. & Salema, R. Influence of several buffers in the growth of *Amphidinium carterae* Hulburt and *Prorocentrum micans* Ehr. in batch cultures. **Anais Fac. Ciências** (em publicação).

INFLUENCE OF SEVERAL BUFFERS IN THE GROWTH OF *Amphidinium carterae* HULBURT AND *Prorocentrum micans* EHR. IN BATCH CULTURE

BY

O. M. LAGE, J. M. OSSWALD, A. M. PARENTE, & R. SALEMA

Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P.

Abstract

Studies of the effects of copper in batch cultures of dinoflagellates, showed the importance to buffer the pH of them. The influence of some biological buffers in batch cultures of *Prorocentrum micans* and *Amphidinium carterae* , namely ACES (1 and 10 mM), HEPES (1.6, 5 and 10 mM), imidazole (1mM), MOPS (1 and 10 mM) and PIPES (1 and 5 mM), was tested. Imidazole and ACES induced inhibition of the growth or even death of the cultures in both species. HEPES, MOPS and PIPES, in convenient concentrations, were found to be suitable for studies of copper effects in *A. carterae* and *P. micans*.

Introduction

Copper speciation is largely influenced by hydrogen ion concentration and the study of the effects of metals like copper in the growth of dinoflagellates in batch cultures (1) has evidenced the need to buffer the pH of the cultures. The artificial ESAW medium (2), currently used in our laboratory to culture marine dinoflagellates, is not a pH buffered medium. Consequently, during the growth of the cultures the pH can

rise about two units. Therefore, the importance to incorporate in the growth medium an appropriate buffer to stabilize the pH in the range of 7.5 to 8.0 (the pH of sea water is about 8.0), which should neither interfere with the growth of the cultures in an unfavourable way nor chelate copper. In the present work the influence of some zwitterionic (Good's) buffers (3, 4) and imidazole, a buffer of the amine type, in *A. carterae* Hulburt and *P. micans* Ehr. batch cultures, was studied with the aim to better the conditions to study the effects of metals in the growth of these microalgae.

Materials and Methods

Populations of the two dinoflagellate species were grown in ESAW medium (control cultures). To test the different buffers, *A. carterae* and *P. micans* were grown in the same medium supplemented with 1 and 10 mM ACES[(a)] (pH 7.5); 1.6, 5 and 10 mM HEPES[(b)] (pH 8.0); 1 mM imidazole[(c)] (pH 7.7); 1 and 10 mM MOPS[(d)] (pH 8.0) and 1 and 5 mM PIPES[(e)] (pH 7.5). All batch cultures were grown at 18 ± 1 °C and in a 12:12 h photoperiod (30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$). The growth of the cultures was estimated by cell count in a ZM Coulter-Counter. The pH of the medium of the cultures was monitored by potenciometry in a pH meter WTW 537.

(a) ACES: N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (pKa at 20 °C - 6.9; pH range 5.9-7.8);

(b) HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid (pKa at 20 °C - 7.2; pH range 6.25-8.15);

(c) Imidazole (pKa at 20 °C - 7.05; pH range 6.2-7.8);

(d)MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (pKa at 20 °C - 7.2; pH range 6.25-8.15);

(e) PIPES: Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (pKa at 20 °C - 6.82; pH range 6.1-7.5)

Results and Discussion

Cultures of *A. carterae* were efficiently buffered by 10 mM HEPES, 10 mM MOPS and 5 mM PIPES but not by lower concentrations of the same buffers (Table 1). In all *P. micans* buffered cultures, pH variations were lower than in control cultures and never exceeded 0.5 units (Table 2). The growth of both species in the presence of HEPES, MOPS and PIPES was similar to, or even increased when compared to that of the control as evidenced by the generation time and by the growth of the cultures in the end of exponential phase (Tables 1 and 2). The cultures buffered with MOPS had the shortest generation times and the highest number of cells, at the end of the experiment. ACES, which strongly chelate copper (3), at 10 mM and imidazole at 1 mM hindered the growth of the cultures of both species. The latter inhibited the growth of *P. micans* and in the other three cultures death even occurred (Fig. 1).

Several buffers with a wide range of application in biological research (3, 4 e 5) had been developed and the effects of some of them in the growth of various microalgae in culture (3, 6, 7), as well as, in the control of pH in studies of metabolism (3, 8) had been tested.

Our study showed that HEPES, MOPS and PIPES, when present in the cultures in convenient concentrations, were adequated to the study of the

effects of copper in these dinoflagellates, because they showed good capacity to control the pH, favoured the growth of the cultures and do not chelate copper (3,4).

To further this study, higher concentrations of the used buffers will be tried and other buffers with pKas close to 8.0 as possible will be assayed to find out better conditions to study the effects of toxic levels of copper in these dinoflagellates.

Acknowledgment

This work was supported by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (Grant PBIC/CEN/1014/92).

References

(1) Lage,O.M., Parente,A.M., Soares,H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. & Salema,R. 1994. Eur. J. Phycol. 29: 253-260.
(2) Harrison,P.J., Rosemary,E.W & Taylor,F.J.R. 1980. J. Phycol. 16: 28-35.
(3) Good,N.E. & Izawa,S. 1972. Meth Enzymol. 24 Part B: 53-68.
(4) Good,N.E., Winget,D., Winter,W., Connolly,T.N., Izawa,S. & Singh,R.M.M. 1966. Biochemistry 5: 467-477.
(5) Ferguson, W.J., Braunschweiger, K.I., Braunschweiger, W.R., Smith, J.R., McCormick, J.J., Wasmann, C.C., Jarvis, N.P., Bell, D.H. & Good, N.E. 1980. Anal. Biochem. 104: 300-310.
(6) Foster, P.L. 1977. Nature: 269: 322-323.
(7) Takamura, N. Kasai, F. & Watanabe, M. 1989. J. Appl. Phycol. 1: 39-52
(8) Overnell, J. 1975. Mar. Biol. 29: 99-103.

Culture	pH variation	Generation time (days)	Culture growth (%)
Control	1.81 ± 0.22	2.50 ± 0.14	2702 ± 726
ACES 1 mM.	0.52 ± 0.09	2.81 ± 0.28	1002 ± 107
ACES 10 mM	0.41 ± 0.13	-------	- 92 ± 4
HEPES 1.6 mM	1.21 ± 0.40	2.28 ± 0.23	2179 ± 157
HEPES 5 mM	0.98 ± 0.42	2.36 ± 0.16	2373 ± 322
HEPES 10 mM	0.51 ± 0.22	2.19 ± 0.25	2631 ± 740
Imidazole 1 mM	0.66 ± 0.13	-------	- 77 ± 7
MOPS 1 mM	1.68 ± 0.13	2.60 ± 0.50	3094 ± 553
MOPS 10 mM	0.67 ± 0.45	2.30 ± 0.15	3423 ± 566
PIPES 1 mM	1.46 ± 0.53	2.88 ± 0.43	2330 ± 809
PIPES 5 mM	0.71 ± 0.03	2.06 ± 0.29	3394 ± 278

Table 1. Influence of various buffers in cultures of *A. carterae* compared with the control (ESAW medium) in the following parameters: maximum pH variation of the cultures, generation time and growth of the cultures after 14 days of experiment.

Culture	pH variation	Generation time (days)	Culture growth (%)
Control	0.36 ± 0.05	2.76 ± 0.15	833 ± 37
ACES 1 mM.	0.39 ± 0,11	2.51 ± 0.07	727 ± 83
ACES 10 mM	0.22 ± 0.09	-------	28 ± 7
HEPES 1.6 mM	0.21 ± 0.02	2.55 ± 0.18	1236 ± 158
HEPES 5 mM	0.21 ± 0.02	3.02 ± 0.07	1063 ± 33
HEPES 10 mM	0.24 ± 0.01	2.91 ± 0.13	954 ± 14
Imidazole 1 mM	0.41 ± 0.08	-------	133 ± 48
MOPS 1 mM	0.23 ± 0.02	2.30 ± 0.02	1440 ± 265
MOPS 10 mM	0.24 ± 0.04	1.93 ± 0.26	1747 ± 122
PIPES 1 mM	0.15 ± 0.00	2.63 ± 0.35	1089 ± 95
PIPES 5 mM	0.20 ± 0.06	2.67 ± 0.13	1313 ± 64

Table 2. Influence of various buffers in cultures of *P. micans* compared with the control (ESAW medium) in the following parameters: maximum pH variation of the cultures, generation time and growth of the cultures after 20 days of experiment.

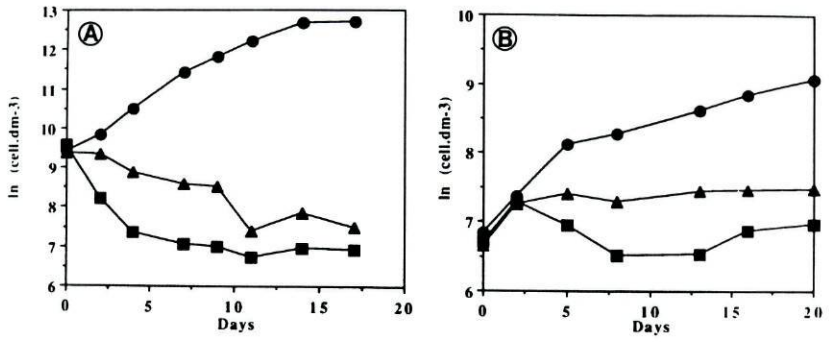


Fig. 1. Effects of 10 mM ACES (■) and 1 mM Imidazole (▲) in the growth of (A) *A. carterae* and (B) *P. micans* in batch cultures comparatively to the control (●).

Trabalho 4

ADEQUAÇÃO DOS TAMPÕES DE pH ÁCIDO 3-[N-BIS(HIDROXIETIL)AMINO]-2-HIDROXIPROPANOSSULFÓNICO E ÁCIDO N-2-HIDROXIETILPIPERAZINA-N'-ETANOSSULFÓNICO PARA ESTUDOS *IN VITRO* DE TOXICIDADE PELO COBRE

Lage, O. M., Vasconcelos M. T. S. D., Soares, H. M. V. M., Osswald, J. M., Sansonetty, F., Parente, A. M. & Salema R. 1996. Suitability of the pH buffers 3-[N-bis(hydroxyethyl) amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid and N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane- sulfonic acid for *in vitro* copper toxicity studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 31: 199-205.

Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 199–205 (1996)

ARCHIVES OF
Environmental
Contamination
and Toxicology
© 1996 Springer-Verlag New York Inc.

Suitability of the pH Buffers 3-[*N*-*N*-*bis*(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic Acid and *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*′-2-ethanesulfonic Acid for *In Vitro* Copper Toxicity Studies

O. M. Lage[1], M. T. S. D. Vasconcelos[2], H. M. V. M. Soares[2]*, J. M. Osswald[1], F. Sansonetty[3], A. M. Parente[1], R. Salema[1]

[1] Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal
[2] LAQUIPAI, Departamento de Química, Faculdade de Ciências da U.P., Rua do Campo Alegre 687, 4150 Porto, Portugal
[3] IPATIMUP, Rua Roberto Frias, 4200 Porto, Portugal

Received: 11 October 1995/Revised: 27 February 1996

Abstract. The influence of the zwitterionic (ampholytic) pH buffers, 3-[*N*-*N*-*bis*(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid (DIPSO, 10 mM) and *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*′-2-ethanesulfonic acid (HEPES, 25 mM), on the toxicity of copper(II) to the marine dinoflagellate, *Amphidinium carterae,* was investigated. For this purpose, DIPSO or HEPES buffered complete ESAW (enrichment solution artificial seawater) growth media as well as simplified (enrichment solution deficient) buffered media were assayed in the toxicity tests, at pH 8.0. Similar assays were performed in unbuffered ESAW medium. Toxicity evaluation was based on growth changes, EC_{50} (effective concentration of labile copper that reduces growth rate by 50%) and esterase activity. In addition to biological parameters, electrochemical behavior of the buffers in the presence of copper(II) was used to interpret the results. Neither of the buffers were toxic to *A. carterae.* HEPES increased copper toxicity (synergistic effect) while DIPSO diminished it (strong antagonistic effect). HEPES does not significantly complex copper(II) and this effect was possibly due to change in kinetics of metal binding to the organisms due to its surfactant properties at 25 mM. DIPSO is a strong copper(II) complexing agent (average conditional stability constant, log K = 7.3, pH 8.0, 25°C). These results suggest that DIPSO may substitute EDTA in culture media with the advantage of simultaneously buffering changes in pH and metallic cations.

Unicellular algae inhabiting coastal waters are frequently exposed to relatively high levels of copper, due to anthropogenic inputs. Copper toxicity has been largely studied under different perspectives in both freshwater and marine phytoplankton (De Filippis and Pallaghy 1994; Price & Morell 1994). Increasing evidence has been found (Price *et al.* 1989; Buckley 1994; Tubbing *et al.* 1994; Azenha *et al.* 1995; Lage *et al.* 1996b) that not only the free metal fraction but its labile fraction (*i.e.,* the hydrated metal plus its inorganic or organic complexes from which it can be released quickly) can be bioavailable and therefore toxic.

Algal culture media require the presence of artificial chelating agents as metallic buffers to maintain the free concentration of heavy metal at trace (μM) or even ultratrace (nM) levels, in a similar way to what happens in natural seawater. Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) is one of the most commonly used (Hutner *et al.* 1950; Provasoli *et al.* 1957; Morel *et al.* 1979; Harrison *et al.* 1980). The thermodynamic parameters of complexes of different heavy metals with inorganics and EDTA are well known. This allows the calculation of metal speciation under chemical equilibrium conditions. Such thermodynamic information is relevant in toxicity studies, although kinetic aspects must also be considered, due to the biological activity of the organisms that adsorb, absorb, release and transform chemical species in solution (Price *et al.* 1989).

Hydrogen ion concentration also plays an important role in the chemistry of aqueous solutions because it competes with metallic cations in solution for ligand binding sites. In alkaline solutions the hydroxide ion (whose pOH = 14 − pH) acts as ligand, originating soluble and insoluble metallic complexes. As the competition of hydroxide with other ligands (biotic and abiotic) is important at seawater pH, the trace metal speciation may change markedly when the pH increases. Due to the high complexity of the chemical/biological system, a pH variation will strongly limit the interpretation of results in studies of metal toxicity in synthetic seawater (Price *et al.* 1989). Therefore, algal cultures should be buffered at a pH similar to that of seawater because, during algal batch growth, the pH rises

Correspondence to: Olga Maria Lage

* *Permanent address:* Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, P 4099, Porto Codex, Portugal

substantially, due to removal of CO_2 and uptake of negatively charged ions.

The control of pH can be achieved by bubbling CO_2 in the medium, but in general this method is not successful in cultures of dinoflagellates. When other pH buffers are considered for use in algal culturing, some properties must fulfill the following requests: (a) the absence of toxicity to the organism; and (b) the absence of complexation with the metals of interest or, (c) the stability constants of their complexes have to be known. Because the buffer concentration must be relatively high (usually about 10 mM) in order to maintain the pH constant, more than one of these properties [(a), (b), or (c)] usually fail. Several studies focusing on the toxicity of copper have been made using tris(hydroxymethyl)amino methane (TRIS) as a chelator (Anderson and Morel 1978; Hawkins and Griffiths 1982) as well as a pH stabilizer. However, in addition to complexing copper (Gavis *et al.* 1981), TRIS was shown to interfere with the growth of several phytoplankton (Harrison *et al.* 1980) and to sustain active bacterial growth in nonaxenic microalgal cultures (Fábregas *et al.* 1993). Good' buffers (Good *et al.* 1966) have been shown to be relatively free of such side effects (Stoll and Blanchard 1990). For many of these alkaline buffers, such as 3-[*N-N-bis*(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid—DIPSO (pH 7.0–8.2), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid—HEPES (pH 6.8–8.2), *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-hydroxypropanesulfonic acid—HEPPSO (pH 7.1–8.5), 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid—MOPS (pH 6.25–8.15) and Piperazine-*N-N'-bis*[2-hydroxypropanesulfonic acid]—POPSO (pH 7.2–8.5), particularly properties (b) and (c) are not still well known, but some of them have been used in biological studies (Ferguson *et al.* 1980), including algal culturing and toxicity bioassays (Overnell 1975). The present situation, prompted us to investigate the suitability of some of these zwitterionic (*i.e.,* an ion that has both a positive and negative charge on the same species) pH buffers to be used in algal culturing. Several buffers at various concentrations were tested in the culture of two dinoflagellate species (Lage *et al.* 1996a and unpublished data); 10 mM DIPSO and 25 mM HEPES provided good buffering of the cultures at pH 8.0, witout no toxicity effects.

The aim of the present work was to examine the influence of DIPSO or HEPES on the toxicity of copper to *A. carterae* Hulburt. The chosen strategy was to evaluate copper toxicity in ESAW media buffered at pH 8.0 with 10 mM DIPSO or 25 mM HEPES and to compare it with that obtained in the unbuffered medium. Copper toxicity was also evaluated in EDTA and microsalts deficient buffered ESAW media (pH 8.0) and compared with the correspondent complete medium. The simplified media, which allowed a more acute chemical speciation of copper, were assayed to appreciate their ability to be used in short-term toxicity experiments. Toxicity was evaluated based on growth, EC_{50}, cell viability, and esterase activity.

Materials and Methods

All solutions including culture medium were prepared with double distilled, deionized water and *pro analysis* reagents or equivalent. To avoid metal contamination, all material was washed with 1:1 nitric acid. The culture medium was sterilized by filtration through a cellulose acetate filter with a pore size of 0.45 μm.

Organism and Culture Conditions

A. carterae (isolate 39) was kindly supplied by Dr. Estela Sousa e Silva (Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge). Stock cultures were maintained in the artificial seawater medium ESAW without silicates (Table 1) (Harrison *et al.* 1980), at 19 ± 1°C, on a 12:12 h photoperiod and a photon flux density of about 30 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Evaluation of Toxicity

The toxicity experiments were carried out in the following media: [1] ESAW, [2] ESAW buffered with 10 mM DIPSO, pH 8.0; [3] ESAW bufferd with 25 mM HEPES, pH 8.0; [4] ESAW without the enrichment solution (ES) buffered with 10 mM DIPSO, pH 8.0; [5] ESAW without the enrichment solution (ES) buffered with 25 mM HEPES, pH 8.0.

Culture media were inoculated with *A. carterae* in exponential growth phase. Cell concentration in the beginning of the experiments was adjusted to 1.5×10^4 cells$\cdot cm^{-3}$. Copper, as copper(II) chloride in 5 mM hydrogen chloride, was then added to the batch cultures in order to obtain concentrations in the range of 0–16 μM total metal. The levels of copper tested in ES deficient HEPES-buffered medium [5] were set about 10-fold lower than in the complete medium [3] due to the absence of EDTA. As controls, cells were cultivated in the same media without copper. The experiments were performed in 100 cm^{-3} glass flasks. All tested copper concentrations were run in triplicate.

Growth was measured by counting the number of cells of neutral formaldehyde fixed samples in a Coulter counter (Model ZM) and growth rates (k) were calculated. By plotting k values against copper concentration and applying polynomial regression lines of third degree EC_{50} were calculated. A probability greater than 95% was verified among triplicates.

In order to evaluate cell viability and esterase activity, a fluorescein diacetate (FDA) assay was performed. After 10 min incubation with 7.5 μM FDA, fluorescein accumulation in cells was measured using a Coulter EPICS C flow cytometer (Dorsey *et al.* 1989; Lage *et al.* submitted). Forward and orthogonal light scatters and green fluorescence were measured from 2,000 cells. Laser emission was 200 mW at 488 nm. Green fluorescence was measured using a 530-nm short pass filter. Histograms were analyzed with the Epics Cytologic Software (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA).

The percentage of fluorescein positive cells and the ratios of green fluorescence (R) between cell populations exposed to copper and those unexposed (control) were calculated using the following formulations: (1) d = (green fluorescence mean channel of cells incubated with FDA) − (green autofluorescence mean channel); (2) $F = 10^{(d \times (3/256))}$; 3) $R = F_{\text{of cells exposed to copper}}/F_{\text{of cells unexposed to copper}}$. The logarithmic histograms were linearized by equation (2). An R value less than one means a decrease in green fluorescence while a value greater than one means an increase, with respect to control cells not exposed to copper.

Determination of Complexation Parameters

To evaluate the ability of DIPSO and HEPES to complex copper required for copper speciation calculations (see below), ion-selective electrode (ISE) potentiometric titrations were carried out with equipment previously described (Soares and Vasconcelos 1994). Measurements were performed at 25°C and pH 8.0 buffered with 10 mM DIPSO or 25 mM HEPES, at an ionic strength of 0.5 M (identical to that of ESAW medium). As background solution, 0.5 M sodium perchlorate was used. Chloride was changed to perchloride because it is a severe interferent with the copper(II) ISE. As titrant, 5 mM copper(II) nitrate solutions with identical background composition were used.

To test the influence of all the compounds used in ESAW medium on the titration curves, the experiments described above were repeated

Table 1. Composition of the artificial seawater ESAW medium (Harrison *et al.* 1980) without silicates

Artificial seawater (AW) base	(mM)	*Enrichment solution (ES)*	(μM)
NaCl	363	$NaNO_3$	549
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	47.2	$NaglyceroPO_4$	21.8
Na_2SO_4	25.0	Na_2EDTA	14.9
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	9.14	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	5.97
KCl	8.04	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.42
$NaHCO_3$	2.07	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5.92×10^{-1}
KBr	7.25×10^{-1}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.54×10^{-1}
H_3BO_3	4.34×10^{-1}	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	5.69×10^{-2}
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	8.20×10^{-2}	*Vitamins*	(μM)
NaF	6.57×10^{-2}	Thiamine HCl	2.97×10^{-1}
AW ionic strength	700	Vitamin B_{12}	1.47×10^{-3}
		Biotin	4.09×10^{-3}

at pH 6.3 in a modified ESAW medium. In this, chloride salts were substituted by the correspondent sulphate salts in identical concentrations. The experiments were also repeated at pH 6.3 in 0.5 M sodium perchlorate in the presence of thiamin, vitamin B12 and biotin in identical concentrations to those present in ESAW. A pH of 6.3 was chosen to minimize the Cu-OH complex formation, thus simplifying the system.

Calculations

In order to calculate the average conditional stability constants (K) of both copper-DIPSO or copper-HEPES, the potentiometric data were treated by the Scatchard model (Buffle, 1988).

Computational simulations of chemical equilibrium in the media (Table 2) were performed with the speciation computer program MICROQL (Westall 1979) as previously described (Lage *et al.* 1994). For media [1] and [3], besides copper-EDTA complexes, major side equilibria, namely copper-inorganic ligand (OH^-, CO_3^{2-}, Cl^-, NH_3) complexes and complexes of other metals (Mg, Ca, Fe, Mn, Zn) with EDTA were considered. For this purpose, stoichiometric stability constants from the literature (Martell and Smith 1974; Stumm and Morgan 1981; Hogfeldt 1982) were used. For medium [5], complexes of copper(II) and of the other metal ions with inorganic ligands were considered (HEPES does not complex copper in a significant extent at pH 8.0 as discussed below). For medium [2], besides equilibria considered in [1], copper-DIPSO equilibria were also included. For medium [4], equilibrium data considered for medium [5] and those for copper-DIPSO complexes were used. Due to the high complexity of the medium the simulations involved some approximations; (*i*) some minor equilibria were not considered; (*ii*) the stoichiometric stability constants used were not determined under identical experimental conditions; (*iii*) only equilibria in homogeneous phase (liquid phase) were considered; and, (*iv*) exsudates and dead cells which may be potential ligands in the culture medium after cell inoculation were neglected. Therefore, the data obtained through the computational simulations should be considered as an approximation of the speciation of copper in the culture media.

To verify whether or not the mean values obtained in different sets of measurements disagree significantly, the statistical test of comparison of two means (Miller and Miller 1994) was used.

Results and Discussion

Metal Speciation

From a Scatchard plot (Buffle 1988), an average conditional stability constant of copper-DIPSO of 7.3 (logarithmic value) was obtained. This result indicates that DIPSO is a strong copper complexing agent in the experimental conditions used. For HEPES the Scatchard plot did not clearly evidence copper complexation.

Table 2. Total and calculated free and labile copper concentrations in the different media assayed in *A. carterae* copper toxicity. DIPSO and HEPES media were buffered at pH 8.0

Medium	Nominal total copper(II) (μM)	Calculated free copper (nM)	Calculated labile copper (nM)
[1] ESAW and	7.87	0.295	132
[3] 25 mM HEPES-	11.9	2.14	1,030
buffered ESAW	15.8	6.55	3,130
[5] 25 mM HEPES-	0.79	1.65	790
buffered ESAW	1.58	3.29	1,580
without ES solution	3.94	8.23	3,940
[2] 10 mM DIPSO-	1.58	4.84×10^{-3}	2.8
buffered ESAW	3.94	1.25×10^{-2}	6.0
	7.87	2.61×10^{-2}	13
	11.9	4.06×10^{-2}	19
	15.8	5.58×10^{-2}	29
[4] 10 mM DIPSO-	1.58	7.28×10^{-3}	3
buffered ESAW	3.94	1.82×10^{-2}	9
without ES solution	7.87	3.64×10^{-2}	17
	11.9	5.46×10^{-2}	30
	15.8	7.29×10^{-2}	40

DIPSO—3-[*N-N-bis*(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid; HEPES—*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid

It was also verified that thiamin, vitamin B12 and biotin (present in ESAW medium, Table 1) did not complex copper at a significative extent at pH 6.3.

In another work (Vasconcelos *et al.* 1996 and unpublished data) carried out in parallel by differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) both 10 mM DIPSO and 25 mM HEPES presented surface-active effects. These effects prevented the determination of the operational lability of the copper-DIPSO complex, which would have interest for the present work. Consequently, and because copper-DIPSO complex is very stable, in the speciation calculation copper(II)-DIPSO complex was not included in the copper labile fraction. That is, copper(II) lability was calculated as the sum of the concentrations of free metal with the metal in inorganic complexes.

It has been noted (Wilkins 1991) that the presence of a charged interface in the aqueous phase, which may be provided

Table 3. Fluorescein positive cells (%) and relative levels of fluorescein fluorescence between copper(II) treated and untreated cells (R) after 1, 4, and 10 days of exposure to different labile copper concentrations in ESAW [1] and HEPES buffered media [3] and [5]. Mean values and standard deviations are given (n = 3)

Labile Cu(II) (nM)	Days	Medium [1]		Medium [3]		Medium [5]	
		Positive cells (%)	R	Positive cells (%)	R	Positive cells (%)	R
0	1	97.2 ± 1.3	1	88.8 ± 7.5	1	91.9 ± 0.8	1
(control)	4	98.6 ± 0.5	1	95.8 ± 0.8	1	92.3 ± 1.1	1
	10	99.4 ± 0.2	1	96.8 ± 1.3	1	99.3 ± 0.3	1
132	1	94.8 ± 1.6	0.90 ± 0.06	92.8 ± 2.4	1.19 ± 0.35		
	4	95.0 ± 1.1	0.82 ± 0.15	89.7 ± 1.2	1.57 ± 0.49		
	10	95.7 ± 2.5	0.64 ± 0.18	93.7 ± 0.1	0.55 ± 0.03		
790	1					83.8 ± 2.6	1.01 ± 0.22
	4					84.4 ± 0.4	0.47 ± 0.16
	10					92.4 ± 6.4	0.66 ± 0.33
1,030	1	85.3 ± 6.9	2.99 ± 0.73	81.0 ± 3.1	0.63 ± 0.24		
	4	93.9 ± 2.8	0.83 ± 0.05	80.2 ± 4.8	0.52 ± 0.09		
	10	93.5 ± 2.2	1.10 ± 0.31	91.2 ± 1.7	0.42 ± 0.09		
1,580	1					98.0 ± 1.10	3.60 ± 0.14
	4					82.4 ± 3.4	1.71 ± 0.45
	10					88.0 ± 0.81	0.46 ± 0.24
3,130	1	85.7 ± 8.9	4.57 ± 1.60	79.4 ± 13.5	2.71 ± 0.12		
	4	82.3 ± 3.1	1.65 ± 0.43	81.7 ± 1.2	2.51 ± 0.76		
	10	36.3 ± 21.8	1.64 ± 0.45	72.5 ± 3.7	1.43 ± 0.18		
3,940	1					94.7 ± 1.6	3.26 ± 0.97
	4					73.1 ± 3.6	3.69 ± 0.23
	10					57.7 ± 12.3	2.08 ± 0.20

by anionic surfactants, usually enhances the rate of metal-complex formation. The accelerative effects may result of metal and ligand being bound at the surface layer of the micelle (surfactant–water interface) and enhanced rates being caused by enhanced reactant concentrations there. Therefore, there is the possibility that the presence of high concentration of a zwitterionic buffer in culture media enhances the copper toxicity to algae even when it showed not to be toxic to their growth.

Effects of DIPSO and HEPES on A. carterae *Growth*

Surfactants are known to inhibit algal growth affecting cell morphology and structure, and cell biochemistry and physiological processes such as photosynthesis, respiration and nutrient uptake (Nalewajko 1994). The growth of control cultures of *A. carterae* in the presence of these two buffers, but in the absence of copper, was evaluated to confirm the lack of possible toxic effects on the algae under the concentrations used in the media. This analysis was performed in the five media, complete and ES-deficient DIPSO or HEPES buffered ESAW media and unbuffered ESAW. As mentioned before both DIPSO and HEPES did not significantly ($P \geq 0.01$) interfere with the growth of *A. carterae* in the complete media [2] and [3] being the growth rates (divisions · day^{-1}) (0.37 ± 0.04 and 0.39 ± 0.03, respectively) similar to the control medium [1] (0.39 ± 0.03).

The significant ($P < 0.01$) decrease in growth during a culture cycle obtained in both ES deficient DIPSO ([4]) and HEPES ([5]) buffered media (reduction of 32% and 33% in k values, respectively) must only be attributed to the absence of nutrients. However, even in medium [5] after 10 days of growth the cell population was 99% fluorescein positive suggesting a "normal" metabolic (esterase activity) status (Table 3). Therefore, DIPSO and HEPES were apparently innocuous to *A. carterae* under the concentrations used.

In the presence of copper the chemical behavior of both buffers can be different, because they may coordinate the metal and/or modify the kinetics of the coordination of the metal by the organisms. In order to clarify these hypothesis and to evaluate the effectiveness of these two buffers for studies of copper toxicity, several different concentrations of this metal was assayed in cultures of *A. carterae* in the presence of DIPSO or HEPES.

Toxicity Studies in HEPES Buffered Media

Copper toxicity in two different HEPES-buffered ESAW media (complete [3] and ES-deficient [5]) and, for comparison purposes, in ESAW unbuffered medium ([1]) was assayed.

In the two HEPES-buffered ESAW modified media the 96-h EC_{50} values (medium [3] 0.70 μm ± 0.26; medium [5] 0.79 μm ± 0.06) were significantly lower ($P < 0.01$) than those obtained for the unbuffered ESAW medium (2.18 μm ± 0.57). These results (*e.g.*, reduction of about 65% in the 96-h EC_{50}) unequivocally shows that HEPES increased copper toxicity and this particular parameter of toxicity is considered a sensitive indicator of heavy metal toxicity (Visviki and Rachlin 1991). EC_{50} values in media [3] and [5] were similar ($P \geq 0.01$), which indicate that the effect of HEPES on the toxicity was so relevant that it overlapped the deficiency of the ES solution.

The influence of copper on *A. carterae* growth rates in HEPES-buffered media ([3],[5]) is shown in Figure 1A. For comparison, the results obtained in medium [1] were also included in the same figure. Sublethal toxic effects were signifi-

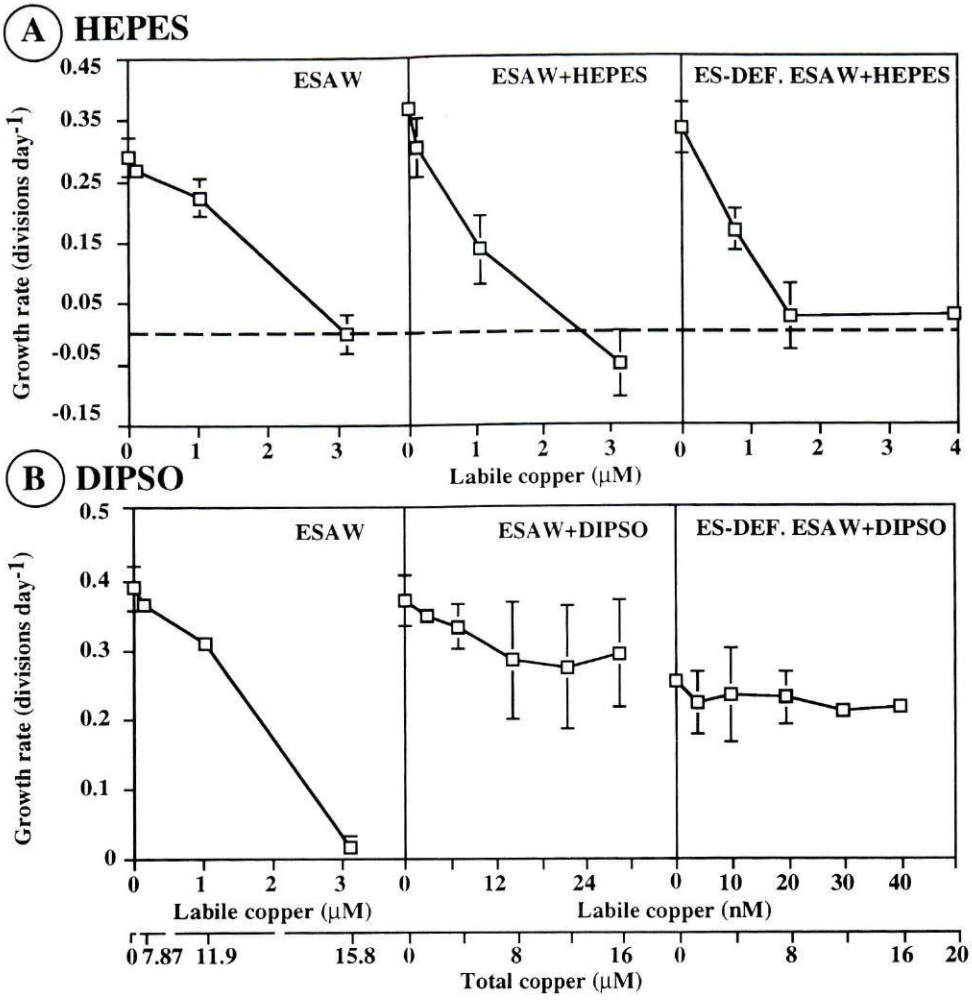


Fig. 1. Growth rates of *A. carterae* obtained in the copper toxicity experiments (A) in the presence of HEPES after 4 days of exposure to the metal and (B) in the presence of DIPSO after 6 days of exposure to the metal. For comparison, the growth rates obtained in the unbuffered ESAW medium were also included. Means and standard deviations (n = 3) are given. ES-DEF—enrichment solution deficient medium

cantly ($P < 0.01$) evident at 1.03 μM labile copper in medium [3], which were more extensive than those found in medium [1] ($P < 0.05$). Lower growth rates (63% and 23% in media [3] and [1] after 4 days, respectively) and decrease in cell number (60% and 40% in media [3] and [1] by day 10, respectively (data not shown)) were obtained when compared to controls. Similar effects were observed in medium [5] for 0.79 μM labile copper. A lag phase of four days (50% increase) was observed in both [3] and [5] media under these copper concentrations when compared to a 2 days lag phase in unbuffered medium [1]. These results constituted additional evidence that HEPES enhances copper toxicity to *A. carterae*.

Labile copper concentrations of 3.13 μM in medium [3] and 1.58 μM or 3.94 μM in medium [5] induced inhibition of growth or death (negative growth rates) (Fig. 1A). A similar result was obtained in medium [1] under 3.13 μM labile copper. In these media, this range of labile copper concentration was near the lethal concentration to *A. carterae*.

Fluorescein labelling of cells has been used as a measure of esterase activity, and this, as an indicator of cell viability. The ratios (R) between the mean emission intensity of fluorescein fluorescence of copper treated and untreated cell populations were calculated after 1, 4 and 10 days. The results obtained in the three culture media are presented in Table 3.

For 0.79 and 1.03 μM labile copper, after 10 days of exposure to copper the percentage of fluorescein labelled cells was frequently higher than after 1 day, sometimes markedly ($P < 0.01$). A similar result was also obtained in the absence of copper, suggesting a period of adaptation of the cells to the new media after inoculation. However, R values significantly decreased between days 1 and 10 (higher confidence intervals after 10 days) indicating that, despite the recover of cell division capability, the esterase activity remained affected. For instance, in HEPES buffered medium cells exposed to 1.03 μM presented lower R values after 10 days ($P < 0.01$) than after day 1 ($P < 0.05$).

After 4 days of exposure to 1.03 μM labile copper, toxicity was significantly higher ($P < 0.02$) in the presence of HEPES (medium [3]) than in the unbuffered medium ([1]) as indicated by the percentage of fluorescein labelled cells (80% and 94%, respectively) and R values (esterase activity affected). Significant similar results ($P \geq 0.02$) were obtained at 0.79 μM labile copper in medium [5] and are in agreement with the four-day lag phase observed.

In general, labile copper ≥ 1.58 μM induced a decrease of fluorescein positive cells with the time of exposure. No remarkable difference between cells from HEPES buffered ([3], [5]) and unbuffered ESAW ([1]) media was observed ($P > 0.02$). These results are consistent with growth data but also showed that, even after 10 days of exposure to these highest concentrations, a certain percentage of cells still remained fluorescein positive. At these concentrations, R values were generally

higher than 1, indicating an intensification of fluorescein fluorescence. The highest R values were obtained after 1 day of exposure to copper. As discussed in a previous work (Lage *et al.* submitted), this result may not reflect an increase in esterase activity but an increase in intracellular pH, due to encystment. Encystment associated with loss of motility was observed in cells exposed for one day to 1.58 μM labile copper, observation in agreement with $R > 1$. After 10 days, the 88% of fluorescein labelled cells exhibited already a certain degree of motility, which indicated that the cells were no more encysted, but their esterase activity was affected ($R = 0.46$).

Toxicity Studies in DIPSO Buffered Media

Growth of *A. carterae* in complete [2] and ES-deficient [4] DIPSO-buffered media in copper concentrations between 0 and 15.8 μM total metal was measured after 6 days of exposure and are presented in Figure 1B. For comparison, growth rates obtained in medium [1] were also included in the same figure. It is clearly evident that DIPSO markedly diminished copper toxicity in such a way that it was impossible to estimate EC_{50} values in both media. Growth rates were almost the same in all the copper concentrations assayed ($P \geq 0.01$) contrary to what happened in medium [1]. DIPSO capacity to eliminate copper toxicity is emphasized in the ES-deficient medium [4] where EDTA is absent. These results suggest that DIPSO may replace EDTA in its role as a metallic cation buffer, avoiding metal precipitation.

The speciation of copper in the DIPSO-buffered media (Table 2) supports the absence of toxicity. In fact, the labile copper concentrations were about 100-fold lower than those in HEPES-buffered and ESAW unbuffered media, and of the same order of magnitude of free copper in these media [1, 3, 5].

Conclusions

Both buffers, DIPSO and HEPES, at 10 and 25 mM, respectively, were non-toxic to the marine dinoflagellate *A. carterae.*

HEPES does not significantly complex copper(II) but increased the toxicity of the metal, possibly by changing the kinetics of metal binding to the organisms due to the surfactant properties it displays at 25 mM. The effect of HEPES in copper toxicity was supported by the different biological parameters analyzed.

On the other hand, in the presence of DIPSO, which is a strong copper(II) complexing agent, copper toxicity was not observed. This result suggests that DIPSO may substitute for EDTA in culture media, with the advantage of being simultaneously a pH and a metallic buffer.

The similarity of results obtained in complete and ES-deficient buffered media indicate that short-term toxicity experiments can be performed in these simplified media.

Acknowledgments. The authors acknowledge Carlos A. R. Gomes for the calculations of complexing parameters and António J. T. Sousa for the potentiometric routine work. Financial support for this work was provided by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica–JNICT, Lisbon.

References

Anderson DM, Morel FMM (1978) Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis.* Limnol Oceanogr 23:283–295

Azenha M, Vasconcelos MT, Cabral JPS (1995) Organic ligands reduce copper toxicity in *Pseudomonas syringae.* Environ Toxicol Chem 14:369–373

Buckley JA (1994) The bioavailability of copper in wastewater to *Lemna minor* with biological and electrochemical measures of complexation. Wat Res 28:2457–2467

Buffle I (1988) Interpretation of complexation equilibria. In: Buffle I (ed) Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach. Ellis Horwood, Chichester, pp 228–232

De Filippis LF, Pallaghy CK (1994) Heavy metals: sources and biological effects. In: Rai SC, Gaur JP, Soeder CJ (eds) Algae and water pollution. Arch Hidrobiologie 42:31–77

Dorsey J, Yentsch CM, Mayo S, McKenna C (1989) Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. Cytometry 10:622–628

Fábregas J, Vásquez V, Cabezas B, Otero A (1993) Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria. J Appl Phycol 5:543–545

Ferguson WJ, Braunschweiger KI, Braunschweiger WR, Smith JR, McCormick JJ, Wasmann CC, Jarvis NP, Bell DH, Good NE (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. Anal Biochem 104:300–310

Gavis J, Guillard RRL, Woodward BL (1981) Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. J Mar Res 39:315–333

Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry 5:467–477

Harrison PJ, Rosemary EW, Taylor FJR (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J Phycol 16:28–35

Hawkins PR, Griffiths DJ (1982) Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. Bot Mar 25:31–33

Hogfeldt E (1982) Stability constants of metal ion complexes. Part A. Inorganic ligands. Pergamon Press, Oxford

Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of the metals in the metabolism of microrganisms. Proc Am. Phil Soc 94:152–170

Lage OM, Parente AM, Soares HMVM, Vasconcelos MTSD, Salema R (1994) Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. Eur J Phycol 29:253–260

Lage OM, Osswald JM, Parente AM, Salema R (1996a) Influence of several buffers in the growth of *Amphidinium carterae* Hulburt and *Prorocentrum micans* Ehr. in batch culture. Anais Fac Ciências (in press)

Lage OM, Soares HMVM, Vasconcelos MTSD, Parente AM, Salema R (1996b) Toxicity effects of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae.* Influence of metal speciation. Eur J Phycol 32 (in press)

Lage OM, Sansonetty F, Osswald JM, Parente AM, Salema R. Evaluation of copper effects on *Amphidinium carterae* by FCM quantification of esterase activity. Cytometry (submitted)

Martell AE, Smith RM (1974) Critical stability constants. Volume 1: Amino acids. Plenum Press, NY, pp 204–207

Miller JC, Miller JV (1994) Statistics for analytical chemistry. Ellis Horwood, NY

Morel FMM, Rueter JG, Anderson DM, Guillard RRL (1979) Aquil: a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. J Phycol 15:135–141

Nalewajko C (1994) Effects of surfactants on algae. In: Rai SC, Gaur

JP, Soeder CJ (eds) Algae and water pollution. Arch Hidrobiologie 42:195–204

Overnell J (1975) The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta and Phaeodactylum tricornutum.* Mar Biol 29:99–103

Price NM, Harrison GI, Hering JG, Hudson RJ, Nirel PMV, Palenik B, Morel FMM (1989) Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. Biol Oceanogr 6:443–461

Price NM, Morel FMM (1994) Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. In: Rai SC, Gaur JP, Soeder CJ (eds) Algae and water pollution. Arch Hidrobiologie 42:79–97

Provasoli L, McLaughlin JJA, Droop MR (1957) The development of artificial media for marine algae. Arch Mikrobiol 25:392–428

Soares HMVM, Vasconcelos MTSD (1994) Study of the lability of copper(II)-fulvic complexes by ion selective electrodes and potentiometric stripping analysis. Anal Chim Acta 293:261–270

Stoll VS, Blanchard JS (1990) Buffers: principles and practice. Methods Enzym 182:24–38

Stumm W, Morgan J (1981) Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. Wiley, NY

Tubbing DMJ, Admiraal W, Cleven RFMJ, Iqbal M, van de Meent D, Verweij W (1994) The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. Wat Res 28:37–44

Vasconcelos MTSD, Azenha MAGO, Lage OM (1996) Electrochemical evidence of surfactant activity of the HEPES pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures *in vitro.* Anal Biochem (accepted)

Visviki I, Rachlin JW (1991) The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine algae *Dunaliella minuta,* in both acute and chronic exposure. Arch Environ Contam Toxicol 20:271–275

Westall JC (1979) MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC. Internal Report, EAWAG, Dubendorf

Wilkins RG (1991) Kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes. 2nd edition VCH, Weinhein, Germany

Trabalho 5

TOXICIDADE DO COBRE EM *AMPHIDINIUM CARTERAE*. AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA ACTIVIDADE ESTERÁSICA CELULAR MEDIDA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Lage, O. M., Sansonetty, F., Osswald, J. M., Parente, A. M. & Salema , R. Copper toxicity on *Amphidinium carterae*. Evaluation by cell esterase activity measured by flow cytometry. (Submetido para publicação na revista **Cytometry**)

Copper Toxicity on *Amphidinium carterae*. Evaluation by Cell Esterase Activity Measured by Flow Cytometry [1,2]

Olga M. Lage, Filipe Sansonetty, Joana M. Osswald, Ana M. Parente and Roberto Salema

Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal.

IPATIMUP, Rua Roberto Frias, 4200 Porto, Portugal.

Mailing address: Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal. Telephone - 351 2 6099154, Fax - 351 2 6099157

Evaluation of copper toxicity by the FDA assay

---

[1] Financial support for this work was provided by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica - JNICT (Lisboa).

[2] Part of this work was presented at the Vth Spanish Portuguese Congress of Biochemistry, September 27-30, 1994, Salamanca.

Abstract

Toxic effects of sublethal copper concentrations were studied in the unicellular marine dinoflagellate *Amphidinium carterae* by flow cytometric and fluorescence microscopic evaluation of cell "viability" with the FDA assay. Cells exposed to 2.8 µM estimated labile copper (15.8 µM total copper) underwent morphological and physiological alterations apparently indicative of encystment. Under FCM, these cells showed an intense green fluorescence after loading with FDA when compared to cells not exposed to copper or exposed to lower concentrations of this metal. These results may reflect alterations in the "metabolic status" of the cells which could be on the basis of the adaptative mechanism of *A. carterae* to copper stress under extreme conditions. Phenonena probably behind the results obtained, the high fluorescence levels in these cells, are discussed.

Key words: Copper toxicity, esterase activity, cell viability, fluorescein diacetate (FDA), flow cytometry, *Amphidinium carterae*.

INTRODUCTION

Man's awareness of the increasing pollution problems justify metal toxicity studies as a pertinent topic of research. Copper is an abundant metal in the environment. It may play a double role, as an essential micronutrient and as a toxicant, depending on its bioavailability. In our laboratory we are studying copper toxicity in marine dinoflagellates, organisms that can, in their natural environment, be directly exposed to high levels of this metal as a result of human activities. These algae, one of the most important group of phytoplankton, are at the base of the aquatic food chain and the bioaccumulation of pollutants like copper by these microorganisms may cause serious problems at higher trophic levels.

Flow cytometry (FCM) is being increasingly used in phytoplankton studies and its relevance has been summarized by Phinney and Cucci (21). Examples of FCM applications are the analysis of the dinoflagellate toxin saxitoxin (28), the study of the marine phytoplankton distribution by chlorophyll and DNA analysis (17,18), the study of the effects of environmental stress on cell cycle (19) , the discovery of a new group of prochlorophytes organisms in the oceans (5), the measurement of cell DNA (4), and the development of a method of immunochemical identification of toxic dinoflagellates (26). Beside these and other potential applications, important advantages of FCM are rapidity, sensitivity, multiparametric analysis and cell sorting capacity. These features are making this technique a very promising one in this field. An interesting application is the evaluation of cell "viability", through esterase activity measurements using fluorescein diacetate (FDA). FDA has been used to test "viability" in different cells like mammalian (22), bacteria (13), marine phytoplankton (3,7,24) and cultured plant cells (27). FDA is a non-fluorescent, nonpolar and lipophilic molecule that diffuses across cell membranes. After entering the cell, its acetate residues are cleaved off by nonspecific esterases and the polar hydrophilic fluorescent product that is formed, the fluorescein, is retained by cells with intact plasma membranes. Dead or "non-viable" cells with altered membranes rapidly leak the dye, even if they retain some residual esterase activity, and remain non-fluorescent. Esterases are common enzymes in both plant and animal cells. This

assay relies on an active metabolic process, the enzymatic activity of esterases, to identify "living" (viable) cells.

In this work we used the rapid and reproducible FDA assay to assess toxic effects caused by copper in the unicellular marine dinoflagellate *Amphidinium carterae,* a species common in the portuguese coastal waters.

MATERIALS AND METHODS

Culturing conditions

A. carterae (isolate 39) was kindly supplied by Dr. Estela Sousa e Silva (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). Stock cultures were maintained in the artificial seawater medium ESAW - Enrichment Solution Artificial seaWater (8), at 19 ± 1°C, on a 12 h light : 12 h darkness light regimen and in a cold white photon fluxe intensity of about 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Preparation of fluorescein diacetate

A stock solution of FDA (5 $mg.cm^{-3}$ in dimethylsulfoxide) was prepared as described by Dorsey et al.(7) and stored at 4 °C in 100 µl aliquots. When needed, each aliquot of FDA was diluted 40-fold into cold 32‰ NaCl, pH 7.9, kept in ice, in the dark and subsequently used to assess cell "viability" by the addition of 25 µl to 1 ml of cell culture (FDA final concentration of 7.5 µM). Microscopic observations and flow cytometric analysis were performed after 10 min. of fluorescence development.

Toxicity experiments

Copper as 0.16 mM (10 $mg.dm^{-3}$) copper (II) chloride in 5 mM HCl was added to unialgal batch cultures of *A. carterae,* in exponential growth phase, in order to obtain concentrations in the range of 0-15.8 µM total copper (7.87, 11.9 and 15.8 µM total copper corresponding to, respectivelly, 0.27, 0.77 and 2.8 µM estimated labile copper). As a control, the cells were cultivated in the same medium without copper. All the experiments were done in 100 cm^3 glass flasks. Each test was run in triplicate. The growth of the cultures was followed by cell number quantification in neutral formaldehyde fixed samples in a Coulter counter (Model ZM). Labile copper concentrations were estimated by computational simulations of chemical

equilibrium in ESAW medium for the various total metal concentrations tested as previously described (14). To avoid copper contamination of the culture medium all glassware was washed with nitric acid and deionized water.

FCM Cell analysis

After cell loading with FDA, accumulation of fluorescein was measured using a Coulter EPICS C flow cytometer, in cell suspensions from cultures growing in different copper concentrations and at different days. Forward and orthogonal light scatters and green and red fluorescence were analyzed. In all measurements, data were collected from 2,000 cells. Laser emission was 200 mW at 488 nm. Green fluorescence was measured using a 530 nm short pass filter and red fluorescence with a 610 nm long pass filter. Histograms were analyzed with the Epics Cytologic Software.

In order to evaluate the effects of copper on *A. carterae,* measured by the FDA assay, the ratios of green fluorescence (R) of cell populations, after different times of exposure to different copper concentrations were calculated (using always the situation without copper as control), with the following formulations: 1) d = (green fluorescence mean channel of positive cells incubated with FDA) - (green autofluorescence mean channel); 2) F = 10 ^ (d x (3 / 256)); 3) R = F of cells exposed to copper / F of cells in the absence of copper. The log histograms were linearized by equation 2). A R value less than one means a decrease in green fluorescence while a value greater than one means an increase, with respect to reference cells not exposed to copper.

The data were subjected to descriptive statistical analysis. Each value presented is the mean of determinations from triplicate cultures.

Microscopy

Epifluorescence microscopy of *A. carterae* was done in a Zeiss Axioskop microscope using the Zeiss filter set 48-79-09: 450-490 nm blue excitation, 510 chromatic beam splitter and a 520 barrier filter.

A. carterae images were also obtained by a confocal scanning laser microscope (Bio-Rad MRC-600). For excitation of fluorescein, a light emission at 488 nm from an air-cooled argon-ion laser was used. Three dimensional images were directly recorded with a x63, NA =

1.40, Nikon planapo oil-immersion objective by scanning at ascending z-levels. Image analysis was performed using the COMOS software (Bio Rad Labs.).

RESULTS

A. carterae produces a characteristic 90°LS x FLS log histogram with an homogeneous population (Fig. 1). In a monoparametric log green fluorescence histogram a well defined autofluorescence distribution can be seen (Fig. 2A). After cell loading with FDA the green fluorescence increases considerably (Fig. 2B) in comparison with autofluorescence levels (Fig. 2A). In a control cell suspension of "non-viable" cells (killed by neutral formaldehyde), green fluorescence was shown to be coincident with green autofluorescence. This result enables us to quantify the proportion of "non-viable " cells in a sample. To control this quantification, mixtures of different percentages of dead and live cells were analyzed. The results obtained showed the validity of the FDA assay (Fig. 3).

The effect of copper on the growth of *A. carterae* is shown in Fig. 4. In the control and in the 0.27 µM estimated labile copper exposed cultures, growth was similar, being only slightly inferior in the presence of the metal (12% reduction of the growth rate in logarithmic phase and 14% reduction of cell number attained after 10 days of growth). Toxic effect of copper was observed in the presence of 0.77 µM estimated labile copper where a lag phase of two days, a slight reduction in the growth rate (25%) and a decrease in the cell number (40 %) attained after 10 days of exposure to the metal occurred comparative to the control. Labile copper at an estimated concentration of 2.8 µM resulted in inhibition of culture growth and even cell death at day 10 of exposure to the metal.

Figure 5 shows the percentage of "viable cells" after exposure in different days to the copper concentrations tested. In the absence of copper there was approximately 100 % "viability". After 1 day of exposure to the metal and in the two highest concentrations tested it was observed a certain percentage of "non-viable" cells, probably due to the initial impact of copper in the cells. After 2 and 4 days almost all the cells were "viable", even in the highest copper concentration. The effects of copper toxicity on cell "viability" were well visible after

10 days of exposure to 2.8 μM estimated labile copper. A percentage of "non-viable" cells was detectable at 0.27 μM and 0.77 μM estimated labile copper.

The FDA assay, with quantification of esterase activity using FCM, showed that the majority of the cells exposed to 2.80 μM estimated labile copper were "viable" (although a number of "non-viable" cells could be found - Fig. 5) and that the mean fluorescence intensity increased significantly when compared to that of cells not treated with copper (more than 4.5 times) (Figs 2B, 2D and 6) or exposed to lower levels of this metal (Figs 2C, 2D and 6). This increase was so high that it was necessary to acquire the green fluorescence with half the value of the voltage of the photomultiplier (PMT) for signal visualization (Fig 2D). Cells exposed to 0.27 μM or 0.77 μM estimated labile copper showed a decrease of the mean green fluorescence after loading with FDA and after they had reached their maximum mean fluorescence ($R < 1$) (Figs 2B, 2C and 6). At 0.77 μM estimated labile copper and only after 1 day of exposure to copper, the mean green fluorescence increased considerably ($R = 2.7$), phenomenon similar to the one observed at 2.80 μM estimated labile copper. Cells not exposed to copper or exposed to 0.27 μM or 0.77 μM estimated labile copper 1 or 2 h after FDA loading showed loss of fluorescence intensity (probably by leakage out of the cell) while the cells exposed to 2.80 μM estimated labile copper maintained the same levels of green fluorescence as after 10 min. of FDA load. To exclude any direct copper-fluorescein interaction we compared fluorimetrically mixtures of (1) culture medium + 0.39 μM fluorescein and (2) culture medium + 0.39 μM fluorescein + 2.80 μM labile copper. The levels of fluorescence of the two mixtures were similar.

The exposure to the different copper concentrations did not affect the intense red autofluorescence of *A. carterae* (Fig. 7), which comes mainly from chlorophyll a.

The exposure of *A. carterae* to 2.80 μM estimated labile copper induced morphological alterations. The cells underwent a shape change, becoming more spherical (Figs 8), non-motile (no flagella were observed) (Figs 8) and some formed aggregates of varied dimensions (Figs 8B, and 9A). These effects persisted during the 10 days of experiment. The cells that underwent these alterations had their motility restored when re-inoculated in copper-free medium and the culture attained normal growth rate (data not shown).

When FDA assay was performed the great majority of the cells were shown to be fluorescein "positive" (Fig. 9A) and its intense green fluorescence was localized mainly in the cytoplasm, in contrast to the peripheral localization of the red autofluorescence from chlorophyll in the chloroplast (Fig. 9B).

DISCUSSION

A. carterae is a microrganism with good characteristics for FCM studies. The comparison of the fluorescein fluorescence after FDA loading with the cell green autofluorescence, an intrinsic and well defined parameter, enables us to rapidly assess the "viability" of a sample of this dinoflagellate in a reproducible way.

Our results showed that copper interfered with the growth of the cultures and the cell "viability" of *A. carterae* but not with its levels of chlorophyll. Based on culture growth, sublethality was achieved around an estimate labile concentration of 0.77 μM while 2.8 μM inhibited growth and induced death, after a longer period of exposure to the metal. Although, if cell "viability" was analyzed (FDA assay), both 0.27 μM or 0.77 μM estimated labile copper showed to be sublethal concentrations ($R<1$). Lage et al. (14) reported sublethal toxic effects of copper on culture growth of *A. carterae* as well as on cell motility. They observed that under copper stress, cells lost their motility but, as the levels of copper assayed were not so high as those tested in this work, cells could recover their motility. At the estimated labile concentrations of 2.8 μM *A. carterae* cells irreversibly lost their motility during the 10 days of the experiment. Motility has been used as an alternative methodology to evaluate cell "viability" (24). If we only considered this parameter we would interpret that these cells were "non-viable". However, the high fluorescein fluorescence levels exhibited by them probably can reflect an intense esterase activity and may be interpreted as a sign of "viability". This result was confirmed by the re-establishment of culture growth in medium without copper, after inoculum transfer. A similar recovering result was observed by Hawkins and Griffiths (9) in *A. carterae* cells with cell division strongly inhibited by copper. The pollutant fluoride at

concentrations that almost totally inhibited growth also induced immobilization of *A. carterae* cells, which appeared rounder in shape (11).

An interesting aspect to point out is the fact that the *A. carterae* response to copper was not linear when the intensity of the fluorescein fluorescence after FDA loading was analyzed. As copper concentration increased (0.27 µM and 0.77 µM estimated labile copper) generally a decrease of the fluorescein fluorescence occurred (R<1) compared to the cells not treated with copper. Copper at these levels probably interfered negatively with the metabolic process that involved the breakdown of the FDA molecule, possibly by a decrease of esterase activity, or it may have induced a decrease in the FDA absorption or a fluorescein leakage due to alteration of the plasma membrane permeability. The rapid adsorption of Cu^{2+} ions to the anionic polysaccharide surface of the cell covering of *A. carterae* (12), making a coat of positive charges, may change the electrical potential of the plasma membrane just beyond this layer, most probably altering its permeability. The interaction of copper with the sulphydryl groups in a cell membrane, probably forming -S-Cu-S- bridges, could produce considerable stress at the molecular level inducing changes in the permeability of the membrane (6). McBrien and Hassall (15) suggested that the primary toxic effect of copper is to increase the permeability of the cell membrane. The increase in permeability led to loss of intracellular constituents, like potassium ions. This phenomenon was observed, for instances, by McBrien and Hassall (15) and Overnell (20) respectively, in *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* exposed to copper and also in *A. carterae* by us (data not shown). This potassium leakage could be interpreted as a Cu^{2+}/K^{+} antiport. Studies of copper transport across membranes are sparse and incomplete (10).

On the other hand, at the estimated labile copper concentrations of 2.8 µM the mean fluorescein fluorescence did not diminished but, unexpectedly, it increased most significantly, despite an increase in the number of "non-viable" cells with time (non-fluorescent) occurred. This response to such high levels of copper, which persisted during the 10 days of experiment, may be indicative of alterations in the "metabolic status" of the cells, reflecting possibly an increase in the activity of the esterases as a defense response. Another possible explanation to this highly "positive" signal is an increase of the cellular pH due to copper

absorption to levels that intensify fluorescein fluorescence. The absorption of unusual high levels of Cu^{2+} cations leads to an increase of positive charges inside the cell, at least during a certain period of time. In order to maintain an appropriate ionic balance cells may excrete H^+ or absorb OH^- which implicates an increase of the cellular pH. The emission of fluorescein is pH dependent (25) (pKa ~ 6.5); the longest-wavelength absorbance and emission peaks heights are considerably diminished at acidic pH. The fact that these cells after 1 or 2 h of FDA loading remained with the same intense fluorescein fluorescence levels showed that membrane permeability did not increase by the action of copper as was observed in cells exposed to 0.27 μM and 0.77 μM estimated labile copper.

When copper was added to the *A. carterae* cultures and during a certain period of time, before the chemical equilibrium of copper in the medium was established, the cells were exposed to much higher levels of the metal than the estimated ones (14). The bioavailable copper concentration was close to the total copper concentration. This may be the reason why the cells, after one day of exposure to 0.77 μM estimated labile copper, showed an intense mean green fluorescence compared to the control (R = 2.7). During a short period the adsorbed and absorbed copper concentrations should have been of the same order of magnitude in the cells exposed to the two higher copper levels tested leading to a similar cell response. At the second day of incubation this effect was no more evident and the cells showed R values indicative of sublethal toxicity.

As observed microscopically, under the highest copper concentration *A. carterae* seemed to form cysts, morphologically similar to the ones described by Sampayo (23) for this species. Loss of motility and a very positive fluorescein signal (probably high esterase activity) seem to be two rapid responses of the vegetative form towards this high level of copper during the process of encystment associated with persistence of the plasma membrane integrity. These changes of the "metabolic status" of the cell may reflect an adaptative mechanism of *A. carterae* to an aggressive environmental change. Similarly, Bentley-Mowat (3) using fluorescence microscopy observed that vegetative "auxospores" of *Ditylum* formed in cultures under copper stress showed a strong reaction with FDA. Anderson and Morel (1) also observed that the response of *Gonyaulax tamarensis* to toxic levels of copper was a rapid loss

of motility and loss of the cell capacity to divide. These cells increased in size and could also be "revived" if normal culture conditions were restored. They did not consider these nonmotile cells as cysts, but as a temporary resting stage in the life cycle of *G. tamarensis*. Anderson and Wall (2) induced the formation of asexual cysts in laboratory cultures of *Gonyaulax excavata* by treatment with cold, nutrient starvation and toxic copper concentrations. These cysts, referred to as pellicle cysts, were nonmotile athecate cells, incapable of overwintering and their role in nature was considered as an adaptation to short-term perturbations in ambient conditions. Pellicle cysts are characterized by the presence of a pellicular wall layer surrounding the cell. Morrill and Loeblich (16) in a survey of representatives of twenty dinoflagellate genera did not find any sign of a pellicular layer in *Amphidinium* spp. *A. carterae* is an athecate species and thus that the kind of cysts we observed could not be considered pellicle cysts, despite having some characteristics in common. We intend to make an ultrastructural study of these cells in order to evaluate structural alterations and to clarify the existence of such a layer.

We find that the FDA assay and flow cytometry are useful in the evaluation of metal and probably cytotoxicity of other substances in unicellular phytoplankton. This technique allows us to get information after short periods of exposure to the toxicant. This would be impossible to achieve with a parameter like culture growth, specially in species with doubling time of some days as happens with *A. carterae*. Selvin et al (24) pointed out the usefulness of the FDA assay in the identification and study of temporary resting stages.

Our results show that more attention should be addressed when determining lethal concentrations because, even when inhibition and death of the cultures occurred, at least some cells could be "viable" during a certain period of time and potentially capable of restoring growth if normal conditions are reestablished.

In order to obtain more information about the magnitude of the apparent metabolic alterations observed during the process of encystment, several other functional parameters (*e.g.* intracellular pH measurements) are being evaluated.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. Helena Monteiro from Faculdade de Engenharia U.P. for the estimation of copper lability, Professor Claudio Sunkel and Paula Almeida Coelho from Centro de Citologia Experimental, U.P. for the cell observations in the Confocal Microscope. We also thank Professor Dr. G. Valet and Dr. A. Davies for their review of the manuscript and pertinent criticisms and suggestions and Professor Dr. J. D. Dodge for reading the manuscript. The authors are grateful to Mrs. M. Andreia Costa for excellent technical assistance with the photographs.

LITERATURE CITTED

1. Anderson DM, Morel FMM: Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. Limnol Oceanogr 23:283-295, 1978.
2. Anderson DM, Wall D: Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. J Phycol 14:224-234, 1978.
3. Bentley-Mowat JA: Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. Bot Mar 25:203-204, 1982.
4. Boucher N, Vaulot D, Partensky F: Flow cytometric determination of phytoplankton DNA in cultures and oceanic populations. Mar Ecol Prog Ser 71:75-84, 1991.
5. Chrisholm SW, Olson RJ, Zettler ER, Waterbury J, Goericke R, Welschmeyer N: A novel free-living prochlorophyte occurs at high cell concentrations in the oceanic euphotic zone. Nature 334:340-343, 1988.
6. Davies AG: Pollution studies with marine plankton. Part II. Heavy metals. Adv mar Biol 15:381-508.
7. Dorsey J, Yentsch CM, Mayo S, McKenna C: Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. Cytometry 10:622-628, 1989.
8. Harrison PJ, Rosemary E.W, Taylor FJR: A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J Phycol 16:28-35, 1980.

9. Hawkins PR, Griffiths DJ: Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. Bot Mar 25:31-33, 1982.

10. Hughes MM, Poole RK: Metals and Micro-organisms. Chapman and Hall, London, 1989.

11. Klut ME, Bisalputra T, Antia NJ: Abnormal ultrastructural feactures of a marine dinoflagellate adapted to grow successfully in the presence of inhibitory fluoride concentration. J Protozool 28:406-414, 1981.

12. Klut ME, Bisalputra T, Antia NJ: Some cytochemical studies on the cell surface of *Amphidinium carterae* (*Dinophyceae*). Protoplasma 129:93-99, 1985.

13. Kvach JT, Veras JR: A fluorescent procedure for determining the validity of mycobacterial cells. Intern. J Leprosy 50:183-192, 1982.

14. Lage OM, Parente AM, Soares HMVM, Vasconcelos MTSD, Salema R: Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. Eur J Phycol 29:253-260, 1994.

15. McBrien DCH, Hassall KA: Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. Physiologia Pl 18:1059-1065, 1965.

16. Morrill LC, Loeblich AR III: The dinoflagellate pellicular wall layer and its occurrence in the division Pyrrhophyta. J Phycol 17:315-323, 1981.

17. Olson RJ, Frankel SL, Chrisholm SW, Shapiro HM: An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: chlorophyll and DNA distributions. J exp mar Biol Ecol 68:129-144, 1983.

18. Olson RJ, Vaulot D, Chrisholm SW: Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. Deep Sea Res 32:1273-1280, 1985.

19. Olson RJ, Vaulot D, Chrisholm SW: Effects of environmental stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species. Plant Physiol 80:918-925, 1986.

20. Overnell J: The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Biol. 29:99-103, 1975

21. Phinney DA, Cucci TL: Flow cytometry and phytoplankton. Cytometry 10:511-521, 1989.

22. Rotman B, Papermaster BW: Membrane properties of living mammalian cells studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc Natl Acad Sci USA. 55:134-141, 1966.

23. Sampayo MAM: Encystment of a portuguese isolate of *Amphidinium carterae* in cultures. *In* "Toxic Dinoflagellates", Anderson DM, White , and Baden DG (eds). Elsevier Scientific Publishing Co., Inc., , 1985, pp.125-130.

24. Selvin R, Reguera B, Bravo I, Yentsch CM: Use of fluorescein diacetate (FDA) as a single-cell probe of metabolic activity in dinoflagellate cultures. Biol Oceanog 6:505-511, 1988/1989.

25. Slavík J: Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. FEBS Letters 140:22-26, 1982.

26. Vrieling EG, Draaijer A, van Zeijl WJM, Peperzak L, Gieskes, WWC, Veenhuis M: The effect of labeling intensity, estimated by real-time confocal laser scanning microscopy, on flow cytometric appearance and identification of immunochemically labeled marine dinoflagellates. J Phycol 29:180-188, 1993.

27. Widholm JM: The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol 47:189-194, 1972.

28. Yentsch CM: Flow cytometric analysis of cellular saxitoxin in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* cf. *excavata*. Toxicon 19:611-621, 1981.

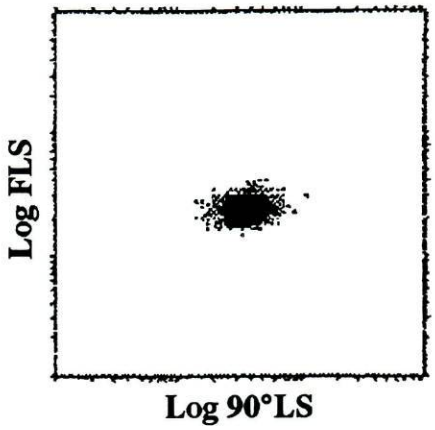


Fig. 1 - Dot plot relating log orthogonal light scatter (90°LS) *versus* log forward light scatter (FLS) produced by *A. carterae* cells. A very homogenous population is defined by these two physical parameters.

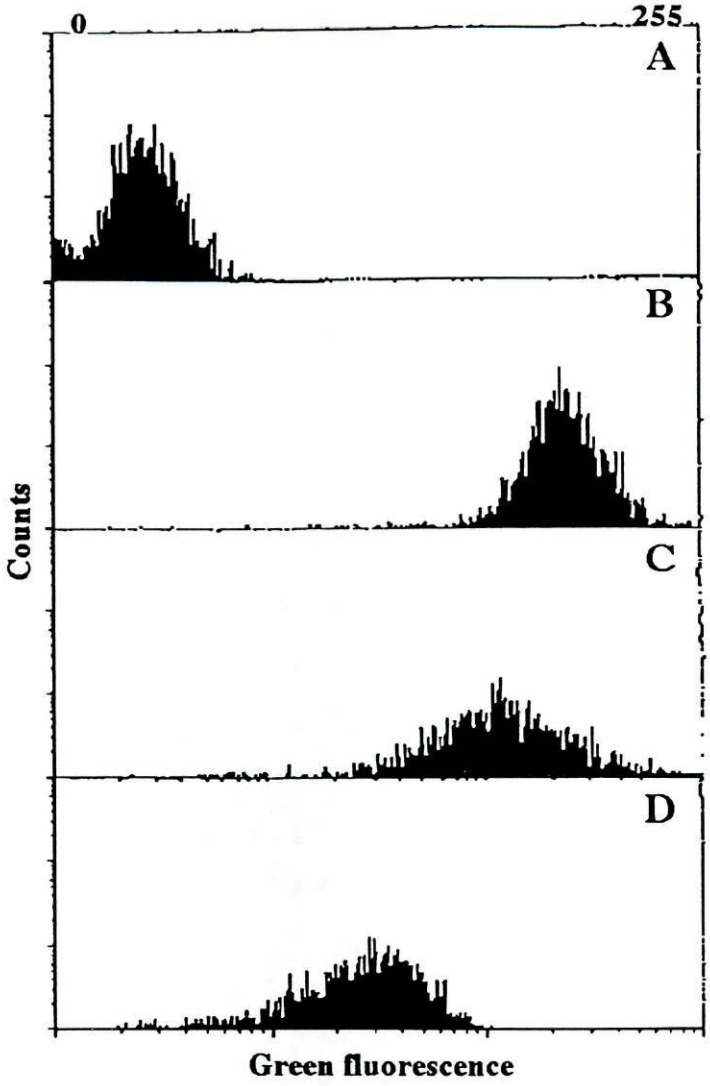


Fig. 2 - 3-Decade logaritmic histograms of green fluorescence after analysis of 2,000 cells of *A. carterae*. A) Green autofluorescence; B) FDA loaded *A. carterae* not exposed to copper; C) FDA loaded *A. carterae* exposed to 0.27 µM. The mean green fluorescence decreased comparative to the control (B) and the fluorescence distribution is broader. Similar results were obtained with 0.77 µM estimated labile copper; D) FDA loaded *A. carterae* exposed to 2.8 µM estimated labile copper (15.8 µM total copper). Under this concentration it occurred such a great increase of the green fluorescence that, to acquire the green fluorescence signal, it was necessary to reduce the voltage of the PMT to half the value (from 1220 V to 600 V).

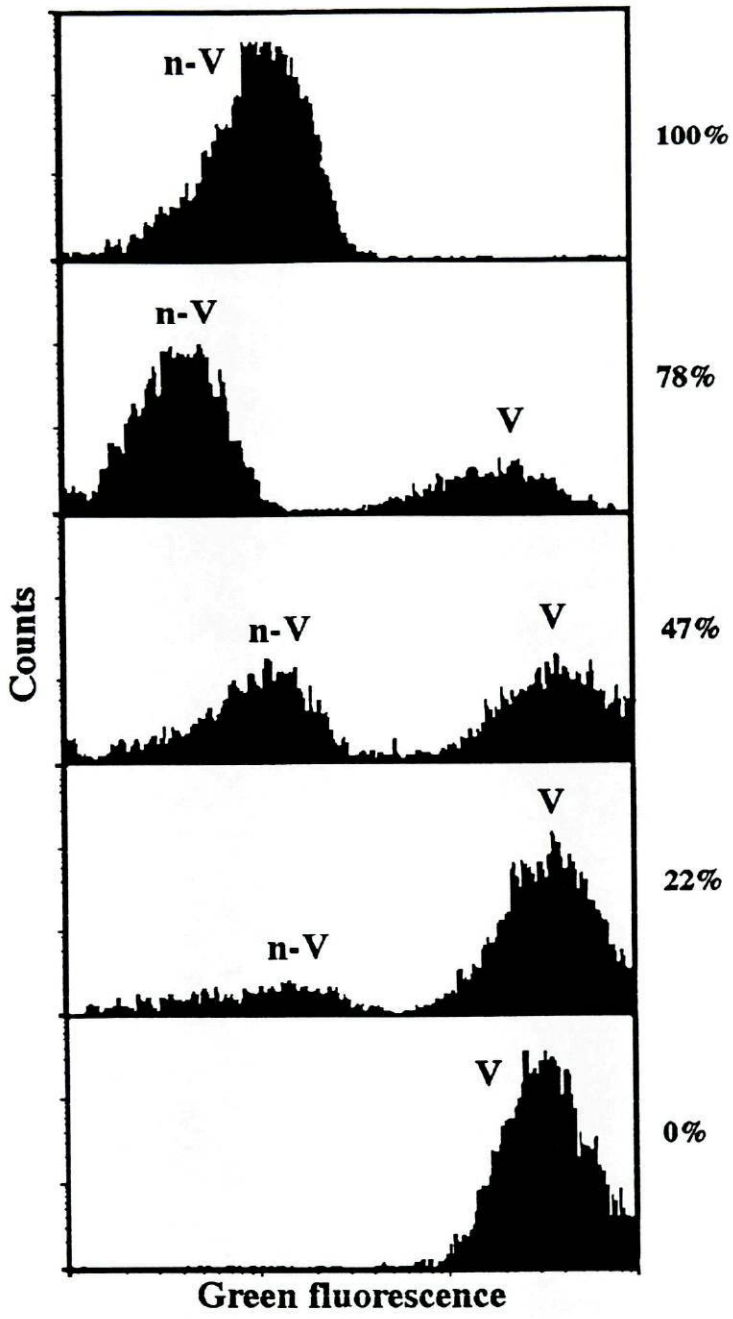


Fig. 3 - Green fluorescence logaritmic histograms of samples with different proportions of "viable" (V) and "non-viable" (n-V) *A. carterae* cells obtained as control of the FDA assay to quantificate "viability". The figures on the right are the percentage of "non-viable" cells, values estimated with the FCM data. Cell death was achived by treatment with neutral formaldehyde.

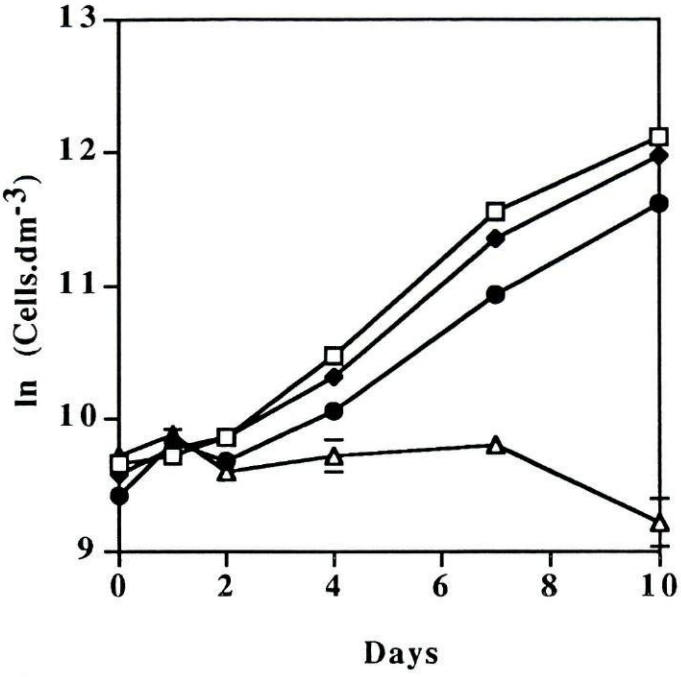


Fig. 4 - Growth curves of *A. carterae* batch cultures after exposure to copper and in its absence (control) during 10 days. —□— 0 μM; —◆— 0.27 μM; —●— 0.77 μM; —△— 2.8 μM.

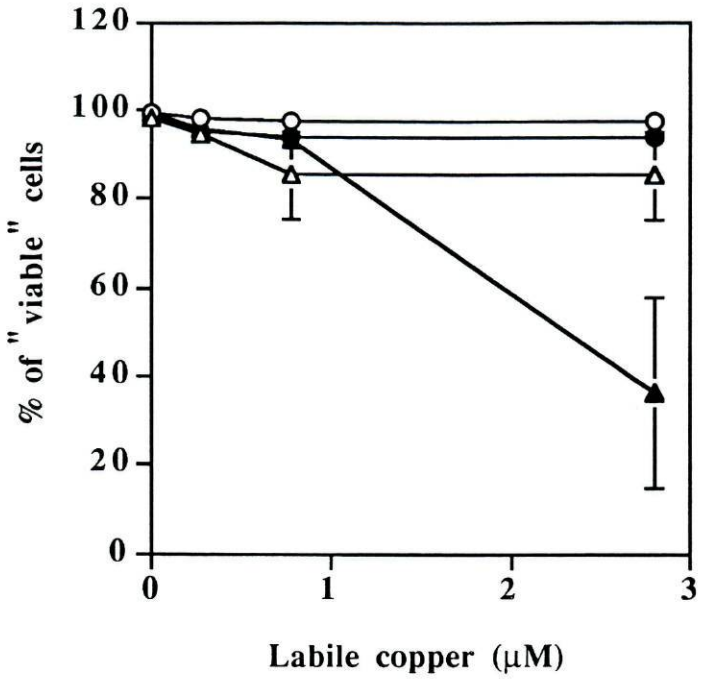


Figure 5 - Percentage of "viable" cells exposed to different concentrations of labile copper. Time of exposure to copper: —△— (1 day); —○— (2 days); —●— (4 days); —▲— (10 days).

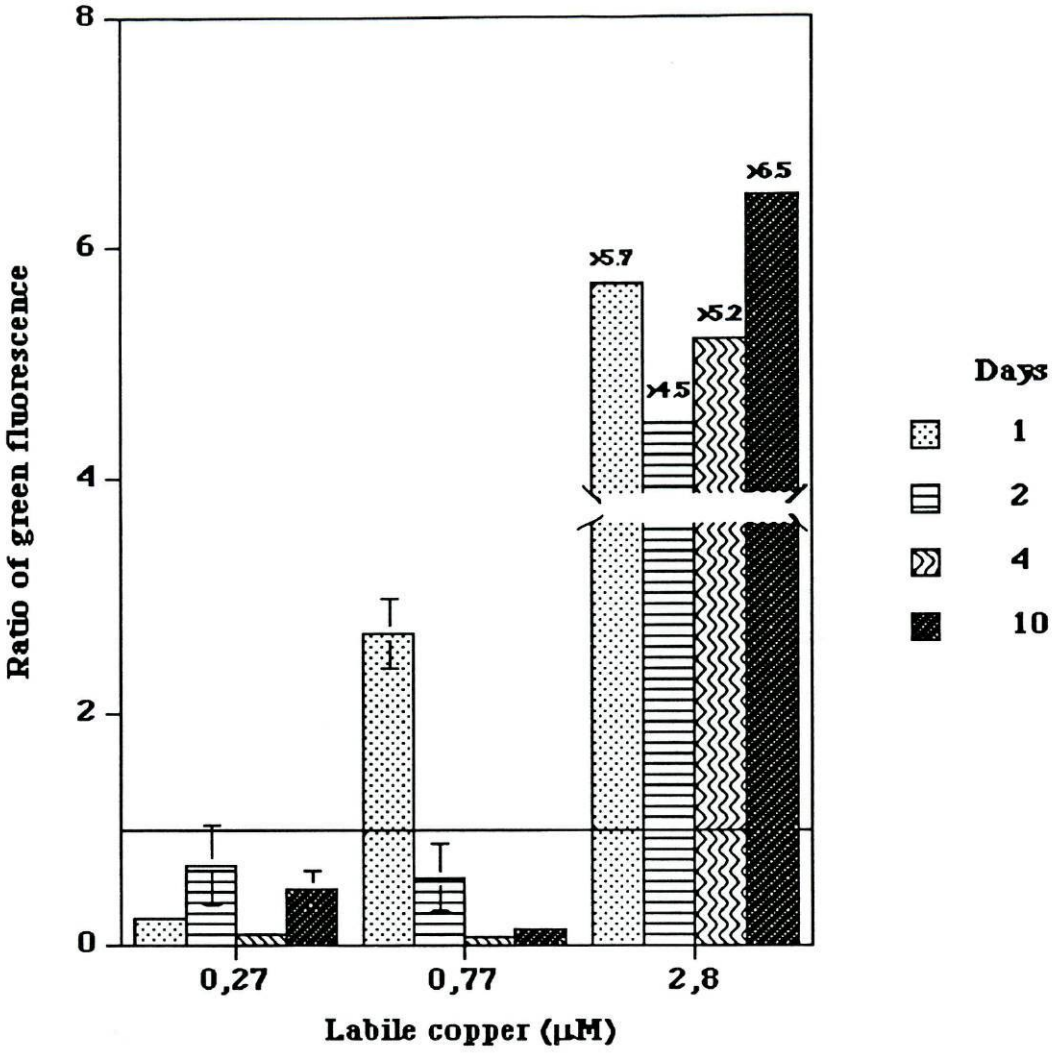


Fig. 6 - Histogram showing the calculated ratios of green fluorescence (R) of cell populations after different times of exposure to different copper concentrations, as compared to the assays without copper, as control. Exposure to 0.27 µM or 0.77 µM estimated labile copper (respectively, 7.87 µM or 11.9 µM total copper) generally decreased the mean green fluorescence. Unexpectedly, exposure to 2.80 µM estimated labile copper (15.8 µM total copper) induced an increase superior to about five fold (> 4.5, > 5.7, > 5.2, > 6.5) of the control assay fluorescence. Means and standard deviations (n=3) are given.

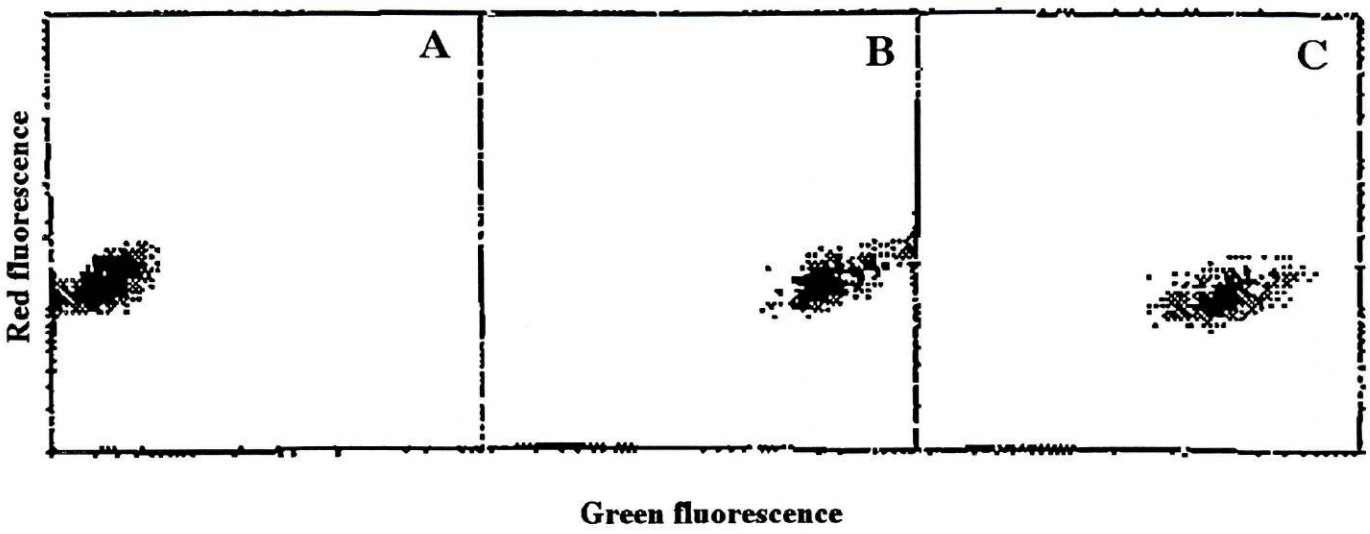


Fig. 7 - A biparametric logaritmic histogram (green fluorescence x red fluorescence) of *A. carterae* to show that the level of red autofluorescence (mainly due to chlorophyll) is stable. On the other hand the changes in the green fluorescence (fluorescein) are significant. (A) Autofluorescence; (B) Cells loaded with FDA but not exposed to copper and (C) exposed to 0.27 μM estimated labile copper (7.87 μM total copper).

Fig. 8 - Phase contrast microscopy of *A. carterae*. Cells exposed to 2.8 µM estimated labile copper (b) are non motile, more rounded in shape and form aggregates, aspects not observed in normal cells (a). F - Flagellum. Scale bars = 2 µm.

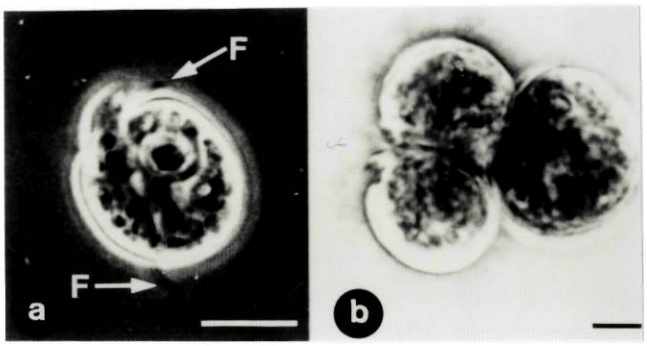
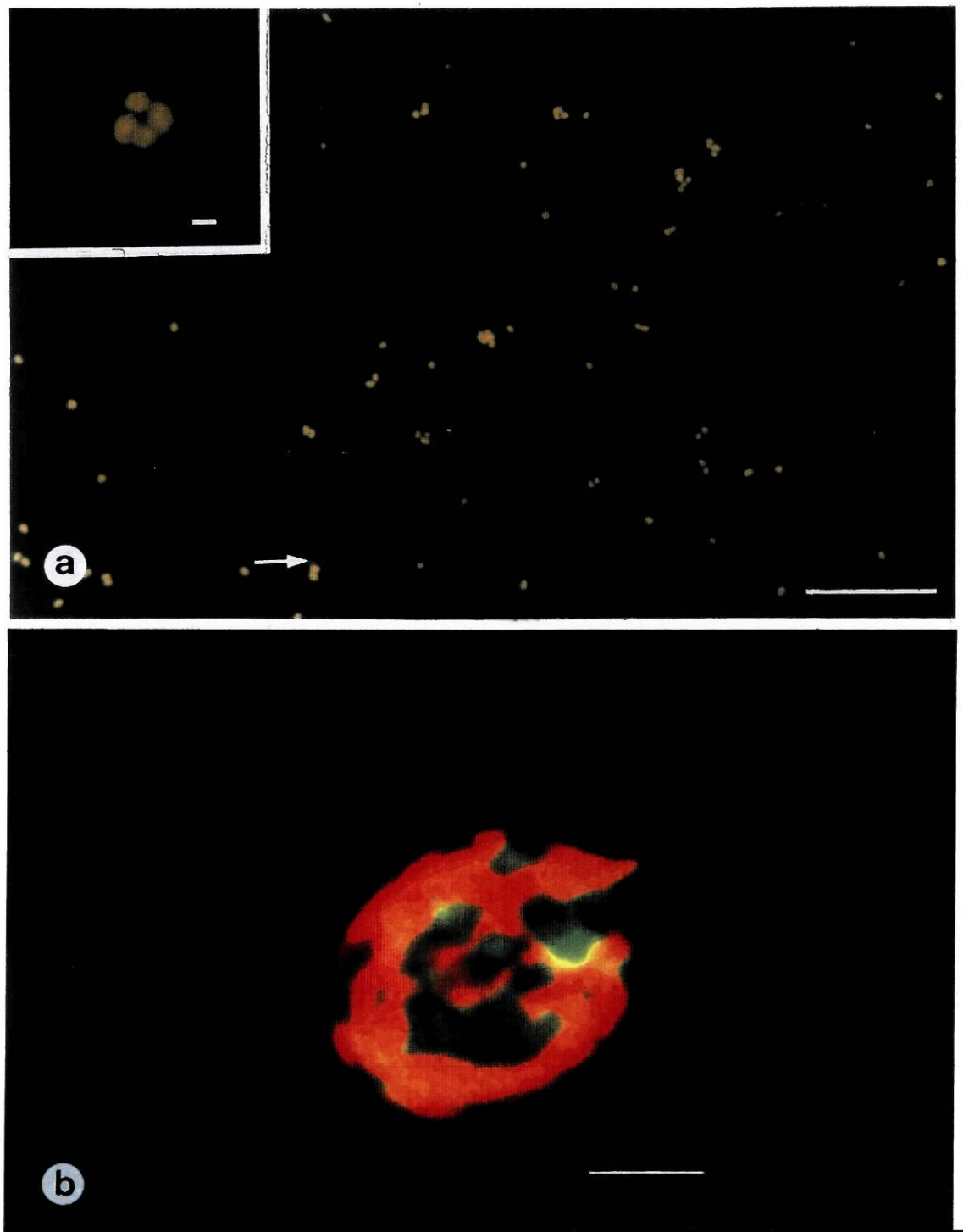


Fig. 9 - Fluorescein positive *A. carterae* cells exposed during one day to 2.8 µM estimated labile copper. After this period of time the majority of the cells were "viable" (a) and some formed aggregates (inset). Confocal scanning laser three dimensional micrograph (b) showing the cytoplasmatic localization of the fluorescein fluorescence in contrast to the intense red autofluorescence of chloroplasts periferically placed in the cell. Arrow - "Non viable" cells showing red autofluorescence. Scale bars: a) = 50 µm; inset and b) = 5 µm.



Trabalho 6

DIFERENÇAS NA MARCAÇÃO EM FLUORESCEÍNA EM *AMPHIDINIUM CARTERAE* COMO UMA INDICAÇÃO DE ENQUISTAMENTO

Lage, O. M., Sansonetty, F., Osswald, J. M., Parente, A. M. & Salema, R. Differences in fluorescein labelling of *Amphidinium carterae* as an indication of encystment. (Submetido para publicação à revista **Eur. J. Phycol.**)

Differences in fluorescein labelling of Amphidinium carterae as an indication of encystment

O. M. LAGE[1],F. SANSONETTY[2], J. M. OSSWALD[1], A. M. PARENTE[1] AND R. SALEMA[1]

[1] Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal

[2]IPATIMUP, Rua Roberto Frias, 4200 Porto, Portugal.

Running title: Fluorescein labelling of A. carterae and encystment

Abstract

The fluorescein diacetate (FDA) assay and flow cytometry (FCM) were used to assess possible differences in metabolic activity of Amphidinium carterae cells from exponential growing and stationary populations. Temporary cysts ("quiescent" cells) are described to appear mainly in laboratory cultures at stationary phase and not in exponential growing populations (only with "vegetative" cells). By definition "quiescent" cells should have lower metabolic activity than "vegetative" cells. Based on this hypothesis we tried to verify the following relationships: (1) low intensity of cellular fluorescein labelling indicating lower metabolic activity or esterase activity and therefore a "quiescent" state characteristic of encystment; (2) high intensity of fluorescein labelling indicating higher metabolic activity or esterase activity and therefore a "vegetative" state. In our experiments A. carterae cells from an exponential growing cultures showed an homogeneous fluorescein labelled population (P1) while cells from stationary cultures showed two distinct subpopulations, one with similar levels of fluorescein as P1 and another one (P2) with levels of fluorescein much higher (6 to 10 - fold higher). In a previous work, A. carterae cells exposed to 2.8 μM labile copper exhibited, after incubation with FDA, higher levels of fluorescein labelling (similar to P2), when compared to cells not exposed or exposed to lower concentrations of this metal (e.g. 0.77 μM labile copper). When cell samples from the exponential growing and stationary cultures were exposed for 30 minutes to 2.8 μM labile copper, only the P2 sub-population was then apparent. The two different stresses, caused either by culture ageing or by copper toxicity, induced the same change in the intensity of fluorescein labelling and are being interpreted by us as an indication of cell "encystment" and as a cell answer to stress factors. Going against the hypothesis raised above, P2 subpopulation has been interpreted as "quiescent" or "encysted" cells. The observed increase in fluorescence labelling, apparently related to encystment, may be determined by a real increase in esterase activity, or by an intracellular pH increase as fluorescein fluorescence at higher pH is more intense, or by both.

Keywords: Amphidinium carterae, copper, encystment, esterase activity, flow cytometry, cell viability.

Introduction

FDA assay is being extensively used to evaluate cell viability. This method is based on the accumulation of fluorescein inside the cells. Rotman and Papermaster (1966) suggested that the test was primarily one of the integrity of the cell membrane, being closely correlated with viability. Bentley-Mowat (1982), in a study of several species of phytoplankton, considered that the strength of the reaction (cleavage of FDA into fluorescein) appeared to be allied to the metabolic vigour of the cells. In this work, rapidly dividing cells showed a vigorous reaction, while static cultures a feeble reaction. He considered that the reaction offered a rapid and easy mean of determining morbidity and viability. Dorsey et al (1989) considered that FDA could be used to signal presence versus absence of active esterases and its rapid turnover correlated with metabolic activity. They believed that membrane turnover and photosynthesis were more active in healthy, rapidly growing cells than in stressed ones. Selvin et al (1989), in a survey of 30 clones of dinoflagellates, observed that cells with chlorophyll fluorescence in stationary cultures did not developed fluorescein fluorescence. In contrast to most strains examined, epiphytic species developed FDA fluorescence in most cells (motile and nonmotile) and in very old cultures.

Induction of dinoflagellate temporary cysts or nonmotile vegetative stages in laboratory cultures at stationary phase is a well known phenomenon (Guillard & Keller, 1984; Loeblich III & Loeblich, 1984; Pfiester & Anderson, 1987). Under this situation, culture conditions, such as, deficiency of nutrients and release of toxic substances into the culture medium, become unfavourable and the cells are submitted to an increasing stress. Temporary cyst survive for short periods of time and reestablish easily a motile population if favourable conditions are restored. The occurrence of other kind of cysts, like dormant zygotes (resting cysts) is quite common in dinoflagellates, but these have a mandatory resting period before return to motile stages. Based on the terminology used for seeds of higher plants (Jann & Aman, 1977), "dormancy" is considered as the suspension of growth by active endogenous inhibition, and "quiescence" as the suspension of growth by unfavourable environmental

conditions. Though, "quiescent" cells should have lower metabolic activity than "vegetative" cells.

In a previous work (Lage et al. submitted), the effect of copper on the viability (esterase activity) of Amphidinium carterae Hulburt was evaluated with the fluorescein diacetate (FDA) assay (Dorsey et al., 1989) by flow cytometry (FCM). Cells of A. carterae exposed to 2.8 µM estimated labile copper (15.8 µM total copper) showed an unexpected increase in the levels of fluorescein fluorescence (GFl) after incubating with FDA when compared to cells not exposed to copper or exposed to lower concentrations of this metal (0.27 or 0.77 µM labile copper). Other changes also underwent by these cells were inhibition of growth and loss of motility as well as morphological alterations similar to those described by Sampayo (1985) during the encystment of A. carterae. Based on these observations, it seemed evident the existence of a relation between the high levels of GFl and encystment.

In order to clarify the assumed relationships between (1) low intensity of cellular fluorescein labelling indicative of lower metabolic activity / esterase activity and therefore of a "quiescent" state characteristic of encystment, and (2) high intensity of fluorescein labelling indicative of higher metabolic activity / esterase activity and therefore of a "vegetative" state, in the present study, the fluorescein fluorescence levels of the unicellular dinoflagellate A. carterae in exponential growing and stationary cell populations after incubation with FDA were evaluated. The same assay was performed in samples from the same cultures but after exposure to 2.8 µM estimated labile copper.

Materials and Methods

Culturing conditions

A. carterae (isolate 39) was kindly supplied by Dr. Estela Sousa e Silva (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisbon). Stock cultures were maintained in the artificial seawater medium ESAW (Harrison et al., 1980) without silicate and buffered at pH 8.0 with 25 mM HEPES, at 19 ± 1°C, on a 12 : 12 h dark/light regimen and in a photon flux density of about 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Cell analysis by Flow Cytometry

Cells of A. carterae in exponential (7 days) and stationary (24 and 37 days) growth phases were incubated with 7.5 µM FDA (stock solution - 5 $mg.cm^{-3}$ in dimethylsulfoxide, 40-fold diluted in cold 32‰ NaCl, pH 7.9) as described by Dorsey et al. (1989). After 10 min of incubation fluorescein fluorescence, as a measure of cell "viability", was measured using a Coulter EPICS C flow cytometer. Cells also in stationary growth phase, but exposed to 0.77 µM estimated labile copper (11.9 µM total copper) for 25 days, were also assayed by FDA. Subsequently, samples from these cultures were inoculated with copper(II) chloride in order to obtain 2.8 µM estimated labile metal concentration (15.8 µM total copper). After, at least, 30 min of exposure to copper, FDA assay was performed in these samples.

Forward and orthogonal light scatters and green fluorescence were analysed. In all measurements, data were collected from 2,000 cells. Laser emission was 200 mW at 488 nm. Green fluorescence was measured using a 530 nm short pass filter. Histograms were analysed with the Epics Cytologic Software.

The ratios (R) of the mean green fluorescence (d) between the different cell populations observed (P1- lower level of fluorescence and P2- higher level of fluorescence) were calculated after the linearization of the logarithmic histograms by the following equation: $10^{(d \times (3/256))}$.

Labile copper concentrations were estimated by computational simulations of chemical equilibrium in ESAW modified medium (without silicates) for the total metal concentrations as previously described (Lage et al. 1994).

Results

A. carterae in exponential growth showed, after incubating with FDA, an homogeneous GFl population (P1) in a logarithmic histogram (Fig. 1A). In samples from two late stationary growing cultures (24 and 37 days), two subpopulations could be defined (Fig. 1C and table 1), one with a lower mean GFl (P1) and a second exhibiting a higher mean GFl (P2) (respectively, 9.5- and 7-fold higher in P2 relative to P1). These two subpopulations were also clearly

evident (Fig. 1E) in stationary A. carteare cells that have been exposed to a sublethal copper concentration for 25 days (6.5-fold difference between the mean GFl of the two subpopulations).

When cells from all these cultures (exponential or stationary growing) were exposed for 30 min to 2.8 μM estimated labile copper and subsequently incubated with FDA, a GFl homogeneous population, practically coincident with subpopulation P2, appeared (Figs 1B, 1D, 1F), with an increase in the order of 6.0- to 10.0-fold comparative to the fluorescence levels of the correspondent P1 populations (Table 1). The exposure of these cells to copper for longer periods of time (1.5 and 2.5 h), in general, showed still an increase in the fluorescence ratio with no leakage of fluorescein (Table 1).

The levels of fluorescein fluorescence in the exponential growing cells, both before (P1) and after exposure to copper (P2), were slightly inferior to the ones of the stationary growing cells (Fig. 1).

Discussion

The existence of an homogeneous GFl population (P1) in exponential cultures of A. carterae has been consistently observed in our work. These cells seem to be in the same metabolic state, which is in agreement with what is expected to occur in cells in logarithmic growth. When this population was submitted to a "strong" copper stress (2.8 μM labile copper), a great increase in GFL was observed, phenomenon in accordance with previous results obtained (Lage et al., submitted). Under this situation, encystment (temporary cysts) was induced (Lage et al., submitted). Bentley-Mowat (1982) also observed that vegetative "auxospores" of Ditylum brightwellii (West) Gun, ex Van Heurck, which were formed in cultures under stress, showed a strong reaction after incubation with FDA suggesting that these cells were not resting spores with a low rate of metabolism. This "strong reaction" is very much in agreement with our results. Similarly, Doucette (1987) observed that iron stress in batch cultures of Protogonyaulax tamarensis resulted in the formation of pellicular cysts (asexual, temporary cysts).

The existence of two different subpopulations (P1 and P2) in stationary cultures of A. carterae could be interpreted as a difference in the metabolic "vigour" of their cells. However, the population with higher levels of GFl (P2) did not correspond to the exponentially growing but to the encysted form induced by copper stress. The exposure of these stationary growing cells to a copper concentration known to induce encystment with the concomitant appearance of only one uniform GFl population exhibiting fluorescein levels characteristic of P2, seems to indicate clearly the existence of a relation between encystment and the high GFl levels, after performing the FDA assay. Our results seem to go against the assumption that cells in this state have a reduced metabolism (Dorsey et al. 1989; Bentley-Mowat, 1982). Although exhibiting high levels of GFl, the P2 population, most probably had not an intensification of cell metabolism. We believe that these high GFl levels may be due to an increase in the intracellular pH (pH_i), which might occur during the process of encystment. Fluorescein fluorescence is pH dependent (Slavík, 1982) and a raise in pH_i causes an intensification of the signal. Therefore, these kind of results should be interpreted with care and not in a linear and simplistic way.

Musgrove et al. (1987) observed that during exponential growth of three lines of tumour cells the pH_i was cell-cycle related, being more alkaline during S, G2 and M phases, and that the onset of quiescence (stationary growth phase) was associated with a fall of approximately 0.2-0.3 units in pH_i, occurring in parallel with also a fall in the extracellular pH (pH_e). Busa & Crowe (1983) observed in Artemia salina an increase of more than one unit in pHi during the arousal from profound dormancy and decrease, by the same amount, during reinduction of dormancy. They considered that pH_i is a fundamental regulator of the transition between dormancy and metabolism. If encystment in A. carterae is associated with an increase in pH_i our results are in opposition to those described for other kind of cells, as referred above. In ESAW unbuffered medium the pH_e of the cultures increases with growth of A. carterae, result also in opposition to what was verified in tumour cell cultures.

Under the encysted form, A. carterae showed to retain the fluorescein in unchanged levels for relativelly long periods of time (2.5 h). Thus, fluorescence decrease due to fluorescein leakage has not occurred showing that cell membrane integrity is unaffected, as it would be expected in cyst forms.

These results present additional information on temporary cysts and further work under development in our laboratories may contribute to the understanding of some physiological and biochemical aspects of these forms. We also intend to apply the same approach to other cyst producing species.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Helena Monteiro from Faculdade de Engenharia, U.P., for the estimation of copper lability. This work was supported by "Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica" - JNICT, Lisboa.

References

Bentley-Mowat, J.A. (1982). Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. Bot Mar., 25: 203-204.

Busa, W.B. & Crowe, J.H. (1983). Intracellular pH regulates transitions between dormancy and development of Brine Shrimp (Artemia salina) embryos. Science, 221: 366-368.

Dorsey, J., Yentsch, C.M., Mayo, S. & McKenna, C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. Cytometry, 10: 622-628.

Doucette, G.J. (1987). Induction of cyst formation by iron stress in the red tide dinoflagellate Protogonyaulax tamarensis: cyst ultrastructure. J. Phycol. 23 (Suppl.): 6.

Guillard, R.R.L. & Keller, M.D. (1984). Culturing Dinoflagellates. In Dinoflagellates (Spector, D.L., editor), 391-442. Academic Press. Orlando.

Harrison, P.J., Rosemary, E.W. & Taylor, F.J.R. (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol., 16: 28-35.

Jann, R.C. & Amen, R.D. (1977). What is germination? In The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. (Kuhn, A.A., editor), 7-28. Elsevier. North Holland.

Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. & Salema. R. (1994) Some effects of copper on the dinoflagellates Amphidinium carterae and

Prorocentrum micans in batch culture. Eur. J. Phycol., 29:253-260.

Lage, O.M., Sansonetty, F., Osswald, J.M., Parente, A.M. & Salema. R. Copper toxicity on Amphidinium carterae. Evaluation by cell esterase activity measured by flow cytometry. (Submitted to Cytometry).

Loeblich III, A.R. & Loeblich, L.A. (1984). Dinoflagellate Cysts. In Dinoflagellates (Spector, D.L., editor), 443-480. Academic Press. Orlando.

Musgrove, E., Seaman, M. & Hedley, D. (1987). Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence. Exp. Cell Res. 172: 65-75.

Pfiester, L.A. & Anderson, D.M. (1987). Dinoflagellate reproduction. In The Biology of Dinoflagellates (Taylor, F.J.R., editor), 611-648. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Rotman, B. & Papermaster, B.W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. Proc. Natl. Acad. Sci., USA,. 55: 134-141.

Sampayo, M.A.M. (1985). Encystment of a portuguese isolate of Amphidinium carterae in cultures. In Toxic Dinoflagellates (Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. editors), 125-130. Elsevier Scientific Publishing Co., Inc.

Selvin, R., Reguera, B., Bravo, I. & Yentsch, C.M. (1989). Use of fluorescein diacetate (FDA) as a single-cell probe of metabolic activity in dinoflagellate cultures. Biol. Oceanog., 6: 505-511.

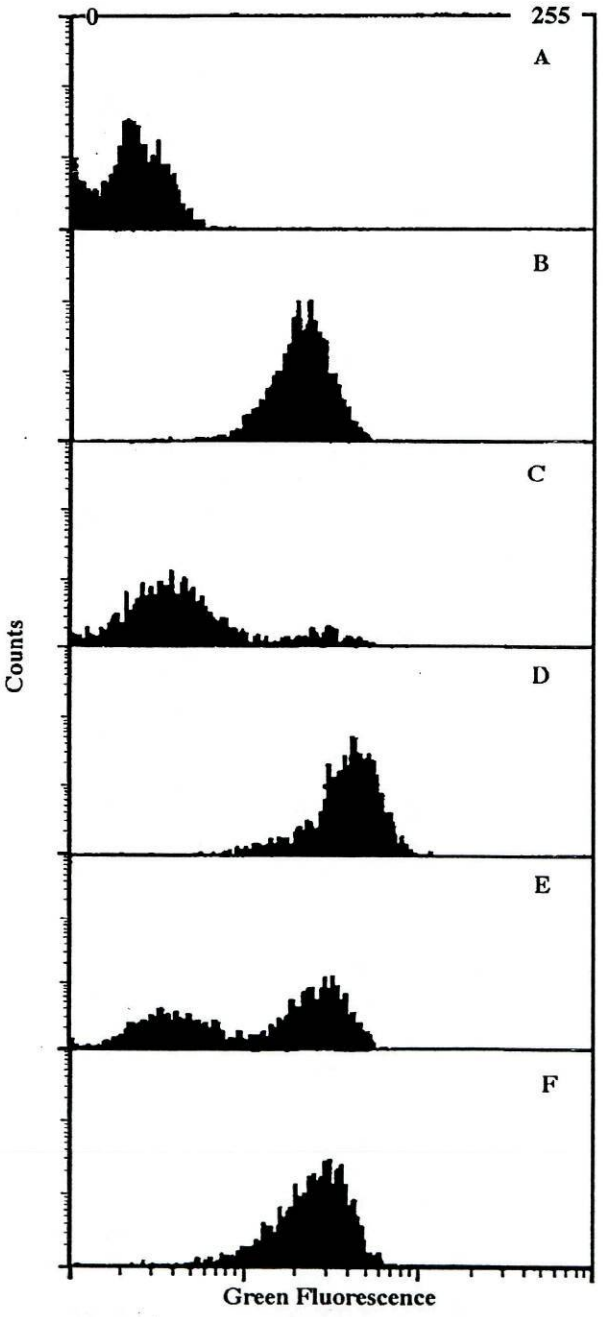
Slavík, J. (1982) Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. FEBS Letters, 140: 22-26.

Table 1. Description of the GFl populations of A. carterae (P1 and P2) obtained after FDA assay at exponential and stationary growth phases and after exposure to 2.8 μM labile copper. The relation between the mean green fluorescence levels of P1 and P2 populations was estimated by the ratio R.

Culture	Treatment	Population	Cell percentage	R
Exponential	10 min. FDA	P1	72%	
	30 min. Cu + 10 min. FDA	P2	97%	a)8.2
	1.5 h Cu + 1 h FDA	P2	98%	a)8.7
	2.5 h Cu + 2 h FDA	P2	90%	a)10.9
Stationary	FDA	P1	74%	
(37 days)		P2	14%	b)7.2
	30min. Cu + 10 min. FDA	P2	92%	a)10.0
	1.5 h Cu + 1 h FDA	P2	95%	a)6.5
Stationary	FDA	P1	41%	
(24 days)		P2	50%	b)9.5
	30min. Cu + 10 min. FDA	P2	89%	a)6.3
Stationary	FDA	P1	38%	
exposed 25 days		P2	55	b)6.5
to 0.77 μM	30min. Cu + 10 min. FDA	P2	94%	a)6.0
labile copper	1.5 h Cu + 1 h FDA	P2	94%	a)9.0

a) R = P2 / P1 only after FDA assay; b) R = P2 pre-treated with copper / P1.

Figure 1. Three-decade logarithmic histograms of green fluorescence after analysis of 2,000 cells of A. carterae incubation for 10 min with FDA. A) Exponentially growing cells (7 days); B) Exponentially growing cells after pre-incubation for 30 min with 2.8 µM estimated labile copper; C) Stationary growing cells (37 days); D) Stationary growing cells after pre-incubation for 30 min with 2.8 µM estimated labile copper; E) Stationary growing cells exposed to 0.77 µM estimated labile copper (11.9 µM total copper) for 25 days; F) Stationary growing cells as in E) after pre-incubation for 30 min with 2.8 µM estimated labile copper. The histograms were acquired with a PMT voltage of 670 V.



Trabalho 7

ANÁLISE ELECTROFORÉTICA DE POLIPÉTIDOS DE *PROROCENTRUM MICANS* EHR. EXPOSTO A NÍVEIS TÓXICOS DE COBRE

Lage, O.M., Parente, A. M. & Salema, R. 1994. Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* exposed to toxic levels of copper. **Rev. Paleobot. Palynol.** 84: 107-112.

ELSEVIER

Review of Palaeobotany and Palynology 84 (1994) 107–112

REVIEW OF PALAEOBOTANY AND PALYNOLOGY

Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* Ehrenberg exposed to toxic levels of copper

O.M. Lage, A.M. Parente, R. Salema

Instituto de Botânica e Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal

Received 24 April 1993; revised and accepted 7 January 1994

Abstract

The effects of toxic levels of copper in the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrenberg were investigated by analysis of SDS-PAGE polypeptide profiles. Sublethal levels of copper added to exponentially growing batch cultures induced evident alterations in the growth of the cultures and in the soluble protein concentration per cell (51% reduction of the number of cells and 36% of the total soluble protein content, after 14 days of 3.94 μM copper exposure). The highest copper concentration (7.87 μM) clearly inhibited the culture growth. The SDS-PAGE polypeptide profiles of control and 14 days copper treated cultures extracts, showed the presence of similar polypeptides between ca. 30 and 110 kDa, but the relative amounts of some of them was changed. Using as reference in each profile the most preeminent polypeptide (33.5 kDa), a reduction of the amounts of the 35 and 39.5 kDa polypeptides and an increase of the 42, 46, 47.5 and 104 kDa ones were observed when compared to the control. The results indicate the occurrence of copper toxicity at the protein level in *P. micans*, as well as interference in the growth of the cultures.

1. Introduction

Heavy metals have become major environmental contaminants due to the fast industrialization and urbanization. Copper, being an essential micronutrient, plays an important role in cell metabolism as component of some metalloproteins such as plastocyanin and cytochrome c oxidase. At higher concentrations it can act as a toxic agent. Copper toxicity mechanisms may strongly inhibit photosynthesis (Stauber and Florence, 1987) and affect respiratory electron transport and ATP production (Robinson et al., 1992). The importance of sulphydryl (SH) groups as binding sites for certain metals like copper on their interactions with the phytoplankton has long been referred (Davies, 1978; Fisher et al., 1981). This binding, followed by reduction in cell division rate, increase in cell size and interference with specific metabolic processes associated with, or regulated by, SH-containing compounds was related with toxicity of the metal to the biological systems (Fisher and Jones, 1981).

Prorocentrum micans, a cosmopolitan marine dinoflagellate common in Portugal coastal seawater, belongs to a group of organisms that is being submitted to increasing levels of metals in its environment. With the aim of understanding the mechanisms underlying the toxic effects of copper and the way in which the unicellular marine dinoflagellate *P. micans* modulates the toxicity, in a first step of our study we analyzed electrophoretically the polypeptides affected by sublethal toxic levels of copper which interfered with the growth of the culture and the soluble protein cell concentration.

0034-6667/94/$7.00 © 1994 Elsevier Science B.V. All rights reserved
SSDI 0034-6667(94)00071-Q

2. Material and methods

2.1 Organism, culture conditions and toxicity assays

Prorocentrum micans, kindly supplied by Prof. J.D. Dodge, Royal Holloway, University of London, was cultivated in ESAW medium (Harrison et al., 1980), at 18 ± 1°C and in a 12:12 hr photoperiod (30 μmol/m^2/s). Copper 160 μM [copper (II) chloride solution in 5 mM HCl] was added to unialgal, exponential growing (18 days of growth) batch cultures of *P. micans* in order to obtain final copper concentrations of 3.94 and 7.87 μM (250 and 500 μg/dm^3). No copper was added to control cultures.

2.2 Cell number and protein quantifications

Cell counts were performed in a Coulter-counter (model ZM) on neutral formaldehyde fixed samples and total soluble proteins were spectrophotometrically estimated by the dye-binding method of Bradford (1976), after homogenization in 0.3 M NaOH for extraction. After copper exposure, and during the fourteen days of the experiment, period of exponential growth, the development of the cultures was estimated by analysis of changes in the cell number, in the protein contents and in the soluble protein concentration per cell (ng/cell $\times$ 10).

2.3 Extraction of polypeptides

After fourteen days of copper exposure, cells from the three referred cultures were harvested by centrifugation at 100 g, for 10 min. Since the cultures were not bacteria-free and to assure their removal, cell pellets were repeatedly washed with sterile culture medium in a membrane filter holder with a 5 μm membrane filter (Hayhome and Pfiester, 1983). The washed cells were transferred to eppendorf tubes and homogeneized in a homogeneization buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10% glycerol, 0.05% Triton X-100 and 5 mM dithiothreitol).

2.4 Polypeptide electrophoresis

Fractionation of the polypeptide extracts was carried out by vertical slab sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using a discontinuous buffer system (Laemmli, 1970). The 1.5 mm thick separation minigel consisted of 10% acrylamide, 0.1% SDS in a pH 8.8, 1.5 M Tris-HCl buffer and the stacking gel of 4% acrylamide, 0.1% SDS in a pH 6.8, 0.5 M Tris-HCl buffer. Before being loaded in the wells 2 volumes of each sample and 1 volume of sampling buffer (0.1875 M Tris-HCl, pH 6.8, 6% SDS, 15% mercaptoethanol, 0.003% bromophenol blue and 30% glycine) were heated in boiling water for 2 min. The electrode chamber buffer was a pH 8.3, 0.025 M Tris, 0.192 M glycine and 0.1% SDS. The stacking gel was run for 4 h at a current of 15 mA and the separating gel at 20 mA. The gel was silver stained.

2.5 Analysis of polypeptide profiles

Gel densitometry was performed in a LKB BROMMA Ultroscan XL enhanced laser densitometrer and the data was computer analysed with the LKB 2400 Gelscan XL, version 1.0 software. The peaks were manually selected and gaussian integration of their areas (absorbancy units/mm) was done. In each lane, the percentages of the areas of the seven polypeptides selected and the ratio (R) between these areas and that of the most preeminent polypeptide were calculated. The molecular weights of the polypeptides were, approximately, estimated by their relative mobility (Rf).

3. Results

The copper concentrations tested induced an evident decrease in the growth of the *Prorocentrum micans* cultures when estimated both by the cell number and by the total soluble protein content. After 3.94 μM copper exposure for 14 days a reduction of about 50% in the cell number (Fig. 1A) and of about 36% in the soluble protein content (Fig. 1B) occurred, when compared to the control. The copper toxic effect was more evident

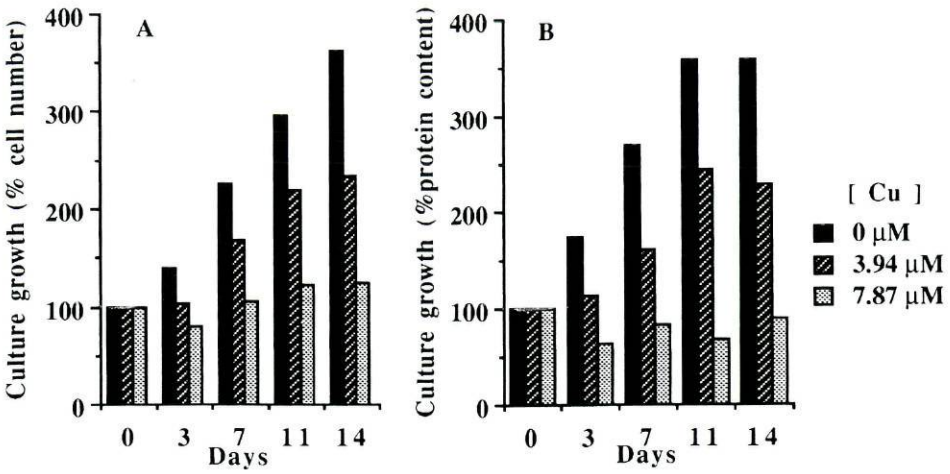


Fig. 1. Growth of *P. micans* cultures after addition of 3.94 and of 7.87 μM copper to exponentially growing cultures and of the control as (A) percentage of the number of cells, and (B) percentage of the soluble protein content.

with 7.87 μM where growth was clearly suppressed (Fig. 1A,B) and the amount of soluble protein per cell decreased after the addition of the metal to the culture (Fig. 2).

Fig. 3 shows the SDS-PAGE polypeptide profiles of *P. micans* of the control (lane 2) and the copper treated cultures (lanes 3 and 4) after 14 days of exposure to the metal. The polypeptides analysed had molecular weights between ca. 30 and 110 kDa. The SDS-PAGE of the extracts showed the presence of bands corresponding to the same polypeptides in the 3 cultures, but the relative amount of the polypeptides was different between the control and either the copper treatments. These alterations were more evident in the highest copper concentration. As the wells were loaded with the same volume of sample, it is not possible to make an absolute quantitative analysis of the polypeptides. After the calculation of the percentage of the areas of the polypeptides the ratio *R* was determined which allowed an easy visualization of the relative increase or decrease of the amount of the polypeptides induced by copper relatively to the most preeminent polypeptide (33.5 kDa). Amoung the polypeptides altered in the presence of the metal (Table 1) a reduction of the 35 and 39.5 kDa polypeptides (decrease of *R* with the increase of copper concentration) and an increase of the 42, 46, 47.5 and 104 kDa polypeptides (increase of *R* with the increase of copper concentration) occurred (Table 1).

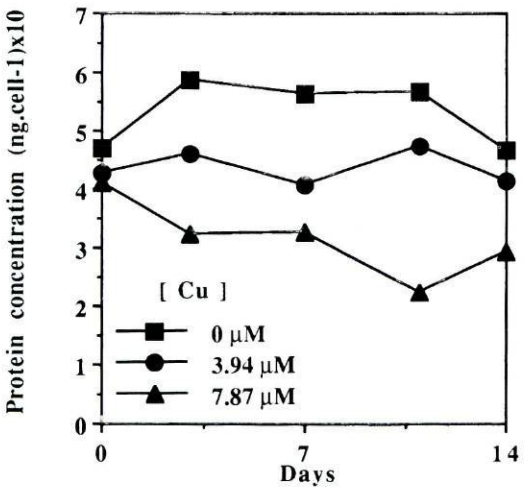


Fig. 2. Variation of soluble proteins of *P. micans* control cells and exposed to 3.94 and to 7.87 μM copper.

4. Discussion

The decrease or supression of growth induced by copper have long been referred and are well documented (Davies, 1978). In the present study sublethal toxic concentrations of copper decreased, as expected, the growth of the cultures. Fisher

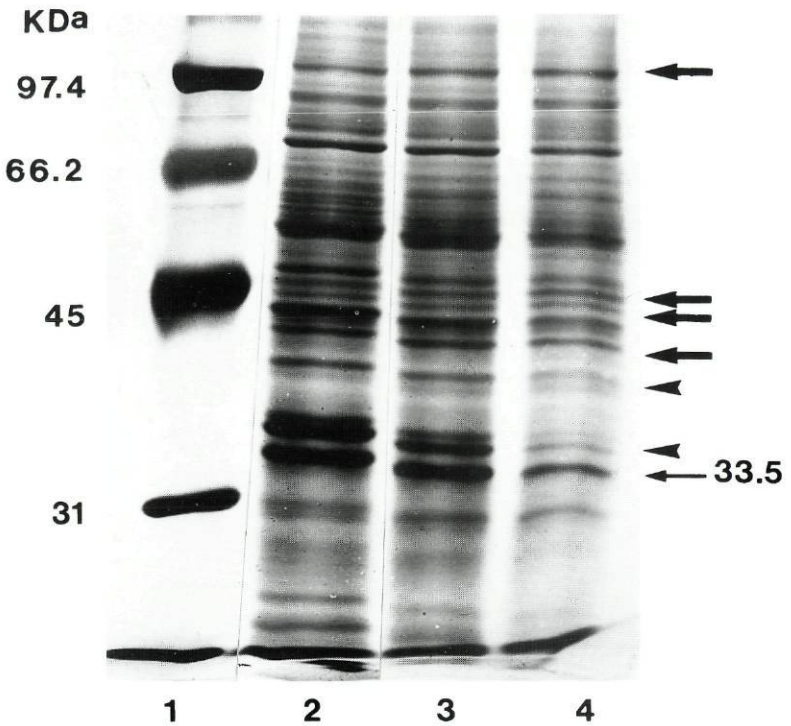


Fig. 3. Polypeptide profiles of *P. micans* after SDS-PAGE from control (lane 2) and 14 days exposure to 3.94 and 7.87 μM copper (lanes 3 and 4). The molecular weights (kDa) of the marker proteins (phosphorylase B, 97.4; bovine serum albumin, 66.2; ovalbumin, 45; carbonic anhydrase, 31; lane 1) are indicated on the left. The polypeptides with relative increase after copper exposure comparated to the control ones are indicated by arrows, and those with decrease by arrowheads.

Table 1
Analysis of the relative amount of polypeptides altered by the presence of copper in the metal treated cells in comparison with the control

MW (kDa)	Polypeptide					
	[Cu] 0 μM		[Cu] 3.94 μM		[Cu] 7.87 μM	
	% area	*R*	% area	*R*	% area	*R*
33.5	36.22		51.10		46.86	
35	45.43	1.25	16.39	0.32	7.86	0.17
39.5	6.56	0.18	6.89	0.13	5.03	0.11
42	4.45	0.12	8.95	0.18	12.89	0.28
46	1.33	0.04	2.75	0.05	4.09	0.09
47.5	1.80	0.05	3.72	0.07	7.23	0.15
104	4.22	0.12	10.19	0.20	16.04	0.34

The % areas of the polypeptides were obtained by the integration of the peaks areas (absorbancy units/mm) with the LKB 2400 Gelscan XL computer program after gel densitometry. *R* = relation between the area of the polypeptides and that of the 33.5 kDa one.

et al. (1981) suggested that it is probably due to the binding of copper to –SH groups which are important in metabolic pathways essential for normal cell division. De Filippis et al. (1981) observed that metals that are strong sulphydryl antagonists, e.g. Cd, had the ability to inhibit the NADP-oxidoreductase resulting in a significant lowering of the cell's supply of NADPH (reducing power), a mechanism that may also account for the observed growth response.

In the copper concentrations studied, the levels of soluble proteins per cell were less compared to the control. Both the reduction of growth and of protein levels are the reflection of copper interference in metabolic processes such as photosynthesis, respiratory electron transport and ATP production (Stauber and Florence, 1987; Robinson et al., 1992). The observation of ultrastructural disturbances in chloroplast thylakoids and dictyosomes induced in *P. micans* by sublethal toxic levels of copper (Lage et al., 1991) supports the probable interference of this metal in the metabolic processes mentioned above.

Although the soluble protein concentration per cell decreased in the presence of copper, the results obtained by SDS-PAGE indicated a decrease of the 35 and 39.5 kDa polypeptides, but an increase of the amount of several others (42, 46, 47.5 and 104 kDa). Several authors using electrophoresis also detected a reduction of the levels of some proteins and synthesis induction of some others induced by copper in different biological materials: soybean roots (Chongpraditnum et al., 1992), with special relevance to a 16 kDa cytosolic Cu, Zn-SOD, *Chlorella pyrenoidosa* (Ilangovan et al., 1992), with special relevance to the photosynthetic enzymes and chlorophyll associated proteins (46 kDa to 67 kDa) and rice plant chloroplast thylakoids proteins (Lidon and Henriques, 1993). The increases in the amount of polypeptides observed might be interpreted as detoxifying responses of the cell towards the toxic effects of copper in order to recover from metabolic disorders. Activation of several oxidases like polyphenol oxidase, ascorbate oxidase (Sekiya et al., 1990), diamine oxidase and tyrosinase, resulting in an increase of free radicals and reactive species of oxygen that cause oxidative stress (Chongpraditnum et al., 1992) and enhancement of enzyme activity as of catalase, IAA-oxidases and peroxidades (Lepp, 1981), are atributed to copper. In yeast, copper induction of the Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) and metallothioneins (Carri et al., 1991) and increasing activities of the Cu, Zn-SOD, glutathione peroxidase and the cytochrome oxidase (Galiazzo et al., 1988) have been reported.

5. Conclusions

Our results showed that sublethal toxic copper concentrations decreased the growth of *Prorocentrum micans* cultures and the soluble protein concentration of the cells.

Using a SDS-PAGE electrophoresis the induction of the synthesis of new polypeptides by copper was not detected between 30 and 110 kDa but we found that both a reduction or an increase of the relative amount of some polypeptides occurred. These results are consistent with data reported in the literature (Chongpraditnum et al., 1992; Ilangovan et al., 1992; Lidon and Henriques, 1993) and are illustrative of copper toxicity at the protein level in the dinoflagellate *P. micans*.

Further work will be needed to clarify *P. micans* metabolism under copper toxic stress. In a second step, we will try to identify the polypeptides that have undergone alterations and we will analyse polypeptides with lower molecular weights.

Acknowledgements

The authors are grateful to Mrs. M. Andrea Costa for excellent technical assistance. This work was supported by JNICT, Lisbon, Portugal.

References

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem., 72: 248–254.

Carri, M.T., Galiazzo, F., Ciriolo, M.R. and Rotilio, G., 1991.

Evidence for co-regulation of Cu, Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. FEBS Lett., 278: 263–266.

Chongpraditnum, P., Mori, S. and Chino, M., 1992. Excess copper induces a cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase in soybean root. Plant Cell Physiol., 33: 239–244.

Davies, A.G., 1978. Pollution studies with marine plankton. Part. II. Heavy metals. Adv. Mar. Biol., 15: 381–508.

De Filippis, L.F., Hampp, R. and Ziegler, H., 1981. The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. II. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. Arch. Microbiol., 128: 404–411.

Fisher, N.S. and Jones, G.J., 1981. Heavy metals and marine phytoplankton: Correlation of toxicity and sulphydryl-binding. J. Phycol., 17: 108–111.

Fisher, N.S., Jones, G.J. and Nelson, D.M., 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionela japonica* (Cleve). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 51: 37–56.

Galiazzo, F., Scheisser, A. and Rotilio, G., 1988. Oxygen-independent induction of enzyme activities related to oxygen metabolism in yeast by copper. Biochem. Biophys. Acta, 965: 46–51.

Harrison, P.J., Rosemary, E.W. and Taylor, F.J.R., 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol., 16: 28–35.

Hayhome, B.A. and Pfiester, L.A., 1983. Electrophoretic analysis of soluble enzymes in five freshwater dinoflagellate species. Am. J. Bot., 70: 1165–1172.

Ilangovan, K., Salazar, M., Dash, S., Monroy, O.H. and Ramos, C.A., 1992. Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Environ. Technol., 13: 195–199.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680–685.

Lage, O.M., Parente, A.M. and Salema, R., 1991. Ultrastructural changes induced by copper in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. CFIME, Barcelona, pp. 134–135 (abstract).

Lepp, N.W., 1981. Copper. In: N.W. Lepp (Editor), Effects of Heavy Metal Pollution on Plants, 1: Effects of Trace Metals on Plant Function. Appl. Sci. Publ., Barking, pp. 111–143.

Lidon, F.C. and Henriques, F.S., 1993. Changes in the thylakoid membrane polypeptide patterns triggered by excess Cu in rice. Photosynthetica, 28: 109–117.

Robinson, M.G., Brown, L.N., Quenneville, M.L. and Hall, B.D., 1992. Aspects of copper tolerance and toxicity in *Amphora coffeaeforomis*. Biofouling, 5: 261–276.

Sekiya, J., Mizuno, K., Kimura, O. and Shimose, N., 1990. Ascorbate oxidase in cucumber calli and enhancement of enzyme activity by copper sulfate. Soil Sci. Plant Nutr., 36: 43–51.

Stauber, J.L. and Florence, T.M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. Mar. Biol., 94: 511–519.

Trabalho 8

POTENCIAIS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DE *PROROCENTRUM MICANS* (DINOPHYCEAE) CONTRA NÍVEIS SUBLETAIS DE COBRE

Lage, O. M., Parente, A .M., Vasconcelos, M. T. S. D., Gomes, C. A. R. & Salema, R. Potential tolerance mechanisms of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae) to sublethal levels of copper. **J. Phycol.** 32: 416-423.

J. Phycol. 32, 416–423 (1996)

POTENTIAL TOLERANCE MECHANISMS OF *PROROCENTRUM MICANS* (DINOPHYCEAE) TO SUBLETHAL LEVELS OF COPPER[1]

Olga M. Lage,[2] *Ana M. Parente*

Instituto de Botânica and Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal

M. Teresa S. D. Vasconcelos, Carlos A. R. Gomes

LAQUIPAI, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, Rua do Campo Alegre 867, 4150 Porto, Portugal

and

Roberto Salema

Instituto de Botânica and Centro de Citologia Experimental da U.P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal

ABSTRACT

We investigated how Prorocentrum micans *Ehrenberg, a planktonic dinoflagellate common in Portuguese coastal waters, is able to tolerate and recover from sublethal concentrations of copper(II). The experimental design simulated events in inshore waters, where* P. micans *is subjected to high levels of pollutants, including copper. Decrease in growth rate, induction of a growth lag phase, temporary loss of motility, and potassium leakage were the effects induced in* P. micans *cultures by 90 nM labile copper. A 10–20-fold increase in cellular copper concentration was observed in toxicity experiments. Copper efflux (representing a 50% decrease in cellular metal content) was a short-term tolerance mechanism. A 25-kDa protein was detected after only 3 h of exposure to copper, but there was no evidence of phytochelatin synthesis. Ultracytochemical labeling of metals with the sulfide-silver procedure showed that copper was associated with the thecal plates, starch grains, and, to a lesser extent, lipid droplets. High values of fixation capacities and average conditional stability constants for copper binding by starch, amylopectin, and cellulose support the location of copper in thecal plates and starch grains. We conclude that* P. micans *responds rapidly to copper toxicity and has two tolerance mechanisms for copper: copper efflux and sequestration in polymeric substances.*

Key index words: atomic absorption spectrometry; copper toxicity; electron microscopy; Prorocentrum micans; *Pyrrophyta; SDS-PAGE; tolerance mechanism; ultracytochemistry*

Coastal waters near Porto, Portugal, have become polluted by effluents from a refinery, various industries, domestic sewage, agriculture activities, the input from two polluted rivers, the Douro and Leça, and the presence of a harbor. In 1987–1988, waters from this region were monitored for four dissolved heavy metals (lead, cadmium, copper, and mercury). Copper was present at levels characteristic of polluted coastal waters, ranging from 7.70 to 130 nM at different places and times. Comparable levels of dissolved copper were also found in 1994–1995.

Dinoflagellates are sensitive to copper (Brand et al. 1986, Taylor and Pollingher 1987) and are common in Portuguese coastal waters. *Prorocentrum micans* is a planktonic dinoflagellate regularly present in coastal waters near Porto. Several studies on metal toxicity have been performed with *P. micans* (Kayser 1976, Prevot 1978, Prevot and Soyer 1978, Soyer and Prevot 1981, Brand et al. 1986, Prevot and Soyer-Gobillard 1986, Lage et al. 1994a, b), but none addressed Cu tolerance in this species.

Copper is an essential micronutrient, but at toxic levels it depresses growth, pigment content, and photosynthesis and respiration rates. Copper induces loss of motility and cellular potassium and an increase in cell size and duration of the lag phase. Changes in structure, membrane permeability, and lipid peroxidation have also been reported (Overnell 1975, Berland et al. 1976, Bentley-Mowat and Reid 1977, Anderson and Morel 1978, Davies 1978, Hawkins and Griffiths 1982, Rachlin et al. 1982, Brand et al. 1986, Lage et al. 1991, Visviki and Rachlin 1991, Robinson et al. 1992, Rai and Mallick 1993). Although copper has been used as a biocide in lakes and streams, its fate and effects on aquatic systems are not well understood, especially the recovery of a system after severe copper stress (Meador et al. 1993). Several mechanisms, such as intracellular accumulation in polyphosphate bodies (Sicko-Goad and Stoermer 1979), storage in membrane-bound vesicles (Silverberg et al. 1976, Coombs and George 1978), excretion of organic compounds into the medium (Steemann Nielsen and Wim Anderson 1970, McKnight and Morel 1979), intracellular chelation by organic compounds like phytochelatins (Rauser 1990), and efflux (Foster 1977), have been proposed to explain how cells can tolerate heavy metals (Hughes and Poole 1989, Fernandes and Henriques 1991). Different organisms have different ways of overcoming heavy metal stress.

Physiological studies of phytoplankton are greatly facilitated by our ability to culture them in artificial media (Price et al. 1989). Algal culture media re-

[1] Received 18 September 1995. Accepted 19 February 1996.
[2] Author for reprint requests.

quire the presence of artificial chelating agents as metal buffers (Hutner et al. 1950, Provasoli et al. 1957, Morel et al. 1979, Harrison et al. 1980) to maintain the free concentration of metals at trace (μM) or even ultratrace (nM) levels, in a similar way to what happens in natural seawater. EDTA is one of the commonly used buffers. The thermodynamic parameters of EDTA–metal complexes are well known, which allows the calculation of metal speciation under chemical equilibrium conditions.

The goal of the present work was to assess the cellular tolerance mechanism(s) of the planktonic dinoflagellate *Prorocentrum micans* to copper(II) at sublethal concentrations. For this purpose, copper(II) was added directly (i.e. not preequilibrated in the medium) to batch cultures of *P. micans* in an artificial medium (Harrison et al. 1980). This experimental design simulates events in inshore waters, at the moment of pollutant discharge where ligands at the surface of the organism compete directly for the metal with abiotic complexing agents present in seawater. Therefore, the algae are exposed to higher levels of free and labile copper forms than later on, when pseudoequilibrium conditions have been attained.

MATERIALS AND METHODS

Prorocentrum micans was cultivated in ESAW medium (Harrison et al. 1980), pH 8.0–8.4, at 18° ± 1° C, in a 12:12 h LD photoperiod, and cool white light with a photon flux density of about 30 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

For the toxicity experiments, 10 mM $CuCl_2$ in 5 mM HCl was added to exponentially growing cultures to provide 3.94 μM total copper (90 nM labile copper). No copper was added to control cultures. Addition of aliquots of 5 mM HCl to the cultures did not change the pH. These experiments were run in triplicate.

To evaluate the growth of *P. micans* cultures, cell numbers in neutral formaldehyde-fixed samples were determined with a Coulter counter (Model ZM).

For cellular copper quantification, cells were concentrated on 5-μm filters, washed with double distilled deionized H_2O, and analyzed by flame atomic absorption spectrometry (AAS, PU 9100X) after digestion with concentrated HNO_3. Control cells and blank filters were processed in the same way as Cu-exposed cells.

For scanning electron microscopy (SEM), cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.4, dehydrated through a graded ethanol series, and critical point–dried. Elemental analysis was conducted, using 10 nm gold-coated cells, by X-ray energy dispersive spectrometry (EDS) with an electron beam energy of 15 KeV and a current of a few nA in a JEOL microscope.

For transmission electron microscopy (TEM), cells were fixed for 2 h in 2.5% glutaraldehyde in 0.01 M cacodylate buffer, pH 7.4, and then postfixed for 4 h in 1% OsO_4 (RK^+) followed by 1 h in 1% uranyl acetate. The treated specimens were subsequently dehydrated through a graded ethanol series and embedded in epoxy resin (Spurr 1969).

Cytochemical analysis of heavy metal sites was performed by the sulfide-silver procedure (Pihl 1968) in ultrathin sections after periodic acid oxidation. Two different controls were used: 1) cells from control cultures were submitted to the sulfide-silver procedure after periodic acid oxidation, and 2) cells exposed to copper were treated with the sulfide-silver developer but not preincubated in ammonium sulfide. This labeling technique is based on the formation of an insoluble heavy metal (copper) sulfide followed by silver intensification. The sections were examined in an EM 10C Zeiss microscope.

Electrophoresis of polypeptides of *P. micans* was performed using extracts from untreated control cells and cells that were exposed for 3, 24, and 48 h to 1030 nM labile copper (11.9 μM total copper). Polypeptide extraction, electrophoretic fractionation, and analysis of polypeptide profiles were done as previously described (Lage et al. 1994a). Acrylamide concentration of the separation gel was 15%. In this experiment, cell number and cellular levels of copper at different sampling times were also determined as previously described.

To estimate the binding strength of cellular molecules likely to complex copper, e.g. cellulose (constituent of thecal plates), starch (carbohydrate reserve), and amylopectin (one of the molecules that forms starch), complexation parameters of cellulose and amylopectin (Sigma) and starch (Merck) were determined by potentiometry. To minimize copper–hydroxide complex formation, a pH of 6.5 was chosen. Suspensions of those substances in a 10^{-2} M piperazine-N,N′-*bis*[2-ethanesulfonic acid] (Pipes) pH buffer solution (I = 0.1 M, adjusted with KNO_3, t = 25° C) (Sigma) were titrated with a copper(II) solution (prepared from a 0.1 M copper(II) nitrate standard, Orion). In preliminary experiments, no Cu–Pipes complexes were formed to a significant extent at pH 6.5 (Soares and Vasconcelos 1994). Good et al. (1966) also found that the Cu(II)–Pipes binding complexes were negligible. The titrations were followed with a PC-controlled potentiometry system (Crison MicropH 2002 pH-meter with a Crison MicroBU 2030 microburette). A copper(II) ion-selective electrode Radiometer 3012, activated with an Ag_2S/CuS sensor (Lima and Machado 1982), combined with a double junction reference electrode (Orion 90-02-00) was used. The experiments were conducted at 25.0° ± 0.5° C in a Metrohm EA880T double-wall glass cell with a Metrohm E649 stirrer. The substances under study are polymeric and probably possess heterogeneous properties. Therefore, a simple method, designed to interpret titration data of heterogeneous ligands, was used. The Scatchard (Buffle 1988) model was chosen to provide the average conditional stability constants (K_{av}) and the total fixation capacity (FC) of each substance (S). At each titration point, total metal ($|Cu|_t$) and free metal concentrations ($|Cu|$) were used to calculate the concentration of metal bound to the polymeric material ($|Cu_b| = |Cu|_t - |Cu|$) and the occupation degree (fraction of sites occupied), Φ ($=|Cu_b|/[S]$, where [S] is the total concentration of S in $g \cdot dm^{-3}$ units). In all cases, the plot $\Phi/|Cu| = f(\Phi)$ yielded a straight line over a large range of Φ values (see Table 1) from which K_{av} and FC were obtained, after the experimental data were corrected for the formation of hydroxy-metal complexes (Buffle et al. 1980) by the following equation:

$$\frac{\Phi}{|Cu|} = K_{av} \cdot FC - K_{av} \cdot \Phi.$$

For each total copper concentration, the labile copper concentration (free metal plus inorganic complexes) was estimated by computational simulations of chemical equilibrium in ESAW medium (Lage et al. 1994b). These calculations should be considered as an approximation of the copper speciation in the culture medium because the existence of equilibrium conditions and absence of cell metabolites in the medium are assumed.

The culture medium contained 14.9 μM EDTA, which formed very stable complexes with copper. Therefore, after equilibrium was attained in the solution, the bioavailable copper concentration (free metal plus labile complexes) was much lower than total copper concentrations. However, at the moment of copper addition, the cells were exposed to higher labile copper concentrations than those calculated because the kinetics of dissociation of other metal–EDTA complexes are relatively slow (Turner et al. 1987) and equilibrium between copper and EDTA is established only after a relatively long period of time. Evidence for this was

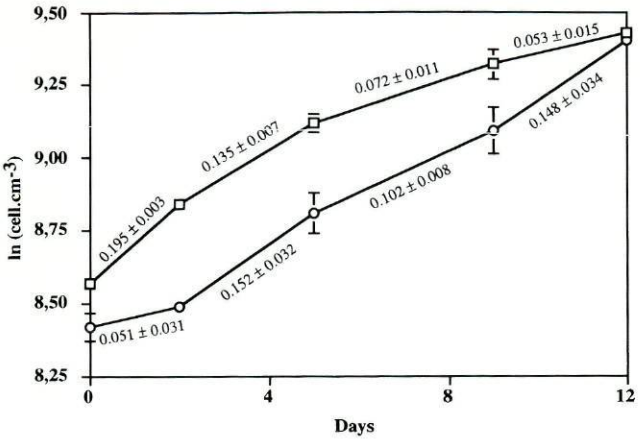


FIG. 1. Growth of *P. micans* cultures untreated (□) and after the addition of 90 nM labile copper (○). Growth rates in each time interval are included. Mean values and standard deviation (n = 3) are given.

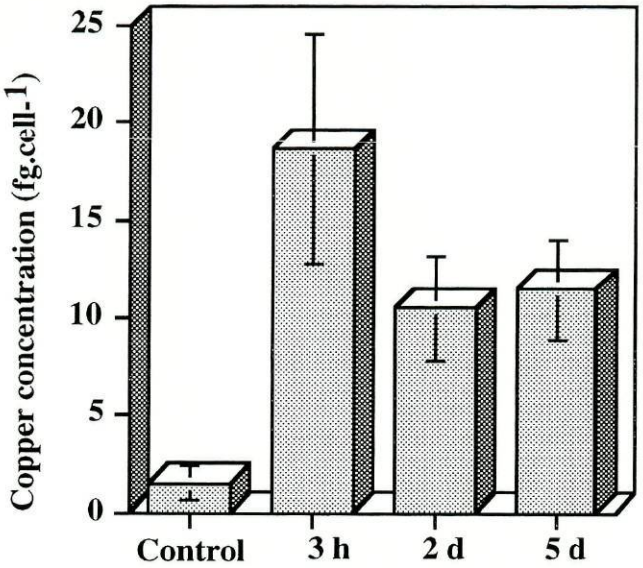


FIG. 2. Cellular levels of copper analyzed by atomic absorption spectrometry in exponentially growing *P. micans* not exposed (control) and exposed for 3 h and 2 and 5 days to 90 nM labile copper. Error bars: ±SD (n = 3).

obtained in experiments (Lage et al., unpubl.) where electrochemical labile copper concentrations were measured by potentiometric stripping analysis in a culture medium of *Amphidinium carterae*. When copper was added to the cultures, higher labile levels (2–3-fold) were observed during the first hour compared to levels obtained when copper was preequilibrated in the medium before cell inoculation. After 2 h, the labile levels decreased but remained (about 2-fold) higher than in a similar experiment with preequilibrated copper. In addition, the amount of copper sorbed by the cells was higher than the free metal but lower than the metal in inorganic forms (free plus inorganic complexes). Also Cu-EDTA dissociation was negligible. Despite the inaccuracy of the labile copper calculated on the assumption of equilibrium conditions, this parameter gives a much better estimate of the bioavailable copper than the total copper concentration and, therefore, was used in this work.

RESULTS

Exposure of *P. micans* to 90 nM labile copper induced several sublethal effects. After 1 h of exposure, the cells lost motility and sank to the bottom of the culture vessel. The growth rate of copper-treated cultures was reduced about 4-fold relative to the control and to the growth rate before the addition of copper, resulting in a short lag phase (Fig. 1). After the initial impact of the metal, growth rates recovered (Fig. 1) and, after 12 days of exposure, the number of cells attained was similar to that of control cultures.

Cellular levels of copper were followed by AAS. After 3 h of exposure to copper, cells contained 12.4 times more copper than the control. However, the amounts of copper sorbed by the cells after 3 h (1.33 nM) were much lower than the calculated labile levels in the culture medium (90 nM). After 5 days, cellular concentrations were still higher than in the controls but decreased to 56% of the level observed after 3 h of exposure (Fig. 2).

SEM X-ray EDS was inadequate to detect intracellular copper or copper in the thecal plates, very likely due to lack of sensitivity of this technique. A large reduction in the potassium peak was observed in cells exposed to 90 nM labile copper for 2 days.

TEM sections of control *P. micans* cells showed the characteristic ultrastructure of a dinoflagellate cell (Fig. 3). Ultrathin sections of *P. micans* cells exposed to copper for 2 days showed abundant silver deposits on thecal plates (Fig. 4c) and starch grains (Fig. 4a) and less pronounced deposits on lipid droplets (Fig. 4b, c). No deposition was evident on other components of the cell (Fig. 4). Furthermore, no silver deposits were observed in cell sections from the two controls, i.e. when the hydrogen sulfide treatment was omitted in copper exposed cells (Fig. 5b, c) and when control cells (cells not exposed to copper) were submitted to the sulfide-silver procedure (Fig. 5a).

We evaluated the copper fixation capacity and the conditional stability constants (K_{av}) of starch, amylopectin, and cellulose because the ultracytochemical study revealed that copper was present in starch grains and in thecal plates (Table 1). Cellulose was the strongest polymeric ligand for copper(II) (log K_{av} = 5.5). Starch and one of its constituent molecules, amylopectin, had similar log K_{av} values, 4.3 and 4.5, respectively, suggesting that these polymeric materials are important binding agents for copper(II) at neutral pH values. A similar study was not made with lipids because the labeling was weak. Also, dinoflagellates possess several unique fats, located in lipid droplets, the isolation of which was beyond the scope of the present work.

The electrophoretic study, under higher labile copper concentration (1.03 μM) was performed to assess any alteration of polypeptide composition. The



FIG. 3. Transmission electron micrograph of *P. micans* control cell showing the chloroplast (Ch) localized at the periphery, several mitochondria (M), dictyosomes (d), vacuoles (V), trichocysts (T), lipid droplets (L), starch grains (S), and two portions of the V-shaped nucleus (N) with permanently condensed chromosomes (C). The cell is surrounded by two thecal plates (Tp) perforated by pores (arrowheads). Scale bar = 2 μm.

cells attained a cellular copper concentration about twice that of cells exposed to 90 nM labile copper (data not shown). After 3 h of exposure to copper, a new band corresponding to a polypeptide of about 25 kDa appeared and persisted after 24 and 48 h exposure to the metal (Fig. 6). Low molecular weight polypeptides (between 3 and 10 kDa), corresponding to phytochelatins, were not detected.

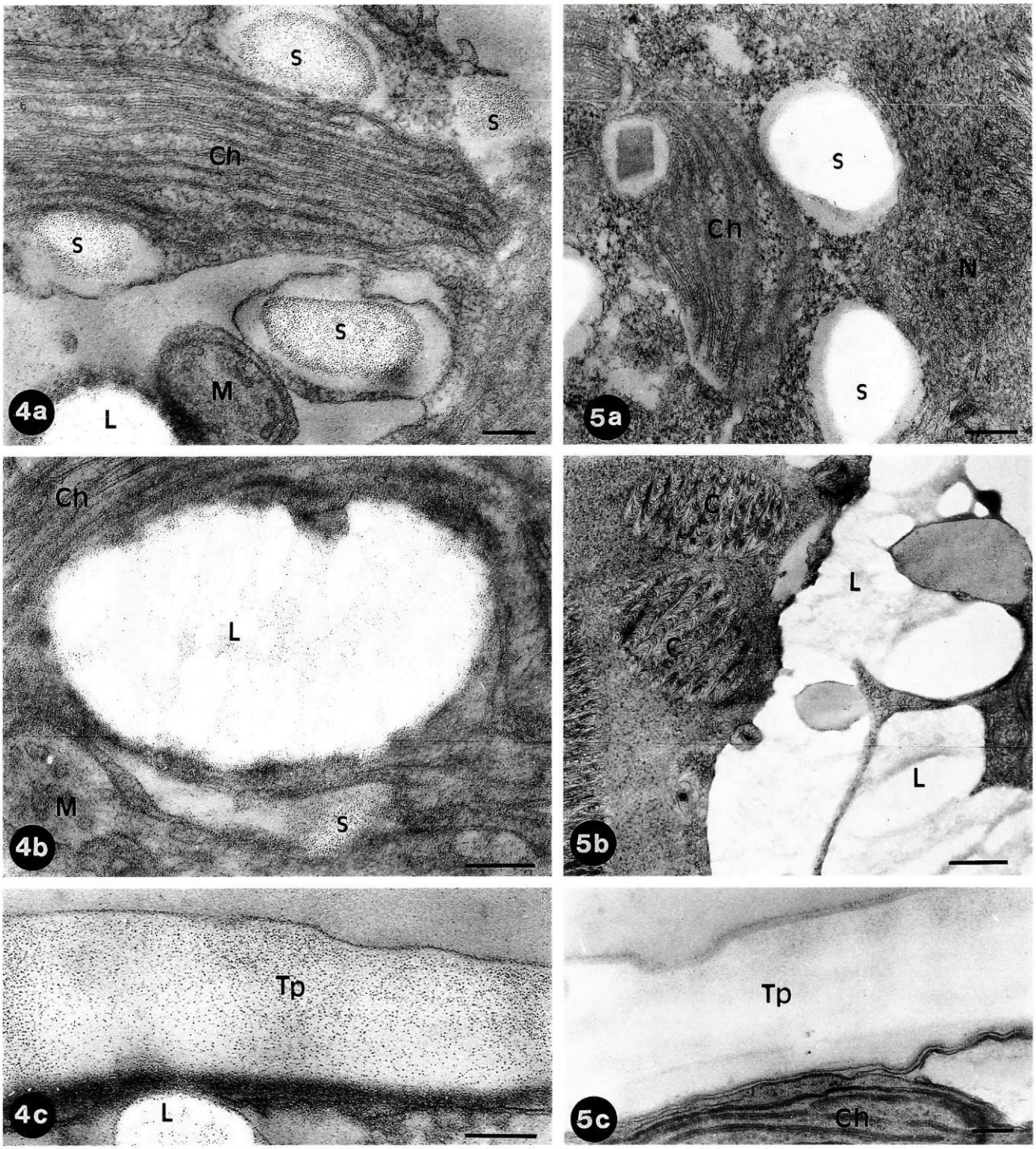
DISCUSSION

Prorocentrum micans tolerated the sublethal levels of copper to which it was subjected. After 3 h of exposure to 90 nM calculated labile copper, *P. micans* accumulated a relatively high amount of metal (12.4 times greater per cell than in the control). Similar to *Amphidinium carterae* (Lage et al., unpubl.), *P. micans* cells sorbed less copper than expected from the calculated labile concentration in the culture medium. In this short exposure, the fraction of bioavailable copper was relatively high because ligands from the surface of the cells compete with ligands in solution (including EDTA) for the labile copper. During the 3 h, high levels of the metal were probably adsorbed to the negatively charged cell surface layers (Klut et al. 1984). Nevertheless, more than 50% of the copper remaining in the cells after 5 days of exposure showed that *P. micans* had incorporated the metal and retained it intracellularly.

Supporting this hypothesis, the sulfide-silver procedure showed an intracellular location of copper in *P. micans*. Toxic effects of the high levels of copper were likely mitigated by copper binding to thecal plates, starch grains, and perhaps also lipid droplets, thereby reducing the availability of the metal to other intracellular components. Metal accumulation in plant cell walls has been inferred by other authors (Turner 1970, Button and Hostetter 1977, Pearlmutter and Lembi 1986, Allan and Jarrell 1989, Ballan-Dufrançais et al. 1991). The association of copper with starch grains and lipid droplets is interesting and novel. Based also on the sulfide-silver procedure and subcellular fraction analysis, Pearlmutter and Lembi (1986) found no association of copper with starch grains or lipids in akinetes of the green filamentous alga *Pithophora oedogonia*. Prior to our work, only Ballan-Dufrançais et al. (1991) observed in *Tetraselmis suecica* copper accumulation in osmiophilic vesicles that contained lipids. Because Ag, Pb, Ca, P, and S coprecipitated in these structures, they considered these vesicles to be polyphosphate bodies. The values of the fixation capacity and of the conditional stability constants of starch, amylopectin, and cellulose are clearly consistent with the binding of copper to starch grains and the cellulosic thecal plates of *P. micans*. The copper-binding

TABLE 1. *Conditional stability constants (K_{av}) at pH 6.5 (I = 0.1 M, KNO_3) and fixation capacities (FC) obtained for different polymeric substances (S). Cu_b = copper(II) bound; Cu_t = total copper(II); N = number of experimental points;* r = *correlation coefficient of the linear regression (see text).*

[S] ($g \cdot dm^{-3}$)	$\lvert Cu_b \rvert / [S]$ ($\mu mol \cdot g^{-1}$)	$-\log(\lvert Cu_t \rvert / [S])$	N	log K_{av}	FC ($\mu mol \cdot g^{-1}$)	r
Starch						
50.25	0.57–1.4	6.1–5.6	17	4.3	2.9	0.992
Amylopectin						
50.51	0.41–1.1	6.2–5.6	7	4.5	1.6	0.998
Cellulose						
25.06	0.50–1.5	6.3–5.7	27	5.5	2.3	0.998



FIGS. 4, 5. Transmission electron micrograph of *P. micans*. Scale bars = 0.2 μm. FIG. 4. Cells treated by the sulfide-silver procedure after 2 days of exposure to 90 nM labile copper. Note silver deposits in a, b) starch grains, c) in thecal plates, and, less pronounced, in a–c) lipid droplets. FIG. 5. Cell sections after control assays. No silver deposits are observed in a) starch grains, b) lipid droplets, or c) thecal plates. a) Sulfide-silver procedure in cells from control cultures; b) and c) treatment with the sulfide-silver procedure (without ammonium sulfide exposure) in cells from copper-treated cultures.

capacities of these polymeric substances were found to be similar to those of other natural chelating agents like fulvic acids (log k_1 = 5.8, log k_2 = 4.2, fulvic acids to copper concentration ratios between 0.2 and 18 [Soares and Vasconcelos 1994]) and keratin (log k = 4.6 [Vasconcelos and Gomes, unpubl.]) at similar pH values. The determination of the fixation capacity and the conditional stability constants using pure substances are an approximation to the exact values of the cellular molecules. Starch and cellulose

in the cell can be associated with other molecules like proteins, which may be involved in the binding of copper. Furthermore, the chemical *in vitro* conditions of the experiment most certainly are different from those *in vivo*. Greene et al. (1986) suggested a list of potential functional groups on the cell wall that may be responsible for metal uptake. These include amines, imidazoles, hydroxyls, carboxylates, phosphates, thiols, and thioethers. In a nuclear magnetic resonance study of metal–algae interactions, Majidi et al. (1990) found that the most likely functional ligands for metal complexation were carboxylic groups, and Gardea-Torresdey et al. (1990) also indicated that carboxyl groups on algal cells were responsible for most copper(II) binding. The faint silver deposition on lipidic reserves was not clear, and we have no additional experimental evidence to support it.

Several tolerance mechanisms to toxic concentrations of metals have been described (Fernandes and Henriques 1991, Ernst et al. 1992). The induction of a protein of about 25 kDa was observed in *Prorocentrum micans* after 3 h of exposure to copper. Living organisms respond at cellular levels to stressful conditions such as heat shock or pollution by a rapid, vigorous, and transient acceleration in the rate of expression of a small number of specific genes (e.g. heat shock genes) with the consequent production of proteins, commonly referred to as heat shock proteins or stress proteins (Morimoto et al. 1990). The function of these proteins is to protect cells from the ill effects of stress, allowing them to recover and survive (Morimoto et al. 1990). Stress proteins include a group of low molecular weight proteins from ~15 to >30 kDa. It is possible that the 25-kDa protein observed in *P. micans* might be a stress protein, but further studies are needed to confirm this.

A copper-induced effect observed in the present work was a decrease in intracellular potassium. Potassium leakage has been reported to occur in several microorganisms under copper stress (McBrien and Hassal 1965, Overnell 1975, Cabral 1989).

Despite the relatively high cellular levels of copper, which initially decreased *P. micans* growth and motility, the cells recovered their "normal" metabolism and apparently adjusted to relatively high copper levels. Our study indicated that, at the metabolic level, *P. micans* reacts rapidly to copper as indicated by the biosynthesis of a 25-kDa polypeptide that may be a stress protein. A short-term response of *P. micans* to copper stress was the efflux of copper, a tolerance mechanism that may have accounted for cell recovery between 3 h and 2 days. However, *P. micans* was able to tolerate the remaining relatively high intracellular levels of copper, probably by binding the metal to nonmetabolic sites such as the thecal plates, starch grains, and probably also lipid droplets. Binding excess copper inside the cell is a passive defense mechanism. The thecal plates also may be a barrier to copper, preventing its passage into the cytoplasm and cellular organelles. Starch and lipids were present in large amounts and, because the culture conditions were favorable to the growth of the organism, these reserve materials were probably not called upon for the metabolic needs of the cell, remaining stored with copper bound to them.

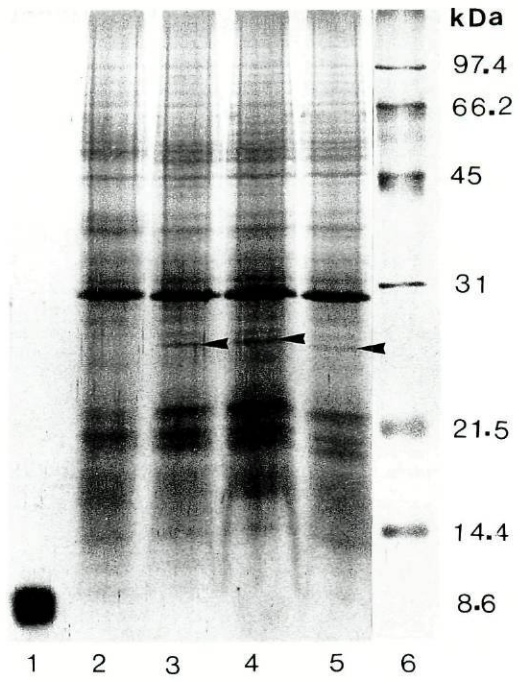


FIG. 6. Polypeptide profiles of *P. micans* after SDS-PAGE from control (lane 2) and after exposure to 1.03 μM labile copper for 3, 24, and 48 h (lanes 3, 4, and 5, respectively). The molecular weights (kDa) of the marker proteins (phosphorylase B, 97.4; bovine serum albumine, 66.2; ovalbumine, 45; carbonic anhydrase, 31; soybean trypsin inhibitor, 21.5; lysozyme, 14.4 [lane 6], and ubiquitin, 8.6 [lane 1]) are indicated on the right. After exposure to copper, a new polypeptide band of about 25 kDa appeared (arrowheads). Low molecular weight polypeptides (between 3 and 10 kDa), corresponding to phytochelatins were not evident.

We thank Dr. A. G. Davies, Marine Biological Association, U.K., for the review of the manuscript and his pertinent criticisms and suggestions and Dr. Artur Águas, ICBAS, U.P., also for the review of the manuscript. The authors are grateful to Professor Dr. J. D. Dodge, Royal Holloway, University of London, for the supply of *P. micans*. We thank Dr. Carlos P. Moreira de Sá, CMUP, Universidade do Porto, for SEM facilities and Dr. Helena Soares for the estimation of copper lability. The authors are grateful to Mrs. M. Andrea Costa for her excellent technical assistance with the photographs. Financial support for this work was provided by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica—JNICT, Lisbon.

Allan, D. L. & Jarrell, W. M. 1989. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiol.* 89:823–32.

Anderson, D. M. & Morel, F. M. M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.* 23:283–95.

Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C. & Amiard-Triquet, C. 1991. Response of the phytoplanctonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell.* 72:103–12.

Bentley-Mowat, J. A. & Reid, S. M. 1977. Survival of marine

phytoplankton in high concentrations of heavy metals, and uptake of copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 26:249–64.

Berland, B. R., Bonin, D. J., Kapkov, V. I., Maestrini, S. Y. & Arlhac, D. P. 1976. Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *C.R. Acad. Sc. Paris* 282:633–6.

Brand, L. E., Sunda, W. G. & Guillard, R. R. L. 1986. Reduction of marine reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96:225–50.

Buffle, I. 1988. *Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach.* Ellis Horwood, Chichester, pp. 228–32.

Buffle, I., Deladory, P., Greter, F. L. & Haerdi, W. 1980. Study of the complex formation of copper (II) by humic and fulvic substances. *Anal. Chim. Acta* 116:255–74.

Button, K. S. & Hostetter, H. P. 1977. Copper sorption and release by *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae) and *Chlamydomonas renhardtii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 13:198–202.

Cabral, J.P.S. 1989. Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability. Microbios 60: 141-150.

Coombs, T. L. & George, S. D. 1978. Mechanisms of immobilization and detoxification of metals in marine organisms. *In* McLusky, D. S. & Berry, A. J. [Eds.] *Physiology and Behavior of Marine Organisms.* Pergamon Press, New York, pp. 179–87.

Davies, A. G. 1978. Pollution studies with marine plankton. Part II. Heavy metals. *Adv. Mar. Biol.* 15:381–508.

Ernst, W. H. O., Verkleij, J. A. C. & Schat, H. 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41:229–48.

Fernandes, J. C. & Henriques, F. S. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57:246–73.

Foster, P. L. 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature (Lond.)* 269:322–3.

Gardea-Torresdey, J. L., Becker-Hapak, M. K., Hosea, J. M. & Darnall, D. W. 1990. Effect of chemical modification of algal carboxyl groups on metal ion binding. *Environ. Sci. Technol.* 24:1372–8.

Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. & Singh, R. M. M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5:467–77.

Greene, B., Hosea, M., McPherson, R., Henzl, M., Alexander, M. D. & Darnall, D. W. 1986. Interaction of gold(I) and gold(II) complexes with algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 20:627–32.

Harrison, P. J., Rosemary, E. W. & Taylor, F. J. R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16:28–35.

Hawkins, P. R. & Griffiths, D. J. 1982. Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. *Bot. Mar.* 25:31–3.

Hughes, M. N. & Poole, R. K. 1989. *Metals and Micro-Organisms.* Chapman and Hall, London, 412 pp.

Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A. & Haskins, C. P. 1950. Some approaches to the study of the role of the metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc.* 94: 152–70.

Kayser, H. 1976. Waste-water assay with continuous algal cultures: the effect of mercuric acetate on the growth of some marine dinoflagellates. *Mar. Biol. (Berl.)* 36:61–72.

Klut, M. E., Bisalputra, T. & Antia, N. J. 1984. Cytochemical studies on the cell surface of two marine dinoflagellates. *J. Phycol.* 20(Suppl.):18.

Lage, O. M., Parente, A. M. & Salema, R. 1991. Ultrastructural changes induced by copper in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *I Coloquio Franco-Ibérico de Microscopia Electrónica.* Barcelona, pp. 134–5.

——— 1994a. Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* Ehr. exposed to toxic levels of copper. *Rev. Palaeobot. Palynol.* 84:107–12.

Lage, O. M., Parente, A. M., Soares, H. M. V. M., Vasconcelos, M. T. S. D. & Salema, R. 1994b. Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. *Eur. J. Phycol.* 29:253–60.

Lima, J. L. T. C. & Machado, A. A. S. C. 1982. Inexpensive ISEs with followed sensor coatings applied to electrically conductive epoxy. *In* Albarges, J. [Ed.] *Analytical Techniques in Environmental Chemistry,* Vol. 2. Pergamon, New York, pp. 419–26.

Majidi, V., Laude, D. A., Jr. & Holcombe, J. A. 1990. Investigation of the metal-algae binding site with ^{113}Cd nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.* 24:1309–12.

McBrien, D. C. H. & Hassal, R. A. 1965. Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. *Physiol. Plant.* 18:1053–65.

McKnight, D. M. & Morel, F. M. M. 1979. Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol. Oceanogr.* 24:823–37.

Meador, J. P., Taub, F. B. & Sibley, T. H. 1993. Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in a standardized aquatic microcosm. *Ecol. Applic.* 3:139–55.

Morel, F. M. M., Rueter, J. G., Anderson, D. M. & Guillard, R. R. L. 1979. Aquil: a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. *J. Phycol.* 15:135–41.

Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. 1990. The stress response, function of the proteins, and perpectives. *In* Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. [Eds.] *Stress Proteins in Biology and Medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1–36.

Overnell, J. 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum. Mar. Biol. (Berl.)* 29:99–103.

Pearlmutter, N. L. & Lembi, C. A. 1986. The effect of copper on the green alga *Pithophora oedogonia. Weed Sci.* 34:842–9.

Pihl, E. 1968. Recent improvements of the sulfide-silver procedure for ultrastructural localization of heavy metals. *J. Microsc.* 7:509–20.

Prevot, P. 1978. Sensibilité au cadmium d'un dinoflagellé libre: *Prorocentrum micans* E. *IVes Journées Étud. Pollutions.* Antalya, C.I.E.S.M., pp. 347–50.

Prevot, P. & Soyer, M-O. 1978. Action du cadmium sur un dinoflagellé libre: *Prorocentrum micans* E.: croissance, absorption du cadmium et modifications cellulaires. *C.R. Acad. Sc. Paris,* 287(Sér. D):833–6.

Prevot, P. & Soyer-Gobillard, M-O. 1986. Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, *Prorocentrum micans* Ehrbg. and *Crypthecodinium cohnii* Biecheler. *J. Protozool.* 33:42–7.

Price, N. M., Harrison, G. I., Hering, J. G., Hudson, R. J., Nirel, P. M. V., Palenik, B. & Morel, F. M. M. 1989. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biol. Oceanogr.* 6:443–61.

Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A. & Droop, M. R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25:392–428.

Rachlin, J. W., Jensen, T. E., Baxter, M. & Jani, V. 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11:323–33.

Rai, L. C. & Mallick, N. 1993. Heavy metal toxicity to algae under synthetic microcosm. *Ecotoxicology* 2:231–42.

Rauser, W. E. 1990. Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:61–86.

Robinson, M. G., Brown, L. N. Quenneville, M. L. & Hall, B. D. 1992. Aspects of copper tolerance and toxicity in *Amphora coffeaeformis. Biofouling* 5:261–76.

Sicko-Goad, L. & Stoermer, E. F. 1979. A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 15:316–21.

Silverberg, B. A., Stokes, P. M. & Ferstenberg, L. B. 1976. Intracellular complexes in a copper-tolerant green alga. *J. Cell Biol.* 69:210–4.

Soares, H. M. V. M. & Vasconcelos, M. T. S. D. 1994. Study of the lability of copper(II)–fulvic acid complexes by ion selective electrodes and potentiometric stripping analysis. *Anal. Chim. Acta* 293:261–70.

Soyer, M-O. & Prevot, P. 1981. Ultrastructural damage by cad-

mium in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *J. Protozool.* 28:308–13.

Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26:31–43.

Steemann Nielsen, E. & Wim Anderson, L. 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Pl.* 22:1121–33.

Taylor, F. J. R. & Pollingher, U. 1987. Ecology of dinoflagellates. *In* Taylor, F. J. R. [Ed.]. *The Biology of Dinoflagellates*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 398–529.

Turner, D. R., Varney, M. S., Whitfield, M., Mantoura, R. F. C. & Riley, J. P. 1987. Electrochemical studies of copper and lead complexation by fulvic acid. II. A critical comparison of potentiometric and polarographic measurements. *Sci. Total Environ.* 20:271–5.

Turner, R. G. 1970. The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 69:725–31.

Visviki, I. & Rachlin, J. W. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20:271–5.

Trabalho 9

ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS PELO COBRE(II) EM DINOFLAGELADOS MARINHOS

Lage, O.M., Parente, A. M. & Salema, R. Ultrastructural alterations induced by copper(II) on marine dinoflagellates. (Submetido para publicação à revista **Phycologia**)

Ultrastructural alterations induced by copper(II) on marine dinoflagellates

OLGA M. LAGE, ANA M. PARENTE & ROBERTO SALEMA

Instituto de Botânica and Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto

Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal

Proofs should be sent to O.M. Lage, Centro de Citologia Experimental, U. P., Rua do Campo Alegre 823, 4150 Porto, Portugal. Fax: 351-2-699175; Email: oslage@ncc.up.pt

Running title: Cu(II) induced ultrastructural changes in dinoflagellates

Keywords: *Amphidinium carterae*, *Prorocentrum micans*, dinoflagellates, copper toxicity, TEM

SUMMARY

The effects induced by copper(II) on the ultrastructure of two dinoflagellate species, *A. carterae* and *P. micans*, were studied. Copper is a heavy metal present in Porto coastal waters in characteristic levels of polluted waters. These particular species were chosen because they are common in local waters and present distinct eco-physiological and structural characteristics. Copper(II) was added to the cultures without a pre-chemical equilibrium in the medium. This experimental design was used to simulate what may happen in natural environments where organisms are exposed to relatively high concentrations of pollutants at the moment of effluent discharges of various sources. Besides the differences exhibited by these two species, *P. micans* and *A. carterae* presented similar ultrastructural alterations induced by copper(II) under labile concentrations quite different, respectively 90 and 1030 nM. The most visibly disturbed organelles were the chloroplasts, the dictyosomes and the mitochondria, all of them membranous organelles and important metabolic centers. The nucleus appeared unaffected. *P. micans*, after the initial noxious effects induced by 90 nM labile copper, revealed the ability to recover the normal structure as observed after 19 days of exposure. Despite physiological responses to copper stress be very fast (already in the first hours), *P. micans* showed no apparent ultrastructural alterations in such short time of exposure to an higher concentration (2800 nM labile copper). The same labile metal concentration, which in *A. carterae* lead to the formation of temporary cysts, showed not to induce relevant ultrastructural alterations in this cell stage after 10 days of exposure. Besides some slighter symptoms of copper toxicity, the cells presented a great increase in lipidic and starch reserves and a marked dilation of some regions of the perinuclear space resulting in a vacuole-like structure, effect most probably due to copper stress. The cell covering remained unchanged and the plasma membrane integrity preserved. Temporary cysts of *A. carterae* seemed to maintain a similar structure to vegetative cells.

INTRODUCTION

Toxicity induced by heavy metals and their effects on various marine organisms have been the subject of many studies (De Filippis & Pallaghy, 1994; Price & Morel, 1994). Heavy metals like copper are essential elements for normal growth and development of biological organisms, but in relatively high concentrations, they can be toxic to the cells. Diverse physiological, biochemical and structural alterations have been attributed to heavy metals, like reduction of growth, longer lag phase, changes in cell volume, decreasing or inhibition of motility, changes in the pigment content, interference with photosynthesis, respiration and the levels of DNA, RNA and proteins, changes in the volume of chloroplasts, mitochondria and vacuole and dilation of various membranes (De Filippis & Pallaghy, 1994). However, only a relatively short number of research on this topic has been done with dinoflagellates.

Dinoflagellates are a group of predominantly unicellular phytoplanktonic algae, being directly exposed to all the substances present in the seawater. They have been considered sensible to low levels of copper (Brand *et al.*, 1986; Taylor & Pollingher, 1987). In 1987/88, coastal seawater from Porto was sampled for dissolved levels of four heavy metals (cadmium, copper, mercury and plumb) and copper was the metal present in levels characteristic of polluted waters (7.70 - 130 nM). Comparable values of dissolved copper were obtained in samples analysed in 1994/95. In the last decades, a great increase in population with consequent enlargement of pollutant activities made this portuguese region of increasing environmental concern.

The aim of the present work was to study, at the ultrastructural level, the effects induced by copper(II) on two dinoflagellate species, common in the portuguese waters. Some physiological alterations were already observed in these species (Lage *et al.*, 1994 a,b,c) and concomitant structural changes are expected to happen, especially at cellular compartments more directly related to metabolic functioning. This kind of study may provide essential information on metal toxicity mechanisms as well as on possible defense

mechanisms to this cation stress. The choice of these particular species was based on their different characteristics such as size, habitat and morphology with special relevance to the cell covering. *Amphidinium carterae* Hulburt and *Prorocentrum micans* Ehr. have been used on toxicity studies of different pollutants (Kayser, 1976; Prevot, 1978; Prevot & Soyer, 1978; Billy & Soyer, 1980; Matthys-Rochon, 1980; Antia & Klut, 1981; Klut *et al.*, 1981; Karydis, 1982; Klut *et al.*, 1984; Prevot & Soyer-Gobillard, 1985; Prevot & Soyer-Gobillard, 1986) including copper (Berland *et al.*, 1976; Hawkins & Griffiths, 1982; Brand *et al.*, 1986). However, as far as we know, any one focused ultrastructural changes induced by copper, and the majority of ultrastructural studies have been done in algae from different groups (Sicko-Goad & Stoermer, 1979; Daniel & Chamberlain, 1981; Lignell *et al.*, 1982; Sicko-Goad *et al.*, 1986; Heumnan, 1987; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1991; Visviki & Rachlin, 1992) and also cyanobacteria (Rachlin *et al.*, 1982; Rachlin *et al.*, 1985; Rai *et al.*, 1990).

The experimental design used, the addition of copper directly to the cultures without a pre-equilibrium period of the metal in the culture medium, tried to simulate what may happen in natural environments, especially in coastal waters, where organisms are exposed to high levels of pollutants at the moment of effluent discharges, due to anthropogenic activities (*e. g.* refineries, industries, sewages or agricultural activities). Under this situation, ligands of the organism surfaces compete directly for the metal with abiotic complexing agents (inorganic and organic) present in the seawater. Thus, in our experimental conditions, the cells were exposed to higher levels of copper in the free or labile (metal weakly bound to inorganic ligands that can easily be released) forms than they would be in pseudo-equilibrium conditions.

MATERIALS AND METHODS

A. carterae (isolate 39) and *P. micans* (kindly supplied by respectively, Dr. Estela Sousa e Silva, Instituto Nacional de Saúde, Lisbon and Prof. J. D. Dodge, Royal Holloway

College, London University) were cultivated in ESAW medium (Harrison et al. 1980), at 18 °C ± 1, with a 12 : 12 h dark/light cycle and under a photon flux density of 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$.

Several different experiments were performed with A. carterae and P. micans to assess the ultrastructural alterations induced by copper. Copper(II) was added to exponential growing cultures as 10 mM copper chloride in 5 mM HCl in order to obtain different total copper concentrations. Cultures to which copper was not added were used as controls. Growth was evaluated by cell counting in neutral formaldehyde-fixed samples with a Coulter counter (Model ZM).

The labile copper concentrations (free metal plus in inorganic complexes) in ESAW medium for the different total copper levels assayed were calculated by computational simulation using the speciation program MICROQL (Westall, 1979), as previously described (Lage et al. 1994b) and the results will be assessed using these theoretical concentrations. The calculations should be considered as only a rough approximation of the exact speciation of copper in the culture medium, but, even so, they are more appropriate than the total metal concentrations. Further more, as observed in previous work, at the moment of addition of copper and even after the pseudo-equilibrium has been established, the labile copper concentrations are higher than they would be at conditions of chemical pre-equilibrium of copper in the medium in the absence of organisms.

For transmission electron microscopy (TEM), whenever possible, cells sampled from the culture medium (to avoid dead cells at the bottom of the flasks), were fixed for 2 h in 2.5% glutaraldehyde in 0.05M cacodylate buffer at pH 7.4 and post-fixed in 1% osmium tetroxide (Ryter & Kellenberger 1958) for 4 to 12 h and 1% uranyl acetate for 30 min. Subsequently, cells were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in an epoxy resin (Spurr 1969). Ultrathin sections were obtained in a LKB Nova ultramicrotome and, after double staining with uranyl acetate (Valentine, personal comm.) / lead citrate (Reynolds 1963), were observed in a Zeiss model 10C TEM microscope.

RESULTS

Toxicity studies in P. micans

As shown in Figure 1A, labile copper concentrations lower than 55 nM (1.58 μM total copper) did not interfere with *P. micans* growth ($k = 0.2$ divisions.day^{-1}), while 55 and 90 nM (respectively, 1.58 μM and 3.94 total copper) reduced the growth (about 50% reduction in the cell number after 22 days of exposure to the metal) and disturbed the cell motility as assessed by light microscopy. The effect of copper on the growth rate was more acute between the 5th and the 12th days ($k_{5\text{-}12} = 0.037$ and 0.066 divisions.day^{-1}, respectively). When transferred to Cu-free medium, cells exposed to 90 nM labile copper showed a rapid recovery, attaining growth rates similar to control (Fig. 1B).

The ultrastructural study of *P. micans* exposed to 90 nM labile copper showed some discernible changes when compared with control cells (Figs. 2 - 7). Stressed cells presented dictyosomes with hypertrophied cisternae, chloroplast profiles with clearly dilated thylakoids including in the pyrenoids, mitochondria more electron-translucent indicative of few ribosomes and with a certain disorganization of the tubular cristae, and enlarged vacuolized areas. The nuclear ultrastructure seemed unchanged. These structural alterations were more pronounced after 2 days than after 19 days of exposure to copper (Figs. 8 - 11), when some cell profiles showed an ultrastructure closer to control cells indicating cell recovery (Figs. 8, 10 and 11), in spite of some still remaining affected (Fig. 9). Several accumulation bodies were present in the ultrastructurally recovered cells.

Since *P. micans* showed a very rapid response to 2800 nM labile copper (15.8 μM total copper) by the loss of motility, ultrastructural alterations were searched after 2 and 3 h of exposure to such a relatively high copper concentration. The great majority of the cells presented an apparent normal ultrastructure, even in the region of the pusule, which is densely surrounded by mitochondria. When compared to cells exposed for 2 days to 90

mM labile copper the pusule was not dilated and mitochondria were more electron-dense showing an higher content in ribosomes (Figs. 12 - 13).

Toxicity studies in A. carterae

In a previous work (Lage *et al.*, 1994c), it was observed that *A. carterae* exposed to 2800 nM labile copper (15.8 μM total copper) irreversibly lost the motility and cell division during the 10 days of experiment and underwent morphological alterations indicative of encystment as observed by light microscopy. The cells still remaining in culture were fluorescein positive ("viable") as assessed by the fluorescein diacetate (FDA) assay. The ultrastructural study of *A. carterae* was especially focused on these cells, although alterations induced by a lower labile copper concentrations (1030 nM labile copper corresponding to 11.9 μM total copper), known to be toxic to *A. carterae*, were also observed.

Under this concentration (Figs. 15 and 17) after 2 days of exposure, the effects of copper were similar to those observed in *P. micans*, but more pronouncedly: chloroplasts, dyctiosomes and mitochondria were clearly more affected, when compared to untreated cells (Figs. 14 and 16). Frequently, accumulation bodies were evident. Like in *P. micans*, also the nucleus seemed unchanged.

Cells exposed for 10 days to 2800 nM labile copper (Figs. 18 and 19) presented some similar symptoms of toxicity although less pronounced than in the acute exposure to 1030 nM. The chloroplast showed some profiles with dilated thylakoids, the central region of cell presented vesicles enlarged, but the mitochondria seemed normal. The cell membrane showed its integrity preserved. Cells showed a great increase in lipidic and starch reserves. A paracrystalline inclusion with round-section particles of about 10 nm in diameter and with hexagonal arrangement was observed inside the chloroplast. The nucleus, contrary to all other experiment in which it seemed unchanged, under this

concentration presented at certain regions of the nuclear envelope a marked dilation of the perinuclear space resulting in a vacuole-like structure.

DISCUSSION

The interference of copper(II) on growth and cell motility of *P. micans* observed are in agreement with results previously described (Lage *et al.*, 1994b) and allowed to confirm the induction of copper toxicity at the metabolic level.

Besides the difference in characteristics existing between these two species of dinoflagellates, *P. micans* and *A. carterae* presented similar ultrastructural alterations induced by copper(II). The most visibly disturbed organelles were the chloroplasts, the dictyosomes and the mitochondria, all of them membranous organelles. These are important metabolic centers, and their structural alterations may be either due to a direct action of copper, or a subsequent result of copper interference with metabolic pathways or, most probably, both. Due to its chemical structure, copper(II) is a strong complexing agent with high affinity to bind to several ligand groups (*e.g.* amine, carboxylate, thiol) present in organic molecules (*e.g.* proteins) constituents of membranes. Furthermore, copper is a transition metal important as catalyst of biological redox processes, possibly being involved in the catalysis of electron transfer and the oxidation-reduction of substrates. Therefore, copper may has the ability to compete and substitute other catalytic cations in their active sites hindering reactions. So changes in the membranes structure, integrity and permeability as well as interference on various metabolic pathways (photosynthesis, respiration, protein glycosylation) strongly dependent on these membranes certainly occurred.

The ultrastructural recovery observed in *P. micans* after 19 days of exposure to copper revealed the capability this organism have to overcome an initial noxious effects of the metal. This dinoflagellate mitigates the intracellular high levels of copper by its binding to the thecal plates, starch grains and, less extensively, to lipid droplets as previously

observed (Lage *et al.*, 1993). The presence of several accumulation bodies in these cells as well as in *A. carterae* after 2 days of exposure to 1030 nM copper might indicate a cellular autophagic activity, eliminating structures irreversibly affected. These structures have been widely reported to occur in dinoflagellates and a functioning in the autodigestion of cellular organelles have been proposed (Spector, 1984).

Besides the reduction of growth rates that occurred, the nucleus seemed apparently unaffected, and therefore, interference in the cell division appear not to be related with any kind of nuclear structural alteration. The reduction of growth rate in the presence of metals has been related mainly to the binding of the metal to the sulphydryl groups of enzymes, which are important for the regulation of cellular division (Fisher *et al.*, 1981). Furthermore, heavy metals are known to significantly decrease ATP levels (De Filippis & Pallaghy, 1994) as observed in *Amphora coffeaeformis* after exposure to copper (Robinson *et al.*, 1992). This phenomenon must also be responsible for the decrease in cell division.

In previous work, *P. micans* under two different stress-inducing situations presented responses somewhat similar to those here reported, especifically dilation of thylakoids and hypertrophy of dictyosomes cisternae when grown in nitrogen deficient medium (Lage *et al.*, 1990) and also similar symptoms in the chloroplasts when submitted to continuous darkness (Lage & Salema, 1989).

Ultrastructural alterations induced by different kind of pollutants have been studied in these two species of dinoflagellates. These include the organochloride 2-4-5-T (Billy & Soyer, 1980), the organophosphorus insecticides parathion (Prevot & Soyer-Gobillard, 1985a) and malathion (Prevot & Soyer-Gobillard, 1985b), the heavy metal cadmium (Soyer-Gobillard & Prevot, 1981), interaction of cadmium and selenium (Prevot & Soyer-Gobillard, 1986) and fluoride (Klut *et al.* 1981). Besides the different kind of the several pollutants referred, they induced some alterations consistent with those described

in this work, especially at the chloroplastidial and mitocondrial levels, and, in general, the nucleus also seemed unaffected.

Similar copper induced effects were observed in other organisms such as increase of the intrathylakoidal space in the cianobacterium *Plectonema boryanum* (Rachlin *et al.*, 1982), dictyosomes as the most disturbed organelles in *Tetraselmis convoluta* (Domozych, 1987) and photosynthetic membranes and mitochondria as the most sensitive organelles in *Melosira granulata*, *Fragilaria capucina* and *Anacystis cyanea* (Sicko-Goad, 1982). Cadmium also induced similar chloroplast ultrastructural disturbances in another algae, *Cystoseira barbata* forma *repens* (Pelligrini *et al.*, 1991). They considered that the alterations seen in plastids and vacuoles after exposure to cadmium were probably the result of changes in membrane permeability and in various biochemical interactions.

Physiological responses to copper stress were very fast (already in the first hours) as observed by loss of motility and synthesis of polypeptides (data not shown) but *P. micans* showed no apparent ultrastructural alterations in such short time of exposure.

Encystment of various species of dinoflagellates has been the subject of several ultrastructural studies. However, the majority of these studies, as it is justified by the ecological impact of this form, were focused on the formation of resting cysts or hypnozygotes, which are a product of sexual reproduction. Less attention has been paid to the structural changes underwent by temporary cysts or quiescent vegetative cells that are produced under unfavorable conditions like under copper stress.

The ultrastructural study of temporary cysts of *A. carterae* showed that no relevant structural alteration occurred. The cell covering was unchanged and the plasma membrane showed its integrity preserved which is consistent with the flow cytometry observations that these cells were capable to retain fluorescein (Lage *et al.*, 1994c). Some symptoms characteristic of copper toxicity were evident but to a less extent than those observed in vegetative cells exposed to lower copper concentrations. Due to the absence of growth and concomitant reduction in metabolic activity, these encysted cells showed a great

increase in lipidic and starch reserves. The nucleus, contrary to all other experiment in which it seemed unchanged, under this cell stage presented, at certain regions of the nuclear envelope, a marked dilation of the perinuclear space resulting in a vacuole-like structure. This effect is most probably due to the relatively high copper concentration. A paracrystalline inclusion with round-section particles of about 10 nm in diameter and with hexagonal arrangement was observed inside the chloroplast. This inclusion may possibly be a stored photosynthetic enzyme or protein due to the quiescent stage of the cell. Spector (1984) describe some round or polygonal vesicles (20 μm in diameter) containing packed paracrystalline rods that have been observed in the cytoplasm of *Crypthecodinium cohnii*, vesicles appearing more predominantly in mitotic or zygotic cysts than in vegetative cells. It was considered that the paracrystalline rods might represent enzymes and/or other proteins similar to those observed in peroxisomes (Novikoff & Holtzman, 1970). Another possibility is to be a virus-like particles (VLPs) on the basis of the nature of this inclusion. VLPs have been reported in cyanobacteria and in various groups of algae (Spector 1984) including dinoflagellates (Tomas & Cox, 1973; Franca, 1976; Sicko-Goad & Walker, 1979). VLPs may measure between 22 and 240 nm in diameter as observed in other algal groups, but can be even larger (385 nm in diameter) like in *Gymnodinium uberricum* (Sicko-Goad & Walker, 1979). VLPs have been observed in the nucleus, free in the cytoplasm or inside vesicles. As the inclusion observed appeared inside the chloroplast, the appearance and the size of its particles are different and smaller than the VLPs described, this hypothesis seems less plausible. Further work would be needed to clarify this point.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Helena Soares for the calculations of the labile copper. This work was financially supported by JNICT, Lisbon.

REFERENCES

Antia, N. & Klut, E. (1981) Fluoride addition effects on euryhaline phytoplankter growth in nutrient-enriched seawater at an estuarine level of salinity. *Bot. Mar.* **24,** 147-152.

Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C. & Amiard-Triquet, C. (1991) Response of the phytoplanctonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal biaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell.* **72,** 103-112.

Berland, B.R., Bonin, D.J., Kapkov, V.I., Maestrini, S.Y. & Arlhac, D.P. (1976) Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *C. R. Acad. Sc. Paris* **282,** 633-636.

Billy, F. & Soyer, M.-O. (1980) Effects toxique et adaptations cellulaires après l'action d'un défoliant, le 2-4-5-T sur le dinoflagellé marin *Prorocentrum micans* E: observation en microscopie photonique et électronique. *J. Protozool.* **27,** 53A.

Brand, L.E., Sunda, W.G. & Guillard, R.R.L. (1986) Reduction of marine reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **96,** 225-250.

Daniel, G.F. & Chamberlain, A.H.L. (1981) Copper immobilization in fouling diatoms. *Bot. Mar* **24,** 229-241.

De Filippis,L.F. & Pallaghy, C.K. (1994) Heavy metals: souces and biological effects. *Arch. Hydrobiol.* **42,** 79-97.

Domozych, D.S. (1987) An experimental analysis of the dictyosome in the green alga*Tetraselmis convoluta. J. Exp. Bot.* **38,** 1399--1411.

Fisher, N.S., Jones, G.J. & Nelson, D.M. (1981) Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **51,** 37-56.

Franca, S. (1976) On the presence of virus-like particles in the dinoflagellate *Gyrodinium resplendens* (Hulburt). *Protistologica* **12,** 425-430.

Harrison, P.J., Rosemary, E.W. & Taylor, F.J.R. (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **16,** 28-35.

Hawkins, P.R. & Griffiths, D.J. (1982) Cupric ion tolerance in four species of marine phytoplankton. *Bot. Mar.* **25,** 31-33.

Heumnan, H.G. (1987) Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma* **136,** 37-48.

Karydis, M. (1982) Toxicity of a photooxidised crude oil on two marine microalgae. *Bot. Mar.* **25,** 25-29.

Kayser, H. (1976) Waste-water assay with continuous algal cultures: the effect of mercuric acetate on the growth of some marine dinoflagellates. *Mar. Biol.* **36,** 61-72.

Klut, M.E., Antia, N.J. & Bisalputra, T. (1984) Some properties of a fluoride-resistant mutant of the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Phycologia* **23,** 301-310.

Klut, M.E., Bisalputra, T., Antia, N.J. (1981) Abnormal ultrastructural feactures of a marine dinoflagellate adapted to grow successfully in the presence of inhibitory fluoride concentration. *J. Protozool.* **28,** 406-414.

Lage, O.M., Parente, A.M. & Salema, R. (1990) Ultrastructural effects induced by different levels of nitrogen in *Prorocentrum micans* Ehr batch cultures. *XXV Reunião Anual da S.P.M.E.*, pp.155-156. Porto.

Lage, O.M., Parente, A.M. & Salema, R. (1993) Ultracytochemical localization of heavy metal in *Prorocentrum micans* Ehr. exposed to toxic levels of copper. *Pollution and the Environment* - Royal Microscopical Society, Plymouth, U.K.

Lage, O.M., Parente, A.M. & Salema, R. (1994a) Electrophoretic analysis of polypeptides of *Prorocentrum micans* Ehr. exposed to toxic levels of copper. *Rev. Palaeobot. Palyn.* **84,** 107-112.

Lage, O.M., Parente, A.M., Soares, H.M.V.M., Vasconcelos, M.T.S.D. & Salema, R. (1994b) Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. *Eur. J. Phycol.* **29,** 253-260.

Lage, O.M. & Salema, R. (1989) Ultrastructural and physiological alterations in *Prorocentrum micans* Ehr. submitted to continuous darkness. *Fourth International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates*, p.70. Woods Hole.

Lage, O.M., Sansonetty, F., Osswald, J.M., Parente, A.M. & Salema, R. (1994c) Evaluation of copper effects on *Amphidinium carterae* by FCM quantification of esterase activity. *Vth Spanish Portuguese Congress of Biochemistry*, Salamanca, Espanha.

Lignell, A., Roomans, G.M. & Pederesen, M. (1982) Localization of absorbed cadmium in *Fucus vesiculosus* by X-ray microanalysis. *Z. Pflanzenphysiol.* **105,** 103-110.

Matthys-Rochon, E. (1980) Action de l'isopropyl-N-phényl carbamate sur un dinoflagellé libre: l'*Amphidinium carterae* Hulburt. Effects sur la croissance et la dinomitose. *Cryptogamie Algologie* **I(1),** 3-17.

Novikoff, A.B. & Holtzman, E. (1970) Peroxisomes (microbodies, glyoxysomes). *Cells and Organelles* (eds. A.B. Novikoff and E. Holtzman), pp. 135-139. Holt, New York.

Pelligrini, L., Pelligrini, M., Delivopoulos, S. & Berail, G. (1991) The effects od cadmium on the fine structure of the brown algae *Cistoseira barbara* forma *repens* Zinova et Kalugina. *Br. phycol. J.* **26,** 1-18.

Prevot, P. (1978) Sensibilité au cadmium d'un dinoflagellé libre: *Prorocentrum micans* E. *IVes Journées Étud. Pollutions*, pp.347-350. Antalya, C.I.E.S.M.

Prevot, P. & Soyer, M.-O. (1978) Action du cadmium sur un dinoflagellé libre: *Prorocentrum micans* E.: croissance, absorption du cadmium et modifications cellulaires. *C. R. Acad. Sc.Paris* **287(série D),** 833-836.

Prevot, P. & Soyer-Gobillard, M.-O. (1985a) Action of the organophosphorus insecticide parathion on the free-living marine dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehrbg. *J. Protozool.* **32,** 626-633.

Prevot, P. & Soyer-Gobillard, M.-O. (1985b) Effects of the organophosphorus insecticide malathion on the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans. Vie Milieu* **35,** 15-21.

Prevot, P. & Soyer-Gobillard, M.-O. (1986) Combined action of cadmium and selenium on two marine dinoflagellates in culture, *Prorocentrum micans* Ehrbg. and *Crypthecodinum cohnii* Biecheler. *J. Protozool.* **33,** 42-47.

Price, N.M. & Morel, F.M.M. (1994) Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* **42,** 79-97.

Rachlin, J.W., Jensen, T.E., Baxter, M. & Jani, V. (1982) Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11,** 323-333.

Rachlin, J.W., Jensen, T.E. & Warkentine, B.E. (1985) Morphometric analysis of the response of *Anabaena flos-aquae* and *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to selected concentrations of zinc. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **14,** 395-402.

Rai, L.C., Jensen, T.E. & Rachlin, J.W. (1990) A morphometric and X-ray energy dispersive approach to monitoring pH-altered cadmium toxicity in *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19,** 479-487.

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17,** 208-212.

Robinson, M.G., Brown, L.N., Quenneville, M.L. & Hall, B.D. (1992) Aspects of copper tolerance and toxicity in *Amphora coffeaeformis*. *Biofouling* **5,** 261-276.

Ryter, A. & Kellenberger, E. (1958) Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoides des bactéries en croissance active. *Z. Naturforsh.* **13,** 597-605.

Sicko-Goad, L. (1982) A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal expoosure. *Protoplasma* **110,** 75-86.

Sicko-Goad, L., Ladewski, B.G. & Lazinsky, D. (1986) Synergistic effects of nutrients and lead on the quantitative ultrastructure of *Cyclotella* Bacillariophyceae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **15,** 291-300.

Sicko-Goad, L. & Stoermer, E.F. (1979) A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **15,** 316-321.

Sicko-Goad, L. & Walker, G. (1979) Viroplasm and large virus-like particles in the dinoflagellate *Gymnodinium uberricum*. *Protoplasma* **99,** 203-210.

Soyer, M.-O. & Prevot, P. (1981) Ultrastrucrural damage by cadmium in a marine dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *J. Protozool.* **28,** 308-313.

Spector, D.L. (1984) Unusual inclusions. *Dinoflagellates* (ed. D.L. Spector), pp 365-390. Academic Press, Orlando.

Spurr, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26,** 31-43.

Taylor, F.J.R. & Pollingher, U. (1987) Ecology of Dinoflagellates. *The Biology of Dinoflagellates* (ed. by. F.J.R. Taylor), pp. 398-529. Blackwell Scientific, Oxford.

Tomas, R.N. & Cox, E.R. (1973) Observations on the symbiosis of *Peridinium balticum* and its intracellular alga. I. Ultrastructure. *J. Phycol.* **9,** 304-323.

Visviki, I. & Rachlin, J.W. (1992) Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23,** 420-425.

Westall, J.C. (1979) MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC. Internal Report, EAWAG, Dubendorf.

Figure 1. Growth of *P. micans* unexposed (—□—) and exposed to 5 nM (·····◇·····), 55 nM (---○---) and 90 nM labile copper (----△----). In B is also shown the growth recovery of cells pre-exposed to 90 nM labile copper and inoculated in free-copper medium (--●--).

Figures 2 - 7. Ultrastructural comparison between *P. micans* unexposed to copper, control (Figs. 2, 4 and 6) and after exposure to 90 nM labile copper for 2 days (Figs. 3, 5 and 7). In Figs. 2, 4 and 6 are shown the normal appearance of the archoplasmic sphere (dictyosomes), mitochondria, chloroplast and pyrenoid as well as of other organelles. Disturbances induced by copper are evident in the dictyosomes (Fig. 3 and inset), mitochondria (Fig. 3), thylakoid membranes (Figs 3 and 5) and pyrenoid (Fig. 7). (Bars - 1 μm)

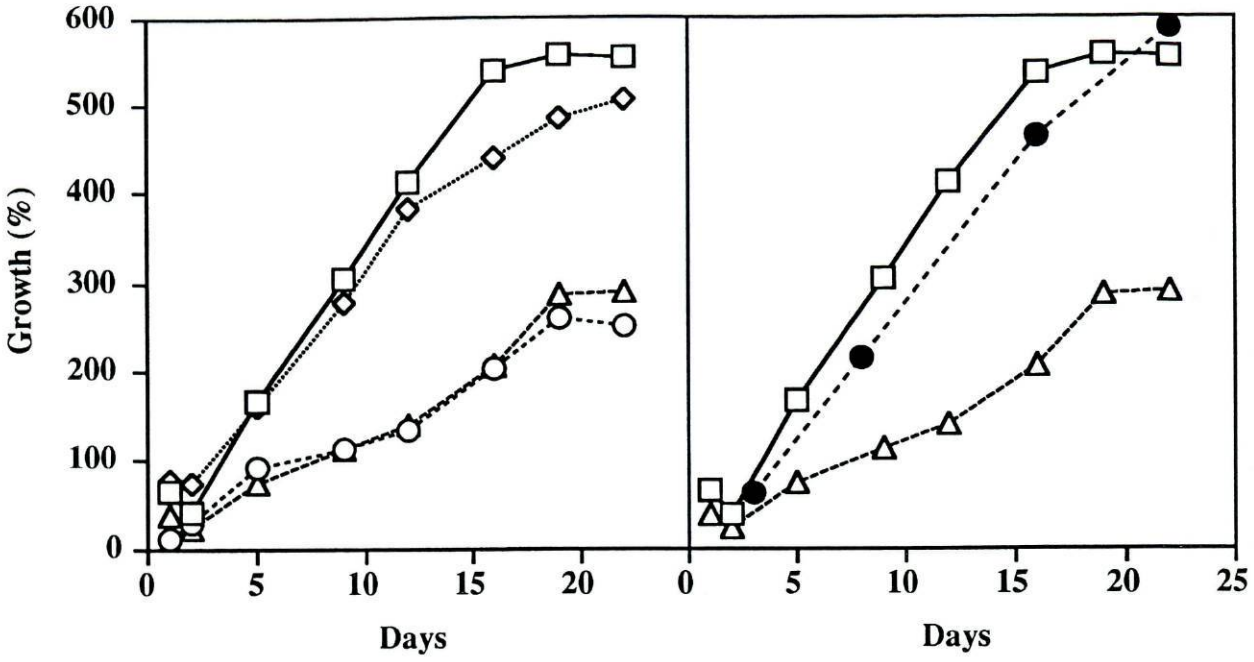
Figures 8 - 11. Ultrastructural aspects of *P. micans* exposure to 90 nM labile copper for 19 days. Although some cell profiles still show symptoms of disturbance (Fig. 9), recovery of the cell structure is clearly evident (Figs. 8, 10 and 11).

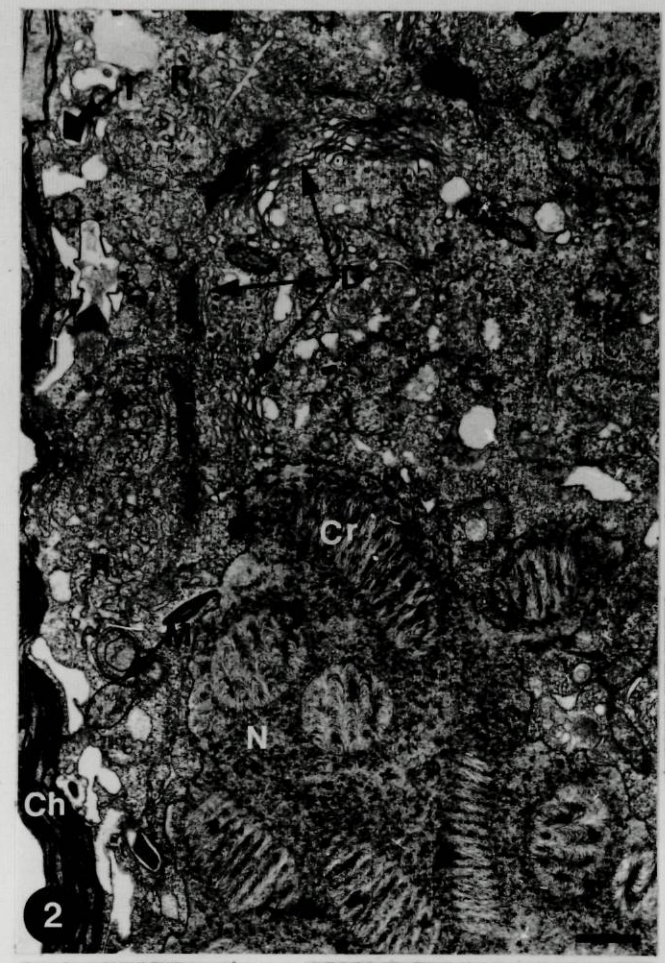
Figures 12 - 13. Comparison between the structure of *P. micans* pusules after (Fig. 12) a short term exposure (3 h) to relatively high levels of labile copper (2800 nM) and (Fig. 13) a longer exposure (2 days) to a lower labile copper concentration (90 nM). Note the apparent normal appearance of the pusule and of the other organelles in Fig. 12, while in Fig. 13 the pusule appears greatly enlarged.

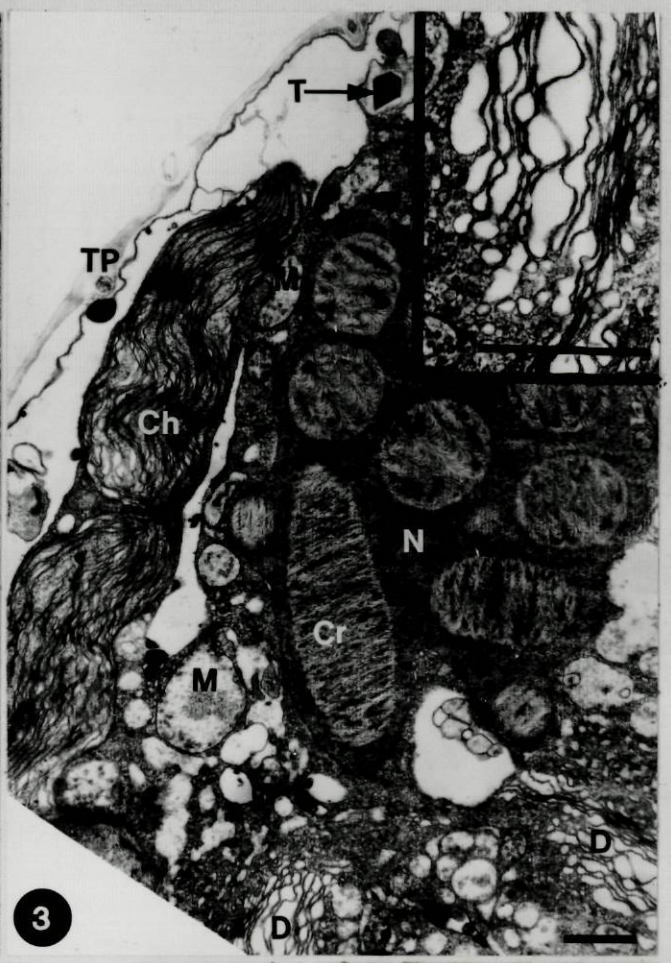
Figures 14 - 17. Ultrastructural comparison between *A. carterae* unexposed to copper, control (Figs. 14 and 16) and after exposure to 1030 nM labile copper for two days (Figs. 15 and 17). Mitochondria are deeply altered by decrease in the number of tubular cristae and ribosomes. Thylakoids appear with dilated areas similarly to what was verified in *P. micans* (head of arrows) but also present vacuole-like regions (*). Dictyosomes have hypertrophied cisternae. (Bars: Figs. 14, 15 and 17 - 1 μm; Fig. 16 - 0.5 μm)

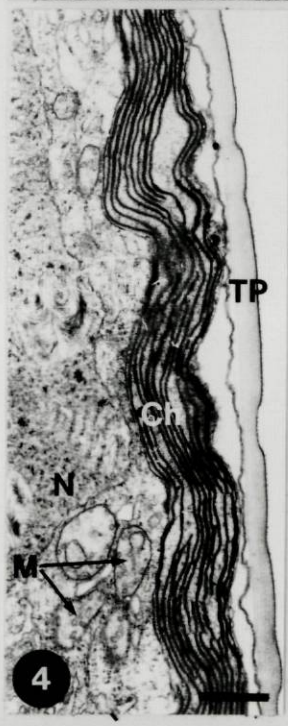
Figures 18 - 19. *A. carterae* exposed to 2800 nM labile copper for 10 days. Fig. 18 - The cells present less pronounced symptoms of toxicity than after an acute exposure to a lower copper concentration (see Figs. 15 and 17), but higher content in lipidic and starch reserves and the plasma membrane integrity seemed unaffected. (Bar - 1 μm) 19 - The nuclear envelope presented vacuole-like structures (*) and a paracristline inclusion (inset) with an hexagonal arrangement of its round-section particles which measured about 10 nm in diameter was observed inside the chloroplast. (Bars - 5 μm)

Abbreviations used in Figures: AC - accumulation body; Ch - chloroplast; Cr - chromosomes; D - dictyosome; FB - fibrous body; L - lipidic droplets; M - mitochondria; N - nucleus; Nu - nucleolus, Py - pyrenoid; R - reticulum endoplasmatic; S - starch; T - tricocyst; TP - thecal plate; V - vacuole


600
500
400
300
200
100
0
Growth (%)
0
5
10
15
20
Days
0
5
10
15
20
25
Days


T
R
D
Cr
N
Ch
2

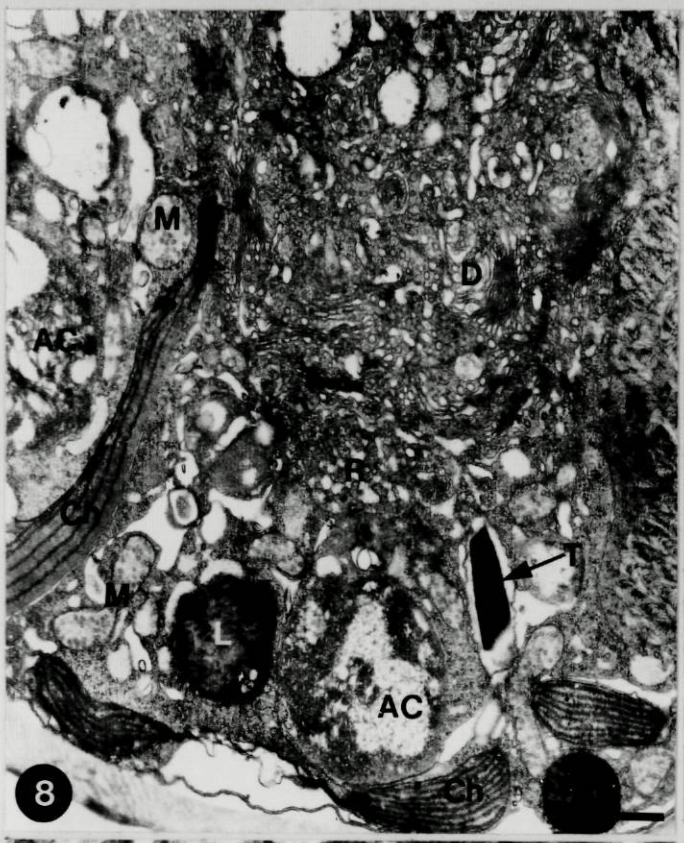

T
TP
Ch
N
Cr
M
D
D
3


TP
Ch
N
M
4


Ch
5


Py
6

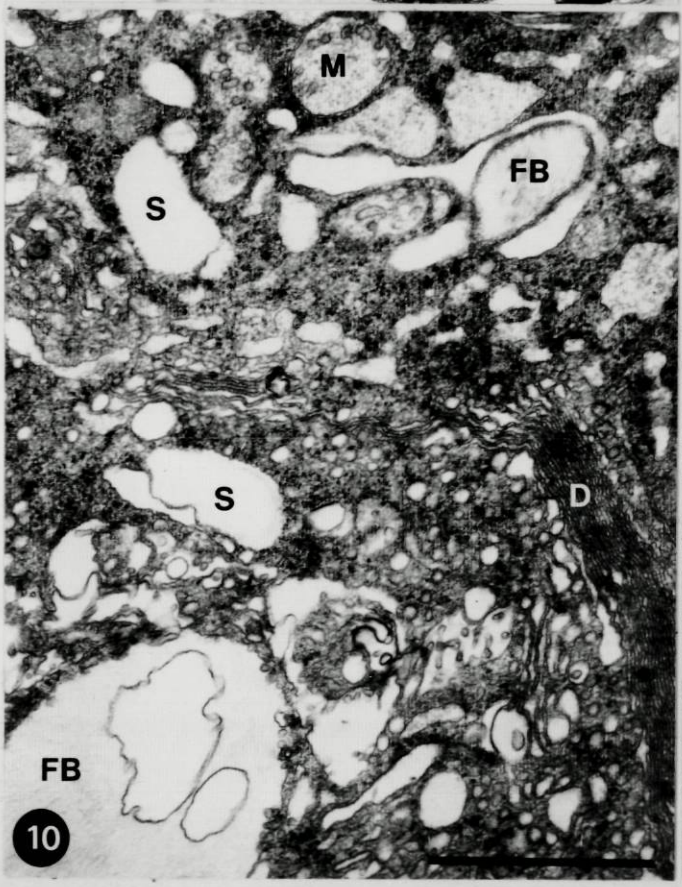

Py
7



8



9

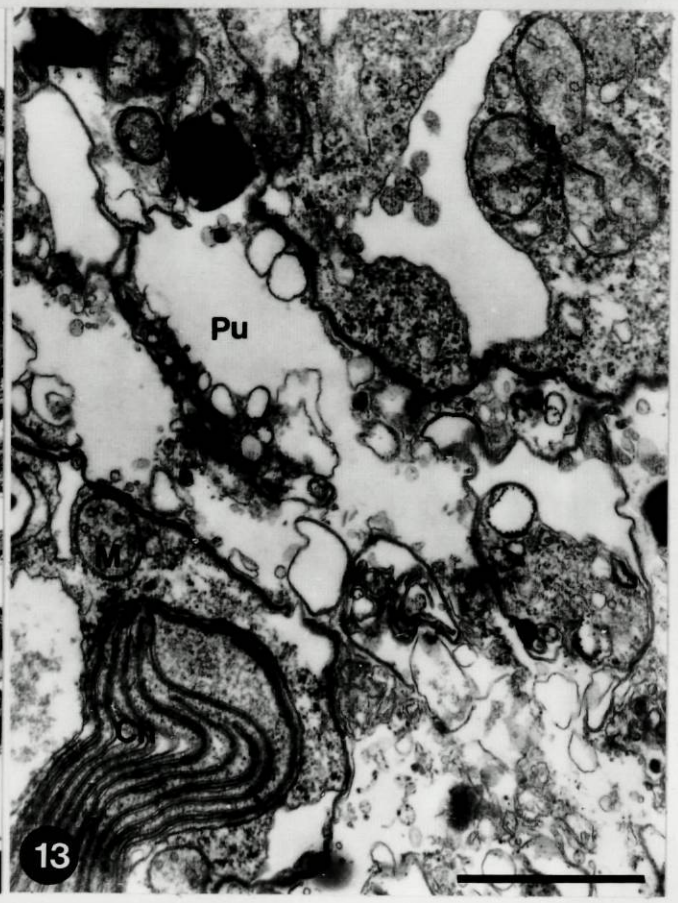


10



11


FB
T
Pu
Ch
V
TP
Pu
Cr
N
12


Pu
13



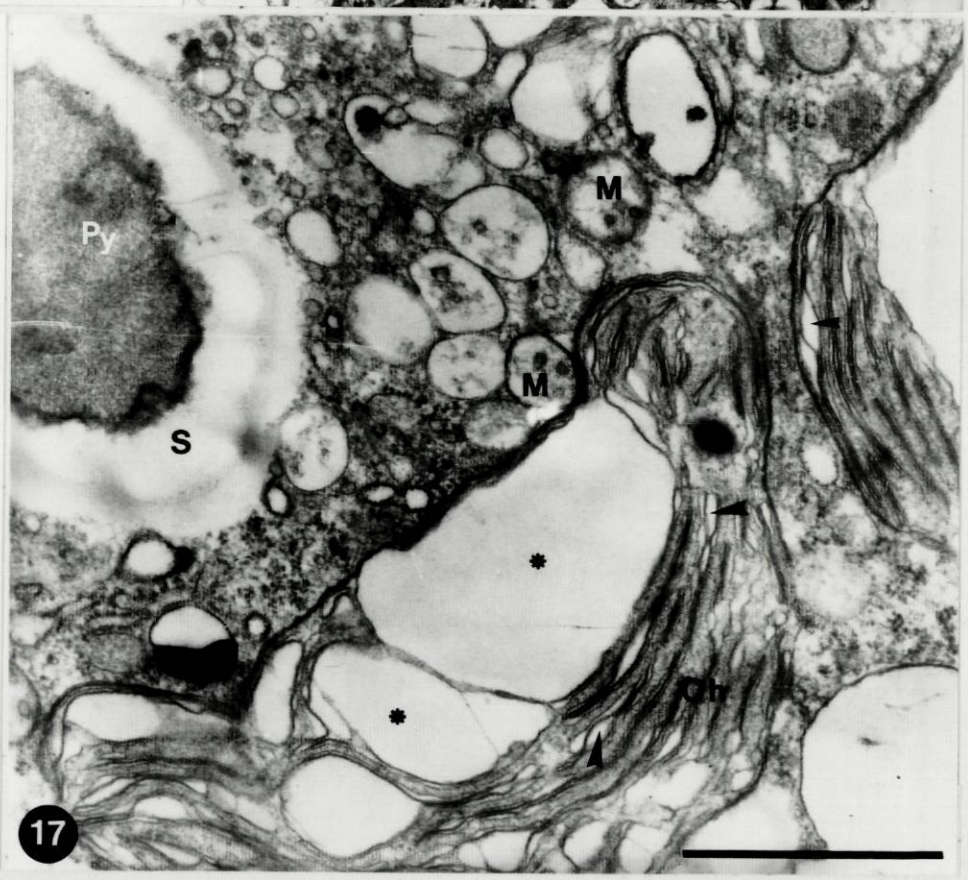
14



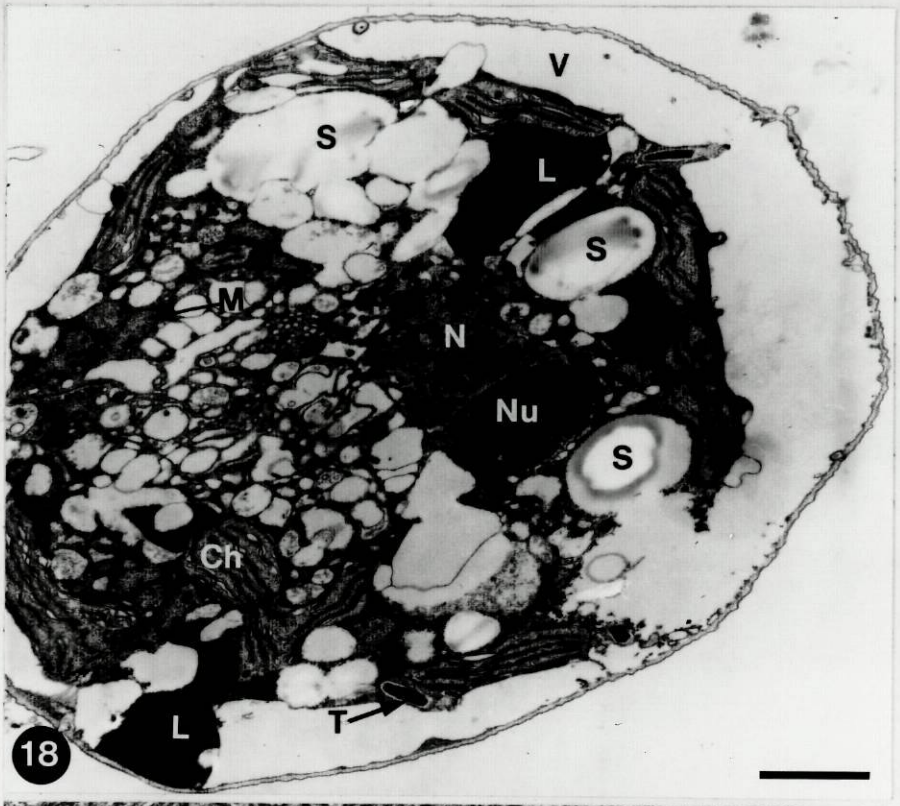
15

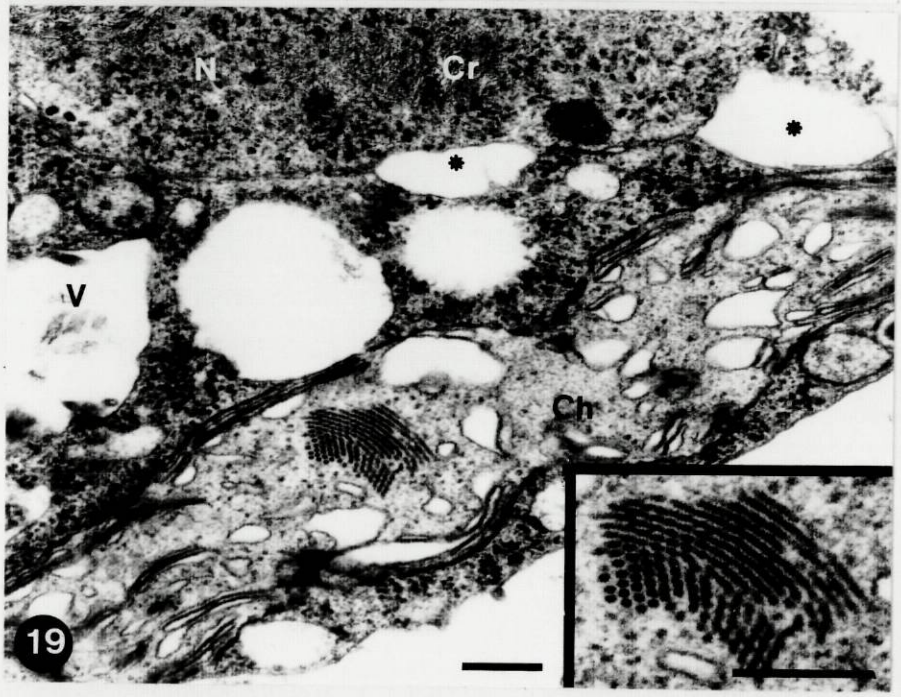


16



17


V
S
L
S
M
N
Nu
S
Ch
L
T
18


N
Cr
V
Ch
19

Capítulo 4

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

1. Efeitos do cobre(II) na biologia de *A. carterae* e de *P. micans*

O cobre(II) interfere, através de uma relação dose-efeito, com o crescimento de *A. carterae* e de *P. micans* como verificado pelo aumento do tempo da fase de latência e diminuição da taxa de crescimento e da biomassa. Ambas as espécies demonstraram, após o período inicial de "stress" exercido pelo cobre, uma capacidade de adaptação ao metal. Concentrações de cobre lábel indutoras de letalidade foram observadas em *A. carterae* e em *P. micans* e são da mesma ordem de grandeza, respectivamente 2,80 - 3,13 e 3,16 μM.

P.micans é mais sensível que *A. carterae* à acção do cobre(II) atendendo à concentração de metal lábel que induziu efeitos de toxicidade. Contudo, se esta análise for efectuada com base na concentração de cobre(II) lábel em solução por célula verifica-se uma inversão do grau de sensibilidade ao cobre entre as duas espécies. A análise da toxicidade baseada nesta razão não é usualmente utilizada mas, quando se pretende efectuar avaliações comparativas de toxicidade, o número de células que inicialmente entra em contacto com o metal é um parâmetro a ter em consideração assim como a relação superfície/volume celular. Para se testar a importância do parâmetro cobre(II) lábel em solução por célula na avaliação da toxicidade dois tipos de experiências deverão ser efectuadas. Uma, em que são usados inóculos com concentrações celulares diferentes em meios com a mesma concentração de cobre lábel. Outra, em que são usados inóculos com concentrações celulares semelhantes de espécies diferentes em meios com diferentes concentrações de cobre lábel.

A nível da mobilidade celular as duas espécies apresentam uma resposta semelhante e aguda ao cobre(II). A partir de certa concentração de cobre lábel as células perdem a mobilidade. Em certos casos conseguem recuperá-la, mas para as concentrações mais elevadas de cobre testadas essa perda pode ser irreversível. É de realçar que uma perda irreversível da mobilidade não significa necessáriamente uma perda de viabilidade celular e consequentemente morte celular, como foi demonstrado neste estudo. Com o aumento da concentração do cobre também se verifica uma perda progressiva do grau de mobilidade assim como uma maior fotossensibilidade.

O cobre(II) lábel em baixas concentrações (5nM) induz um aumento do teor em proteínas solúveis como verificado em *P.micans*, mas em concentrações mais elevadas provoca uma diminuição do teor proteico, tendo-se mesmo verificado uma diminuição total indicativa de morte celular (3,16 μM). Contudo, em concentrações sub-letais e apesar da

diminuição proteica em termos globais, certos polipéptidos sofrem um aumento relativo dos seus níveis enquanto outros apresentam uma diminuição mais acentuada. Estas alterações são bem indicativas da interferência do cobre(II) no metabolismo celular.

O cobre(II), em concentrações capazes de induzir toxicidade, ao contactar com as células e ser absorvido vai afectar o equilíbrio celular. Se funções celulares fundamentais são grandemente afectadas e as células não conseguem responder à agressão, verifica-se uma certa percentagem de mortalidade na população. Este facto foi confirmado por análise citométrica de fluxo e marcação com diacetato de fluoresceína em *A. carterae*, tendo-se verificado que após um dia de exposição ao cobre a percentagem de células viáveis era menor. Morte celular associada a uma inibição da divisão celular justificam a existência da fase de latência induzida pelo cobre.

A recuperação celular e, portanto, da cultura após o impacto inicial do cobre, também foi observada por FCM em *A. carterae* uma vez que, nos dias posteriores à exposição ao cobre, a percentagem de células viáveis se manteve próxima de 100%. Contudo, comparando a intensidade da fluorescência da fluoresceína após marcação com FDA entre as células controlo e as tratadas com cobre verificou-se que nestas a intensidade era menor. Considerando este parâmetro como uma medida do estado metabólico das células através da actividade das esterases ou alteração da permeabilidade do plasmalema, confirma-se que, apesar das células estarem viáveis, o seu metabolismo está afectado justificando a redução das taxas de crescimento e a menor biomassa produzida. Tanto em *A. carterae* como em *P. micans* foi possível verificar uma perda de potássio intracelular após exposição a concentrações subletais de cobre, fenómeno que implica a alteração da permeabilidade celular e que talvés possa ser devido a um antiporte Cu^{2+}/K^{+}.

A. carterae exposto a concentrações de cobre inibitórias do crescimento exibe um comportamento, após marcação com FDA, completamente distinto do verificado em concentrações inferiores do metal. Após um período mais prolongado de exposição ao metal (10 dias) confirma-se, através da diminuição acentuada da percentagem de viabilidade, a ocorrência de morte celular. Mas a intensidade de fluorescência da fluoresceína, ao contrário do que se verifica para as concentrações inferiores, aumenta significativamente várias ordens de grandeza. Ao fim dos 10 dias de exposição ao cobre as células viáveis continuam a exibir elevados níveis de fluorescência da fluoresceína. A integridade da membrana celular permanece inalterada. Este resultado completamente inesperado, e contrário ao pressuposto de que as células possuiam o seu metabolismo altamente afectado e portanto níveis ainda mais baixos de fluorescência, possibilitou uma série subsequente de estudos no sentido da sua interpretação.

Este efeito do cobre em *A. carterae* é imediato como foi demonstrado com os ensaios cinéticos da absorção do FDA o que sugere que o cobre actua na face externa do plasmalema

excluindo uma possível acção a nível da actividade das esterases. Como a emissão da fluoresceína é dependente do pH, sendo mais intensa a pHs mais alcalinos, o cobre deve interferir com o(s) mecanismo(s) de regulação iónica intracelular. Vários dados apontam para uma interferência do cobre com o antiporte Na^+/H^+ exercendo assim uma acção oxidativa imediata nas proteínas da membrana e alterando a homeostasia iónica intracelular.

Em culturas de *A. carterae* em fase estacionária avançada, verificou-se a existência de duas populações celulares com níveis de emissão de fluoresceína diferentes, uma com níveis da mesma intensidade da população em crescimento exponencial, e outra com níveis da mesma ordem de grandeza das células expostas a concentrações inibitórias de cobre. Estes resultados substanciam a hipótese dos cistos possuirem um pH intracelular aumentado em relação às formas vegetativas.

Concentrações subletais de cobre induzem em *A. carterae* um aumento dos níveis celulares de peróxido de hidrogénio e do anião superóxido, duas espécies químicas que são o resultado de explosão oxidativa e vão, portanto, contribuir para o aparecimento de toxicidade. Curiosamente, em concentrações de cobre inibitórias do crescimento e que induzem a formação de cistos temporários, não se verificou um aumento do anião superóxido, mas sim um aumento mais acentuado de peróxido de hidrogénio. Contudo, como o fluorocromo usado para a análise do peróxido de hidrogénio após absorção vai originar fluoresceína, o resultado observado é consistente com o facto destas formas possuirem um pH intracelular aumentado, podendo ser excluída a interpretação de ter ocorrido um aumento real de peróxido de hidrogénio. Assim, muito possivelmente e como seria de esperar, nas formas císticas não ocorreu uma explosão oxidativa.

Como demonstrado, a citometria de fluxo é uma técnica extremamente útil em estudos de citotoxicidade por metais em formas fitoplanctónicas unicelulares como *A. carterae* que apresentem boas características para este tipo de estudos, com a grande vantagem de rapidamente ser possível a obtenção de resultados. As suas potencialidades analíticas, ao permitirem a integração de uma gama grande de níveis de resolução populacionais, fisiológicos e moleculares, conferem à citometria de fluxo uma posição de destaque em estudos de biologia ambiental.

2. Efeitos do cobre(II) na estrutura celular de *A. carterae* e de *P. micans*

Apesar de *A. carterae* e de *P. micans* apresentaram várias características distintas como referido no Capítulo 2, as alterações estruturais induzidas pelo cobre(II) foram semelhantes nos dois organismos. Os organelos mais afectados foram três importantes centros metabólicos: o cloroplasto, os dictiossomas e as mitocôndrias. Como são organelos compostos essencialmente por sistemas membranosos, a complexação do cobre com grupos de moléculas orgânicas suas constituintes em substituição do catião correcto, pode levar à perda da integridade estrutural e da alteração da permeabilidade destes sistemas membranosos e portanto à interferência com várias vias metabólicas fortemente dependentes destas membranas como a fotossíntese, a respiração e a glicolização de proteínas.

O núcleo, em termos estruturais, parece não ser afectado pelo cobre em nenhuma das espécies. Assim, a redução de crescimento induzida pelo cobre não parece estar relacionada com alterações estruturais a nível nuclear, mas provavelmente com funções relacionadas com o metabolismo celular como, por exemplo, a ligação do cobre aos grupos sulfidrilo de enzimas chave na regulação da divisão celular ou à diminuição dos níveis de ATP necessários para que a divisão celular ocorra.

A presença de vários corpos de acumulação nas duas espécies após exposição ao cobre sugere uma actividade celular autofágica para eliminação de estruturas irremediavelmente afectadas e portanto uma resposta à toxicidade no sentido da recuperação celular. A nível estrutural, esta resposta ocorreu em *P. micans* após um certo período de adaptação a níveis anormalmente elevados de cobre. Estas observações estruturais são consistentes com dados de crescimento e outos aspectos biológicos.

Apesar de ambas as espécies apresentarem respostas bioquimico-fisiológicas muito rapidas à toxicidade induzida pelo cobre, as alterações estruturais são mais lentas como observado em *P. micans* pela aparente ausência de alterações após duas horas de exposição ao metal.

Em concentrações de cobre inibitórias do crescimento as células de *A. carterae* sofrem alterações morfológicas. Tornam-se esféricas, persistentemente imóveis, formando agregados de um número variável de células. As alterações observadas são indicativas da formação de cistos temporários. O estudo ultraestrutural destes cistos apoia as indicações obtidas por citometria de fluxo (viabilidade celular, actividade esterásica e integridade celular) sobre estas

células, uma vez que não se observaram alterações estruturais relevantes. Apesar de se tratarem de formas císticas, o revestimento celular não sofre alterações estruturais aparentes não tendo sido observada a formação da camada pelicular característica dos cistos peliculares (definidos por serem formados em condições de perturbação ambiental passageiras) e o plasmalema mantem a sua integridade. Estas células apresentavam um teor mais elevado de reservas lipídicas e de amido, indicativo de um menor consumo energético concordante com a inexistência de divisão celular. A nível nuclear surgem zonas do invólucro nuclear dilatadas formando estruturas tipo vacúolo. Estes cistos, quando inoculados em meio de cultura na ausência de cobre, originaram novas culturas, confirmando que as alterações estruturais e metabólicas não eram relevantes e as que ocorreram foram reversíveis.

3. A importância da labilidade do cobre(II)

A influência do pH na concentração de cobre(II) lábel e, portanto, a sua importância em estudos de toxicidade pelo cobre é evidenciada.

Como claramente demonstrado, mesmo em meios salinos onde agentes quelantes fortes como o EDTA estão presentes em excesso relativamente ao cobre(II), o metal pode ser absorvido pelas microalgas e induzir toxicidade. Isto verifica-se porque os cloretos, cuja concentração é bastante elevada no meio (cerca de 0,5 M) e outros ligandos inorgânicos e possivelmente orgânicos competem pelo cobre com o EDTA, possibilitando a existência de uma fracção de cobre(II) lábel muito mais elevada que a livre. Como o cobre celular foi superior ao metal inicialmente livre em solução, estes resultados contribuem para evidenciar que não é só o cobre livre mas também a concentração lábel que está biodisponível para as algas. Contudo, como as algas absorvem o cobre a partir de complexos lábeis para além do metal livre, o uso de bioensaios com algas para medir a actividade do cobre(II) livre, como previamente recomendado, pode levar a determinações avaliadas por excesso. A actividade do cobre livre pode ser usada como uma medida de toxicidade ou biodisponibilidade do metal somente se for conhecida a constante de proporcionalidade que relaciona as concentrações de cobre livre e lábel. Estes resultados realçam a grande importância dos processos cinéticos nas interacções metal vestigial-fitoplancton, demonstrando que têm de ser considerados em estudos de toxicidade.

A sobreponibilidade entre os valores de cobre lábel medidos electroquimicamente no meio de cultura por PSA (potenciometria de "stripping"), a um potencial de deposição de -0,3 V, e os estimados computacionalmente sugere que ambos os métodos são eficazes na avaliação dos níveis de cobre lábel em solução no meio de cultura usado.

A importância do esquema experimental em estudos de toxicidade é evidenciada. Os dois esquemas experimentais testados (adição do cobre(II) às culturas - "sem pré-equilíbrio" ou pré-equilíbrio do cobre(II) no meio de cultura antes da inoculação- "com pré-equilíbrio") são passíveis de ocorrer na Natureza e produzem um impacto diferente a nível da população celular. Na situação em que se verifica um pré-equilíbrio do cobre(II) no meio de cultura as células são sujeitas a concentrações de cobre lábel comparativamente inferiores como confirmado experimentalmente por PSA e, consequentemente, os efeitos de toxicidade são menores. Neste tipo de estudos e, independentemente do esquema experimental utilizado, convem ter-se a noção que nunca se atingem situações de verdadeiro equilíbrio, mas sim de pseudo-equilíbrio tanto do ponto de vista químico como, principalmente, do ponto de vista químico-biológico.

Verificou-se existir uma relação directa e exponencial entre o cobre celular e a labilidade no meio de cultura e uma relação inversa entre estes dois parâmetros e a toxicidade do cobre.

4. Tampões de pH e toxicidade do cobre(II)

Os tampões HEPES, MOPS E PIPES em concentrações até 10 mM não interferem com o crescimento de *A. carterae* nem de *P. micans*, e nesta concentração o HEPES e o MOPS tamponam eficazmente o meio ESAW a pH 8. PIPES 5mM também é eficaz no tamponamento do meio ESAW a pH 7,5. Os tampões DIPSO, HEPES, HEPSO, MOPS e POPSO a pH 8 e nas concentrações de 10 e 25 mM e PIPES a pH 7,8 e nas concentrações de 5, 10 e 25 mM não afectam o crescimento de *A. carterae* e foram eficazes no tamponamento das culturas à excepção do PIPES. Os tampões ACES e imidazole mostraram ser tóxicos para as duas espécies de dinoflagelados.

O DIPSO é um forte complexante do cobre nas condições experimentais testadas. O logarítmo da constante condicional de estabilidade média é 7,3. O HEPES também complexa o cobre mas em muito menor extensão, pelo que não foi possível determinar a respectiva constante de estabilidade. Por sua vez, tanto os tampões DIPSO 10 mM e HEPES 25 mM apresentaram efeitos tenso-activos, isto é, possuem actividade surfactante.

O HEPES potencia a toxicidade do cobre(II) em *A. carterae* como verificado pela diminuição dos seguintes parâmetros biológicos: valor do EC_{50}, taxa de crescimento, biomassa, percentagem de células marcadas pela fluoresceína ("% de viabilidade") e actividade esterásica. Este efeito do HEPES poderá, possivelmente, estar relacionado com a capacidade deste tampão alterar a cinética de ligação do metal às células devido às propriedades surfactantes que possui.

Na presença de DIPSO e na mesma gama de concentrações totais de cobre testadas na presença de HEPES ou na ausência de tampão, ocorreu uma diminuição muito acentuada da toxicidade do cobre como verificado pela impossibilidade de obter um valor de EC_{50} e pela obtenção de taxas de crescimento significativamente iguais nas diferentes concentrações de cobre. Como o DIPSO possui uma capacidade complexante forte do cobre, admite-se que a sua ligação a este metal no meio de cultura impediu a ocorrência de toxicidade mesmo na ausência de EDTA. Este resultado sugere que o DIPSO pode substituir o EDTA nos meio de cultura, com a vantagem de ser simultaneamente um tampão de pH e do catião metálico.

5. Mecanismos de tolerância ao cobre(II) em *A. carterae* e *P. micans*

Em ambas as espécies foi confirmada a incorporação de cobre(II). As concentrações celulares (metal ligado à superfície e intracelular) de cobre aumentam significativamente nas primeiras horas de contacto com o metal. Nos dias posteriores as concentrações diminuem conservando-se, contudo, significativamente superiores às das células não expostas ao metal. Contudo, em *A. carterae*, após 4 ou 7 dias de exposição ao metal, verificou-se uma tendência para um aumento do cobre celular o que implica ter ocorrido o desenvolvimento de um mecanismo de tolerância. Este comportamento não foi observado em *P. micans*, mas poderá ser devido a diferenças das concentrações de cobre ensaiadas nas duas espécies e/ou ao facto de, como esta espécie possui um maior tempo de duplicação, só mais tardiamente esse aumento ser detectado (de notar que a quantificação do cobre celular em *P. micans* só foi efectuada até ao 5º dia de exposição ao metal). Em ambas as espécies foi verificado que as células adsorvem/absorvem uma concentração de cobre menor do que os níveis de cobre lábel existentes em solução demonstrando um controlo celular destes fenómenos.

O(s) mecanismo(s) de tolerância ao cobre de *A. carterae* e de *P. micans* parecem apresentar características diferentes se bem que ambos os organismos desencadeiem respostas rápidas à presença de níveis anormalmente elevados deste metal.

P. micans tolera níveis celulares apreciáveis de cobre mantendo-o inactivo por complexação com a celulose das placas tecais, o amido e também, provavelmente, com os lípidos de reserva como confirmado pela marcação ultracitoquímica com a técnica do sulfureto de prata. A celulose, a amilopectina e o amido são fortes complexantes do cobre a pH neutro. A celulose possui uma constante condicional de estabilidade média relativamente elevada (log = 5,5). Valores um pouco inferiores e bastante semelhantes (respectivamente, log = 4,5 e 4,3) foram determinados para a amilopectina e o amido. Estes resultados são consistentes com as observações ultrastruturais e suportam-nas. A ligação de metais às paredes celulares é um fenómeno descrito na literatura, mas a ligação do cobre ao amido e, possivelmente, às reservas lipídicas é descrito pela primeira vez. A ligação do cobre a estas moléculas no interior da célula é um mecanismo de tolerância "passivo", uma vez que nenhuma destas substâncias faz parte de vias metabólicas fundamentais e geralmente em actividade. Como as placas tecais se localizam a revestir a célula, estas são uma barreia à passagem do cobre para o citoplasma e organelos celulares, evitando um maior grau de toxicidade.

P. micans produz uma proteína de 25 kDa após 3 h de exposição ao cobre a qual persiste pelo menos durante as 48 h subsequentes. Apesar de análises posteriores não terem sido efectuadas, poder-se-á levantar a hipótese de se estar perante uma proteína produzida pelas células como resposta à situações de "stress" induzida pelo cobre. Este tipo de proteínas estão descritas como sendo produzidas por variados organismos em situações de "stress" como choque térmico ou poluição, devido à rápida aceleração da expressão de genes específicos. São, por isso, designadas por proteínas de choque térmico ou proteínas de "stress", possuindo um dos seus grupos pesos moleculares entre ~15 a >30 kDa.

A pesquisa electroforética (SDS-PAGE) da formação de proteínas de baixa massa molecular correspondentes a fitoquelatinas em presença de cobre parece sugerir a produção destas moléculas em *A. carterae* mas não em *P. micans*. Como *A. carterae* é uma espécie nua, não possuindo portanto, as espessas placas tecais de *P. micans*, teve que de desenvolver um mecanismo de tolerância diverso do existente em *P. micans*. A produção de fitoquelatinas poderá ser o processo pelo qual esta espécie consegue tolerar os níveis anormalmente elevados de cobre celular.

Como em ambas as espécies estudadas verificou-se ocorrer uma diminuição das concentrações celulares de cobre entre as primeiras horas de exposição ao metal e os dias subsequentes, parece plausível admitir-se a existência de efluxo do metal como um mecanismo de tolerância em resposta a curto prazo.

A. carterae consegue tolerar níveis excepcionalmente elevados de cobre (inibitórios do crescimento) ou outras situações de "stress" como condições desfavoráveis no meio de cultura recorrendo à formação de cistos temporários. Estes possuem uma actividade metabólica geral diminuida (falta de mobilidade e de divisão celular e aumento das reservas celulares) e um pH intracelular aumentado cujo significado é ainda desconhecido.

Sendo o Conhecimento e a Ciência inexauríveis, o estudo efectuado lança perguntas ainda sem resposta, deixando em aberto uma série de possibilidades para futuras investigações e justifica o investimento nesta área científica.

Em conclusão, ficam as palavras de dois eminentes investigadores.

"Over the last decade we have made much progress in understanding the importance of the extracellular chemistry of trace metals in controlling their availability and toxicity to phytoplankton. We have begun to unravel the biochemical processes that underlie the interactions among trace metals and between trace metals and major nutrients and their physiological effects. During the next decade we should uncover the molecular mechanisms of trace metal uptake and storage in phytoplankton and their genetic control. Species to species variability in these mechanisms undoubtedly represents an important aspect of environmental fitness. The chemical nature of the transport and storage molecules as well as their metal binding and releasing characteristics pose a fascinating chemical problem of great physiological, ecological and evolutionary significance".

N. M. Price e F. M. M. Morel (1994)

Anexo 1

AVAIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DO COBRE EM *AMPHIDINIUM CARTERAE* ATRAVÉS DE ENSAIOS CINÉTICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

O. M. Lage, E. O'Connor, F. Sansonetty, A. M. Parente and R. Salema. 1996. Flow cytometric kinetic assay of the acute effect of copper on *Amphidinium carterae*. **1st European Phycological Congress**, Köln, Alemanha.

Flow cytometric kinetic assay of the acute effect of copper on *Amphidinium carterae*.

O. M. Lage[1], E. O'Connor[2], F. Sansonetty[3], A. M. Parente[1] and R. Salema[1]

[1]Instituto de Botânica, Centro de Citologia Experimental, Porto, Portugal
[2]Dept. Bioquimica, Faculdad de Medicina, Universidad de Valecia, Valencia, España
[3]CIBO/IPATIMUP, Porto, Portugal

INTRODUCTION

Copper is one of the most abundant heavy metals in the environment. In the last decades, copper content in marine ecosystems, specially in localized regions, has increased to levels characteristic of polluted waters (Hughes & Poole, 1989).

Dinoflagellates, one of the most important groups of the phytoplankton, are sensitive to relative low levels of copper and may be noxiously affected by this metal which, in turn, interferes with ecosystem equilibrium (Sunda, 1989).

In the recent years, flow cytometry (FCM) has been applied to environmental studies on microorganisms (Troussellier *et al.*, 1993; Shapiro, 1995) While taxonomic and structural aspects are more frequently studied, there is still little information on functional aspects. In this regard, uptake of fluorescein diacetate (FDA) has been previously used as an indicator of viability on microalgal cells exposed to cytotoxic conditions (Dorsey *et al.*, 1989).

In the present work, we have used FCM to assess the acute response to copper of a marine dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt. For this purpose, we have developed a fast kinetic assay based upon the uptake of FDA, that allows to estimate cell viability, esterase activity and intracellular pH.

Our results extend previous ones on acute and chronic effects of copper on *A. carterae* (Lage *et al.*, 1994, 1995, 1996), and show that copper raises immediately intracellular pH. This effect seems to involve an oxidative action of copper on the Na^+/H^+ antiporter.

MATERIAL AND METHODS

A. carterae was cultivated at 19 ± 1°C, on a 12:12 h dark/light cycle and a photon flux density of about 30 mmol. $m^{-2}.s^{-1}$, in the artificial seawater medium ESAW (Harrison *et al.*, 1980) without silicate and buffered at pH 8.0 with 25 mM HEPES. Aliquots of 0.16 mM copper(II) chloride in 5 mM HCl were added to some of the cell suspensions or cultures in order to obtain a range of 0-3.13 mM labile copper. Labile copper concentrations were estimated by computational simulations of chemical equilibrium in the culture medium for the total metal concentrations (Lage *et al.*, 1994).

Flow cytometry analysis of forward-angle light scatter, right-angle light scatter and fluorescences was performed with an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL), with an argon-ion laser tuned at 15mW and 488 nm. Fluorescence was collected through 525 nm (FDA-derived fluorescein) and 675nm (chlorophylls) band-pass filters.

Kinetic measurements of FDA uptake were performed recording the logarithm of green fluorescence (FL1 LOG) *versus* time. In summary, 2 cm^{-3} of cell suspension (approx. 10^5 cells.cm^{-3}) were brought to the cytometer and the basal levels of green fluorescence recorded for about 30 seconds. Then, the aquisition was briefly paused and 50 cm^{-3} FDA (from a stock of 5 mg.cm^{-3} in dimethylsulfoxide, 40-fold diluted in cold 32‰ NaCl, pH 7.9, as in Dorsey *et al.*, 1989) were added. Acquisition was then resumed up to 10 min. Using the XL software, mean values of fluorescence and statistics along the experimental period were obtained by means of rectangular pre-defined regions established over the time axis, covering the whole lenght of the Y-axis (FL1 LOG) in each kinetic plot, as shown in Fig.1(A). FDA uptake rates, in fluorescence arbitrary units per minute (FAU/min), were then calculated by the difference between consecutive Y-mean values after logarithmic to lineal conversion (Juan *et al.*, 1994).

To determine the immediate effects of copper(II), in some experiments, this metal was added to the cells after FDA, when the uptake rate was near stabilization (about 5 min). In order to compare the effects of copper(II) with those of a strong membrane oxidant, 8 mM *tert*-butyl hydroperoxide (TBOOH) was added to the cell suspension in the same conditions. To test the effect of an antioxidant, cells were preincubated 30 min with 2.5 mg.cm^{-3} N-acetyl cysteine. To determine the possible participation of Na^+/H^+ exchange in the immediate effects of copper(II), cells were preincubated for 30 min with 32‰ NaCl, pH 7.9.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the result of a typical kinetic experiment of FDA uptake by a control *A. carterae,* including the analytical regions and the data used for the calculations of the uptake rate and the maximal fluorescence intensity.

As shown in Figure 2, following a short exposure of the cells to copper(II), the uptake rate of FDA was enhanced in a dose dependent manner, which resulted in higher fluorescein fluorescence levels at the end of the experimental period. This effect of copper(II) was also evident even when this metal was added to the cells during the uptake of FDA. As seen in Figure 3, copper(II) raises immediately the uptake rate and maximal fluorescence, this effect being more clearly shown when lower concentrations of fluorochrome were used. Since FDA is a pH-sensitive probe, the increased uptake and maximal fluorescence might be related to an immediate effect of copper(II) on the mechanism(s) of intracellular ionic regulation. In this regard, Na^+/H^+ antiporter plays an essential role (Grinstein *et al.*, 1989) for pH and ionic homeostasis in marine organisms (Meseguer *et al.*, 1995). As seen in Figure 4, pre-incubation with 32‰ NaCl, likely resulting in increased H^+-efflux, also enhanced markedly the FDA uptake rate in control cultures, suggesting that copper(II) might interfere with that antiporter system. This is supported also by the absence of additional increase of FDA uptake after copper(II) addition to the NaCl-pretreated cells (Fig. 5).

On the other hand, the immediate effect of copper(II) suggests that this metal may act directly at the extracellular side of the plasma membrane, thus excluding likely an intracellular effect on the cytoplasmic esterases which convert permeable FDA into the cell-impermeant fluorescein. Also, this rapid effect of copper(II) may imply a very fast biochemical mechanism. In this regard, copper(II) is a powerful oxidant, which may inactivate functional proteins by oxidizing -SH or other sensitive groups (Lage *et al.*, 1996).

Consistent with those findings, preincubation of cells with N-acetyl-cysteine, a well characterized antioxidant (Malorni *et al.*, 1993), decreased markedly the effect of copper(II) on FDA uptake (Figs. 5 and 6), strongly supporting an oxidative effect of copper. However, when control cells taking up FDA were treated with TBOOH, a strong membrane lipoperoxidant (Imberti *et al.*, 1993), there was only a short lasting increase in FDA uptake, followed by a rapid and substantial leakage of fluorochrome, suggesting that in acute exposure, copper causes neither extensive membrane damage nor cell lysis (Fig. 7).

Our results show that copper(II), a widespread environmental pollutant, at least in part, may cause its toxic effects on dinoflagellates by an immediate oxidative action on membrane

proteins. As shown here, the Na^+/H^+-antiporter seems affected by copper(II), leading to alterations in the intracellular ionic homeostasis. Although these are preliminar data, they may be relevant to the detection and even prevention of toxic effects on phytoplankton.

On the other hand, our work demonstrates the analytical potency of flow cytometry in allowing the integration of a wide range of populational, physiological and, even, molecular levels of resolution to approach environmental biology.

This work was supported by JNICT.

References

Dorsey J, Yentsch CM, Mayo S and McKenna C (1989) Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. Cytometry 10: 622-628.

Grinstein S, Rotin D and Mason MJ (1989) Biochim. Biophys. Acta 988: 73-97.

Harrison PJ, Rosemary EW and Taylor FJR (1980) A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol. 16: 28-35.

Hughes MN and Poole RK (1989) Metals and Micro-organisms. Chapman and Hall. London.

Imberti R, Niemien AL, Herman B and Lemasters JJ (1993) J. Pharmacol. Exp. Ther. 265: 392-400.

Juan G, Cavazzoni M, Saez GT and O'Connor JE (1994) A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rodamine 123 and flow cytometry. Cytometry 15: 335-342.

Lage OM, Parente AM, Soares HMVM, Vasconcelos MTSD and Salema R (1994) Some effects of copper on the dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Prorocentrum micans* in batch culture. Eur. J. Phycol. 29: 256-260.

Lage OM, Parente AM, Vasconcelos MTSD, Gomes CAR and Salema R (1996) J. Phycol. Potential tolerance mechanisms of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae) to sublethal levels of copper. 32: 416-423.

Lage OM, Sansonetty F, Osswald JM, Parente AM and Salema R (1995) Evaluation of *Amphidinium carterae* viability at different culture phases and under stress induced by copper. Vth Spanish Portuguese Congress of Biochemistry. Salamanca.

Lage OM, Sansonetty F, Parente AM and Salema R (1996) Oxidative burst in *Amphidinium carterae* induced by copper. H_2O_2-DCF and O_2^--FCLA measured by flow cytometry. Cytometry Suppl. 8: 139.

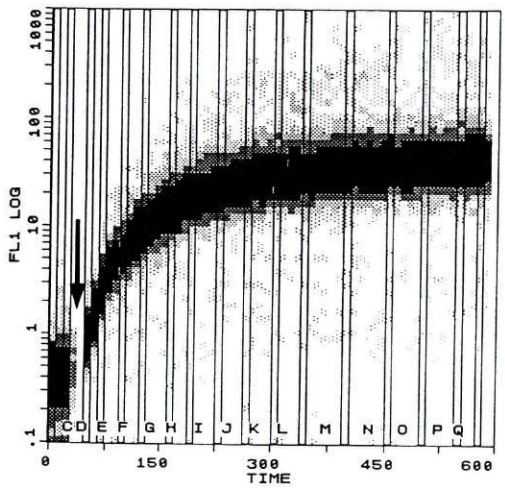
Malorni W, Rivabene R, Santini MT and Donelli G (1993) FEBS Lett. 327: 75-78.

Meseguer I, Torreblanca M and Konishi T (1995) J. Biol. Chem. 270: 6450-6455.

Shapiro HM (1995) Practical Flow Cytometry, 3rd. Ed. Wiley-Liss, New York pp. 413-416.

Sunda WG (1989) Trace metals interaction with marine phytoplankton. Biol. Oceanogr. 6: 411-442.

Troussellier M, Courties C and Vaquer A (1993) Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. Biol. Cell. 78: 111-121.



STATISTICS

DUAL PARAMETER STATISTICS

			.....Peak.....		....X Channel....			....Y Channel....		
ID	Pcnt	Area	Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
A	2.6	1128	0,0.37	176	0.0	****	****	0.388	0.168	43.3
B	2.9	1250	2,0.50	189	2.0	0.0	0.000	0.389	0.167	43.1
C	1.4	620	5,0.89	136	5.0	0.0	0.000	0.893	0.255	28.5
D	1.4	619	7, 2.4	113	7.0	0.0	0.000	2.53	0.879	34.7
E	1.8	759	10, 5.8	152	10.0	0.0	0.000	5.58	1.73	31.0
F	1.6	696	13, 8.9	124	13.0	0.0	0.000	8.68	3.20	36.9
G	1.6	673	17, 14	141	17.0	0.0	0.000	14.1	5.34	37.8
H	1.5	649	20, 16	123	20.0	0.0	0.000	17.2	8.25	47.9
I	1.5	666	24, 21	118	24.0	0.0	0.000	21.7	8.22	37.9
J	1.6	706	28, 24	154	28.0	0.0	0.000	25.5	11.7	45.8
K	1.6	695	32, 28	139	32.0	0.0	0.000	28.7	13.9	48.4
L	1.5	666	36, 28	124	36.0	0.0	0.000	30.4	13.0	42.7
M	1.6	697	42, 28	117	42.0	0.0	0.000	33.6	14.2	42.3
N	1.6	684	48, 32	126	48.0	0.0	0.000	36.4	16.6	45.5
O	1.5	651	53, 32	120	53.0	0.0	0.000	37.1	15.7	42.3
P	1.5	657	58, 43	120	58.0	0.0	0.000	38.2	14.2	37.1
Q	1.6	684	61, 37	120	61.0	0.0	0.000	39.6	17.3	43.6

Figure 1. Typical kinetic experiment of FDA uptake by control *A. carterae* cells showing the analytical regions and the data used for the calculations of the uptake rate (FAU/min) and the maximal fluorescein-fluorescence intensity (FAU) obtained with the EPICS XL software. Arrow - Moment of addition of copper.

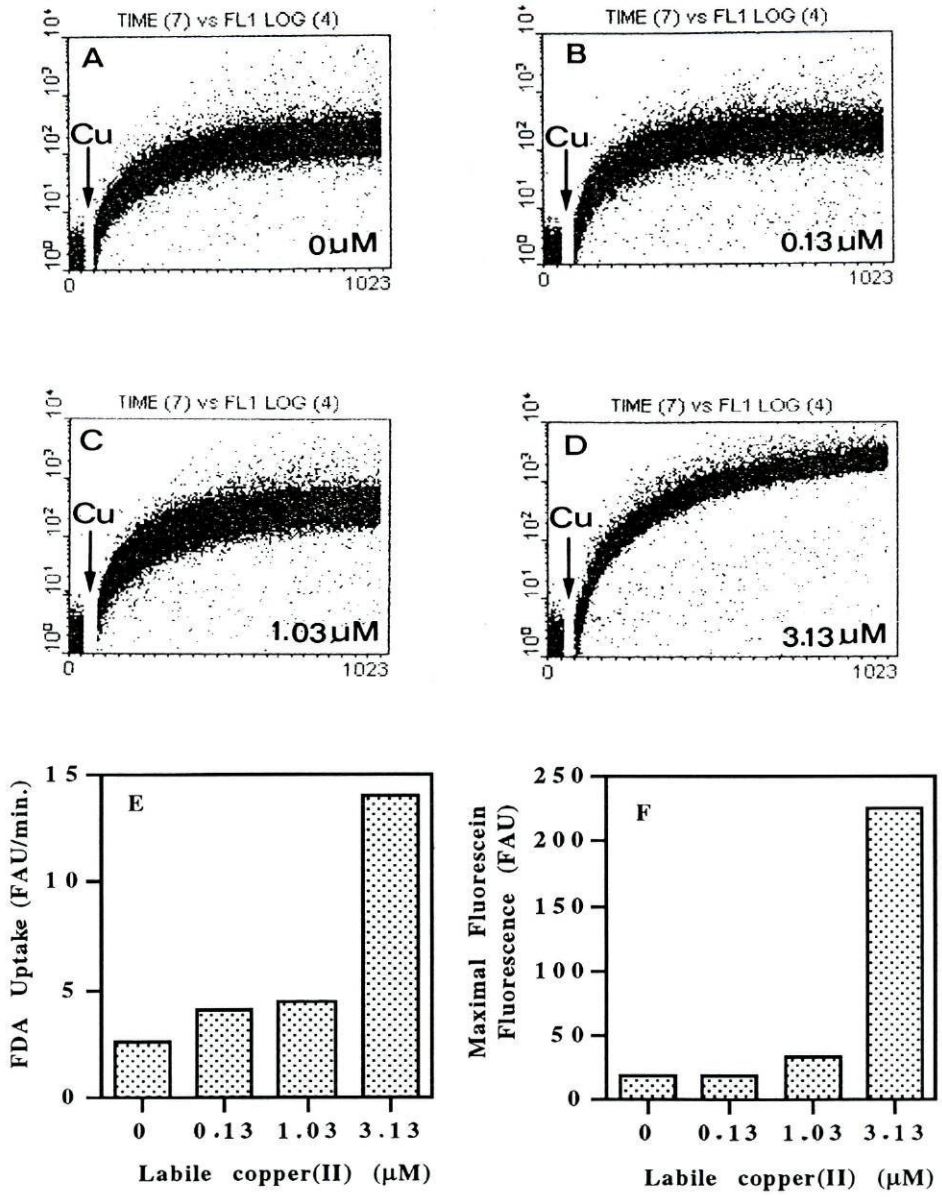


Figure 2. FDA uptake kinetics (A-D) and corresponding bar histograms (E-F) of uptake rate and maximal fluorescein-fluorescence of control *A. carterae* cells and after 30 min incubation with different labile concentrations of copper(II). FDA was added to cell suspensions after about 30 seconds of acquisition (arrow) of basal levels of green autofluorescence.

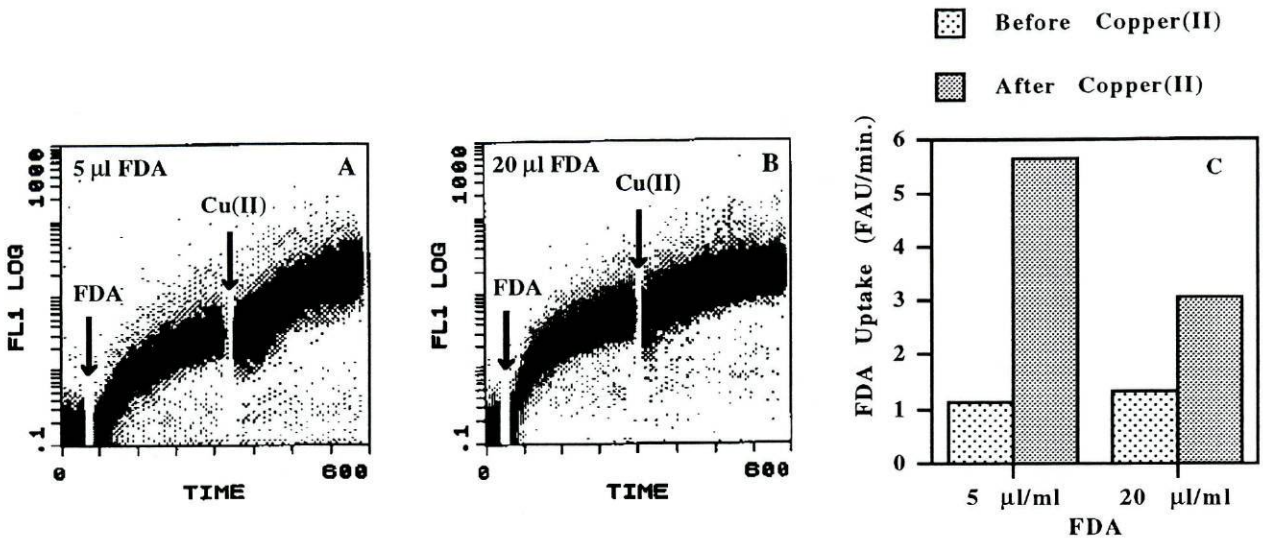


Figure 3. FDA uptake kinetics (A-B) and corresponding bar histogram (C) of uptake rate of control *A. carterae* with different FDA concentrations, before and after the addition of 3.13 M labile copper(II), showing the immediate effect of copper(II).

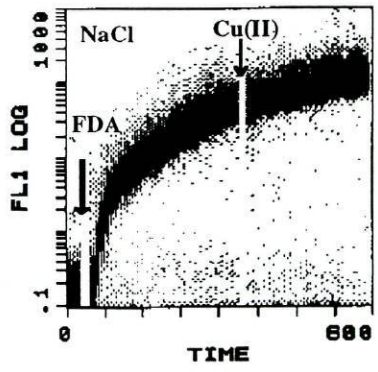


Figure 4. FDA uptake kinetics after 30 min incubation with 32‰ NaCl of *A. carterae* cells, followed by additon of 3.13 M labile copper(II).

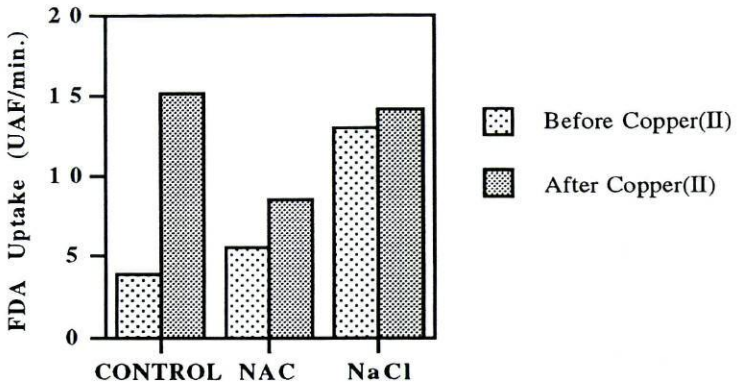


Figure 5. FDA uptake rates (FAU/min) before and after addition of 3.13 M labile copper(II) to control and cell suspensions preincubated with 2.5 mg cm^{-3} N-acetyl-cysteine (NAC) or 32‰ NaCl corresponding to kinetics shown in Figs 4 and 6.

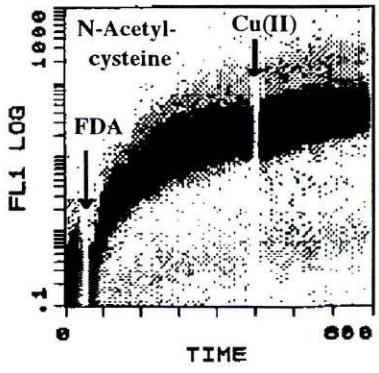


Figure 6. FDA uptake kinetics after 30 min incubation with 2.5 mg cm^{-3} N-acetyl-cysteine (NAC) of *A. carterae* cells followed by the addition of 3.13 M labile copper(II).

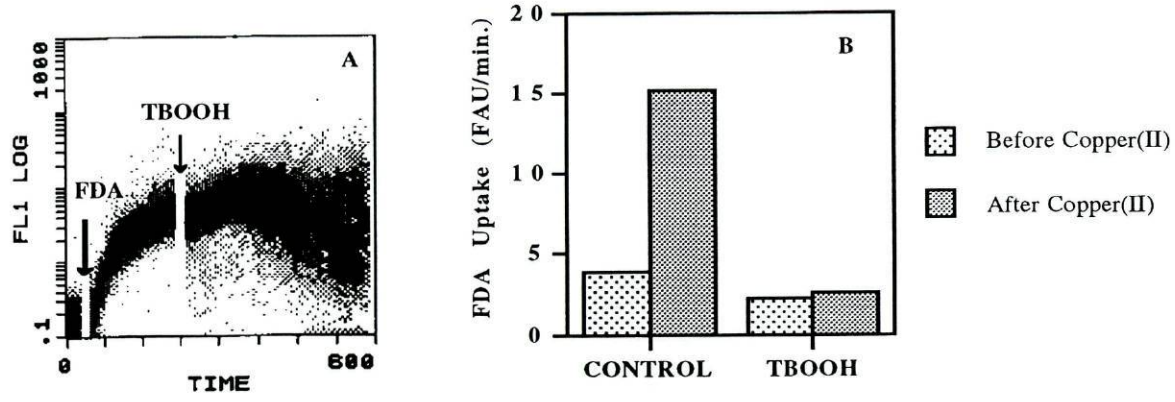


Figure 7. Effect of addition of 8 mM *tert*-butyl hydroperoxide (TBOOH) on FDA uptake by *A. carterae*. FDA uptake kinetics (A) and corresponding bar histogram (C) of uptake rate.

Anexo 2

EXPLOSÃO OXIDATIVA EM *AMPHIDINIUM CARTERAE* INDUZIDA PELO COBRE. MEDIÇÃO DE H_2O_2-DCF E $O_2^{\cdot-}$-FCLA POR CITOMETRIA DE FLUXO

O. M. Lage, F. Sansonetty, A. M. Parente and R. Salema. 1996. Oxidative burst in *Amphidinium carterae* induced by copper. H_2O_2-DCF and $O_2^{\cdot-}$-FCLA measured by Flow Cytometry. **XVIII Congress of the International Society for Analytical Cytology**, Rimini, Itália.

Oxidative burst in *Amphidinium carterae* induced by copper. H_2O_2-DCF and $O_2^{\cdot-}$-FCLA measured by Flow Cytometry

O. M. Lage[1,2], F. Sansonetty[3], A. M. Parente[1,2] and R. Salema[1,2]

[1]Instituto de Botânica, [2]Centro de Citologia Experimental and [3]IPATIMUP

Porto, Portugal

INTRODUCTION

Copper is a heavy metal and an increasing environmental pollutant due to several anthropogenic activities. Because of its chemical characteristics it promotes reactions involving free radicals where it acts as a catalyst. Unicellular algae, such as *Amphidinium carterae*, directly exposed to the metal in their environment are excellent tools to study the mechanisms by which copper affects the biochemical and physiological machinery of the cell.

In this preliminary study the production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) induced by copper(II) was evaluated by flow cytometry with two fluorescent probes.

MATERIAL AND METHODS

A. carterae was exposed to two different estimated labile copper concentrations, respectively, 1.03 and 3.13 µM. As controls, cells were grown in Cu-free ESAW medium (Harrison *et al.*, 1980). The measurements performed were evaluated by flow cytometry (a Coulter EPICS C) with excitation at 488 nm and emission at 530 nm and green autofluorescence was used as a reference for measuring basal labelling with the two probes referred below. The production of $O_2^{\cdot-}$ was evaluated after 10 min incubation with 10 µl/100µl cell suspension of saturated 3,7-dihydro-6[4-{2-(N'-(5-fluoresceinyl) thioureido)ethoxy}phenyl]-2-methylimidazo {1,2-a}pyrazin-3-one (FCLA) (Shimada *et al.*, 1993). Alterations of H_2O_2 levels were evaluated after 30 min incubation with 5 µM 2',7'-

dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Epling *et al.*, 1992). Cell incubation with 0.18 mM H_2O_2 and 2% neutral-formaldehyde were used as positive controls.

RESULTS

Control cells (unexposed to copper) were labelled with both fluorophores (Figs 1B and 3B) when compared to autofluorescence (Figs 1A and 3A).

After incubation with 1.03 μM labile copper, cell labelling by FCLA (Fig. 1E) or dichlorofluorescein (DCF) (Figs 2 and 3C) was about 1.5-fold more intense than controls (Figs 1D and 2B, respectively).

In the presence of 3.13 μM labile copper, labelling by DCF increased pronouncedly (1.5- to 2.5-fold) (Fig. 2) and distributions were broader (Fig. 3D) indicating a more heterogeneous cell population. However, for this copper concentration, the FCLA labelling intensity (Fig. 1F) apparently was similar to the control (Fig. 1F).

Cell pre-incubation for 30 min with H_2O_2 induced an increase of more than 10-fold in the FCLA (Fig. 1G) and DCF (Fig. 3E) levels. But these cells, contrary to what happened with cells exposed to copper, were unable to load fluorescein diacetate. Neutral-formaldehyde showed about 2-fold increase in the FCLA levels (Fig. 1C) when compared to the controls.

DISCUSSION

A. carterae intracellular levels of both oxidants increased by the same order of magnitude in the presence of 1.03 μM labile copper, a concentration that, as previously observed, induces evident signals of toxicity by interfering with metabolic pathways. Such generation of these oxygen radicals accounts for metabolic disorders. Copper(II), by changing its valency, acts as a catalyst causing the net combination of two superoxide anions and two H^+ ions to form hydrogen peroxide and molecular oxygen and speeds this reaction up enormously (Halliwell & Gutteridge, 1985). Hydrogen peroxide is a weak oxidizing agent and can inactivate a few enzimes directly, usually by oxidation of essencial thiol (-SH) groups. It can form the hydroxyl radical, and this may be the origin of most of its toxic effects (Halliwell & Gutteridge, 1985).

The highest labile copper concentration assayed, 3.13 μM, induces the formation of temporary cysts in this species and this phenomena may explain why no production of the superoxide anion was detected. On the other hand, great levels of hydrogen peroxide appear

to be formed. Two possible hypothesis can be raised: (i) the high levels of absorbed copper catalysed the reaction referred above implicating consumption of O_2^- (another reason for the apparently normal levels) and a higher production of H_2O_2; (ii) as DCF fluorescence is pH dependent, the increase observed is due to raise in the intracellular pH of *A. carterae* cysts, a result in agreement with previous observations.

In our work, the existence of oxidative burst induced by copper(II) in *A. carterae* was evidenced.

This work was supported by JNICT.

References

Epling, C.L., Sites, D.P., McHugh, T.M., Chong, H.O., Blackwood, L.L. & Wara, D.W. 1992. Neutrophil function screning in patients with chronic granulomatous disease by a flow cytometric method.Cytometry 13: 615-620.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford. 346 p.

Harrison, P.J., Rosemary, E.W. & Taylor, F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. J. Phycol. 16: 28-35.

Shimada, M., Kawamoto, S. Nakatsuka, Y. & Watanabe, M. 1993. Localization of superoxide anion in the red tide alga *Chattonella antiqua*. J. Histochem. Cytochem. 41: 507-511.

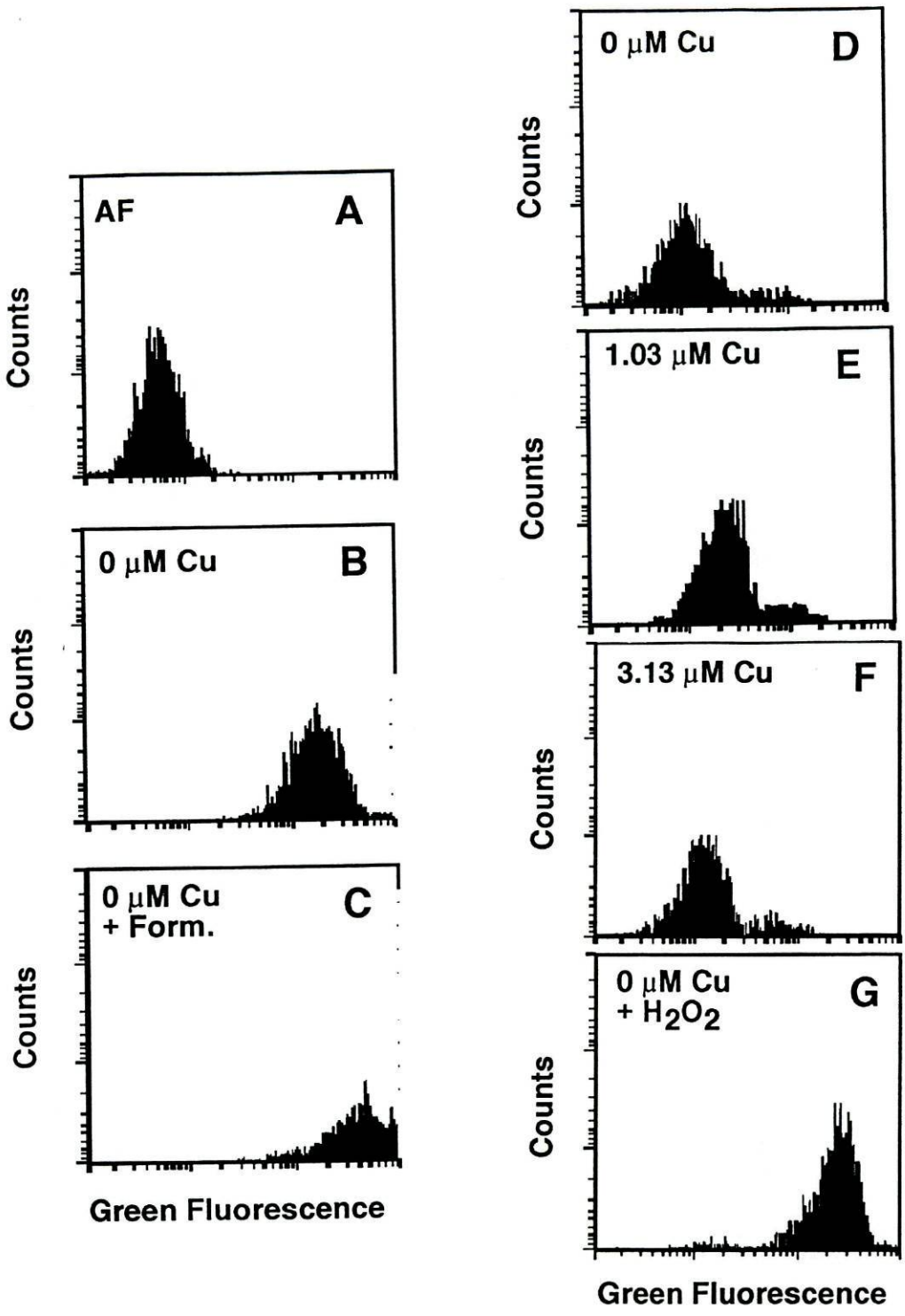


Figure 1 - Histograms of *A. carterae* (**A**) green autofluorescence and (**B** - **G**) green fluorescence after incubation with FCLA. Histograms **A** to **C** were acquired with a lower voltage to enable the visualization of the autofluorescence. Histograms **B** and **D** are from control cells. Histograms **E** and **F** are from cells pre-exposed to, respectively, 1.03 µM and 3.13 µM labile copper(II). Histograms **C** and **G** are from control cells pre-incubated for 30 min. with respectively 2% neutral-formaldehyde and 0.18 mM hydrogen peroxide.

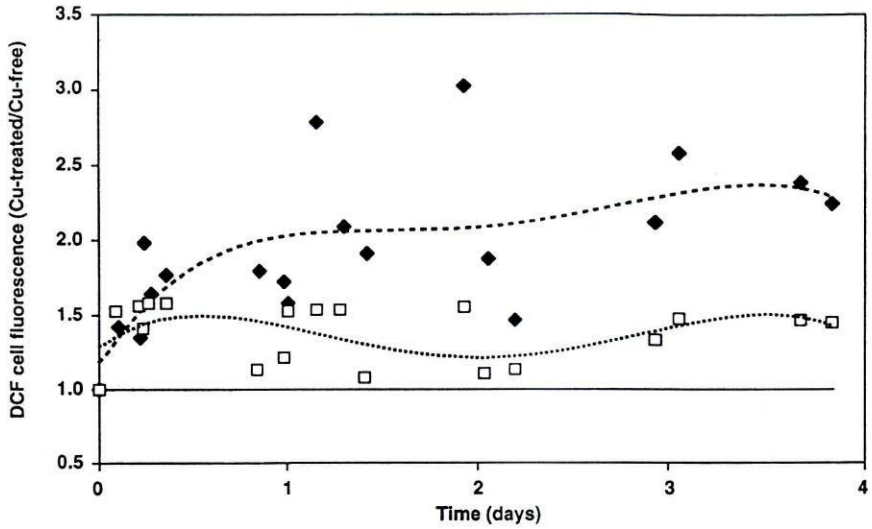


Figure 2 - Hydrogen peroxide measurements in *A. carterae*. The values are the ratio between DCF fluorescences of copper-treated and copper-free (control) cells. Values greater than 1 are indicative of H_2O_2 production by the cells. Labile copper concentrations: □ 1.03 μM; ◆3.13 μM.

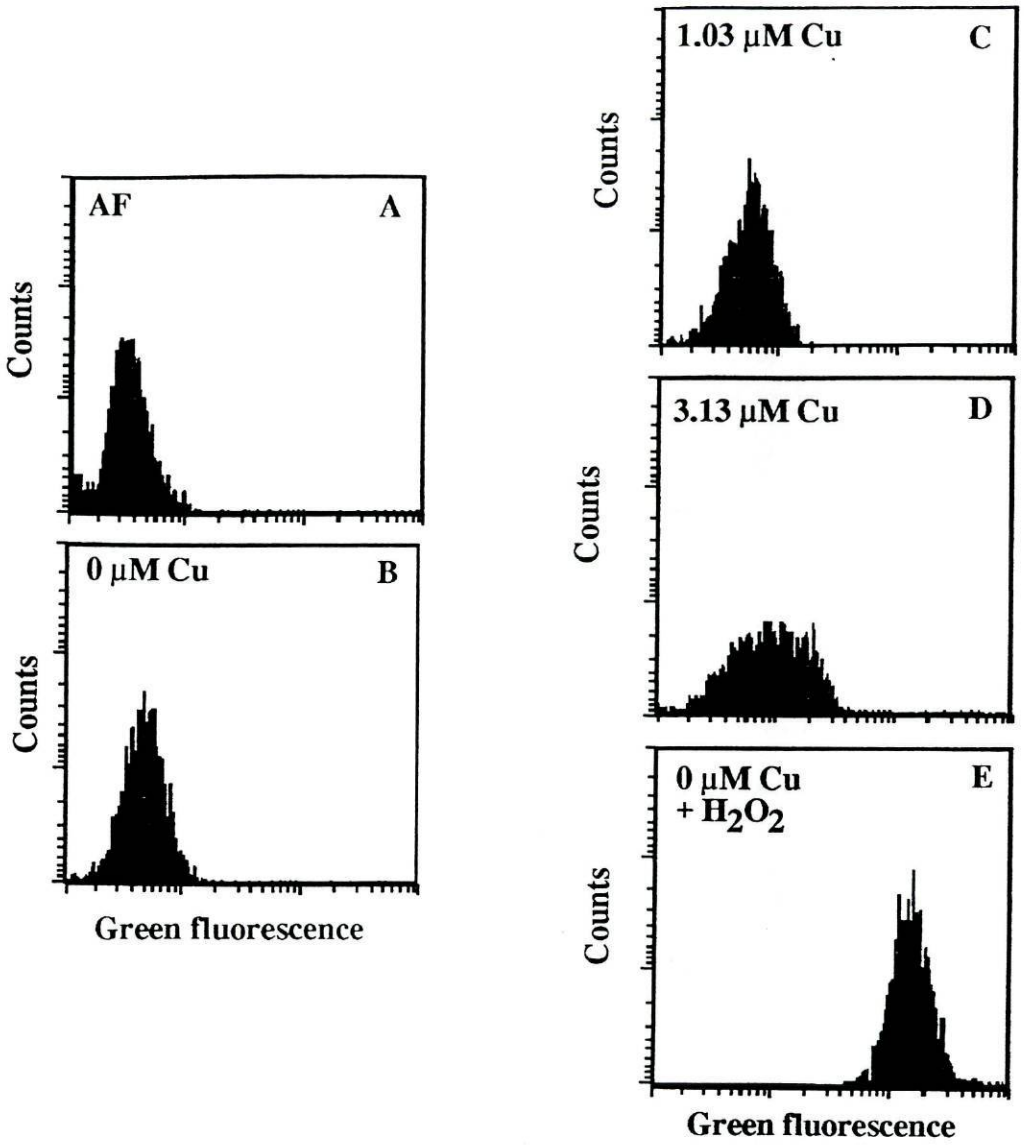


Figure 3 - Histograms of *A. carterae* (**A**) green autofluorescence and (**B** - **E**) DCF fluorescence after incubation with DCFH-DA. Histogram **B** is from control cells. Histograms **C** and **D** are from cells pre-exposed to, respectively, 1.03 µM and 3.13 µM labile copper(II). Histogram **E** is from control cells pre-incubated for 30 min. with 0.18 mM hydrogen peroxide.

Anexo 3

CRESCIMENTO DE *Amphidinium carterae* E VARIAÇÃO DO pH DAS CULTURAS EM MEIO ESAW NA PRESENÇA DE VÁRIOS TAMPÕES DE GOOD

Tabela 1- Influência de vários tampões de Good no tempo de duplicação de *A. carterae* em fase exponencial e na variação de pH das culturas após 13 dias de crescimento, avaliada através da comparação com uma situação controlo (cultura em meio ESAW não tamponado).

Cultura	Variação de pH	Tempo de duplicação (dias)
Controlo	0,61 ± 0,04	3,21 ± 0,30
DIPSO 10 mM	0,16 ± 0,01	2,50 ± 0,13
25 mM	0,17 ± 0,01	2,55 ± 0,12
HEPES 10 mM	0,20 ± 0,00	2,72 ± 0,33
25 mM	0,17 ± 0,04	2,64 ± 0,36
HEPSO 10 mM	0,14 ± 0,00	2,53 ± 0,33
25 mM	0,13 ± 0,05	2,70 ± 0,35
MOPS 10 mM	0,25 ± 0,08	2,64 ± 0,15
25 mM	0,31 ± 0,04	2,91 ± 0,24
PIPES 5 mM	0,70 ± 0,09	2,61 ± 0,22
10 mM	0,62 ± 0,06	2,92 ± 0,22
25 mM	0,42 ± 0,06	2,85 ± 0,73
POPSO 10 mM	0,26 ± 0,02	2,66 ± 0,48
25 mM	0,14 ± 0,05	2,92 ± 0,30

HEPSO - ácido (N[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-hidroxiporpanossulfónico]), pKa = 7,8 a 25 °C, gama de tamponamento 7,1 - 8,5; PIPES - ácido (Piperazina-N,N'-bis[2-etanosulfónico]), pKa = 6,8 a 25 °C, gama de tamponamento 6,1 - 7,5; POPSO - ácido (Piperazina-N,N'-bis[2-hidroxipropanosulfónico]), pKa = 7,8 a 25 °C, gama de tamponamento 7,2 - 8,5. Médias e desvios padão de n = 2.