

MARCELA CASTILHO BORO

Labyrinthulomycota do Parque Estadual da Ilha do
Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo: diversidade
morfológica/molecular e quantificação de ácidos graxos

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria
do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas
Avasculares e Fungos em Análises Ambientais (PAF).

SÃO PAULO

2018

MARCELA CASTILHO BORO

Labyrinthulomycota do Parque Estadual da Ilha do
Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo: diversidade
morfológica/molecular e quantificação de ácidos graxos

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria
do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas
Avasculares e Fungos em Análises Ambientais (PAF).

ORIENTADORA: DRA. CARMEN LIDIA AMORIM PIRES-ZOTTARELLI

CO-ORIENTADORA: DRA. ALINE PATERNOSTRO MARTINS

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Boro, Marcela Castilho

B735L Labyrinthulomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, Estado de São Paulo: diversidade morfológica/molecular e quantificação de ácidos graxos / Marcela Castilho Boro -- São Paulo, 2018.
161p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.
Bibliografia.

1. Mata Atlântica. 2. Thraustochytriales. 3. Labyrinthulales. I. Título.

CDU: 581.526.422.2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força, coragem, esperança e capacidade de superação que me foram concedidas em vários momentos durante a execução deste trabalho e durante toda a minha vida.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela infraestrutura e apoio oferecidos.

Ao Instituto Florestal pela autorização concedida para a realização das coletas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, estado de São Paulo.

À minha orientadora Dra. Carmen Lidia Amorim Pires Zottarelli pela excelente orientação e por toda a dedicação, ensinamento e apoio na realização deste trabalho. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Dra. Aline Paternostro Martins por todo apoio oferecido e auxílio nas análises de ácidos graxos.

Ao Dr. Pio Colepicolo pela receptividade e apoio, tendo disponibilizado toda a infraestrutura de seu laboratório para a execução de parte deste trabalho.

Ao Dr. Timothy Young James, Dr. Eduardo Leão, Dra. Agostina Virginia Marano e a Ms. Ana Lucia de Jesus pelo auxílio no início deste trabalho.

Ao Manoel Osório Neves Júnior por nos conduzir durante as coletas no PEIC.

Ao Dr. Ricardo Harakava pelo auxílio nos sequenciamentos e pela disponibilização de toda a infraestrutura de seu laboratório.

Aos meus queridos do Instituto Biológico, Dr. Mario Barreto Figueiredo (*in memoriam*), Dra. Martha Maria Passador e Dra. Christiane Aparecido Ceriani, pelo exemplo, formação e ensinamentos que me fizeram adentrar na área de pesquisa em micologia.

Ao Dr. José Ivanildo de Souza (*in memoriam*) pela amizade, por ter confiado no meu trabalho e apoiado o meu aprimoramento assim que cheguei ao Núcleo de Pesquisa em Micologia.

Aos meus queridos amigos do laboratório de organismos aquáticos e a todos os amigos do Núcleo de Pesquisa em Micologia pela ótima companhia durante estes anos: Ana Lúcia de Jesus, Gustavo Henrique Jerônimo, Sarah Cristina de Oliveira Rocha, Danilo Reis Gonçalves, Ingrid Capuano, Poliana Ventura, Ricardo Matheus Pires, Viviana Motato Vasquez, Alex Almeida Alcântara, Larissa Bernardino Moro, Ana Cristina Bolanões, Mauro Westphalen e Luiz Antônio Silva Ramos. Desejo o melhor para vocês!

A querida estagiária e amiga Ana Lúcia Vardiero, pela grande ajuda nas repicagens.

Aos funcionários e pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Micologia que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho: Marli Gomes Lima do Nascimento, Rosimeire Inácio da Silva, Dra. Adriana de Mello Gugliotta, Dra. Vera Maria Vitali, Dra. Iracema Helena Schoenlein Crusius, Dr. Michel Navarro Benatti e Dra. Rosely Ana Piccolo Grandi, pelo carinho e pela convivência, o meu muito obrigado!

Aos meus queridos pais, João Carlos Boro e Vera Lucia Castilho Boro, pelo apoio desde sempre, por todo amor, compreensão e por sempre acreditarem nas minhas escolhas. Amo vocês!

A meus avós, Ludovico Boro (*in memoriam*), Maura Nocce Boro (*in memoriam*), Antônio Castilho Filho (*in memoriam*) e Maria Venâncio Castilho. Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Fabrício e minha cunhada Natália pela torcida, e a todos os familiares pelo carinho, incentivo e por sempre acreditarem na minha capacidade.

As minhas queridas amigas: Débora, por me escutar e estar sempre pronta a ajudar, e Lidiane e Neila. Obrigado pela amizade e por estarem sempre ao meu lado, mesmo distantes fisicamente.

Ao meu marido Fábio, por todo auxílio, paciência, compreensão, amizade e amor. Te amo!

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O filo Labyrinthulomycota está classificado no Reino Straminipila e é composto por três grupos distintos de organismos denominados “fungi-like”, os labirintulídeos, as traustochytrídeas e as aplanoquitrídeas. Estes organismos, em sua maioria produtores de zoósporos, estão presentes em águas marinhas e salobras, onde atuam como sapróbios e/ou parasitas. Nos últimos anos tem havido um maior interesse no grupo devido à capacidade, de muitas de suas espécies, em produzir grandes quantidades de lipídios, destacando-se, dentre eles, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). No entanto, apesar da importância do grupo, apenas quatro espécies foram relatadas no Brasil nas décadas de 60 e 70. Assim, diante da importância ecológica e da potencialidade econômica destes organismos, bem como do escasso conhecimento da diversidade do grupo no país, o presente estudo teve por objetivos, realizar a identificação morfológica e molecular de espécimes coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), importante fragmento preservado da Mata Atlântica do estado de São Paulo; e quantificar os diferentes ácidos graxos produzidos por alguns isolados brasileiros. De seis coletas realizadas, entre os anos de 2012 e 2015, 167 espécimes provenientes de amostras de água e folheto foram identificados, por meio de análises das características morfológicas e/ou análise filogenética da região SSU do rDNA, como: *Aurantiochytrium* (111 espécimes), *Labyrinthula* (21 espécimes), *Parietichytrium sarkarianum* (31 espécimes) e *Thraustochytrium* (4 espécimes). Os gêneros *Aurantiochytrium* e *Labyrinthula*, bem como a espécie *Parietichytrium sarkarianum* são primeira citação para o Brasil, e cinco espécimes de *Aurantiochytrium* considerados espécie nova para a ciência. Alguns dos espécimes representativos de cada um dos gêneros/espécie foram descritos, preservados e documentados, com vinte deles incorporados no acervo do Instituto de Botânica de São Paulo (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias – CCIBt) e do Instituto Biológico de São Paulo (Micoteca Mário Barreto Figueiredo – MMBF). Vinte e seis sequências da região SSU do rDNA de isolados brasileiros provenientes deste estudo foram depositadas no GenBank. Dos táxons identificados, 25 deles foram

analisados quanto ao perfil de produção de ácidos graxos (12 isolados de *Aurantiochytrium* sp., cinco de *Aurantiochytrium* sp. nov. e oito de *P. sarkarianum*), com 15 dias de cultivo a 25 °C. Os resultados evidenciaram que os isolados brasileiros coletados no PEIC sintetizam quantidades significativas de ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido palmítico (PA), chegando a 105,57 mg de DHA /g de biomassa e 56,89 mg de PA /g de biomassa. Os melhores produtores dos principais ácidos graxos, dois espécimes de *Aurantiochytrium* sp., um de *Aurantiochytrium* sp. nov. e dois de *P. sarkarianum*, foram submetidos à diferentes condições de cultivo, como menor tempo de crescimento (5 dias) e diferentes temperaturas finais de cultivo (10 °C e 25 °C). Os espécimes cultivados por cinco dias a 25 °C apresentaram queda na produção (mg/g de biomassa) da maioria dos ácidos graxos, comparado a quantidade produzida com 15 dias de crescimento, exceto de DHA nos isolados IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. e IC12 de *P. sarkarianum*, e DHA e PA no isolado IC83 de *P. sarkarianum*. O teste com diferentes temperaturas finais de cultivo mostrou que os isolados apresentaram um aumento na produção de alguns dos ácidos graxos quando a temperatura final foi de 10 °C, exceto o isolado IC83 de *P. sarkarianum*. Este estudo contribui para a ampliação do conhecimento do grupo no Brasil, para a inclusão de sequências de espécimes brasileiros no Genbank, para a obtenção e preservação de isolados em culturas puras para futuros estudos no país, bem como para o conhecimento do perfil de produção de ácidos graxos por representantes brasileiros de Labyrinthulomycota.

Palavras chave: Mata Atlântica, Thraustochytriales, Labyrinthulales, organismos zoospóricos, ácidos graxos poli-insaturados, ácido docosahexaenoico

ABSTRACT

The phylum Labyrinthulomycota is classified into Straminipila Kingdom and is composed of three distinct groups of the fungus-like organisms, the labyrinthulids, the thraustochytrids and the aplanochytrids. These organisms, mostly zoospore producers, are present in marine and brackish waters as saprobes and/or parasites. In recent years, there was an increase interest in studying these organisms, due to the ability that some have to produce large amounts of lipids, among them the polyunsaturated fatty acids (PUFAs). However, in spite of the importance of the group, only four species were reported in Brazil in the 60's and 70's. Thus, considering the ecological importance and the economic potential of these organisms, as well as the limited knowledge about the diversity of this group in the country, the present study had as objectives to perform the morphological and molecular identification of the specimens collected in the "Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)", an important preserved fragment of the Atlantic rainforest on the São Paulo state; and to quantify the different fatty acids produced by some Brazilian isolates. From six collections, between the years of 2012 and 2015, 167 specimens from water and leaf samples were identified, by means of morphological characteristics and/or phylogenetic analysis of the SSU rDNA region, as *Aurantiochytrium* (111 specimens), *Labyrinthula* (21 specimens), *Parietichytrium sarkarianum* (31 specimens) e *Thraustochytrium* (4 specimens). The genera *Aurantiochytrium* and *Labyrinthula*, as well as the species *Parietichytrium sarkarianum* are new records for Brazil, and five species of *Aurantiochytrium* considered new species for science. Some of the representative specimens of each genera/species were described, preserved and documented. Twenty specimens were incorporated into the culture collection of the "Instituto de Botânica de São Paulo" ("Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias – CCIBt") and culture collection of the "Instituto Biológico de São Paulo" ("Micoteca Mário Barreto Figueiredo – MMBF"). Twenty-six sequences of the SSU rDNA region of Brazilian isolates from this study were deposited in the GenBank. From the identified taxa, 25 of them were analyzed for the production profile of fatty acids (12 isolates of

Aurantiochytrium sp., five of *Aurantiochytrium* sp. nov. and eight of *P. sarkarianum*), with 15 days of cultivation at 25 °C. The results evidenced that the Brazilian isolates collected of the PEIC synthesize significant amounts of docosahexaenoic acid (DHA) and palmitic acid (PA), reaching 105.57 mg of DHA /g of biomass and 56.89 mg of PA /g of biomass. The best producers of the main fatty acids, two specimens of *Aurantiochytrium* sp., one of *Aurantiochytrium* sp. nov. and two of *P. sarkarianum*, were submitted to different growing conditions, such as lower growth time (5 days) and different final cultivation temperatures (10 °C and 25 °C). Specimens cultivated for five days at 25 °C showed a decrease in the production (mg/g of biomass) of most fatty acids, compared to the amount produced with 15 days of growth, except for DHA in the isolates IC97 of *Aurantiochytrium* sp. nov. and IC12 of *P. sarkarianum*, and DHA and PA in the isolate IC83 of *P. sarkarianum*. The test with different final temperatures of cultivation showed that the isolates presented increase in the production of some fatty acids when the final temperature was 10 °C, except for the isolate IC83 of *P. sarkarianum*. This study contributes to the knowledge of this group in Brazil, for inclusion of sequences of Brazilian specimens in Genbank, for obtaining and preserving of the isolates in pure cultures for future studies in the country, as well as for knowledge of the production profile of fatty acids by Brazilian isolates of Labyrinthulomycota.

Key words: Atlantic Rainforest, Thraustochytriales, Labyrinthulales, zoosporic organisms, polyunsaturated fatty acids, docosahexaenoic acid

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Alfa-Linolenic Acid (Ácido alfa-linolênico)

APA – Área de Proteção Ambiental

ARA – Arachidonic Acid (Ácido araquidônico)

ATCC – American Type Culture Collection

BHT – Hidroxitolueno Butilado

BLASTn – Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

BOD – Biochemical Oxygen Demand (Demanda bioquímica de oxigênio)

CCIBt – Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica

CEGH-USP – Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

DHA – Docosahexaenoic Acid (Ácido docosahexaenoico)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

DTA – Docosatetraenoic Acid (Ácido docosatetraenoico)

DPA – Docosapentaenoic Acid (Ácido docosapentaenoico)

EPA – Eicosapentaenoic Acid (Ácido eicosapentaenoico)

EPSs – Extracellular Polysaccharides (Polissacarídeos extracelulares)

FAME – Fatty Acid Methyl Ester (Éster metílico de ácido graxo)

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

GLA – Gamma-Linolenic Acid (Ácido gama-linolênico)

ICN – International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants

ICZN – International Code of Zoological Nomenclature

LA – Linoleic Acid (Ácido linoléico)

MMBF – Micoteca Mário Barreto Figueiredo

MUFAs – Monounsaturated Fatty Acids (Ácidos graxos monoinsaturados)

NIST – National Institute of Standards and Technology

PA – Palmitic Acid (Ácido palmítico)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)

PEIC – Parque Estadual da Ilha do Cardoso

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PUFAs – Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos graxos poli-insaturados)

PYGs – Peptone, Yeast extract and Glucose in diluted seawater (Peptona, extrato de levedura e glicose em água do mar diluída)

rDNA – Ribosomal Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico ribossomal)

SAR – Straminipila, Alveolata e Rhizaria

SFAs – Saturated Fatty Acids (Ácidos graxos saturados)

SSU – Small Subunit 18S (Pequena subunidade 18S)

TBE – Tris, Borato e EDTA (Tris, borato e etilenodiamino tetra-acético)

TFA – Total Fatty Acids (Ácidos graxos totais)

UV – Ultravioleta

VLC – Very Long Chain (Cadeia muito longa)

WFCC – World Federation for Culture Collections

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Botrossomo liberando a rede ectoplasmática (Ultraestrutura).....	26
Figura 2. A – Rede ectoplasmática de um representante do gênero <i>Thraustochytrium</i> liberada por um único botrossomo; B – Rede ectoplasmática de um representante do gênero <i>Labyrinthula</i> e detalhe de um dos botrossomos presentes na parede celular que possui mais de uma desta organela.....	26
Figura 3. A – Ciclo de vida de um representante do gênero <i>Thraustochytrium</i> , onde a liberação dos zoósporos ocorre por meio da dissolução da parede do zoosporângio; B – Ciclo de um representante do gênero <i>Labyrinthula</i> , no qual podem ser vistas as células interligadas pela rede ectoplasmática, que são liberadas, após maturação, na forma de zoósporos, por meio da dissolução da parede do zoosporângio; C – Ciclo de um representante do gênero <i>Schizochytrium sensu lato</i> , no qual os zoósporos são liberados por meio da dissolução da parede do zoosporângio que é formado a partir de divisões celulares binárias contínuas da célula vegetativa.....	27
Figura 4. Utilização da rede ectoplasmática pelos três diferentes grupos. A – Labirintulídeos, onde a rede ectoplasmática envolve toda a célula e é utilizada para locomoção; B – Traustoquitrídias, onde a rede ectoplasmática é utilizada somente para fixação; C – Aplanoquitrídias, onde a rede ectoplasmática também é utilizada para locomoção, porém não envolve totalmente a célula.....	27
Figura 5. Localização da Ilha do Cardoso.....	46
Figura 6. Localização dos Núcleos Perequê e Núcleo Marujá no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC).....	48
Figura 7. Locais de amostragem no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Início do rio Perequê; B – Manguezal do rio Perequê; C – Praia do Núcleo Perequê; D – Caminho até o Núcleo Marujá.....	50

Figura 8. Espécies vegetais de mangue coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – <i>Rhizophora mangle</i> L.; B – <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) Gaertn.; C – <i>Avicennia schaueriana</i> Stapf & Leechm. ex Moldenke.....	50
Figura 9. Coleta de amostras no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Coleta de folheto submerso; B – Acondicionamento do folheto submerso; C – Coleta de água.....	51
Figura 10. Processamento das amostras coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Triagem das folhas; B – Corte das folhas; C e D – Lavagem das folhas; E – Iscagem; F – Isolamento direto em meio de cultura PYGs.....	53
Figura 11. Inoculação dos isolados de Thraustochytriales, em meio de cultura líquido PYGs, para a produção de biomassa utilizada na extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos. A – Raspagem das células crescidas em meio de cultura sólido PYGs; B e C – Inoculação do isolado no meio líquido PYGs.....	62
Figura 12. Biomassa liofilizada, dos isolados de Thraustochytriales, para extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos.....	63
Figura 13. Extração de lipídios totais. A – Separação da fase clorofórmica após centrifugação; B – Recuperação da fase clorofórmica; C-D – Filtração da fase clorofórmica; E – Secagem da fase clorofórmica em atmosfera de nitrogênio (N ₂); F – Pesagem para determinação dos lipídios totais.....	66
Figura 14. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; “fatty acid methyl ester”). A – Início da reação de transesterificação, frascos em banho-maria (100 °C) por 1 hora; B – Frascos esfriando após banho-maria; C-D-E – Separação e recuperação dos FAMES; F – Filtração dos FAMES.....	67
Figura 15. Frascos Vials utilizados para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A – Aplicação de 100 µL dos FAMES no <i>insert</i> inserido no frasco Vial; B – Frascos Vials prontos para aplicação no CG-EM.....	68

Figura 16. Identificação dos ácidos graxos. A – Picos mostrando os tempos de retenção dos ácidos graxos; B – Planilha dos ácidos graxos identificados por comparação de seus espectros de massa com os espectros da biblioteca do NIST.....	69
Figura 17. Quantificação dos ácidos graxos. A – Gráficos para confecção das equações da reta da curva padrão dos FAMES do padrão Supelco 37. B – Planilha de cálculos de quantificação dos ácidos graxos.....	70
Figura 18. Preservação de isolados de Thraustochytriales pelo método de <i>Castellani</i>	72
Figura 19. Preservação de isolados de Thraustochytriales em meio de cultura PYGs líquido.....	73
Figura 20. Preservação de isolados de Thraustochytriales em óleo mineral.....	74
Figura 21. Preservação de isolados de Thraustochytriales em papel filtro a -80 °C e/ou a -20 °C....	75
Figura 22. Revitalização dos isolados de Thraustochytriales preservados em papel filtro a -80 °C e/ou a -20 °C.....	75
Figura 23. Árvore filogenética de máxima verossimilhança da região SSU do rDNA. Valores próximos dos ramos indicam o suporte de <i>bootstraps</i> (%) de 1000 pseudo-réplicas. Somente os ramos com suporte > de 50% foram destacados. A barra inferior indica o número de substituições por sítio. Isolados obtidos neste estudo estão em negrito.....	92
Figura 24. Culturas de células crescidas em meio de cultura sólido PYGs. A e B – Culturas IC12 e IC7, respectivamente, de <i>Parietichytrium sarkarianum</i> com oito dias de crescimento; C e D – Culturas IC18 e IC1, respectivamente, de <i>Aurantiochytrium</i> sp. com quatro dias de crescimento; E e F – Cultura IC97 de <i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. com quatro dias de crescimento.....	100
Figura 25. A – Zoosporângios de <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , alguns com a formação de zoósporos em meio PYGs (isolado IC7); B – Células de <i>Aurantiochytrium</i> sp. fixadas pela rede ectoplasmática em epiderme de cebola (isolado IC1); C e D – Células de <i>Aurantiochytrium</i> sp., algumas apresentando divisões em meio PYGs (isolado IC1); E – Zoósporos de <i>Aurantiochytrium</i> sp. já formados em meio PYGs (isolado IC109); F – Células de <i>Aurantiochytrium</i> sp. nov., apresentando divisões e formando agregações em meio PYGs (isolado IC97). Barra = 10 µm.....	101

- Figura 26.** *Labyrinthula* sp. A – Pústulas formadas em semente de *Sorghum* sp. (isolado A220); B – Células vegetativas envoltas pela rede ectoplasmática em epiderme de cebola (isolado PR4); C – Formação de soros (zoosporângio) em epiderme de cebola (isolado PR4); D – Zoósporos sendo liberados em epiderme de cebola (isolado PR4). Barra = 10 µm..... 102
- Figura 27.** Crescimento do isolado IC4 de *Aurantiochytrium* sp. preservado em papel filtro armazenado em freezer frost-free (-20 °C) 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura dos ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) mais comuns presentes em Thraustochytriales.....	38
Tabela 2. Resultados provenientes de diversos estudos científicos sobre a produção de ácido docosaheptaenoico (DHA) e ácido palmítico (PA) por representantes de Thraustochytriales.....	39
Tabela 3. Fatores abióticos mensurados nos pontos de coleta dos Núcleos Perequê e Marujá do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP (agosto de 2012 a setembro de 2015)....	76
Tabela 4. Espécimes observados durante o processamento das amostras provenientes das seis coletas realizadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP, no período de agosto de 2012 a setembro de 2015.....	79
Tabela 5. Isolados utilizados na construção da árvore filogenética de máxima verossimilhança da região SSU do rDNA de representantes de Labyrinthulomycota.....	93
Tabela 6. Número CCIBt (Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica) e MMBF (Micoteca Mário Barreto Figueiredo) de isolados de Labyrinthulomycota depositados.....	96
Tabela 7. Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida, em um total de 300 mL de meio líquido PYGs, pelos representantes de <i>Aurantiochytrium</i> sp., <i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. e <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados para a análise do perfil de produção e quantificação dos ácidos graxos.....	103
Tabela 8. Produção de ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) pelos representantes de <i>Aurantiochytrium</i> sp., <i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. e <i>Parietichytrium sarkarianum</i> , coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo.....	106
Tabela 9. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de <i>Aurantiochytrium</i> sp. coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com	

letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%..... 108

Tabela 10. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp. nov. coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%..... 111

Tabela 11. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de *Parietichytrium sarkarianum* coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%..... 113

Tabela 12. Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs, por espécimes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados no ensaio de produção de ácidos graxos em menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C). Comparação realizada com os 15 dias de crescimento a 25 °C, em um total de 300 mL de meio de cultura líquido PYGs, dos mesmos isolados no ensaio anterior.....117

Tabela 13. Influência do menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) produzidos pelos cinco espécimes selecionados de Labyrinthulomycota coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo.....118

Tabela 14. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 119

Tabela 15. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 119

Tabela 16. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 120

Tabela 17. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC12 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras

- distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 121
- Tabela 18.** Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC83 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 122
- Tabela 19.** Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida em 5 dias, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs, por espécimes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados para o ensaio de produção de ácidos graxos em diferentes temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C).....123
- Tabela 20.** Influência da temperatura final de cultivo (25 °C e 10 °C) na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) produzidos pelos cinco espécimes selecionados de Labyrinthulomycota coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo..... 124
- Tabela 21.** Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 125
- Tabela 22.** Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no

Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 125

Tabela 23. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 126

Tabela 24. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC12 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 127

Tabela 25. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC83 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student..... 128

Tabela 26. Viabilidade de preservação em papel filtro armazenado em freezer frost-free (aproximadamente -20 °C) de 20 isolados, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo..... 131

SUMÁRIO

1. Introdução	24
1.1. Características gerais do filo Labyrinthulomycota	24
1.2. Distribuição e papel ecológico dos representantes do filo Labyrinthulomycota	28
1.3. Taxonomia do filo Labyrinthulomycota	29
1.4. Importância biotecnológica do grupo	32
1.5. Labyrinthulomycota no Brasil	41
1.6. Preservação de Labyrinthulomycota	42
2. Objetivo geral	45
3. Objetivos específicos	45
4. Material e métodos	46
4.1. Caracterização da área de estudo	46
4.2. Coletas	49
4.3. Iscagem e isolamento dos representantes de Labyrinthulomycota	51
4.4. Identificação morfológica dos espécimes	54
4.5. Identificação molecular dos espécimes	54
4.5.1. Produção de biomassa	55
4.5.2. Extração de DNA genômico	55
4.5.3. Amplificação e purificação da região SSU do rDNA	56
4.5.4. Sequenciamento da região SSU do rDNA	57
4.5.5. Análises filogenéticas	58
4.6. Produção de ácidos graxos	59
4.6.1. Produção de biomassa	60
4.6.1.1. Perfil de produção e quantificação de ácidos graxos	60

4.6.1.2. Produção dos principais ácidos graxos em menor tempo de crescimento e em diferentes temperaturas finais de cultivo.....	61
4.6.2. Extração e quantificação de ácidos graxos.....	63
4.6.3. Análises estatísticas	71
4.7. Métodos de preservação dos espécimes obtidos	71
4.7.1. Preservação dos isolados pelo método de <i>Castellani</i>	71
4.7.2. Preservação dos isolados em meio de cultura líquido	72
4.7.3. Preservação dos isolados em óleo mineral.....	73
4.7.4. Preservação em papel filtro a -80 °C (ultrafreezer) e/ou a -20 °C (freezer frost-free)...	74
5. Resultados e discussão	76
5.1. Caracterização dos fatores abióticos mensurados nos pontos de coleta	76
5.2. Iscagem, isolamento e identificação morfológica dos espécimes de Labyrinthulomycota.....	78
5.3. Identificação molecular dos espécimes	87
5.3.1. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento da região SSU do rDNA.....	88
5.3.2. Análises filogenéticas.....	89
5.4. Descrição dos isolados brasileiros de Labyrinthulomycota provenientes deste estudo	97
5.5. Produção de ácidos graxos	103
5.5.1. Perfil de produção e quantificação de ácidos graxos.....	103
5.5.2. Produção dos principais ácidos graxos em menor tempo de crescimento e em diferentes temperaturas finais de cultivo.....	116
5.5.2.1. Menor tempo de crescimento	116
5.5.2.2. Diferentes temperaturas finais de cultivo	123
5.6. Preservação dos espécimes obtidos	129
5.6.1. Preservação dos isolados pelo método de <i>Castellani</i> e em meio líquido PYGs.....	129
5.6.2. Preservação dos isolados em óleo mineral e em papel filtro armazenado a -80 °C (ultrafreezer) e/ou a -20 °C (freezer frost-free)	130

6. Considerações finais	133
7. Referências bibliográficas.....	136
8. Anexo I	161

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais do filo Labyrinthulomycota

Labyrinthulomycota é um grupo de organismos “like-fungi” classificados no Reino Straminipila, supergrupo SAR, juntamente com Alveolata e Rhizaria (Adl *et al.* 2012), possuindo como principais características a nutrição por absorção e a produção de zoósporos biflagelados heterocontes (Bennett *et al.* 2017). Por serem organismos não fotossintéticos (heterotróficos), como os fungos, e produtores de zoósporos, como as algas, foram por diversas vezes transferidos de um reino para outro (Leaño & Damare 2012), sendo ainda chamados de microalgas por muitos pesquisadores do setor industrial (Chen *et al.* 2010, Fan *et al.* 2007, Li *et al.* 2007, Manikan *et al.* 2015, Topuz 2016, Yang *et al.* 2010).

O filo é composto basicamente por três grupos distintos, segregados por meio de características morfológicas e moleculares: os Labirintulídeos, as Traustoquitrídias e as Aplanoquitrídias (Leander *et al.* 2004). Porém, recentes estudos taxonômicos, utilizando filogenia (região SSU do rDNA), mostram que a subdivisão taxonômica do grupo ainda está em andamento, com diversas linhagens adicionais sendo descobertas (Pan *et al.* 2017).

Além da presença de zoósporos biflagelados, sendo um deles mastigonemático, estes organismos possuem como importantes características a parede celular composta por escamas provenientes do aparelho de Golgi, acumulação de β 1-3 e β 1-6 glucanos como substância de reserva e a presença de uma rede ectoplasmática, que é uma extensão da membrana plasmática, produzida por organelas especializadas denominadas “botrossomos” (Alexopoulos *et al.* 1996, Perkins 1972) (**Figuras 1 e 2**). Esta rede ectoplasmática adere as células às superfícies e contém enzimas hidrolíticas que são liberadas no meio para a degradação da matéria orgânica e, assim, absorção dos compostos resultantes (Coleman & Vestal 1987). No entanto, nem todos os representantes do grupo produzem zoósporos ou possuem “botrossomo” (Dick 2001).

A reprodução do grupo é basicamente assexuada e caracteriza-se pela formação de zoósporos e liberação a partir da dissolução (total ou parcial) da parede da célula vegetativa, que se diferencia em zoosporângio, como nos representantes do gênero *Thraustochytrium* (**Figura 3A**) e *Labyrinthula* (**Figura 3B**). Em outros casos pode ocorrer a formação de zoósporos, ou novos zoosporângios, a partir da divisão da célula vegetativa como nos representantes do gênero *Schizochytrium sensu lato* (**Figura 3C**). Os zoósporos liberados nadam até encontrar um substrato adequado, sobre o qual se fixam e, posteriormente, se diferenciam em uma nova célula vegetativa que dará origem a um novo zoosporângio (Porter 1989).

Os labirintulídeos apresentam células em forma de fuso que deslizam livremente dentro da rede ectoplasmática (bem desenvolvida no grupo) que os envolve completamente (**Figura 4A**) e é por meio dela que estes absorvem os nutrientes. São principalmente marinhos, vivendo, em sua maior parte, em gramíneas marinhas e algas marinhas onde atuam como parasitas, comensalistas ou mutualistas. Suas células crescem em forma de colônia, durante a fase vegetativa, e são ligadas umas às outras por meio do líquido ectoplasmático. O zoósporo biflagelado, presente na fase reprodutiva, pode não estar presente em algumas espécies do gênero (Porter 1989).

Os grupos das traustoquitrídias e aplanoquitrídias possuem esporângios globosos ou subglobosos, a rede ectoplasmática é bem menos desenvolvida que nos labirintulídeos e os seus representantes se multiplicam por meio de zoósporos biflagelados e aplanósporos, respectivamente. As traustoquitrídias utilizam delicados filamentos das extensões ectoplasmáticas para fixação no substrato e absorção de nutrientes (**Figura 4B**) e as aplanoquitrídias utilizam a rede ectoplasmática para se mover de forma amebóide (**Figura 4C**), porém esta não os envolve completamente (Leander 2001, Leañó & Damare 2012, Moss 1986, Rosa *et al.* 2006).



Figura 1. Botrossomo liberando a rede ectoplasmática (Ultraestrutura) (Imagem: <http://www.botany.uga.edu/zoosporicfungi/labyrint.htm>)



Figura 2. A – Rede ectoplasmática de um representante do gênero *Thraustochytrium* liberada por um único botrossomo; B – Rede ectoplasmática de um representante do gênero *Labyrinthula* e detalhe de um dos botrossomos presentes na parede celular que possui mais de uma desta organela (Imagem: Porter 1989)

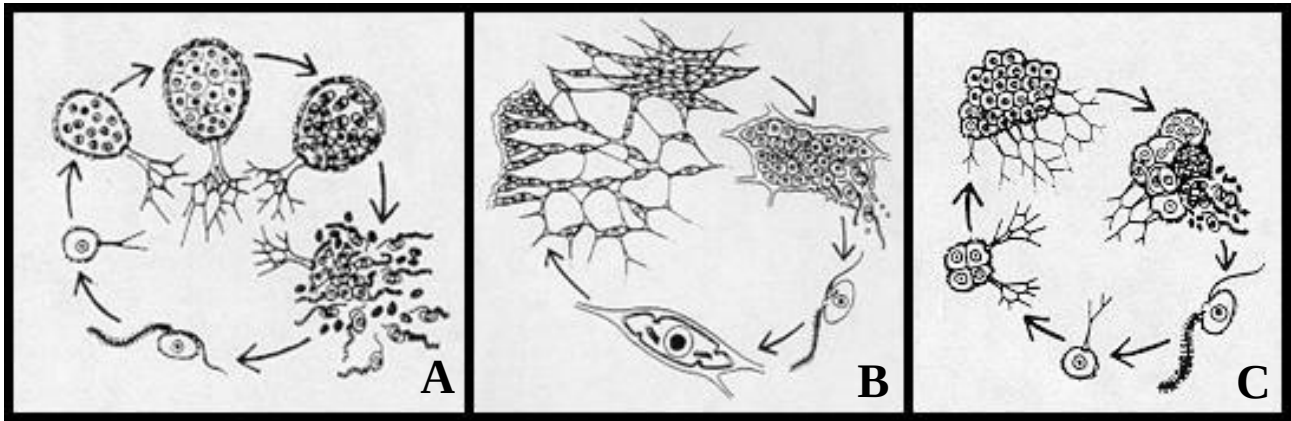


Figura 3. A – Ciclo de vida de um representante do gênero *Thraustochytrium*, onde a liberação dos zoósporos ocorre por meio da dissolução da parede do zoosporângio; B – Ciclo de um representante do gênero *Labyrinthula*, no qual podem ser vistas as células interligadas pela rede ectoplasmática, que são liberadas, após maturação, na forma de zoósporos, por meio da dissolução da parede do zoosporângio; C – Ciclo de um representante do gênero *Schizochytrium sensu lato*, no qual os zoósporos são liberados por meio da dissolução da parede do zoosporângio que é formado a partir de divisões celulares binárias contínuas da célula vegetativa (Imagem: Porter 1989)

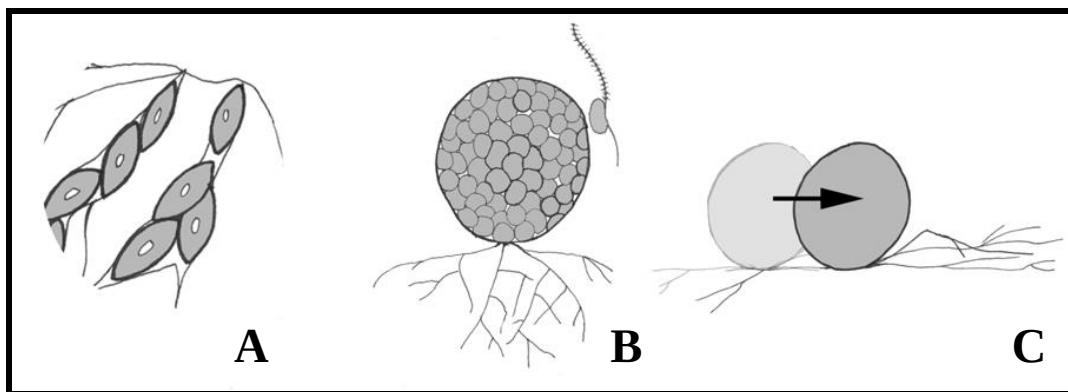


Figura 4. Utilização da rede ectoplasmática pelos três diferentes grupos. A – Labirintulídeos, onde a rede ectoplasmática envolve toda a célula e é utilizada para locomoção; B – Traustochitrídiás, onde a rede ectoplasmática é utilizada somente para fixação; C – Aplanoquitrídiás, onde a rede ectoplasmática também é utilizada para locomoção, porém não envolve totalmente a célula (Imagem: Leander 2001)

1.2. Distribuição e papel ecológico dos representantes do filo Labyrinthulomycota

Representantes do filo Labyrinthulomycota estão presentes em uma grande diversidade de ecossistemas e habitats ao redor do mundo, como águas marinhas, salobras e em ambientes terrestres, e têm uma ampla distribuição geográfica, incluindo região tropical, subtropical, temperada e até mesmo regiões do Ártico/Antártico (Anderson & Cavalier-Smith 2012, Damare & Raghukumar 2010, Leañó & Damare 2012, Liu *et al.* 2014, Sullivan *et al.* 2016). São considerados importantes componentes da comunidade microbiana marinha, atuando principalmente como decompositores de detritos orgânicos (Leañó & Damare 2012, Raghukumar 2002). Devido a este papel, são em sua grande maioria encontrados associados a material vegetal em decomposição, especialmente algas e folhas de mangue, no entanto, podem também ser encontrados como componentes do filme microbiano marinho, sendo importantes transportadores de nutrientes para níveis mais profundos do mar (Raghukumar & Raghukumar 1998, Raghukumar *et al.* 2000). Além disso, estudos demonstram que a associação destes organismos com a matéria orgânica morta incrementa a qualidade nutricional desta, aumentando o consumo, principalmente, de ácidos graxos poli-insaturados por outros organismos ao longo da cadeia alimentar (Harrison 1990, Mann 1988).

Algumas espécies também são relatadas como parasitas de algas, plantas ou invertebrados, ou associadas a organismos marinhos vivos (Bigelow *et al.* 2005, Bower 1987, Damare 2015, McLean & Porter 1982, Muehlstein & Porter 1991, Muehlstein *et al.* 1988, Raghukumar 2002, Schärer *et al.* 2007, Whyte *et al.* 1994), as quais podem causar danos ecológicos ou até mesmo econômicos. No grupo das traustochytrídiás, Schärer *et al.* (2007) relataram uma espécie de *Thraustochytrium* denominada por eles de *Thraustochytrium caudivorum*, como parasita do platelminto marinho de vida livre, *Macrostomum lignano* (Ladurner *et al.* 2008). Dentre os labirintulídeos, relata-se o caso de uma espécie de *Labyrinthula*, denominada por Muehlstein & Porter (1991) de *Labyrinthula zosterae*, que parasita *Zostera marina*, uma planta vascular marinha, causando lesões necróticas pretas em suas folhas (Muehlstein *et al.* 1988). Esta doença tem, ao

longo do tempo, causado picos de prejuízos econômicos e ecológicos (com os maiores problemas registrados em 1930 e 1980), devido a esta planta marinha ser um componente importante das zonas costeiras e funcionar como berçário para estágios larvais de camarões, ostras, crustáceos e outros organismos. Sendo assim, a infecção por *Labyrinthula zosterae* ocasionou diminuição drástica do abrigo fornecido por ela e, conseqüentemente, a diminuição e/ou extinção de organismos que se abrigavam nela (Carlton *et al.* 1991, Milanez 1999). Ainda no grupo dos labirintulídeos, outro grande dano econômico causado por uma espécie de *Labyrinthula*, denominada por Bigelow *et al.* (2005) de *Labyrinthula terrestris*, ocorreu durante os anos de 1995 e 2005, onde campos de golfe tiveram seus gramados devastados por imensas manchas marrons causadas por este patógeno, sendo a primeira observação deste tipo de organismo atacando plantas terrestres. Esta espécie é a única do grupo conhecida por ocorrer em ambiente terrestre, sendo que todas as outras ocorrem em ambientes salinos (Bigelow *et al.* 2005, Kerrigan *et al.* 2012, Stowell *et al.* 2005).

1.3. Taxonomia do filo Labyrinthulomycota

A taxonomia do filo, tradicionalmente baseada em morfologia, tem sido historicamente confusa, tendo os representantes deste filo já sido considerados fungos, protozoários e/ou protistas (Alexopoulos *et al.* 1996, Dick 1973, 2001, Olive 1975, Patterson & Sogin 1992, Sparrow 1976). A revisão taxonômica, baseada em caracteres morfológicos, mais recente foi realizada por Dick (2001), no entanto, como a identificação morfológica destes organismos é bastante difícil, devido à simplicidade em estruturas de muitos de seus representantes (Leander 2001, Yokoyama & Honda 2007), trabalhos posteriores têm sugerido modificações taxonômicas baseando-se principalmente na combinação de estudos morfológicos, filogenéticos e bioquímicos (Burja *et al.* 2006, Chang *et al.* 2012, 2014, Gupta *et al.* 2017, Leander *et al.* 2004, Yokoyama & Honda 2007, Yokoyama *et al.* 2007).

Alguns autores, como Cavalier-Smith & Chao (2006) e Anderson & Cavalier-Smith (2012), amparados em estudos moleculares, chegaram a propor para o grupo uma nomenclatura relacionada ao “Código Internacional de Nomenclatura Zoológica” (ICZN – “International Code of Zoological Nomenclature”) e não ao “Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas” (ICN – “International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants”). Eles propuseram que uma única classe, Labyrinthulea, pertenceria ao Filo Bigyra, Subfilo Sagenista, com duas ordens, Thraustochytrida e Labyrinthulida, e uma superfamília, Amphifiloidea, onde estariam distribuídas oito famílias, Amphifilidae, Aplanochytriidae, Althorniidae, Diplophryidae, Labyrinthulidae, Oblongichytriidae, Sorodiplophryidae e Thraustochytriidae, porém esta nomenclatura não foi bem aceita pelos especialistas no grupo.

Atualmente, uma única classe dentro do filo é reconhecida, Labyrinthulea, esta composta por duas ordens, Labyrinthulales e Thraustochytriales, e duas famílias bem aceitas, Labyrinthulaceae e Thraustochytriaceae. Labyrinthulaceae está representada por três gêneros e 18 espécies, com duas espécies em *insertae sedis*; e Thraustochytriaceae por 12 gêneros e 40 espécies, com oito espécies em *insertae sedis* (Mycobank 2017).

Reino: Straminipila

Phylum: Labyrinthulomycota

Classe: Labyrinthulea

Ordem: Labyrinthulales

Família: Labyrinthulaceae

Gêneros: *Labyrinthomyxa* (3 espécies)

Labyrinthula (*sensu stricto*, 14 espécies)

Pseudoplasmodium (1 espécie)

Ordem: Thraustochytriales

Família: Thraustochytriaceae

Gêneros: *Althornia* (1 espécie)

Aplanochytrium (8 espécies)

Aurantiochytrium (2 espécies)

Botryochytrium (1 espécie)

Elina (2 espécies)

Japonochytrium (1 espécie)

Oblongichytrium (3 espécies)

Parietichytrium (1 espécie)

Schizochytrium (*sensu stricto*, 1 espécie)

Sicyoidochytrium (1 espécie)

Thraustochytrium (*sensu stricto*, 16 espécies)

Ulkenia (*sensu stricto*, 3 espécies)

*Os gêneros indicados como *sensu stricto* correspondem a gêneros clássicos dentro do filo que tiveram algumas de suas espécies transferidas para outros gêneros.

1.4. Importância biotecnológica do grupo

Atualmente há um interesse maior em se estudar as traustochitridíadas (Thraustochytriales) por seu reconhecido potencial biotecnológico, evidenciado pela capacidade de seus representantes em produzir grandes quantidades de lipídios, destacando-se os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs – polyunsaturated fatty acids), especialmente o ácido docosahexaenoico (DHA – docosahexaenoic acid, C22:6 ω 3) (Aasen *et al.* 2016, Bowles *et al.* 1999, Burja *et al.* 2006, Byreddy 2016, Chang *et al.* 2011, 2012, 2014, Fan *et al.* 2001, 2007, Gupta *et al.* 2012, 2017, Huang *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2004, Lewis *et al.* 1999, Marchan *et al.* 2017, Ou *et al.* 2016, Pandey & Bhatena 2014, Raghukumar 2008, Unagul *et al.* 2017, Yaguchi *et al.* 1997, Yang *et al.* 2010, Yokochi *et al.* 1998).

Os PUFAs apresentam uma estrutura de cadeia reta de 18 ou mais carbonos com duas ou mais ligações duplas, tendo em uma terminação um grupo carboxila (COO^-) e na outra um grupo metila (CH_3^-). A presença destas ligações duplas na estrutura do ácido graxo, chamadas de insaturações, faz com que este tenha menor temperatura de fusão do que os ácidos graxos saturados com o mesmo número de carbonos, razão pela qual são líquidos em temperatura ambiente. Dentre os PUFAs existem os compostos chamados ômega, cuja nomenclatura se dá devido a primeira dupla ligação ocorrer na posição 3, 6 ou 9 mais próxima ao grupo metila, sendo assim classificados como ômega 3, 6 ou 9, respectivamente (Anderson & Wynn 2001).

Os efeitos benéficos dos PUFAs sobre a saúde humana têm sido demonstrados em inúmeros estudos e incluem a prevenção ou tratamento de uma variedade de enfermidades, como arteriosclerose, trombose, artrite e alguns tipos de câncer (Braden & Carroll 1986, Kremer *et al.* 1985, Mehta *et al.* 1987, Norday & Hansen 1994). Adicionalmente, os PUFAs de cadeia muito longa (VLC – very long chain), ou seja, com mais de 20 carbonos, contendo mais de duas ligações duplas, são considerados importantes nutrientes bioativos que regulam muitas condições fisiológicas. O DHA é um importante ômega 3, pois é um componente estrutural essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso infantil e fotorreceptores da retina, sendo que, o aumento do

seu consumo em idade adulta reduz o risco de doenças crônicas cardiovasculares e do sistema nervoso central, artrites e doenças hepáticas (Lauritzen *et al.* 2001, Salem *et al.* 2001, Simopoulos 1991).

A ênfase dada aos PUFA's deve-se ao fato do organismo humano não poder sintetizá-los, por não possuírem as enzimas delta-12 e delta-15 desaturase, identificadas em eucariotos superiores, plantas e animais, exceto mamíferos. Estas enzimas são responsáveis pela biossíntese dos ácidos linoléico (LA – linoleic acid, C18:2 ω 6) e α -linolênico (ALA – α -linolenic acid, C18:3 ω 3), que são os precursores dos PUFA's VLC ômega 6 e 3, respectivamente. Devido a este fato, o LA e o ALA são considerados ácidos graxos essenciais na dieta dos seres humanos (Anderson & Wynn 2001, Lee *et al.* 2016, Meyer *et al.* 1999).

As dietas das sociedades ocidentais são extremamente desbalanceadas com relação às proporções de PUFA's essenciais, contendo altas concentrações de ácidos graxos ômega 6 e baixíssimas de ômega 3, em torno de uma proporção de 20:1, bastante diferente do consumo recomendado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), que é de uma proporção de 5:1 a 10:1 (FAO 1994, Mataix 2002). Por tal motivo, os governos e principais órgãos responsáveis pela nutrição recomendam a utilização de PUFA's VLC ômega 3, especialmente o DHA, como suplemento dietético, principalmente em formulações infantis (Ward & Singh 2005).

O óleo de peixe tem sido a fonte comercial tradicional de PUFA's ômega 3, mas apresentam inúmeros inconvenientes, como sua instabilidade frente à oxidação, odor e gosto pouco agradáveis, variações de qualidade devido ao ambiente e a época do ano e altos custos de purificação devido a alta concentração de PUFA's relacionados estruturalmente entre si (Tacon 1995, Varela *et al.* 1990). Considerando estes inconvenientes mencionados, além do aumento da contaminação de ambientes marinhos, a produção de PUFA's a partir de microorganismos em condições confinadas e controladas aparece como uma forte alternativa, especialmente se o intuito for manter um produto de qualidade constante (Ratledge 2004).

Nos últimos anos, as traustóquitrídias têm se estabelecido como uma das fontes microbianas mais promissoras de produção de PUFA, devido a sua alta taxa de crescimento, seu alto rendimento de biomassa, a alta proporção de lipídios na biomassa e a alta proporção de PUFA entre os lipídios totais obtidos por determinados isolados. Os PUFA provenientes das traustóquitrídias apresentam menor odor e o DHA presente nestes organismos é facilmente purificável, devido a baixa concentração de outros PUFA relacionados estruturalmente com este (Lewis *et al.* 1999). Segundo Gupta *et al.* (2017), a presença de ácidos graxos ômega 3, particularmente o DHA, no perfil de ácidos graxos dos microrganismos, é um marcador de Thraustochytriales.

Além dos PUFA, as traustóquitrídias também estão sendo exploradas, de maneira menor, pela produção de ácidos graxos saturados (SFAs – saturated fatty acids) e ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs – monounsaturated fatty acids), principalmente o SFA ácido palmítico (PA – palmitic acid, C16:0), sendo este, juntamente com o PUFA DHA, um dos ácidos graxos principais presentes no perfil de Thraustochytriales, constituindo de 70 a 90% dos ácidos graxos totais (TFAs – total fatty acids) (Chang *et al.* 2014, Fan *et al.* 2001, Gupta *et al.* 2012, 2017, Ou *et al.* 2016). A produção destes SFAs e MUFAs podem ser importantes por serem utilizados na indústria de biocombustível (Gomes 2009, Nakahara *et al.* 1996), sendo a produção deste pelos Thraustochytriales barata e favorável ao meio ambiente (Arafiles *et al.* 2011).

Em seus estudos, Jiang *et al.* (2004) e Chang *et al.* (2013) verificaram que o conteúdo de SFAs, nos isolados testados por eles, foi maior nos primeiros dias de crescimento, ao contrário do que aconteceu com os PUFA, os quais foram aumentando proporcionalmente à diminuição dos SFAs, ocorrendo assim uma "inversão" na produção.

A nomenclatura dos ácidos graxos mais comuns presentes em Thraustochytriales (nome comum, nome sistemático e designação numérica) estão demonstrados na **tabela 1**.

Dentre alguns estudos de produção de PUFA realizados com traustóquitrídias, podemos citar as pesquisas com o isolado de *Aurantiochytrium limacinum* SR21 (Nakahara *et al.* 1996) que

foi proposto como um modelo para a produção comercial de DHA por Raghukumar (2008), devido aos altos valores obtidos em diversos trabalhos, tanto no crescimento em frascos sob agitação onde obtiveram uma proporção de até 33% do TFAs de DHA (Yokochi *et al.* 1998) como no crescimento em fermentadores, com uma proporção de até 36% (Yaguchi *et al.* 1997). Estes e outros resultados provenientes de pesquisas de produção de DHA e PA pelas traustochytrídiás estão relacionados na **tabela 2**.

Em estudo mais recente de Gupta *et al.* (2017) foi investigado o perfil de ácidos graxos de isolados provenientes de dois diferentes ambientes, um de clima tropical (Índia) e um de clima temperado (Austrália), levando-se em consideração que os fatores físico-químicos destes ambientes (precipitação, salinidade, níveis de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, níveis de nutrientes e teor de carbono) são diferentes e influenciam a fisiologia dos microrganismos como relatado anteriormente por Pereira *et al.* (2011). Este estudo comparativo mostrou que os isolados que produziram maior biomassa foram os identificados como pertencentes aos gêneros *Aurantiochytrium* ou *Schizochytrium*, independentemente do local de isolamento, o que corrobora trabalhos anteriores (Burja *et al.* 2006, Chang *et al.* 2012, Yang *et al.* 2010). Os isolados coletados em habitats indianos demonstraram ser ricos em SFAs e MUFAs, constituindo em conjunto entre 51 a 76% dos ácidos graxos totais (TFAs), já a proporção de DHA foi modesta, variando de 6 a 25% do TFAs. No entanto, os isolados de habitats australianos apresentaram em média uma maior proporção de DHA (17 a 31% do TFAs), sendo que, a produção em conjunto de SFAs e MUFAs foi de até 79%. Os autores concluíram que a diferença no perfil de ácidos graxos, especialmente do DHA, entre os isolados indianos e australianos pode ser atribuída ao habitat e, principalmente, às condições ambientais de onde esses foram isolados, sendo que, no momento da coleta, a temperatura máxima na região indiana e australiana foi de 35 °C e 18 °C, respectivamente. Sabe-se, por meio de outros estudos (Lewis *et al.* 2001, Rosa *et al.* 2011) que as traustochytrídiás que crescem em regiões mais frias tendem a ter mais PUFA's do que as que crescem em regiões tropicais, que por sua vez, têm maior conteúdo de SFAs e MUFAs.

Diversos estudos também têm sido realizados visando à otimização das condições de crescimento, produção de lipídios e de ácidos graxos, através da manipulação dos componentes do meio de cultura, temperatura, salinidade, tempo de cultivo e outros fatores que são importantes principalmente na promoção da produção de DHA em condições laboratoriais (Arafiles *et al.* 2011, Chodchoey & Verduyn 2012, Furlan *et al.* 2017, Iida *et al.* 1996, Kim *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Ludeverse-Pascual *et al.* 2016, Manikan & Hamid 2013, Manikan *et al.* 2014, 2015, Nagano *et al.* 2009, Perveen *et al.* 2006, Pino *et al.* 2015, Singh & Ward 1997, Taoka *et al.* 2009, Vazhappilly & Chen 1998a, b, Yokochi *et al.* 1998).

Atualmente, o DHA proveniente de células de algumas espécies de *Schizochytrium sensu lato* já é utilizado em preparações comerciais de alto valor agregado, sendo estes produtos comercializados como suplementos dietéticos após estudos demonstrarem sua eficácia no mercado de alimentos e bebidas (Ward & Singh 2005), em dieta de peixes na aquicultura (Barclay & Zeller 1996, Carter *et al.* 2003, Estudillo-del Castillo *et al.* 2009, Langdon & Onal 1999, Sarker *et al.* 2016, Somatawin *et al.* 1997, Song *et al.* 2007, Sprague *et al.* 2016), como alimentação de animais na pecuária (Franklin *et al.* 1999, Mooney *et al.* 1998, Papadopoulos *et al.* 2002, Sim *et al.* 2000) e, também, como suplementação direta na nutrição humana (Martins *et al.* 2013, Raghukumar 2008, Topuz 2016), porém seu custo ainda não é competitivo frente ao óleo de peixe.

Além dos ácidos graxos, alguns estudos também têm demonstrado que as traustochytrídiás podem ainda sintetizar um composto bioativo chamado esqualeno (Aasen *et al.* 2016, Chen *et al.* 2010, Fan *et al.* 2010, Jiang *et al.* 2004, Leño *et al.* 2003, Lewis *et al.* 2001, Li *et al.* 2009, Nakazawa *et al.* 2014, Shene *et al.* 2010, Unagul *et al.* 2005), um importante triterpeno intermediário da síntese de colesterol, que atua como um antioxidante natural efetivo em reduzir a incidência de diferentes tipos de câncer e de doenças coronárias pelo seu consumo diário (Chen *et al.* 2010, Jiang *et al.* 2004). Este composto, que é extraído principalmente do óleo de fígado de tubarão, foi primeiramente relatado como um composto extraído de *Thraustochytrium* sp. por Weete *et al.* (1997), que observaram altos níveis de produção em uma das linhagens estudadas.

A atividade antioxidante das traustequitrídias também foi evidenciada por Kalidasan *et al.* (2015), os quais testaram o extrato de cinco isolados, provenientes de folhas de mangue, que haviam demonstrado atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que todos apresentaram atividade antioxidante significativa, sendo que, quanto maior a concentração do extrato, maior a atividade. O composto produzido não foi identificado neste estudo, porém os autores concluíram que as traustequitrídias podem ser uma fonte rica de compostos naturais com atividade antioxidante e alto potencial de sequestro de radicais livres, podendo isto estar relacionado com a alta produção de derivados de ácidos graxos poli-insaturados, reportados como responsáveis por atividade antioxidante na remoção de radicais livres tóxicos (Plaza *et al.* 2009).

As traustequitrídias também são conhecidas por produzirem pigmentos carotenoides, que podem ser úteis como suplementos alimentares (Aasen *et al.* 2016, Aki *et al.* 2003, Atienza *et al.* 2012, Gupta *et al.* 2012, 2013, Pino *et al.* 2015, Raghukumar 2008, Shimidzu *et al.* 1996), proteases, amilases, lipases e quitinases (Arafiles *et al.* 2011, Damare & Raghukumar 2006, Gupta *et al.* 2012) e polissacarídeos extracelulares (EPSs - extracellular polysaccharides), que estão sendo explorados em diversas aplicações biotecnológicas como agentes antitumorais, anticoagulantes e curativo de feridas (Chang *et al.* 2014, Gupta *et al.* 2012, Jain *et al.* 2005).

Tabela 1. Nomenclatura dos ácidos graxos* (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) mais comuns presentes em *Thraustochytriales*

Nome comum	Nome sistemático	Designação numérica	
Ácido pentadecílico	Ácido pentadecanoico	C15:0	Saturados
Ácido palmítico (PA)	Ácido hexadecanoico	C16:0	
Ácido margárico	Ácido heptadecanoico	C17:0	
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	C18:0	
Ácido palmitoléico	<i>cis</i> -9-hexadecanoico	C16:1	Mono-insaturados
Ácido oléico	<i>cis</i> -9-octadecanoico	C18:1	
Ácido linoléico (LA)	<i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	C18:2 ω6	Poli-insaturados
Ácido alfa-linolênico (ALA)	<i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	C18:3 ω3	
Ácido gama-linolênico (GLA)	<i>cis</i> -6-9-12-octadecatrienoico	C18:3 ω6	
Ácido araquidônico (ARA)	<i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	C20:4 ω6	
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C20:5 ω3	
Ácido docosatetraenoico (DTA)	<i>cis</i> -7,10,13,16-docosatetraenoico	C22:4 ω6	
Ácido docosapentaenoico (DPA ω6)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16-docosapentaenoico	C22:5 ω6	
Ácido docosapentaenoico (DPA ω3)	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoico	C22:5 ω3	
Ácido docosahexaenoico (DHA)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	C22:6 ω3	

*Baseado em Dupont *et al.* 1996 e Rosa 2010

Tabela 2. Resultados provenientes de diversos estudos científicos sobre a produção de ácido docosahexaenoico (DHA) e ácido palmítico (PA) por representantes de Thraustochytriales

Isolado	Idade*	Local	Clima	DHA (%TFA)	PA (%TFA)	Referência
<i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 20892	5 dias	-	-	35,00 (25,30 mg/g)	28,60	Singh <i>et al.</i> 1996
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	5 dias	-	-	4,70 (4,20 mg/g)	20,90	Singh <i>et al.</i> 1996
<i>Aurantiochytrium</i> <i>limacinum</i> SR21	5 dias	Micronésia (Yap)	Tropical	32,50	49,40	Yokochi <i>et al.</i> 1998
SW4/4	3 dias	-	Temperado quente	45,73	19,28	Bowles <i>et al.</i> 1999
HSED/14	3 dias	-	Temperado frio	13,60	38,88	Bowles <i>et al.</i> 1999
M6W/2	3 dias	-	Subtropical	23,79	17,71	Bowles <i>et al.</i> 1999
<i>Aurantiochytrium</i> <i>mangrovei</i> KF6	52 horas	Hong Kong (mangue)	Subtropical	41,10 (204,30 mg/g)	38,80	Fan <i>et al.</i> 2001
<i>Aurantiochytrium</i> <i>mangrovei</i> KF7	52 horas	Hong Kong (mangue)	Subtropical	31,10 (118,10 mg/g)	48,10	Fan <i>et al.</i> 2001
<i>Thraustochytrium</i> <i>striatum</i> KF9	52 horas	Hong Kong (mangue)	Subtropical	36,60 (16,00 mg/g)	6,70	Fan <i>et al.</i> 2001
<i>Ulkenia</i> sp. KF13	52 horas	Hong Kong (mangue)	Subtropical	4,00 (5,50 mg/g)	22,80	Fan <i>et al.</i> 2001
<i>Schizochytrium</i> sp. KF1	52 horas	Hong Kong (mangue)	Subtropical	28,10 (37,00 mg/g)	10,50	Fan <i>et al.</i> 2001
<i>S. aggregatum</i> KK17-3	3 dias	Japão (Iriomote)	Subtropical	52,10	4,50	Huang <i>et al.</i> 2001
<i>Aurantiochytrium</i> <i>limacinum</i> A5-20	4 dias	Japão (Nagasaki)	Temperado	34,10	-	Huang <i>et al.</i> 2003
<i>Aurantiochytrium</i> <i>mangrovei</i> FB1	3 e 5 dias	Hong Kong (mangue)	Subtropical	37,80 e 39,14	42,17 e 40,36	Jiang <i>et al.</i> 2004
<i>Aurantiochytrium</i> <i>mangrovei</i> FB3	3 e 5 dias	Hong Kong (mangue)	Subtropical	32,29 e 34,90	48,25 e 45,08	Jiang <i>et al.</i> 2004

Isolado	Idade*	Local	Clima	DHA (%TFA)	PA (%TFA)	Referência
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FB5	3 e 5 dias	Hong Kong (mangue)	Subtropical	32,63 e 32,76	47,36 e 46,69	Jiang <i>et al.</i> 2004
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i> FB3	3 dias	Hong Kong (mangue)	Subtropical	29,71 (201,50 mg/g)	50,36	Fan <i>et al.</i> 2007
<i>Aurantiochytrium</i> sp. BL10	15 dias	Taiwan (mangue)	Subtropical	47,00	-	Yang <i>et al.</i> 2010
<i>Schizochytrium</i> sp. TC01	7 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	26,40	13,20	Chang <i>et al.</i> 2011
<i>Thraustochytrium</i> sp. TC04	7 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	31,10	9,30	Chang <i>et al.</i> 2011
<i>Aurantiochytrium</i> sp. TC20	7 dias	Austrália (Queensland)	Tropical	51,70	22,30	Chang <i>et al.</i> 2012
<i>Aurantiochytrium</i> sp. TC21	7 dias	Austrália (Queensland)	Tropical	49,40	22,70	Chang <i>et al.</i> 2012
<i>Ulkenia</i> sp. TC10	7 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	37,50	23,60	Chang <i>et al.</i> 2012
<i>Aurantiochytrium</i> sp. TC39	7 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	60,80	6,90	Chang <i>et al.</i> 2012
<i>Aurantiochytrium</i> sp. TC20	9 dias	Austrália (Queensland)	Tropical	46,70	39,80	Chang <i>et al.</i> 2014
<i>Schizochytrium</i> sp. TC02	9 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	4,20	18,10	Chang <i>et al.</i> 2014
<i>Ulkenia</i> sp. TC10	9 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	13,70	27,60	Chang <i>et al.</i> 2014
<i>Thraustochytrium</i> sp. TC04	9 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	2,70	34,80	Chang <i>et al.</i> 2014
<i>Schizochytrium</i> sp. SW1	96 horas	Malásia	Equatorial	50,10	36,30	Manikan <i>et al.</i> 2015
<i>Aurantiochytrium</i> sp. UMACC-T03	7 dias	Malásia (mangue)	Equatorial	7,50	69,40	Ou <i>et al.</i> 2016
<i>Aurantiochytrium</i> sp. UMACC-T04	7 dias	Malásia (mangue)	Equatorial	38,40	40,50	Ou <i>et al.</i> 2016
<i>Parietichytrium</i> sp. UMACC-T10	7 dias	Malásia (mangue)	Equatorial	0	67,40	Ou <i>et al.</i> 2016

Isolado	Idade*	Local	Clima	DHA (%TFA)	PA (%TFA)	Referência
<i>Aurantiochytrium limacinum</i> JS828	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	55,50	27,03	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>Aurantiochytrium limacinum</i> JS989	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	51,16	35,10	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>P. sarkarianum</i> JS510	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	13,01	24,49	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>P. sarkarianum</i> JS1087	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	15,80	20,39	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>Schizochytrium</i> sp. JS1089	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	22,33	20,29	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>Schizochytrium</i> sp. JS1128	7 dias	Tailândia (mangue)	Tropical	22,71	23,99	Unagul <i>et al.</i> 2017
<i>Aurantiochytrium</i> sp. DBTIOC-6	4 dias	Índia (Goa)	Tropical	25,00	27,00	Gupta <i>et al.</i> 2017
<i>Aurantiochytrium</i> sp. DBTIOC-18	4 dias	Índia (Goa)	Tropical	12,00	40,00	Gupta <i>et al.</i> 2017
<i>Schizochytrium</i> sp. DT3	4 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	31,00	30,00	Gupta <i>et al.</i> 2017
<i>Schizochytrium</i> sp. DT13	4 dias	Austrália (Tasmânia)	Temperado	20,00	50,00	Gupta <i>et al.</i> 2017

*O crescimento dos isolados foi feito em frascos Erlenmayer com meio líquido utilizando glicose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A temperatura de crescimento variou de 20 a 30 °C, dependendo do clima do local de coleta.

1.5. Labyrinthulomycota no Brasil

Apesar da importância do grupo, o conhecimento destes no país é extremamente escasso. Somente alguns estudos foram realizados no Brasil, nos quais foram citadas quatro espécies pertencentes ao Filo Labyrinthulomycota: *Schizochytrium aggregatum* Goldstein & Belsky, *Oblongichytrium multirudimentale* (S. Goldst.) R. Yokoy. & D. Honda (= *Thraustochytrium multirudimentale* S. Goldst.), *Thraustochytrium pachydermum* Erh. Scholz e *Thraustochytrium*

proliferum Sparrow, todas provenientes como resultado de um levantamento da biodiversidade em área de manguezal do município de Cananéia, São Paulo (Booth 1979, Ulken 1966, 1970).

1.6. Preservação de Labyrinthulomycota

Devido ao potencial biotecnológico encontrado nos Thraustochytriales, um método de preservação eficaz se torna necessário para posteriores estudos, exploração biotecnológica e desenvolvimento comercial de seus produtos.

Sabe-se que para o crescimento destes isolados não é necessária luz, sendo a temperatura ótima de crescimento para a maioria em torno de 25 °C (Burja *et al.* 2006, Fan *et al.* 2002, Rosa 2010, Yokochi *et al.* 1998). Porém, os isolados de regiões polares, apresentam uma temperatura ótima de crescimento entre 0 e 9 °C, não proliferando em temperaturas maiores que 17 °C (Bahnweg & Sparrow 1974). Estudos também mostram que os níveis de salinidade ótimos para o crescimento variam de 50 a 100% da concentração da água do mar (15 a 35 g L⁻¹) (Fan *et al.* 2002), no entanto, alguns isolados podem crescer em salinidades bem baixas (2 g L⁻¹) (Burja *et al.* 2006), como os isolados provenientes de manguezal que mostram níveis ótimos de salinidade mais baixos e, em geral, uma tolerância mais ampla (Raghukumar 2008).

Atualmente, a maioria das grandes coleções de culturas mundiais de microrganismos utiliza a técnica de criopreservação ou congelamento a -80 °C. Alguns organismos pertencentes ao grupo Labyrinthulomycota são encontrados na coleção da “American Type Culture Collection” (ATCC), onde são preservados pelo método de congelamento a -80 °C ou liofilização (2 a 8 °C), juntamente com um agente crioprotetor não divulgado.

Sabe-se que uma das premissas mais importantes na criopreservação de um microrganismo é a composição do meio usado para suspender este durante o congelamento, sendo que a presença de uma substância crioprotetora apropriada reduz o dano celular e aumenta consideravelmente as chances de sobrevivência (Cañavate & Lubian 1995). Nos eucariotos, um dos aditivos

crioprotetores mais utilizado é o glicerol, mas também podem ser utilizados soros sanguíneos e dimetilsulfóxido (Me_2SO) (Hubálek 2003). O processo de congelamento e descongelamento também é muito importante para o sucesso do protocolo, sendo que o congelamento lento ($1\text{ }^\circ\text{C}$ por minuto) e o descongelamento rápido (banho-maria a $50\text{ }^\circ\text{C}$) minimizam as injúrias que ocorrem durante os dois processos (Cañavate & Lubian 1997, Day & Brand 2005).

Cox *et al.* (2009) testaram a viabilidade de três isolados marinhos de *Thraustochytrium* sp., depois de congelados por um mês em nitrogênio líquido juntamente com cinco combinações diferentes de três crioprotetores (glicerol, soro de cavalo e dimetilsulfóxido). Os isolados foram avaliados pela contagem de células ao longo de 10 dias, logo após a retirada do nitrogênio líquido (descongelados rapidamente a $50\text{ }^\circ\text{C}$, transferidos para meio líquido fresco e incubados a $20\text{ }^\circ\text{C}$). O melhor resultado foi obtido com a combinação de 10% de dimetilsulfóxido e 30% de soro de cavalo como crioprotetores. Os autores também concluíram que o congelamento através de fases controladas e o descongelamento por aquecimento, diminuíram os efeitos danosos da crioproteção dos isolados. Unagul *et al.* (2017) também testaram a utilização de diferentes agentes crioprotetores (dimetilsulfóxido; glicerol; “skim milk” + glicerol; soro de cavalo + dimetilsulfóxido; trealose + glicerol) na preservação, através de congelamento a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, de quatro traustoquítridias. Após seis meses de preservação, os isolados foram descongelados por imersão em água a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 minutos e plaqueados em meio sólido PYGs (1,25 g de peptona de carne, 1,25 g de extrato de levedura, 3 g de glicose, 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada). Os resultados mostraram que a viabilidade, com cada um dos agentes crioprotetores, variou conforme a espécie preservada. Para o espécime de *Parietichytrium sarkarianum* o melhor agente crioprotetor foi o glicerol (10%), proporcionando uma viabilidade de 61%, para os espécimes de *Aurantiochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp. e *Schizochytrium* sp. o melhor crioprotetor foi a mistura de trealose (5%) e glicerol (10%), proporcionando uma viabilidade de 29%, 21% e 60%, respectivamente.

Estudos na área de preservação com organismos do filo Labyrinthulomycota precisam ser continuados e são sempre necessários para futuras pesquisas com o grupo, sendo que, no caso dos Thraustochytriales, a potencialidade biotecnológica crescente faz com que a preservação seja uma questão essencial.

2. OBJETIVO GERAL

Devido à importância ecológica, potencialidade econômica e o escasso conhecimento dos representantes do filo Labyrinthulomycota no país, o presente estudo teve como objetivo geral realizar a identificação morfológica e molecular de espécimes coletados em um fragmento preservado de Mata Atlântica do estado de São Paulo, bem como quantificar os diferentes ácidos graxos produzidos por alguns dos espécimes brasileiros isolados.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Levantamento de espécimes de Labyrinthulomycota do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (SP);
- (ii) Ampliação do conhecimento do grupo no estado de São Paulo e no Brasil, com ênfase em Mata Atlântica;
- (iii) Identificação morfológica e molecular (região SSU do rDNA) dos espécimes;
- (iv) Análise do perfil de produção e quantificação de ácidos graxos de alguns dos espécimes;
- (v) Avaliação de diferentes métodos de preservação dos espécimes obtidos;
- (vi) Ampliação do acervo da CCIBt (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias do Instituto de Botânica) por meio da inclusão de espécimes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso – PEIC ($25^{\circ}03'05''$ - $25^{\circ}18'18''$ S e $47^{\circ}53'48''$ - $48^{\circ}05'42''$ W), fragmento preservado de Mata Atlântica administrado pela Instituto Florestal (Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). O parque ocupa uma área de aproximadamente 22.500 ha (Ab'Saber 1977, Negreiros *et al.* 1974) dentro da Ilha do Cardoso, a qual está localizada no extremo sul do litoral de São Paulo, no município de Cananéia (Figura 5).

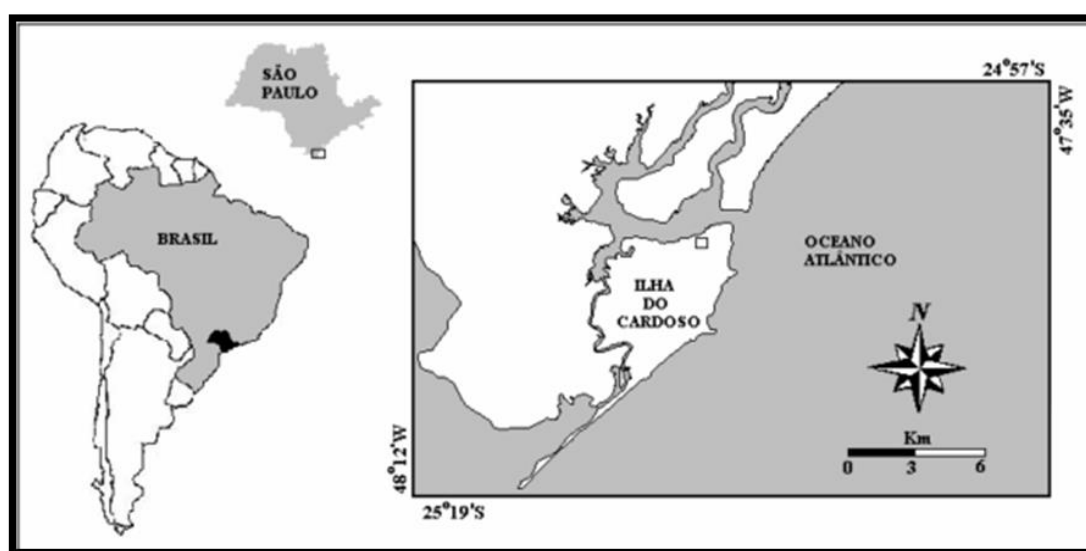


Figura 5. Localização da Ilha do Cardoso (Imagem: Gomes *et al.* 2007)

A ilha possui predominantemente topografia montanhosa, podendo ser dividida em dois diferentes compartimentos: planícies costeiras que margeiam a ilha e relevo montanhoso visto nas partes centrais e norte (Campos 2009). O clima da região é classificado como megatérmico superúmido, sem estação seca definida e com temperatura média anual de $21,2^{\circ}\text{C}$. A ilha faz parte do complexo estuarino lagunar de Iguape-Cananéia-Paranaguá, com 600 km^2 de manguezal, sendo

considerado o terceiro estuário do mundo em relação à produtividade primária (Barros *et al.* 1991, Bernardi *et al.* 2005, Funari *et al.* 1987). A vegetação da ilha é extremamente diversa, ocorrendo em sua extensão praticamente todas as formas de fisionomias vegetais características da faixa costeira de Mata Atlântica, como: 1) vegetação de mangue, 2) vegetação de restinga, 3) vegetação pioneira de dunas, 4) floresta tropical pluvial de planície litorânea e 5) floresta pluvial da Serra do Mar. Em adição a estas formações, há ainda a formação arbustiva de topos e as decorrentes da ação do homem, que podem ser tratadas conjuntamente como “vegetação secundária” (Barros *et al.* 1991). O sistema de drenagem local é do tipo radial, com rios que desaguam diretamente no mar, sendo um dos principais rios o Perequê (Barros *et al.* 1991), um rio de grande extensão que corta todo o PEIC. O manguezal da região classifica-se como Mangue Vermelho de Franja pela dominância das árvores de *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho), que é seguida por *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (mangue branco) e *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke (mangue preto) (Souza *et al.* 2006).

O PEIC é banhado pelo Oceano Atlântico e pelo Canal do Ararapira e participa de quatro projetos governamentais distintos de proteção ambiental, Projeto de Preservação da Mata Atlântica, Reserva da Biosfera, Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro e APA (área de proteção ambiental) Cananéia- Iguape- Peruíbe. Dois núcleos localizados dentro do PEIC foram escolhidos para o presente estudo, Núcleo Perequê e Núcleo Marujá. No Núcleo Perequê (**Figura 6**) foram realizadas a grande maioria das coletas, onde a facilidade de acesso, a existência de um centro de pesquisa científica e o controle de visitação, foram os principais norteadores. Por outro lado, o Núcleo Marujá (**Figura 6**), localizado mais ao sul da Ilha, diferentemente do Núcleo Perequê, é mais povoado e o principal destino de ecoturistas.

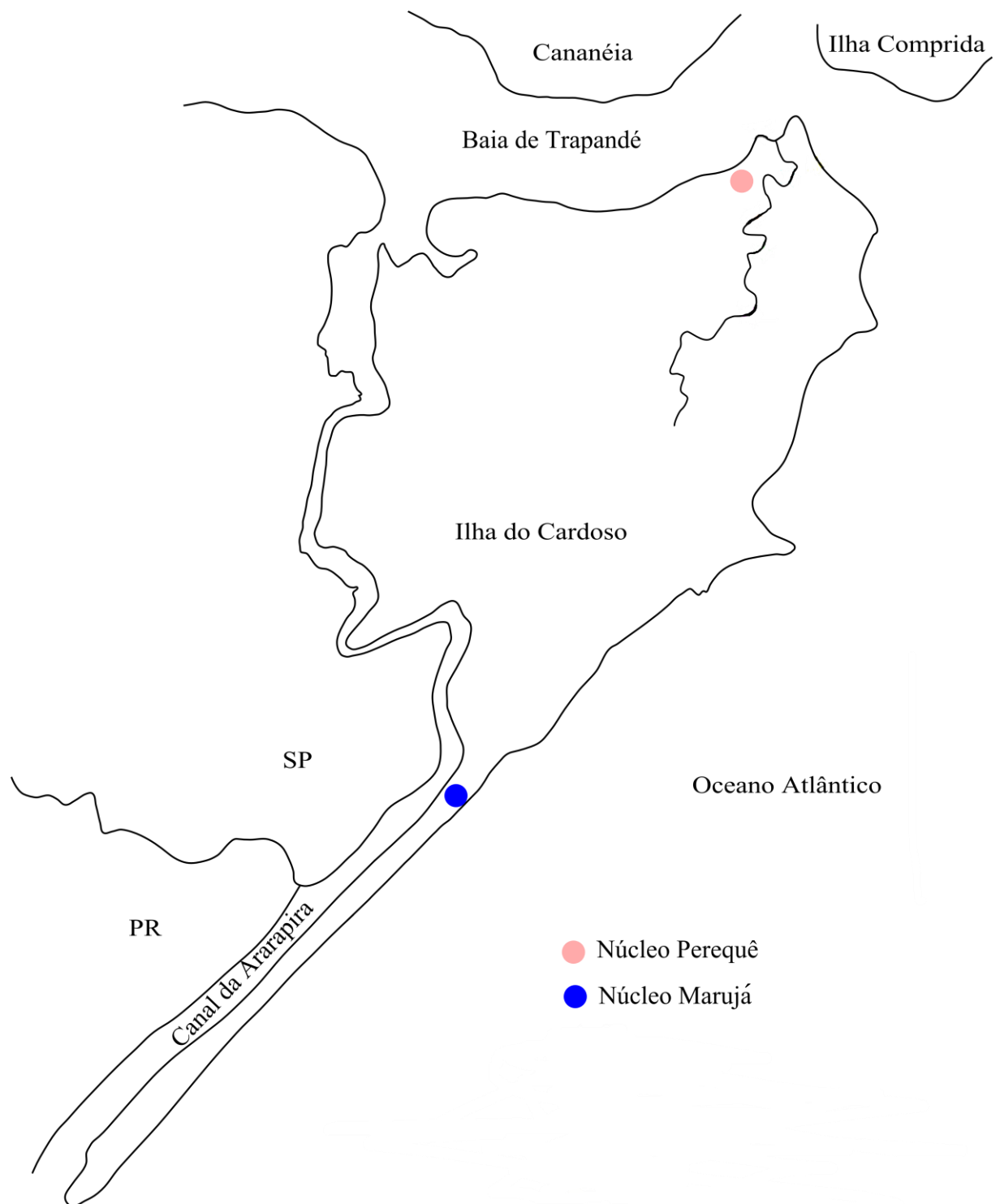


Figura 6. Localização dos Núcleos Perequê e Núcleo Marujá no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC)

4.2. Coletas

Para o estudo foi utilizado material proveniente de seis coletas, as quais foram realizadas em agosto/novembro de 2012, fevereiro/junho de 2013 e março/setembro de 2015, com amostragem em área de manguezal e áreas litorâneas (praia) do Núcleo Perequê, em uma lagoa salina próxima ao Rio Perequê e em áreas pertencentes ao Núcleo Marujá, visando uma ampla amostragem e a obtenção de uma maior diversidade em espécies (**Figura 7**).

Os locais de amostragem foram selecionados a partir da mensuração da salinidade, a qual foi realizada com o auxílio de um equipamento multiparâmetros U10/U51 da Horiba, considerando-se salinidades variadas, desde água praticamente doce (0,05% de salinidade) até água marinha (3% de salinidade). Também foi mensurada, em cada local escolhido para coleta, a temperatura (°C) da água, por meio do mesmo equipamento.

Em cada um dos locais de amostragem foram coletadas amostras de água e de folheto submerso de *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), *Laguncularia racemosa* (mangue branco) e, quando presente, de *Avicennia schaueriana* (mangue preto) (**Figura 8**). Estas espécies vegetais foram selecionadas por serem as mais frequentes nesta área de manguezal (Souza *et al.* 2006) e estarem bem representadas no folheto submerso, além de conterem diferentes composições químicas (Oliveira 2009).

As amostras de água coletadas foram acondicionadas em frascos de polietileno de 500 mL, e as de folheto em sacos plásticos tipo “ziplock” (aproximadamente 400 g) e umedecidas com água do local (**Figura 9**). Todas as amostras coletadas foram transportadas para o laboratório numa caixa térmica para evitar a dessecação e o aumento excessivo da temperatura.



Figura 7. Locais de amostragem no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Início do rio Perequê; B – Manguezal do rio Perequê; C – Praia do Núcleo Perequê; D – Caminho até o Núcleo Marujá

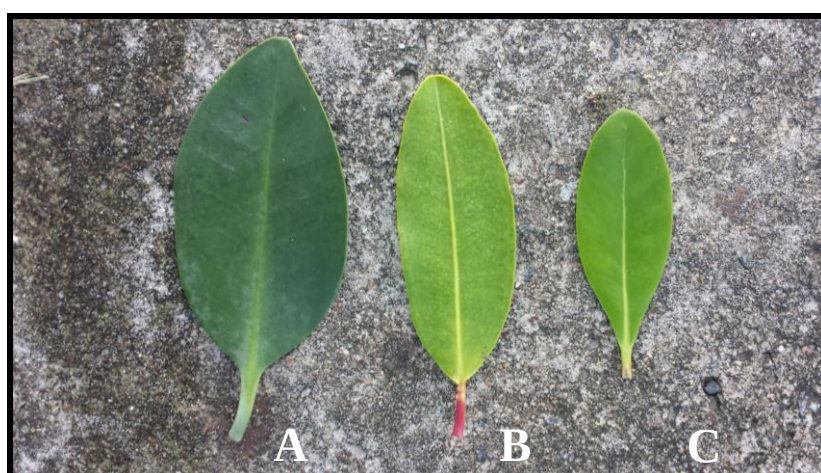


Figura 8. Espécies vegetais de mangue coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – *Rhizophora mangle* L.; B – *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.; C – *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke

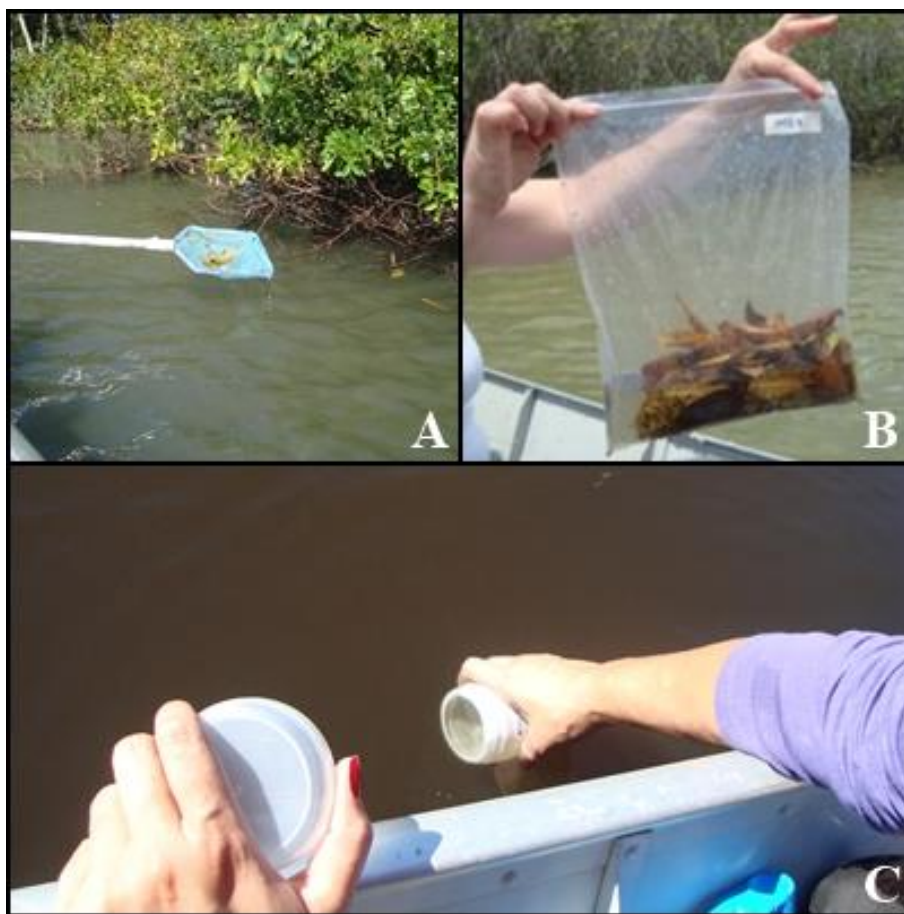


Figura 9. Coleta de amostras no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Coleta de folheto submerso; B – Acondicionamento do folheto submerso; C – Coleta de água

4.3. Iscagem e isolamento dos representantes de *Labyrinthulomycota*

No laboratório, alíquotas de 30 mL das amostras de água, de cada um dos locais de coleta, foram colocadas em placas de Petri e iscadas, separadamente, com sementes de *Sorghum* spp. (sorgo), discos (0,5 cm de diâmetro) de epiderme de *Allium cepa* (cebola), discos (0,5 cm de diâmetro) de ecdise de cobra e grãos de pólen de *Pinus* sp., seguindo a metodologia de Sparrow (1960) e de Milanez (1989), sendo que para cada local de coleta foram preparadas triplicatas de placas com as diferentes iscas.

As folhas coletadas em cada local foram triadas considerando cada espécie vegetal, e cortadas em discos de 0,5 cm de diâmetro com furador de rolha. Após o corte, as folhas foram lavadas por cinco vezes com água do mar filtrada estéril diluída a 50% com água destilada (salinidade aproximada de 1,5%), para retirar o sedimento depositado nas mesmas (**Figura 10**). Cinco discos de cada espécie vegetal foram colocados em placas de Petri com 30 mL de água do mar filtrada estéril diluída a 50% com água destilada estéril (salinidade aproximada de 1,5%), e iscados da mesma forma e com os mesmos substratos utilizados nas amostras de água. Outros cinco discos de cada espécie vegetal foram colocados na superfície de meio de cultura sólido PYGs (1,25 g de peptona de carne, 1,25 g de extrato de levedura, 3 g de glicose, 12 g de ágar, 500 mL de água do mar filtrada e 500 mL de água destilada - salinidade aproximada de 1,5%) com os antibióticos penicilina G e sulfato de estreptomicina ($0,4 \text{ g L}^{-1}$ de cada antibiótico), adicionados após a autoclavagem do meio (Fuller & Jaworski 1987) (**Figura 10**). Todas as placas foram incubadas em sala climatizada com temperatura de aproximadamente 21 °C.

Após a incubação das amostras por sete a 15 dias, lâminas foram preparadas das iscas e das colônias crescidas em meio de cultura, e observadas sob microscópio óptico. As iscas e as colônias que apresentaram a presença de organismos pertencentes ao filo Labyrinthulomycota foram transferidas para novas placas com água do mar filtrada estéril diluída a 50% com água destilada estéril (salinidade aproximada de 1,5%) e novas iscas e/ou para novas placas com meio de cultura sólido PYGs. Após crescimento, os organismos foram purificados através de repicagens periódicas e preservados, no mesmo meio, em ambiente climatizado com temperatura de aproximadamente 21 °C até identificação.

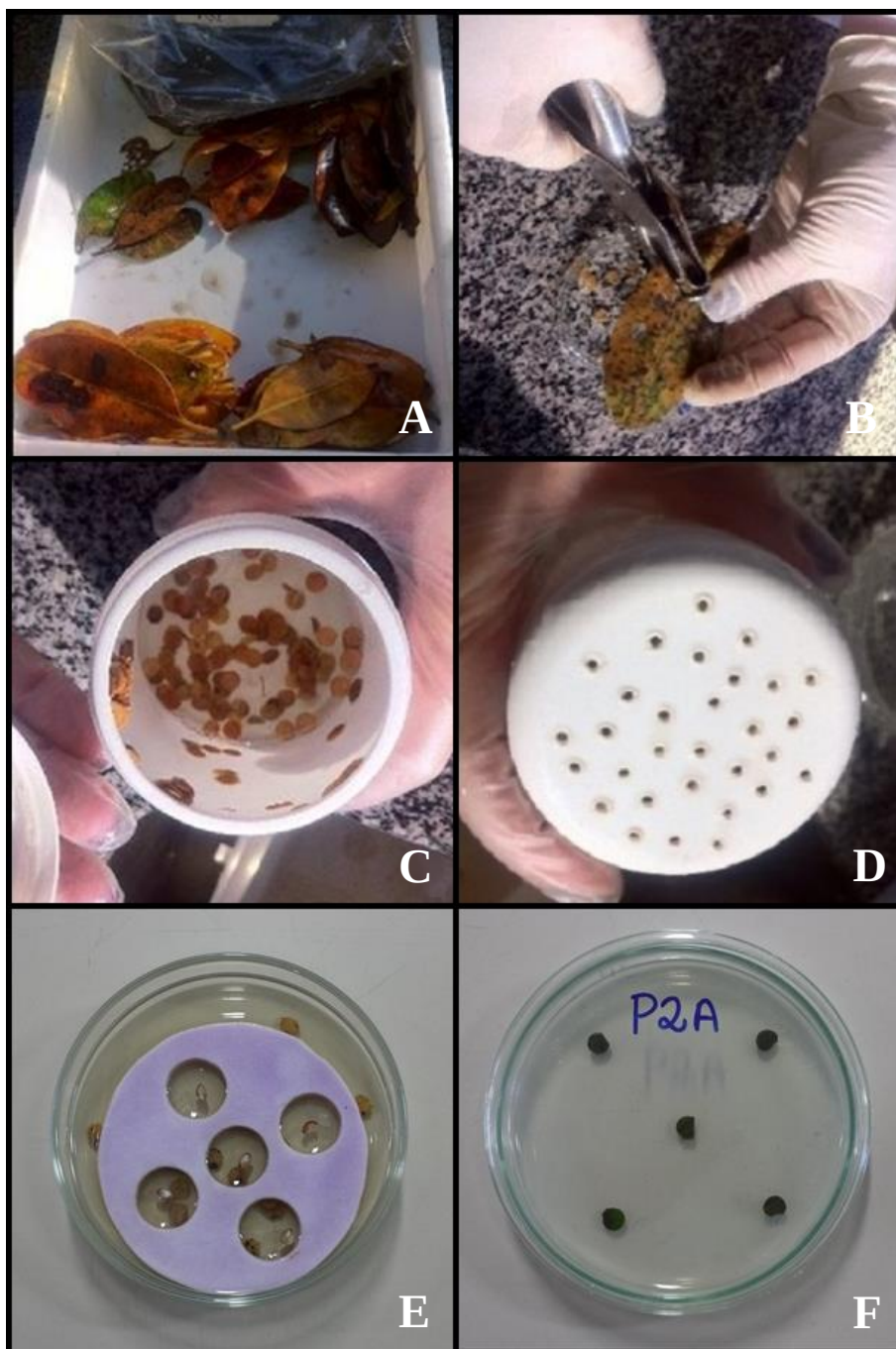


Figura 10. Processamento das amostras coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC). A – Triagem das folhas; B – Corte das folhas; C e D – Lavagem das folhas; E – Iscagem; F – Isolamento direto em meio de cultura PYGs

4.4. Identificação morfológica dos espécimes

A identificação dos espécimes foi conduzida com base no preparo de lâminas de culturas puras, observação de características morfológicas microscópicas de valor taxonômico (tamanho e forma das células vegetativas; divisão e arranjo celular; tamanho e forma dos zoosporângios; produção, quantidade e forma de liberação de zoósporos) sob microscópio óptico e consulta de literatura específica e descrição original das espécies (Bongiorni *et al.* 2005, Cienkowski 1867, Gaertner 1972, 1977, Goldstein 1963, Goldstein & Belsky 1964, Honda *et al.* 1998, Johnson & Sparrow 1961; Karling 1981, Kobayashi & Ookubo 1953, Konno 1972, Leander 2001, Leander & Porter 2000, Leander *et al.* 2004, Leaño & Damare 2012, Porter 1989, Raghukumar 1988, Rosa *et al.* 2006, Schneider 1967, Scholz 1958, Sparrow 1936, 1960, Ulken 1990), além da forma de crescimento e coloração das culturas no meio de cultura sólido utilizado. Os táxons obtidos foram mensurados e documentados por meio de equipamento e software de captura de imagem Leica Qwin V3 (Leica Microsystems). As fotografias foram expostas em formato de pranchas confeccionadas por meio do programa PhotoImpact® XL SE (Ulead®).

4.5. Identificação molecular dos espécimes

Para corroborar com a caracterização morfológica dos táxons e para a inclusão de sequências no banco de genes (GenBank), foi realizada a caracterização molecular da região SSU (18S) do rDNA. Esta região foi escolhida por ser a mais frequentemente analisada por especialistas no grupo (Anderson & Cavalier-Smith 2012, Bongiorni *et al.* 2005, Burja *et al.* 2006, Craven *et al.* 2005, Damare 2015, Fan *et al.* 2009, Kobayashi *et al.* 2011, Leander 2001, Leander & Porter 2001, Leander *et al.* 2004, Li *et al.* 2009, Pan *et al.* 2017, Sullivan *et al.* 2016, Yang *et al.* 2010, Yokoyama & Honda 2007, Yokoyama *et al.* 2007) e, conseqüentemente, possuir um maior número de sequências disponíveis no GenBank para comparação.

4.5.1. Produção de biomassa

A produção de biomassa para obtenção de DNA genômico foi realizada por meio do crescimento do isolado na superfície do meio de cultura sólido PYGs com os antibióticos, já citados anteriormente, durante 5 a 7 dias, a aproximadamente 21 °C, e posterior raspagem das colônias com o auxílio de uma alça de platina. Deste modo, de forma asséptica, as colônias foram inseridas em microtubos Eppendorf® para dar início às etapas de extração do DNA genômico.

4.5.2. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico dos espécimes foi realizada com o “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen®) da seguinte forma: para a lise de células e tecidos foram adicionados 180 µL de tampão de digestão e 20 µL de proteinase K aos microtubos contendo os *pellets* de biomassa. O material de cada microtubo foi macerado com um pistilo e incubado em um termobloco (Kasvi®) a 55 °C durante 1 h para a completa lise das células e liberação do DNA. Após este procedimento foram realizadas as etapas consecutivas para a ligação, lavagem e a eluição do DNA com 50 µL de tampão de eluição através das colunas de purificação do kit (“PureLink Spin Columns”) para a obtenção de DNA genômico purificado. A quantificação e/ou qualidade do DNA extraído foi realizada com o auxílio do aparelho e software quantificador I-Quant v.2.0.0 (Loccus Biotecnologia®) ou através de eletroforese em 75 mL de gel de agarose a 1% (p/v), corado com 3,5 µL de “GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000x in water” (Biotium®), submerso em tampão TBE 1x. No gel de agarose foi aplicado 10 µL de “E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder” (Invitrogen®) no primeiro poço e 2 µL de DNA extraído + 2 µL de “Gel Loading solution, Type I, 6x” (Sigma®) nos poços seguintes. A eletroforese foi realizada em “Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System” (Bio-Rad) acoplado a uma fonte “PowerPac Basic Power Supply” (Bio-Rad) ajustada para 100 V durante 40 minutos e a visualização do gel foi realizada em um

transiluminador UV (Kasvi®). Após a extração, o DNA genômico foi armazenado em freezer comum (aproximadamente -20 °C) para posterior realização das etapas seguintes.

4.5.3. Amplificação e purificação da região SSU do rDNA

A região SSU (18S) do rDNA foi amplificada por PCR utilizando-se o “PCR Supermix kit” (Invitrogen®) ou o “Ready Mix Taq PCR Reaction Mix” com MgCl₂ (Sigma-Aldrich®), sempre para um volume final de 25 µl em microtubos de 200 µL, sendo: 22,5 µL do “mix” utilizado, 0,75 µL de cada *primer* na concentração de 10 µmol L⁻¹ e 1 µL de DNA genômico. Os microtubos foram incubados em um termociclador “C1000 Touch™ Thermal Cycler” (Bio-Rad) onde foram utilizados os seguintes programas, indicado na literatura para cada *primer* listado a seguir:

1) *Primer forward* QPX-F e *primer reverse* QPX-R2 (Liu *et al.* 2009, Qian *et al.* 2007). O programa do termociclador para a amplificação destes *primers* por PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos, e extensão final de 72 °C durante 10 minutos (Qian *et al.* 2007), sendo a manutenção a 12 °C (∞).

2) *Primer forward* 16S1N e *primer reverse* 16S2N (Chodchoey & Verduyn 2012). O programa do termociclador consistiu de uma desnaturação inicial de 94 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos, e extensão final de 72 °C durante 5 minutos (Chodchoey & Verduyn 2012), sendo a manutenção a 12 °C (∞).

3) *Primer forward* 16S1N (Chodchoey & Verduyn 2012) e *primer reverse* NS4 (Craven *et al.* 2005, White *et al.* 1990). Para os *primers* citados o programa do termociclador utilizado consistiu de uma desnaturação inicial de 95 °C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minutos, e extensão final de 72 °C durante 5 minutos (Craven *et al.* 2005), sendo a manutenção a 12 °C (∞).

4) *Primers forward* NSF370F e LAB83F e *primer reverse* LAB1017R (Chang *et al.* 2012, Siboni *et al.* 2010). O programa do termociclador para a amplificação por PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95 °C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos, e extensão final de 72 °C durante 20 minutos (Siboni *et al.* 2010), sendo a manutenção a 12 °C (∞).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese como descrita no tópico 4.5.2. O material amplificado foi armazenado em geladeira (5-8 °C) e posteriormente purificado com o “AxyPrep PCR Clean-up Kit” (Axygen®) utilizando-se 30 µL de tampão eluente e finalmente armazenado em freezer a -20 °C.

4.5.4. Sequenciamento da região SSU do rDNA

As primeiras amostras purificadas e amplificadas com os dois primeiros conjuntos de *primers* foram sequenciadas em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies™) instalado no CEGH-USP, Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, USP (<http://genoma.ib.usp.br>). Neste caso, para cada reação de sequenciamento foi enviado um microtubo de 200 µL contendo 5 µL de DNA amplificado e purificado (na concentração obtida) e 2,5 µL de cada *primer* na concentração de 5 µmol L⁻¹.

As amostras restantes (amplificadas com os *primers* 16S1N-16S2N e NSF370F/LAB83F-LAB1017R) foram sequenciadas em sequenciador 3500 xL Genetic Analyser (Applied Biosystems™), instalado no Instituto Biológico de São Paulo. Para aplicação das amostras no sequenciador utilizou-se a placa “MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate” (Applied Biosystems™), sendo que em cada uma das cavidades da placa preparou-se uma reação de sequenciamento (10 µL), onde foram incorporados 5 µL de DNA amplificado e purificado (na concentração obtida), 0,3 µL de apenas um *primer* na concentração de 10 µmol L⁻¹ (para cada *primer* faz-se uma reação diferente), 2,2 µL de água ultrapura (Milli-Q®), 1 µL de “BygDye

Terminator” e 1,5 µL de solução tampão (BygDye Terminator Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems™). Após o preparo da reação, a placa foi tampada, centrifugada e levada ao termociclador para uma nova PCR utilizando-se o seguinte programa: 95 °C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 50 °C durante 30 segundos e 60 °C durante 4 minutos, sendo a manutenção a 12 °C (∞) (BygDye Terminator Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems™). Ao retirar a placa do termociclador adicionou-se em cada reação 40 µL de isopropanol 75% e a placa foi agitada e centrifugada por 30 minutos a 4000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e a placa foi colocada em estufa a 37 °C por, aproximadamente, 15 minutos para total secagem do isopropanol. Após secas, cada reação recebeu 10 µL de formamida (Hi-Di™ Formamide) e a placa foi levada novamente ao termociclador por 2 minutos a 95 °C para desnaturação do DNA (BygDye Terminator Cycle Sequencing Kit - Applied Biosystems™) e posterior encaminhamento ao sequenciador.

4.5.5. Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando-se o programa Sequencher™ Version 4.1.4, para a realização dos “cortes” de suas extremidades, montagem dos *contigs*, correção de bases ambíguas de acordo com os cromatogramas e obtenção das sequências consenso.

Para a obtenção das sequências nucleotídicas de máxima identidade, as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizando-se a ferramenta de busca BLASTn (“Basic Local Alignment Search Tool”), sendo o critério considerado para a confirmação da identificação na base molecular de 100% de cobertura e 99-100% de identidade máxima, se em concordância com os dados morfológicos. Além da comparação das sequências com as disponíveis no banco de dados GenBank, a filogenia foi utilizada para auxílio na identificação dos isolados.

Para a construção da árvore filogenética, as sequências da região SSU do rDNA obtidas foram comparadas com as sequências dos representantes de Labyrinthulomycota depositadas no GenBank, usando duas sequências de *Ochromonas danica* E.G. Pringsheim como grupo externo (*outgroup*). Os alinhamentos múltiplos das sequências obtidas foram realizados por meio do programa on line MAFFT versão 7 (Kazutaka & Daron 2013) e a correção do alinhamento e eliminação de regiões ambíguas no programa Geneious versão 8.0.5 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.* 2012). O melhor modelo de substituição foi selecionado usando o “Akaike Information Criterion” em jModeltest 0.1.1 (Posada 2008) e as análises filogenéticas pelo método de máxima verossimilhança e a geração da árvore foram conduzidas através do programa PhyML 3.1 (Guindon & Gascuel 2003), utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos gerado anteriormente e suporte para o modelo de *bootstrap* (%) obtidos com 1000 pseudo-réplicas.

4.6. Produção de ácidos graxos

Devido ao histórico dos representantes de Thraustochytriales como excelentes produtores de ácidos graxos, foram selecionados alguns dos isolados, obtidos neste estudo, para verificação do perfil de produção destes compostos. Para tal, primeiramente foi realizada a produção de biomassa de duas formas diferentes, para dois diferentes ensaios: 1) Perfil de produção e quantificação de ácidos graxos dos isolados; 2) Produção dos principais ácidos graxos, com os isolados que apresentaram os melhores resultados no ensaio anterior, considerando diferentes tempos de crescimento e diferentes temperaturas finais de cultivo. Após a produção da biomassa foi realizada a extração e quantificação dos ácidos graxos produzidos.

4.6.1. Produção de biomassa

4.6.1.1. Perfil de produção e quantificação de ácidos graxos

Para a análise do perfil de produção e quantificação dos ácidos graxos foram utilizados 25 isolados e a produção de biomassa foi realizada através da inoculação dos espécimes, previamente cultivados em meio sólido PYGs, em frascos erlenmayer de 250 mL com 50 mL de meio PYGs líquido ($1,25 \text{ g L}^{-1}$ de peptona de carne, $1,25 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, 3 g L^{-1} de glicose em água do mar filtrada estéril diluída a 50% com água destilada estéril - salinidade aproximada de 1,5%) (**Figura 11**). Para cada isolado foi realizada seis réplicas de crescimento, visando uma quantidade significativa de biomassa. Após a inoculação, os frascos foram mantidos por dois dias em temperatura ambiente e sem agitação, para verificação de possíveis contaminações por bactéria e/ou fungos. Depois deste período, foram colocados sob agitação (200 rpm) em mesa agitadora, durante duas semanas (período em que se observou uma produção adequada de biomassa) em temperatura de 25°C conforme metodologia de Yang *et al.* (2010).

Após o crescimento dos isolados, os frascos foram retirados do agitador e armazenados em geladeira (10°C) por 24 horas para decantação das células e, assim, descarte do meio sobrenadante. O restante do conteúdo dos frascos (meio e células) foi transferido para tubos Falcon® de 15 mL e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, para a separação total da biomassa do sobrenadante, o qual foi descartado. A biomassa produzida em cada dois frascos foi concentrada em um tubo e o conteúdo de cada tubo foi lavado através de agitação e centrifugação (3000 rpm por 15 minutos) com água destilada estéril. Este procedimento de lavagem das células foi repetido por três vezes seguindo-se a metodologia de Fan *et al.* (2001).

Os *pellets* de biomassa obtidos nos três tubos foram congelados em freezer frost-free, liofilizados por aproximadamente quatro dias e novamente estocados em freezer para posterior extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos (**Figura 12**).

4.6.1.2. Produção dos principais ácidos graxos em menor tempo de crescimento e em diferentes temperaturas finais de cultivo

Para este ensaio foram selecionados cinco isolados, levando-se em consideração a melhor produção de biomassa e dos principais ácidos graxos (DHA e PA) no ensaio anterior. Foram testados um menor tempo de crescimento do isolado e uma menor temperatura no último dia de cultivo. A escolha do menor tempo de crescimento levou em consideração resultados de trabalhos de otimização que visaram uma maior produção de ácidos graxos (Fan *et al.* 2001, 2007, Manikan *et al.* 2014, Yokochi *et al.* 1998) e a escolha da menor temperatura no último dia de cultivo baseou-se em trabalhos que relataram que, apesar da temperatura de cultivo ideal ser em torno de 25 °C (Burja *et al.* 2006, Kumon *et al.* 2002, Perveen *et al.* 2006, Rosa 2010, Yokochi *et al.* 1998), as baixas temperaturas estimulam a produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, dentre eles o ácido docosahexaenoico (DHA) (Huang *et al.* 2003, Jain *et al.* 2004, Sakata *et al.* 2000, Singh *et al.* 1996).

A produção de biomassa foi realizada também por meio da inoculação dos espécimes, previamente cultivados em meio sólido PYGs, em frascos erlenmayer de 250 mL com 50 mL de meio PYGs líquido (**Figura 11**). Para cada isolado foram realizadas 30 réplicas de crescimento (15 frascos para cada temperatura final), visando uma quantidade significativa de biomassa. Após inoculação, os frascos foram colocados sob agitação (200 rpm) em mesa agitadora, durante 3 dias (72 horas), em temperatura de 25 °C. No quarto dia, os frascos foram retirados do agitador e divididos em dois grupos, cada grupo armazenado em uma temperatura diferente: 1) o primeiro grupo (15 frascos) foi mantido em BOD na temperatura de 25 °C sem agitação por mais 44 horas e; 2) o segundo grupo (15 frascos) foi mantido em geladeira na temperatura de 10 °C, também sem agitação por mais 44 horas. Após este período, o conteúdo dos frascos, submetidos a cada temperatura final, foi transferido para tubos tipo Eppendorf® de 10 mL e estes foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos, para que o sobrenadante fosse descartado. A biomassa produzida por

cada cinco frascos foi concentrada em um tubo e o conteúdo de cada tubo foi lavado através de agitação e centrifugação (3000 rpm por 15 minutos) com água destilada estéril. Este procedimento de lavagem das células foi repetido por três vezes.

Os *pellets* de biomassa obtidos nos três tubos foram congelados em freezer frost-free, liofilizados e novamente estocados em freezer para posterior extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos (**Figura 12**).

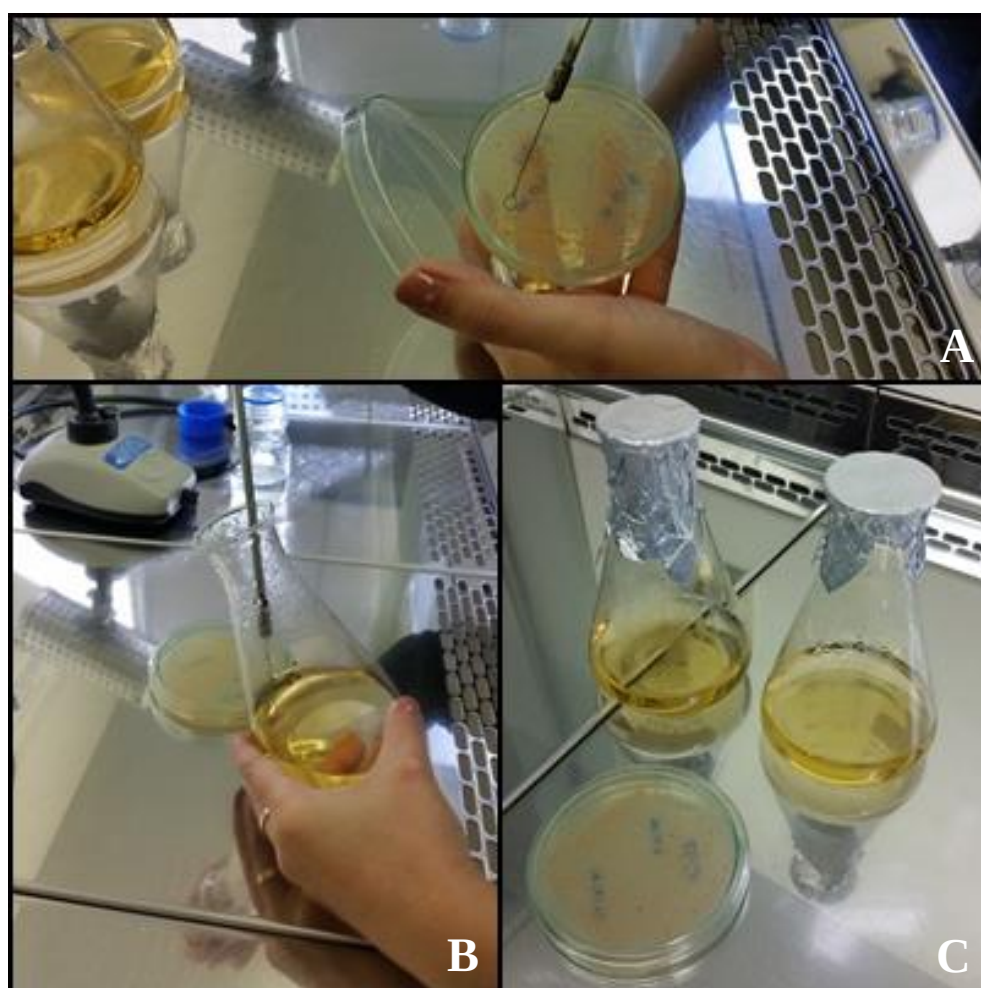


Figura 11. Inoculação dos isolados de Thraustochytriales, em meio de cultura líquido PYGs, para a produção de biomassa utilizada na extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos. A – Raspagem das células crescidas em meio de cultura sólido PYGs; B e C – Inoculação do isolado no meio líquido PYGs

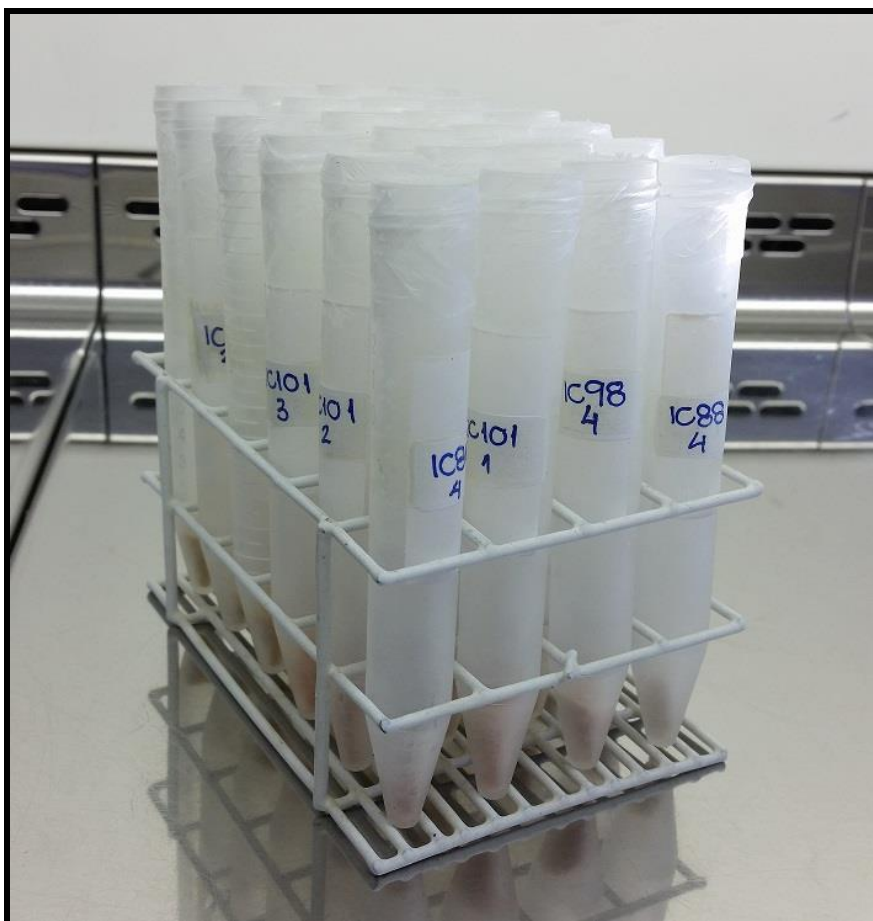


Figura 12. Biomassa liofilizada, dos isolados de Thraustochytriales, para extração de lipídios totais e quantificação de ácidos graxos

4.6.2. Extração e quantificação de ácidos graxos

A extração dos lipídios totais dos isolados selecionados foi realizada por meio de três etapas seguindo a metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959): 1) Rompimento das células; 2) Separação entre o conteúdo polar (proteínas, glicose, etc.) da célula e o conteúdo apolar (lipídios); 3) Retirada da fase apolar e posterior secagem em atmosfera de nitrogênio. Para a realização destas etapas foram pesadas 100 mg de biomassa seca e liofilizada de cada isolado (em triplicata) e para cada biomassa foi adicionado 0,6 mL de tampão PBS (pH 7,4), 38 μL da solução contendo o padrão interno (C13:0, T3882 Sigma), composto por 5 mg mL^{-1} de tritridecanoína em hexano, 1,5 mL de metanol e 0,75 mL de clorofórmio com BHT (antioxidante) a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O conteúdo foi agitado

em vortex por 30 segundos e após agitação foram adicionados 0,75 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água ultrapura (Milli-Q®). A mistura foi novamente agitada em vortex por 1 minuto e depois centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos (na temperatura de 4 °C). Após a centrifugação, a fase de baixo (apolar/clorofórmica) foi recuperada, filtrada em filtro 0,45 µm (Merck Millipore), e seca em atmosfera de nitrogênio (N₂). Após a secagem, o conteúdo de lipídios totais foi determinado gravimetricamente (**Figura 13**).

Para a análise dos ácidos graxos, o extrato lipídico foi transesterificado para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; fatty acid methyl ester). Para tal, foram adicionados 1 mL de BF₃ (trifluoreto de boro, 7% em metanol) e 0,5 mL de tolueno ao extrato de lipídios totais seco. Os frascos foram lacrados com membrana e lacre de alumínio e mantidos à temperatura de 100 °C por 1 hora. Após o término da reação e o esfriamento até a temperatura ambiente, os lacres foram abertos e foi adicionado ao conteúdo 2,5 mL de H₂O e 1 mL de hexano para a extração dos FAMEs. O conteúdo foi misturado e, após separação das fases polar e apolar, a fase hexânica (parte de cima) foi retirada com micropipeta (200 µL) e colocada em uma seringa para nova filtração com filtro 0,45 µm (Merck Millipore) (**Figura 14**).

Em seguida, 100 µL dos FAMEs obtidos foram colocados em frascos específicos (vials com *insert*) (**Figura 15**) para serem analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), em coluna capilar de sílica fundida (VF-Wax, com dimensões de 30 m de comprimento, 0,25 mm de espessura e 0,25 µm de diâmetro interno do filme, Agilent). A temperatura de injeção foi de 220 °C, volume de 1 µL, no modo Split. O hélio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹, e a seguinte rampa de temperatura: temperatura inicial de 60 °C, com aumento de 5 °C por min, até 260 °C, mantidos por 10 min.

O padrão utilizado para a identificação dos picos foi o Supelco 37 47885-U (Sigma). Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção do padrão utilizado e/ou por comparação de seus espectros de massa com espectros da biblioteca (NIST) (**Figura 16**), e os FAMEs que não constavam no padrão e que apresentavam índice de similaridade abaixo de 90%

com os da biblioteca, não foram considerados. A quantificação dos FAMES foi feita através da equação da reta da curva padrão do respectivo FAME do padrão Supelco 37, em uma planilha Excel e, para os FAMES que não constavam no padrão Supelco 37, a quantificação foi realizada por meio de cálculos, considerando-se a concentração do padrão interno colocado na hora da extração (C13:0), uma vez que área do pico é proporcional a concentração de FAME (**Figura 17**).

As reações de extração de lipídios totais, transesterificação e a leitura em cromatógrafo CG para quantificação dos ácidos graxos foram todas realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

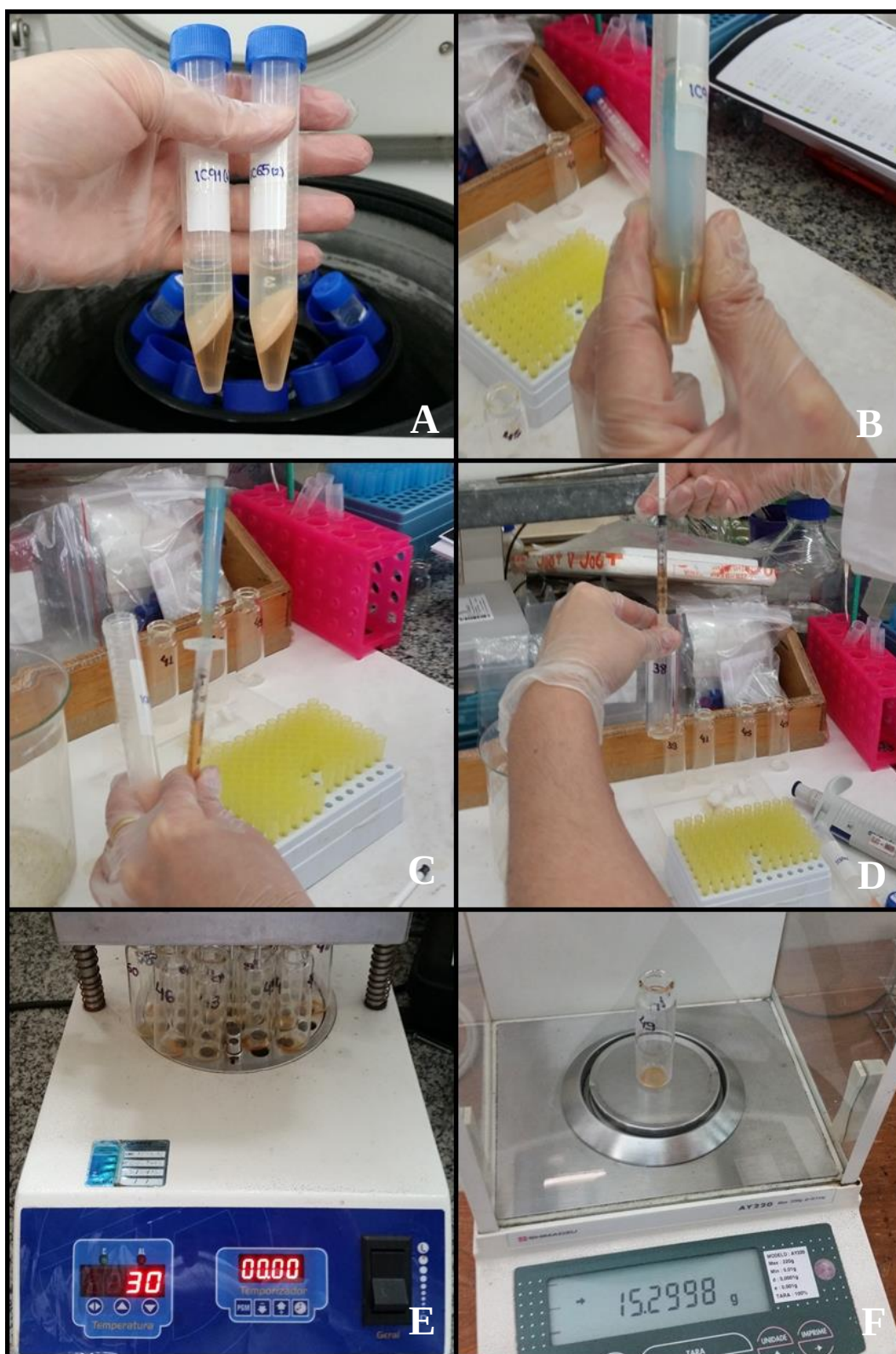


Figura 13. Extração de lipídios totais. A – Separação da fase clorofórmica após centrifugação; B – Recuperação da fase clorofórmica; C-D – Filtração da fase clorofórmica; E – Secagem da fase clorofórmica em atmosfera de nitrogênio (N_2); F – Pesagem para determinação dos lipídios totais



Figura 14. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; “fatty acid methyl ester”). A – Início da reação de transesterificação, frascos em banho-maria (100 °C) por 1 hora; B – Frascos esfriando após banho-maria; C-D-E – Separação e recuperação dos FAMES; F – Filtração dos FAMES

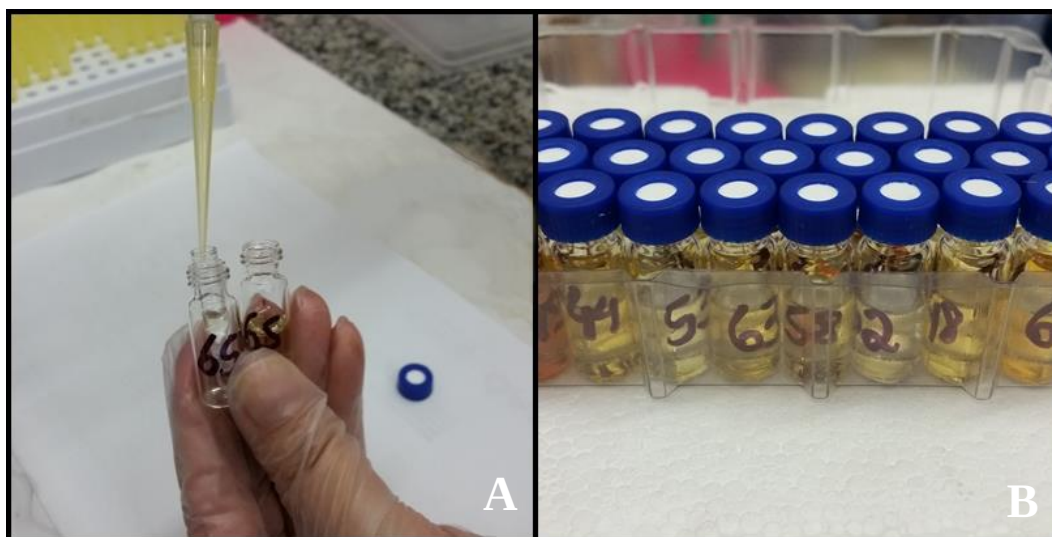


Figura 15. Frascos Vials utilizados para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A – Aplicação de 100 μ L dos FAMES no *insert* inserido no frasco Vial; B – Frascos Vials prontos para aplicação no CG-EM

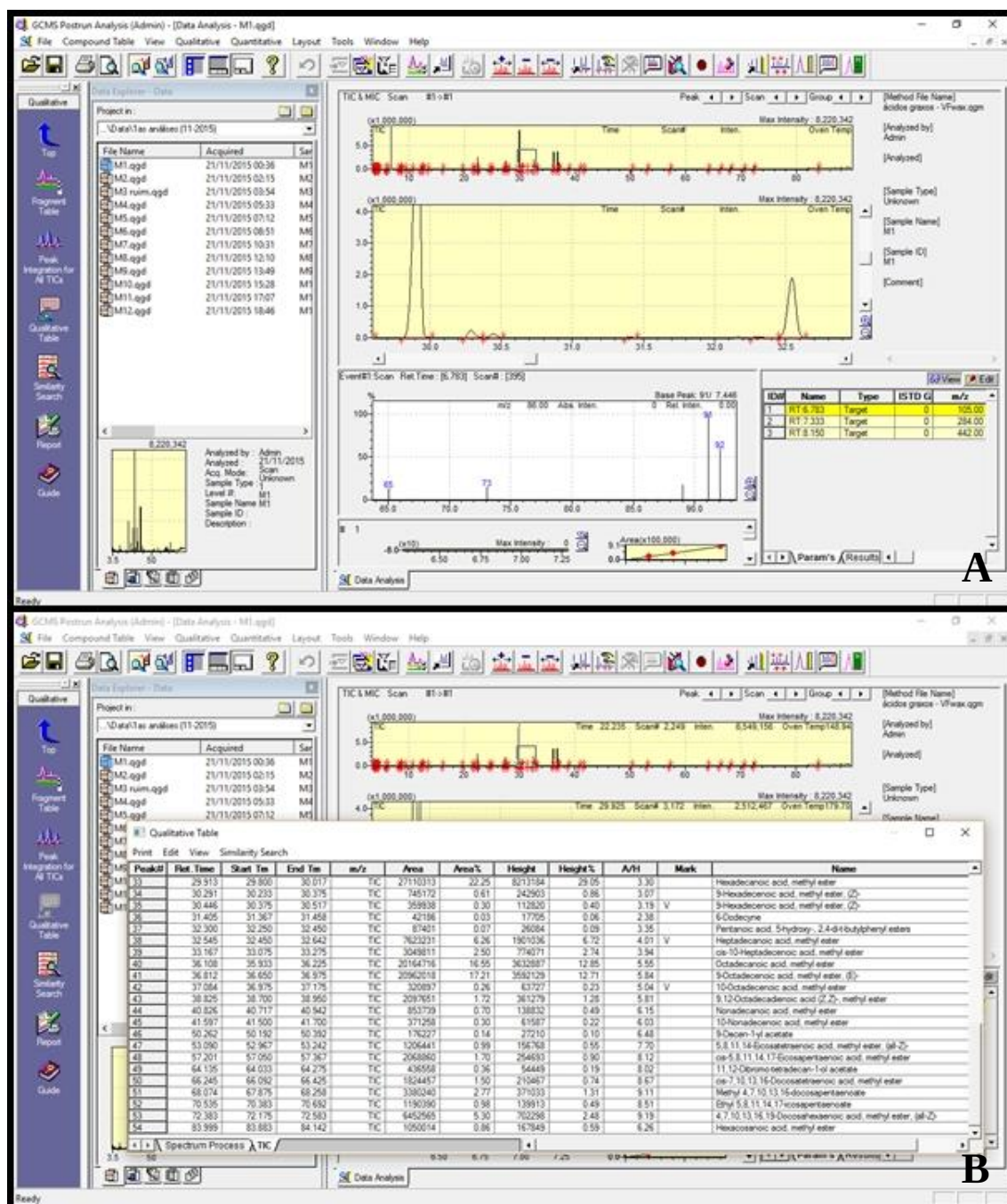


Figura 16. Identificação dos ácidos graxos. A – Picos mostrando os tempos de retenção dos ácidos graxos; B – Planilha dos ácidos graxos identificados por comparação de seus espectros de massa com os espectros da biblioteca do NIST

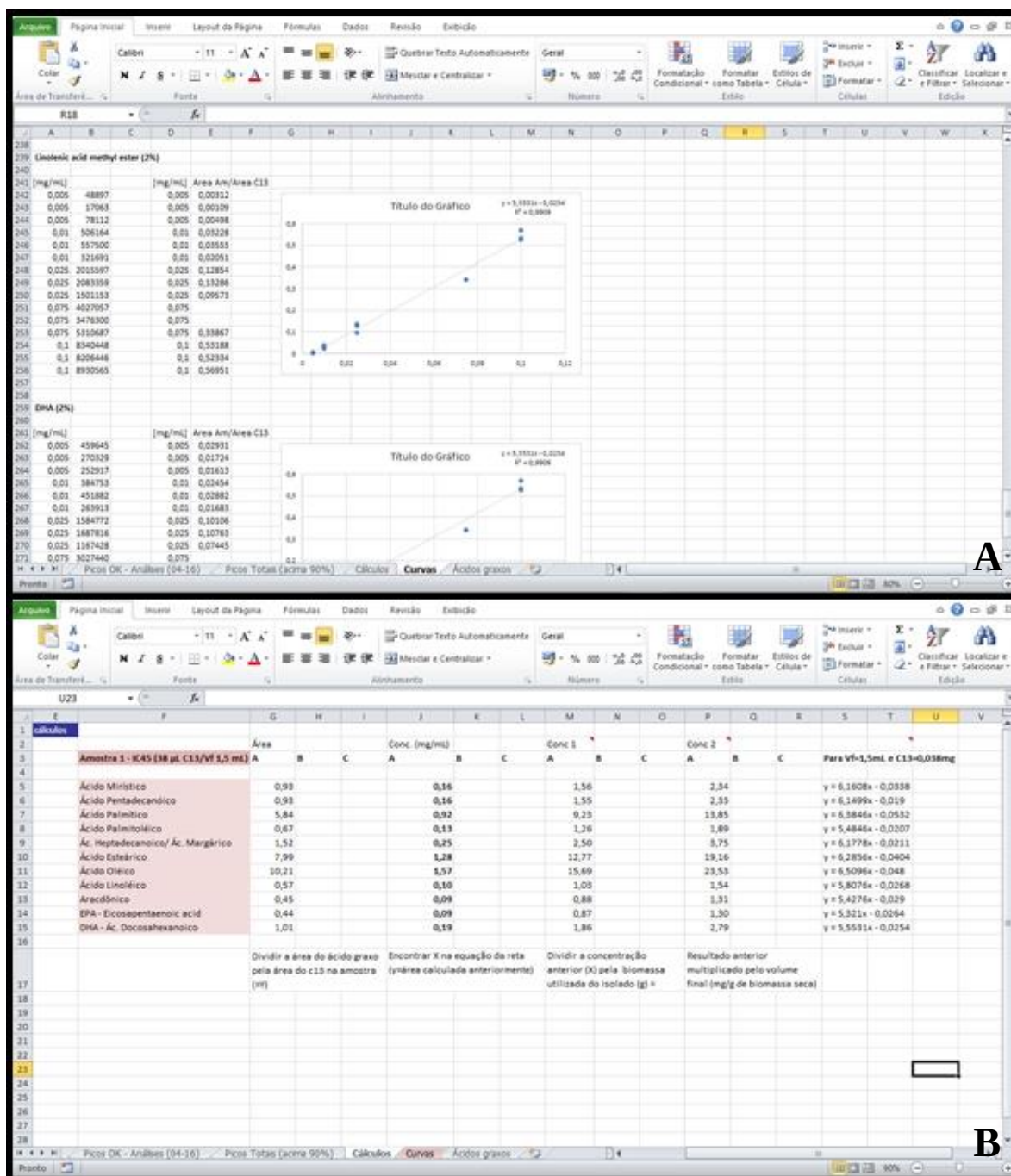


Figura 17. Quantificação dos ácidos graxos. A – Gráficos para confecção das equações da reta da curva padrão dos FAMES do padrão Supelco 37. B – Planilha de cálculos de quantificação dos ácidos graxos

4.6.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SigmaStat® versão 3.1. Para a comparação de produção de ácidos graxos, entre os isolados da mesma espécie, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%. Para a comparação de produção de ácidos graxos entre os dois tempos de crescimento e as duas temperaturas finais de cultivo, foi utilizado o teste de comparação de duas médias, Teste *t* de Student (Student 1908).

4.7. Métodos de preservação dos espécimes obtidos

Além da manutenção dos isolados purificados em meio de cultura PYGs, através de repicagem periódica (transferência do microrganismo para meios de cultura recém-preparados) de 15 em 15 dias, foram testados alguns outros métodos, descritos abaixo, de forma a facilitar e otimizar a preservação dos espécimes obtidos. Os métodos foram escolhidos visando uma preservação, além de efetiva, de baixo custo.

4.7.1. Preservação dos isolados pelo método de *Castellani*

O método de preservação em *Castellani* (Castellani 1939) tem sido eficiente para a manutenção da viabilidade de diferentes microrganismos (Aparecido & Figueiredo 1997, Boro & Figueiredo 2005, Boro *et al.* 2004, Figueiredo 1967, Passador *et al.* 2000). Este método consiste na transferência de pequenos discos ou pedaços de meio de cultura contendo estruturas do microrganismo para água estéril (aproximadamente 5 mL) contida em frasco tipo ampola (**Figura 18**). Para os isolados obtidos utilizou-se para armazenamento água do mar filtrada estéril diluída a 50% com água destilada estéril e a estocagem dos frascos foi feita em temperatura de

aproximadamente 17 °C. Foram testados por este método 10 isolados de *Thraustochytriales* e a reativação foi realizada após, no mínimo, um mês de preservação. Para reativação do microrganismo, os discos foram transferidos diretamente para placas de Petri contendo meio de cultura PYGs sólido e as placas mantidas em BOD na temperatura de 25 °C.



Figura 18. Preservação de isolados de *Thraustochytriales* pelo método de *Castellani*

4.7.2. Preservação dos isolados em meio de cultura líquido

Para o teste de manutenção em meio de cultura líquido, sete isolados de *Thraustochytriales* foram transferidos para tubos contendo o meio líquido PYGs e mantido em temperatura aproximada de 17 °C (**Figura 19**). A reativação dos isolados foi realizada após, no mínimo, um mês de preservação e para isto, transferiu-se uma pequena quantidade do meio líquido contendo o microrganismo para placas de Petri contendo meio de cultura sólido PYGs e estas placas foram mantidas em BOD na temperatura de 25 °C.

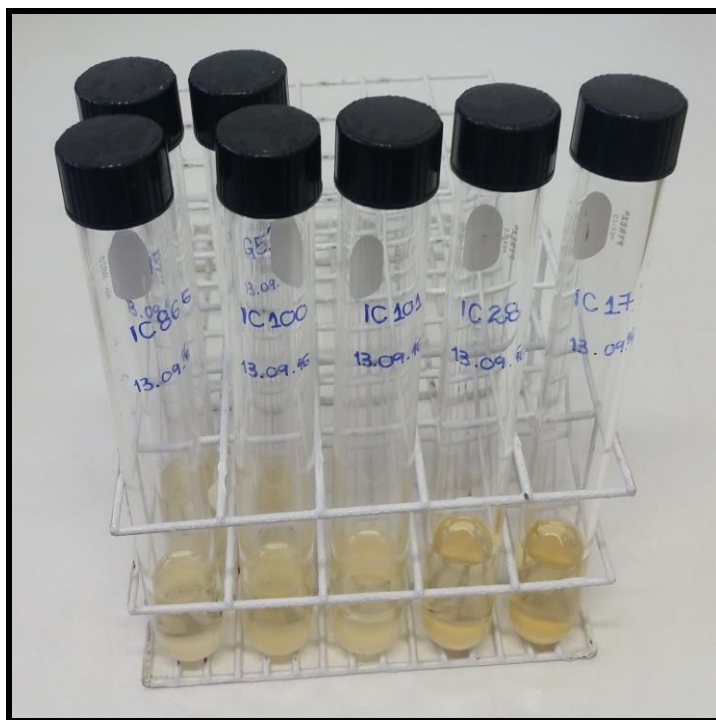


Figura 19. Preservação de isolados de Thraustochytriales em meio de cultura PYGs líquido

4.7.3. Preservação dos isolados em óleo mineral

O método de preservação em óleo mineral consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral estéril sobre uma cultura de microrganismo crescida em meio de cultura sólido apropriado, visando limitação da quantidade de oxigênio disponível, redução no metabolismo e consequentemente na taxa de multiplicação. O método tem apresentado bons resultados quanto à eficiência na manutenção da viabilidade de isolados fúngicos (Boro 2004, Boro *et al.* 2004, Figueiredo 2001, Sola *et al.* 2012). Para os isolados obtidos utilizou-se como meio de cultura o PYGs sólido, onde após o crescimento do isolado, este foi coberto por uma pequena camada de óleo mineral (**Figura 20**). Foram testados por este método 10 isolados de Thraustochytriales e a reativação foi realizada após, no mínimo, um mês de preservação. Para reativação do microrganismo, transferiu-se uma pequena quantidade do microrganismo coberto pelo óleo para placas de Petri contendo meio de cultura PYGs sólido e estas placas foram mantidas em BOD na temperatura de 25 °C.



Figura 20. Preservação de isolados de *Thraustochytriales* em óleo mineral

4.7.4. Preservação em papel filtro a -80 °C (ultrafreezer) e/ou a -20 °C (freezer frost-free)

Estudos recentes demonstraram a eficiência na preservação de isolados fúngicos em papel filtro mantido em ultrafreezer a -80 °C (Aparecido *et al.* 2013a, b). A preservação por este método é realizada da seguinte forma: inicialmente o isolado é colocado em placas de Petri com meio de cultura PYGs e, após sete dias, é preparada uma suspensão do isolado adicionando-se à placa um pequeno volume de água destilada estéril. Em seguida, tiras de papel filtro são colocadas em contato com a suspensão para que esta seja totalmente absorvida. Após absorção da suspensão, estas tiras são retiradas e colocadas em uma nova placa de Petri autoclavada (sem meio de cultura) e esta placa é mantida em estufa de secagem por aproximadamente sete dias a 30 °C. Após este período, uma tira do papel filtro é imediatamente colocada em placa de Petri com meio de cultura PYGs para verificação de sua viabilidade, e as tiras restantes são transferidas para microtubos Eppendorf® (**Figura 21**), os quais são armazenados em freezer frost-free (-20 °C) e, posteriormente, em freezer de ultracongelamento (-80 °C). Por este método foram testados sete isolados de *Thraustochytriales* mantidos em freezer de ultracongelamento, sendo que, os mesmos isolados e mais outros 13

(totalizando 20), também foram testados mantidos em freezer frost-free. A reativação de todos os isolados foi realizada após, no mínimo, um mês de preservação e, para tal, as tiras de papel filtro preservadas foram plaqueadas em meio PYGs (**Figura 22**) e incubadas durante aproximadamente sete dias em BOD a 25 °C.

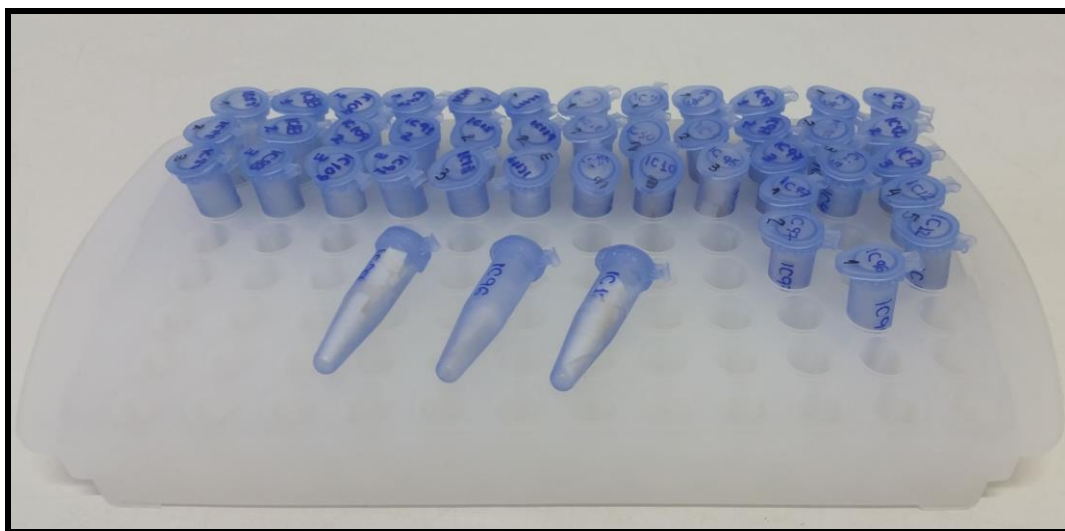


Figura 21. Preservação de isolados de Thraustochytriales em papel filtro a -80 °C e/ou a -20 °C

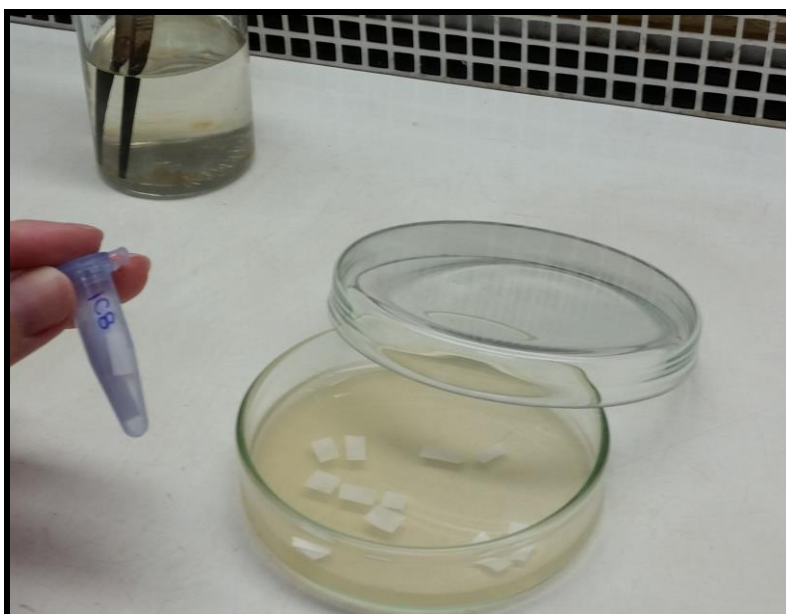


Figura 22. Revitalização dos isolados de Thraustochytriales preservados em papel filtro a -80 °C e/ou a -20 °C

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos fatores abióticos mensurados nos pontos de coleta

Os dados relativos aos valores dos fatores abióticos (temperatura e salinidade da água) mensurados nos pontos de coleta, durante o período de estudo, estão demonstrados na **tabela 3**.

Tabela 3. Fatores abióticos mensurados nos pontos de coleta dos Núcleos Perequê e Marujá do Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP (agosto de 2012 a setembro de 2015)

Coleta/Fatores	Locais	Temperatura (°C)	Salinidade (%)
1ª Coleta (agosto de 2012)	P1	19	0,05
	P2	20	0,72
	P3	21	1,62
	P4	21	2,91
	P5	22	3,00
	LS	19	2,50
2ª Coleta (novembro de 2012)	P1	25	0,10
	P2	27	0,79
	P3	27	1,67
	P4	27	2,17
	P5	27	2,72
	LS	24	1,35

*Pontos de coleta no núcleo Marujá; LS = Lagoa salina; Sd = sem dado

Coleta/Fatores	Locais	Temperatura (°C)	Salinidade (%)
3ª Coleta (fevereiro de 2013)	P1	24	0,06
	P2	26	0,78
	P3	27	1,35
	P4	28	2,46
	P5	28	2,62
	LS	26	1,04
4ª Coleta (junho de 2013)	P1	19	0,06
	P2	20	0,81
	P3	22	1,75
	P4	22	2,62
	P5	22	2,75
	LS	18	0,54
5ª Coleta (março de 2015)	P1	22	0,02
	P2	22	0,03
	P3	22	0,04
	P4	25	0,47
	P5	23	0,04
	P6	28	0,72
	P7	28	1,08
	P8	24	1,08
	P9*	24	0,72
	P10*	24	0,60
	P11*	24	0,46
	P12*	24	0,45
	P13*	24	0,36

*Pontos de coleta no núcleo Marujá; LS = Lagoa salina; Sd = sem dado

Coleta/Fatores	Locais	Temperatura (°C)	Salinidade (%)
6ª Coleta (setembro de 2015)	P1	22	1,10
	P2	22	2,08
	P3	22	2,27
	P4	22	2,22
	P5	22	2,55
	LS	21	1,19
	Praia	Sd	Sd

*Pontos de coleta no núcleo Marujá; LS = Lagoa salina; Sd = sem dado

Os valores nos mostram que a temperatura variou conforme as estações do ano, sendo os valores mais baixos obtidos em agosto de 2012 e junho de 2013, com o valor mais baixo de 18 °C na lagoa salina em junho de 2013; e os valores mais altos (27 e 28 °C) em novembro de 2012, fevereiro de 2013 e março de 2015. Devido à alta pluviosidade, os pontos de menor salinidade ocorreram em março de 2015 (5ª coleta), variando de 0,02% a 1,08%.

5.2. Iscagem, isolamento e identificação morfológica dos espécimes de Labyrinthulomycota

Durante o processamento das amostras coletadas, 167 espécimes de Labyrinthulomycota foram obtidos, os quais foram classificados primeiramente com base em análise morfológica e literatura específica (Goldstein & Belsky 1964, Johnson & Sparrow 1961, Porter 1989, Sparrow 1936, Yokoyama & Honda 2007, Yokoyama *et al.* 2007) em quatro gêneros: *Schizochytrium* S. Goldst. & Belsky *sensu lato* (106 espécimes), *Labyrinthula* Cienk. (21 espécimes), *Parietichytrium* R. Yokoyama, Salleh & D. Honda (31 espécimes), *Thraustochytrium* Sparrow (4 espécimes) e 5 espécimes, provavelmente de um mesmo gênero, não identificados até este momento. Todos os espécimes observados estão listados na **tabela 4**.

Tabela 4. Espécimes observados durante o processamento das amostras provenientes das seis coletas realizadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, SP, no período de agosto de 2012 a setembro de 2015

1ª Coleta (agosto de 2012)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P4	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Água	Ecdise de cobra	<i>Parietichytrium</i>
LS	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
2ª Coleta (novembro de 2012)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P1	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P1	Água	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Água	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Lr	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

2ª Coleta (novembro de 2012)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P3	Água	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P3	Água	Ecdise de cobra	<i>Parietichytrium</i>
P3	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P5	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Água	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
LS	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
3ª Coleta (fevereiro de 2013)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P1	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P1	Água	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P3	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

3ª Coleta (fevereiro de 2013)

Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P4	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Água	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P4	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
P5	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Água	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
LS	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

4ª Coleta (junho de 2013)

Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

5ª Coleta (março de 2015)

Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P1	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

5ª Coleta (março de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P4	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Água	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P5	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P5	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P6	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P6	As	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P6	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P6	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P7	Água	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P8	Água	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P8	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P8	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P8	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P9	Água	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Thraustochytrium</i>
P9	Rm	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P9	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P9	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P9	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

5ª Coleta (março de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P9	Rm	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P9	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P10	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Lr	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Lr	ID - Placa 3	<i>Labyrinthula</i>
P10	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Lr	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P10	Lr	Epiderme de cebola	<i>Labyrinthula</i>
P10	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P10	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P11	Água	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P11	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P11	Lr	Epiderme de cebola	<i>Labyrinthula</i>
P12	Água	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Thraustochytrium</i>
P12	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Rm	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P12	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

5ª Coleta (março de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P12	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P12	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Lr	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Lr	ID - Placa 2	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	As	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P12	As	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P13	Rm	ID - Placa 3	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P13	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P13	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P13	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P13	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P13	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
6ª Coleta (setembro de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P1	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P1	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P1	As	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P1	As	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
P2	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P2	Rm	Ecdise de cobra	<i>Parietichytrium</i>
P2	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	Não identificado
P2	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

6ª Coleta (setembro de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P3	Rm	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	Não identificado
P3	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
P3	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P3	As	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P3	As	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
P3	As	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	Não identificado
P3	As	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P4	Rm	Epiderme de cebola	<i>Labyrinthula</i>
P4	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P4	Rm	Ecdise de cobra	<i>Thraustochytrium</i>
P4	Lr	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	Epiderme de cebola	<i>Labyrinthula</i>
P5	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
P5	Rm	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
P5	Rm	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	Não identificado
P5	Lr	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P5	Lr	Ecdise de cobra	<i>Parietichytrium</i>
P5	Lr	Ecdise de cobra	<i>Thraustochytrium</i>
P5	Lr	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
P5	As	Epiderme de cebola	<i>Parietichytrium</i>
P5	As	Epiderme de cebola	Não identificado
P5	As	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

6ª Coleta (setembro de 2015)			
Ponto	Substrato	Isca	Organismo
P5	As	Ecdise de cobra	<i>Parietichytrium</i>
P5	As	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
LS	Lr	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
LS	Lr	Pólen de <i>Pinus</i> sp.	<i>Parietichytrium</i>
Praia	Rm	ID - Placa 1	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
Praia	Rm	ID - Placa 1	<i>Parietichytrium</i>
Praia	Rm	Epiderme de cebola	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
Praia	Rm	Ecdise de cobra	<i>Schizochytrium sensu lato</i>
Praia	Rm	Semente de <i>Sorghum</i> sp.	<i>Labyrinthula</i>
Praia	As	ID - Placa 1	<i>Labyrinthula</i>
Praia	As	ID - Placa 2	<i>Parietichytrium</i>

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; LS = Lagoa salina; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

Uma predominância dos isolados de *Labyrinthula* foi observada em sementes de *Sorghum* spp. e dos isolados do gênero não identificado em grãos de pólen de *Pinus* sp. Já os isolados dos gêneros *Schizochytrium sensu lato*, *Parietichytrium* e *Thraustochytrium* não demonstraram preferência entre epiderme de cebola, ecdise de cobra e grãos de pólen de *Pinus* sp.

Ressaltamos que, dentre os espécimes de *Labyrinthula* observados, só foi possível o isolamento de dois, dos quais foi inviável manter o cultivo, devido a sua curta viabilidade em meio de cultura. Além disto, não foi possível o isolamento de nenhum espécime do gênero *Thraustochytrium* observado. A dificuldade no isolamento de espécimes deste gênero se deu devido a sua presença na mesma isca em que encontramos espécimes dos gêneros *Parietichytrium* ou *Schizochytrium sensu lato*, sendo que este último se reproduz por meio de bipartição em intervalos

regulares (Bremer 2000) e, assim, tem um crescimento muito mais rápido em comparação aos demais representantes do grupo (Jakobsen *et al.* 2007, Kimura *et al.* 1999).

Dentre os espécimes dos gêneros *Schizochytrium sensu lato*, *Parietichytrium* e do gênero não identificado (5 espécimes), a grande maioria foi isolada, porém houve grande dificuldade quanto a manutenção dos cultivos, pois mesmo com o uso dos antibióticos, ocorreu uma alta contaminação por bactérias e leveduras, ocasionando a perda de diversos isolados. Atualmente, 42 espécimes continuam sendo mantidos a 20 °C, em meio de cultura sólido PYGs, e repicados quinzenalmente.

Na América Latina, além dos levantamentos realizados em áreas de manguezal do município de Cananéia, estado de São Paulo (Booth 1979, Ulken 1966, 1970), apenas mais dois estudos foram realizados utilizando-se somente dados morfológicos para identificação dos espécimes, um em área de manguezal da Costa Rica (Ulken *et al.* 1990), onde foram citados os gêneros *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Labyrinthula* e *Ulkenia*; e um estudo sobre diversidade em ambientes salinos continentais e de estuários da Argentina (Rosa *et al.* 2006), onde foram identificados morfolologicamente espécimes de *Thraustochytrium* aff. *antarcticum*, *Ulkenia* aff. *radiata* e *U.* aff. *visurgensis*.

5.3. Identificação molecular dos espécimes

Devido à simplicidade morfológica dos representantes deste grupo de organismos, não foi possível a identificação em nível específico baseada somente em morfologia, sendo necessária a ferramenta molecular para isto. Honda *et al.* (1999) já enfatizaram em seu estudo, que as características morfológicas dos Thraustochytriales, utilizadas como critérios taxonômicos, deveriam ser reavaliadas e que outros critérios para identificação específica destes microrganismos seriam necessários.

5.3.1. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento da região SSU do rDNA

Dos espécimes observados, foi possível a obtenção de biomassa para extração, amplificação e sequenciamento da região SSU do rDNA de 92 espécimes (alguns que já tiveram suas culturas perdidas), das quais todas tiveram seu rDNA extraído, purificado e sequenciado com sucesso.

Para a amplificação da região SSU do rDNA, dentre os *primers* testados, os melhores resultados foram obtidos com o conjunto de *primers forward* 16S1N e *reverse* NS4 (Chodchoey & Verduyn 2012, Craven *et al.* 2005, White *et al.* 1990) para os Labyrinthulales, e *primers forward* NSF370F e *reverse* LAB1017R (Chang *et al.* 2012, Siboni *et al.* 2010) para os Thraustochytriales.

As reações de PCR com o conjunto de *primers* QPX-R – QPX-F não apresentaram resultado positivo, ou seja, não houve amplificação da região SSU do rDNA. Já o conjunto de *primers* 16S1N – 16S2N e LAB83F – LAB1017R amplificaram a região SSU, porém as sequências obtidas foram de qualidade inferior às obtidas através dos *primers* escolhidos.

Após a obtenção das sequências de nucleotídeos da região SSU do rDNA, estas foram comparadas, através da ferramenta de busca BLASTn ("Basic Local Alignment Search Tool"), com sequências da mesma região disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Por meio desta comparação confirmamos a prévia identificação morfológica de 67 espécimes de *Schizochytrium sensu lato* como pertencentes ao gênero *Aurantiochytrium* R. Yokoyama & D. Honda, gênero este que foi separado através de estudos filogenéticos do gênero *Schizochytrium* (Yokoyama & Honda 2007), estes espécimes mostraram ter uma alta similaridade com as duas únicas espécies descritas para o gênero, *Aurantiochytrium mangrovei* (Raghuk.) R. Yokoy. & D. Honda e *Aurantiochytrium limacinum* (D. Honda & Yokochi) R. Yokoyama & D. Honda. Os cinco espécimes, não identificados por meio da morfologia, também mostraram similaridade genética com as espécies de *Aurantiochytrium*, porém esta similaridade foi menor que a dos isolados anteriores, no entanto estes foram identificados como pertencentes ao mesmo gênero. Os 18 espécimes de *Parietichytrium* foram confirmados como

pertencentes à espécie *Parietichytrium sarkarianum* (A. Gaertn.) R. Yokoyama, Salleh & D. Honda, a única espécie descrita para o gênero, e dos dois espécimes identificados como *Labyrinthula* foram confirmados como *Labyrinthula* sp.

5.3.2. Análises filogenéticas

Para a reconstrução filogenética da região SSU do rDNA foram utilizadas 63 sequências pertencentes a 10 gêneros do filo Labyrinthulomycota, dentre as quais, 26 sequências de representantes obtidos neste estudo (17 sequências de espécimes pertencentes ao gênero *Aurantiochytrium*, duas pertencentes ao gênero *Labyrinthula* e sete pertencentes ao gênero *Parietichytrium*) que ocorreram nas diferentes amostragens. Duas sequências pertencentes à espécie *Ochromonas danica* foram utilizadas como *outgroup*. O modelo de substituição utilizado (gerado pelo JModelTest) para a reconstrução filogenética foi o modelo de substituição GTR + G e suporte de *bootstrap* de 1000 pseudo-réplicas.

A árvore filogenética de máxima verossimilhança (**Figura 23**) mostra que, com os resultados do sequenciamento da região SSU do rDNA, nossos isolados se agrupam em clados bem suportados com os isolados do mesmo gênero/espécie que possuem sequência disponível no GenBank, com os membros dos gêneros *Aurantiochytrium*, *Labyrinthula* e *Parietichytrium*, formando grupos monofiléticos suportados por um alto valor de *bootstrap* (100%), corroborando assim outros estudos filogenéticos realizados com o grupo (Tsui *et al.* 2009, Yokoyama & Honda 2007, Yokoyama *et al.* 2007).

Os isolados do gênero *Parietichytrium* foram classificados como *P. sarkarianum*, pois suas sequências se agrupam (100% de *bootstrap*) com sequências de isolados de *P. sarkarianum* disponíveis no GenBank, o que corroboramos com a morfologia.

O clado do gênero *Aurantiochytrium* se dividiu em dois clados bem suportados, um com os espécimes pertencentes as duas únicas espécies descritas para o gênero, *Aurantiochytrium*

mangrovei e *Aurantiochytrium limacinum*, onde agruparam-se os espécimes identificados morfológicamente neste estudo como *Schizochytrium sensu lato* e um clado bem suportado com os cinco espécimes que o gênero não foi identificado morfológicamente, mas que mostraram similaridade genética com as espécies de *Aurantiochytrium*.

No primeiro clado, não ocorreu separação filogenética das espécies *A. mangrovei* e *A. limacinum*, nem mesmo das sequências já depositadas por outros autores no GenBank, mostrando que, considerando a região SSU do rDNA, estas espécies não são filogeneticamente distintas. Assim, não foi possível a definição de espécie para os nossos isolados, ficando estes como *Aurantiochytrium* spp. A não separação filogenética dos espécimes deste gênero talvez ocorra devido a região amplificada ser uma região bem conservada, com muita semelhança entre as duas espécies. Bennett *et al.* (2017) e Pan *et al.* (2017) recentemente demonstraram em seus estudos, que a região SSU do rDNA não é uma região eficiente para resolução das divisões mais profundas do filo Labyrinthulomycota, porém, esta foi uma região essencial para a identificação através do banco de dados utilizado, pois poucas são as sequências de outras regiões de rDNA disponíveis para este grupo.

No segundo clado, os isolados (5) formaram um agrupamento bem suportado por um alto valor de *bootstrap* (100%), juntamente com outras duas sequências de *Aurantiochytrium* sp. já depositadas no Genbank, sendo assim, identificamos estes como uma nova espécie pertencente ao gênero *Aurantiochytrium*, pois a diferença morfológica já havia sido observada.

As sequências dos dois isolados pertencentes ao gênero *Labyrinthula* deste estudo agruparam-se com as sequências de *Labyrinthula* sp. (100% de *bootstrap*) do GenBank. No entanto, ficaram em grupos filogeneticamente separados das duas únicas espécies que possuem sequências gênicas no banco de dados, *L. zosterea* e *L. terrestris*, sendo assim, identificamos nossos isolados do gênero como *Labyrinthula* sp.

As sequências gênicas dos isolados obtidos neste estudo foram depositadas no GenBank e todos os isolados utilizados para a reconstrução da árvore filogenética de máxima verossimilhança da região SSU do rDNA (incluindo o número de acesso GenBank) estão listados na **tabela 5**.

Dos espécimes identificados, 20 representantes (sete espécimes de *Parietichytrium sarkarianum*, 12 de *Aurantiochytrium* sp. e um de *Aurantiochytrium* sp. nov.) também foram incorporados no acervo do Instituto de Botânica de São Paulo (Coleção de Culturas de Algas, Fungos e Cianobactérias – CCIBt) e do Instituto Biológico de São Paulo (Micoteca Mário Barreto Figueiredo – MMBF), sendo este último pertencente ao WFCC (World Federation for Culture Collections) (**Tabela 6**).

Os resultados das análises filogenéticas com os isolados de Labyrinthulomycota apontam que outros estudos, com outras regiões gênicas, necessitam ser realizados, visando principalmente uma melhor compreensão da filogenia do gênero *Aurantiochytrium*.

Com a utilização de dados moleculares, além do presente estudo, apenas mais dois foram realizados na América Latina, uma tese de doutorado (Rosa 2010) onde isolados argentinos dos gêneros *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium* e espécies de *Thraustochytrium* e *Ulkenia* foram identificados (por meio de uma combinação de estudos morfológicos, moleculares e de perfis de PUFA); e uma publicação de Boro *et al.* (2018), onde, além dos resultados provenientes do presente estudo, foram citadas outras duas espécies: *Thraustochytrium striatum* Joa. Schneid., primeira citação para o Brasil, proveniente do município de Itanhaém, e *Schizochytrium aggregatum* S. Goldst. *et* Belsky, proveniente do município do Guarujá, ambos municípios do estado de São Paulo (**Anexo 1**).

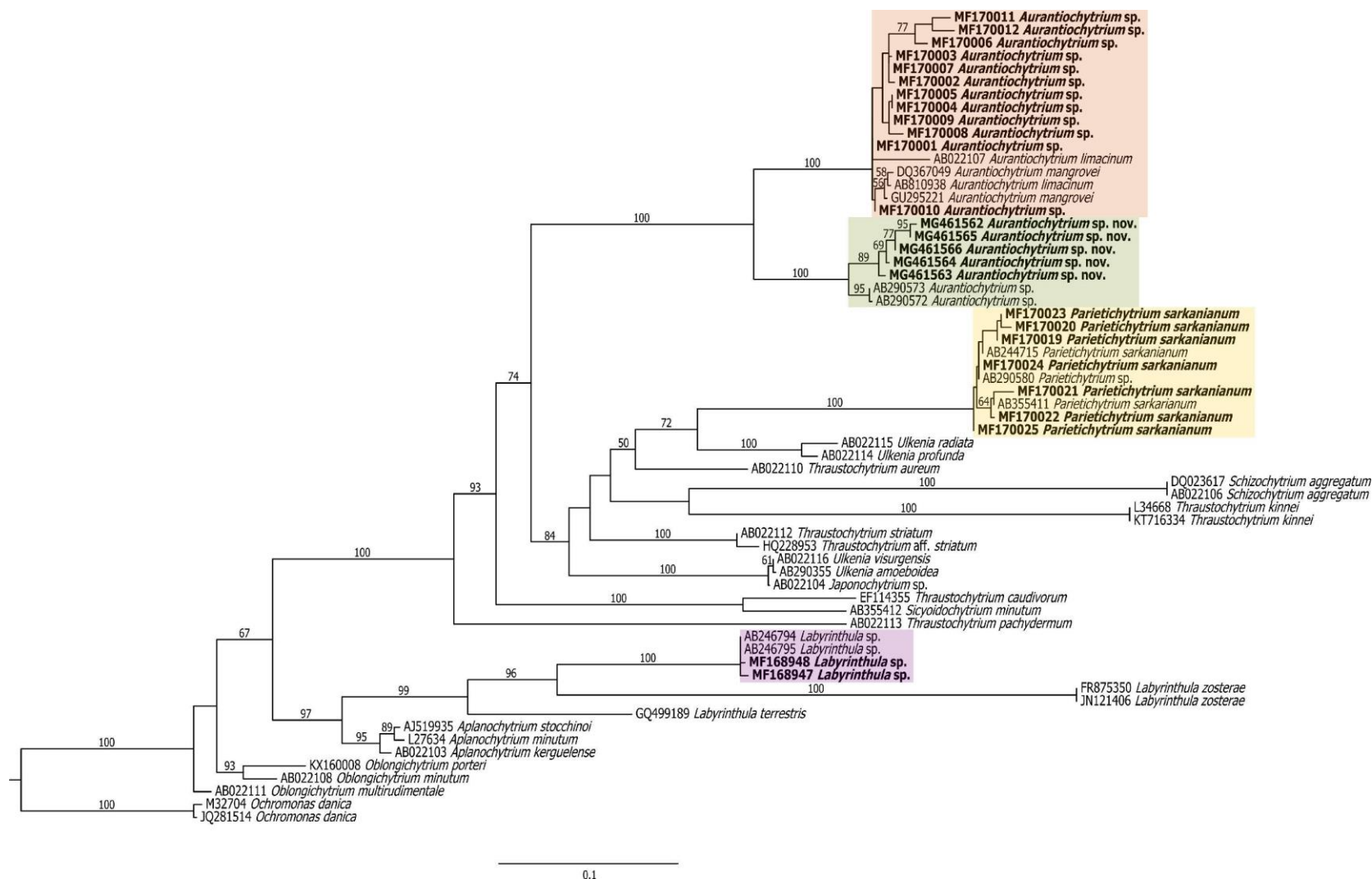


Figura 23. Árvore filogenética de máxima verossimilhança da região SSU do rDNA. Valores próximos dos ramos indicam o suporte de *bootstraps* (%) de 1000 pseudo-réplicas. Somente os ramos com suporte > de 50% foram destacados. A barra inferior indica o número de substituições por sítio. Isolados obtidos neste estudo estão em negrito

Tabela 5. Isolados utilizados na construção da árvore filogenética de máxima verossimilhança da região SSU do rDNA de representantes de Labyrinthulomycota

Organismo	Isolado	Número de Acesso	Referência
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	KMPB N-BA-107	AB022103	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Aplanochytrium minutum</i>	-	L27634	Leipe <i>et al.</i> 1994
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i>	-	AJ519935	Moro <i>et al.</i> 2003
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	NIBH SR21	AB022107	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	NIBH SR21 (C1)	AB810938	Nakazawa <i>et al.</i> 2014
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	RCC893	DQ367049	Tsui <i>et al.</i> 2009
<i>Aurantiochytrium mangrovei</i>	TB17	GU295221	-
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	SEK217	AB290572	Yokoyama & Honda 2007
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	SEK218	AB290573	Yokoyama & Honda 2007
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC01	MF170001	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC04	MF170002	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC08	MF170003	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC09	MF170004	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC10	MF170005	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC16	MF170006	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC18	MF170007	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC19	MF170008	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC62	MF170009	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC65	MF170010	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	MF170011	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	MF170012	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC86	MG461566	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC96	MG461565	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	MG461564	*

*Sequências provenientes deste estudo

Organismo	Isolado	Número de Acesso	Referência
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC98	MG461563	*
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC100	MG461562	*
<i>Japonochytrium</i> sp.	ATCC28207	AB022104	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Labyrinthula</i> sp.	N8	AB246794	-
<i>Labyrinthula</i> sp.	N12	AB246795	-
<i>Labyrinthula</i> sp.	A220	MF168948	*
<i>Labyrinthula</i> sp.	PR4	MF168947	*
<i>Labyrinthula terrestris</i>	Laby10	GQ499189	Douhan <i>et al.</i> 2009
<i>Labyrinthula zosterae</i>	C75-9a	FR875350	-
<i>Labyrinthula zosterae</i>	C77-LA47	JN121406	Bergmann <i>et al.</i> 2011
<i>Oblongichytrium minutum</i>	KMPB N-BA-77	AB022108	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Oblongichytrium multirudimentale</i>	KMPB N-BA-113	AB022111	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Oblongichytrium porteri</i>	-	KX160008	Fiorito <i>et al.</i> 2016
<i>Ochromonas danica</i>	-	M32704	Gunderson <i>et al.</i> 1987
<i>Ochromonas danica</i>	SAG933.7	JQ281514	-
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	RT0049	AB244715	-
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	SEK351	AB355411	Yokoyama <i>et al.</i> 2007
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC12	MF170019	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC45	MF170020	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC67	MF170021	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC79	MF170022	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC83	MF170023	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC88	MF170024	*
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC119	MF170025	*
<i>Parietichytrium</i> sp.	MBIC11085	AB290580	-

*Sequências provenientes deste estudo

Organismo	Isolado	Número de Acesso	Referência
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	ATCC28209	AB022106	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	-	DQ023617	-
<i>Sicyodochytrium minutum</i>	SEK354	AB355412	Yokoyama <i>et al.</i> 2007
<i>Thraustochytrium aureum</i>	ATCC34304	AB022110	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Thraustochytrium caudivorum</i>	SJ	EF114355	Schärer <i>et al.</i> 2007
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	KMPB1694d	L34668	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	-	KT716334	-
<i>Thraustochytrium pachydermum</i>	KMPB N-BA-114	AB022113	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Thraustochytrium striatum</i>	ATCC24473	AB022112	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Thraustochytrium</i> aff. <i>striatum</i>	BAFCult3522	HQ228953	-
<i>Ulkenia amoeboides</i>	SEK214	AB290355	Takao <i>et al.</i> 2007
<i>Ulkenia profunda</i>	29 Raghukumar	AB022114	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Ulkenia radiata</i>	16 Raghukumar	AB022115	Honda <i>et al.</i> 1999
<i>Ulkenia visurgensis</i>	ATCC28208	AB022116	Honda <i>et al.</i> 1999

*Sequências provenientes deste estudo

Tabela 6. Números CCIBt (Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica) e MMBF (Micoteca Mário Barreto Figueiredo) de isolados de Labyrinthulomycota depositados

Organismo	Isolado	Coleta	Ponto	Substrato	Isca	CCIBt	MMBF
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC01	1 ^a	P5	Lr	Cebola	4268	67/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC04	3 ^a	P5	Rm	ID -Placa 3	4269	68/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC08	3 ^a	P2	Lr	Cebola	4270	69/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC09	3 ^a	P2	Rm	ID -Placa 1	4271	70/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC10	3 ^a	P2	Rm	ID -Placa 2	4272	71/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC16	4 ^a	P3	Rm	Cebola	4273	72/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC18	4 ^a	LS	Rm	ID -Placa 3	4274	73/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC19	4 ^a	P2	Rm	Cebola	4275	74/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC62	5 ^a	P1	Rm	Semente	4276	75/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC65	5 ^a	P8	Água	Cebola	4277	76/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	6 ^a	P5	As	Cobra	4278	77/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	6 ^a	P3	Lr	Pólen	4279	78/17
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	6 ^a	P5	As	Cebola	4329	95/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC12	3 ^a	P4	Lr	Semente	4286	85/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC45	5 ^a	P12	Rm	Cebola	4287	86/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC67	5 ^a	P10	Lr	Cebola	4288	87/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC79	5 ^a	P5	Água	Cebola	4289	88/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC83	6 ^a	Praia	As	ID -Placa 2	4290	89/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC88	6 ^a	P3	Lr	Pólen	4291	90/17
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC119	6 ^a	P5	As	Cebola	4292	91/17

Rm = *Rhizophora mangle*; Lr = *Laguncularia racemosa*; As = *Avicennia schaueriana*; ID = Isolamento direto em meio de cultura PYGs

5.4. Descrição dos isolados brasileiros de *Labyrinthulomycota* provenientes deste estudo

A espécie *Parietichytrium sarkanianum* e os gêneros *Aurantiochytrium* e *Labyrinthula* são citados pela primeira vez no país e espécimes representativos deste estudo estão descritos a seguir:

Parietichytrium sarkanianum (A. Gaertn.) R. Yokoyama, B. Salleh et D. Honda, Mycoscience 48: 333, 2007.

Basiônimo: *Ulkenia sarkariana* A. Gaertn., Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 16: 144, 1977.

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado IC7 proveniente da terceira coleta, isolado a partir de água em salinidade de 1,04% (Lagoa salina); isolado IC12 proveniente da terceira coleta, isolado a partir de folhas de *Laguncularia racemosa* em salinidade de 2,46% (P4); isolado IC45 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de folhas de *Rhizophora mangle* em salinidade de 0,45% (P12); isolado IC67 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de folhas de *L. racemosa* em salinidade de 0,6% (P10); isolado IC79 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de água em salinidade de 0,04% (P5); isolado IC83 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *Avicennia schaueriana* coletadas na praia; isolado IC88 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *L. racemosa* em salinidade de 2,27% (P3); e isolado IC119 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *A. schaueriana* em salinidade de 2,55% (P5).

Cultura em meio PYGs de coloração creme a amarelada, na maioria das vezes brilhante, com o crescimento superficial espalhado e um pouco elevado (**Figura 24A-B**).

As estruturas microscópicas foram visualizadas através de lâminas confeccionadas da cultura pura com oito dias de crescimento (**Figura 25A**). Presença de zoosporângios globosos de 8 a 20 µm diâm., ovais de 25-42 x 15-27 µm e/ou irregulares, produzindo mais de 20 zoósporos; liberação dos zoósporos não observada.

Aurantiochytrium R. Yokoyama et D. Honda, Mycoscience 48: 203, 2007.

Basiônimo: *Schizochytrium* S. Goldst. & Belsky, American Journal of Botany 51: 72, 1964.

Material examinado: ***Aurantiochytrium* sp.** BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado IC1 proveniente da primeira coleta, isolado a partir de folhas de *Laguncularia racemosa* em salinidade de 3% (P5); isolado IC4 proveniente da terceira coleta, isolado a partir de folhas de *Rhizophora mangle* em salinidade de 2,62% (P5); isolado IC8 proveniente da terceira coleta, isolado a partir de folhas de *L. racemosa* em salinidade de 0,78% (P2); isolado IC16 proveniente da quarta coleta, isolado a partir de folhas de *R. mangle* em salinidade de 1,75% (P3); isolado IC18 proveniente da quarta coleta, isolado a partir de folhas de *R. mangle* em salinidade de 0,54% (Lagoa salina); isolado IC62 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de folhas de *R. mangle* em salinidade de 0,02% (P1); isolado IC65 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de água em salinidade de 1,08% (P8); isolado IC91 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *Avicennia schaueriana* em salinidade de 2,55% (P5); e isolado IC109 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *L. racemosa* em salinidade de 2,27% (P3).

Cultura em PYGs com coloração creme a laranja, na maioria das vezes opaca, com o crescimento superficial um pouco elevado (**Figura 24C-D**).

Os isolados em epiderme de cebola (**Figura 25B**), ecdise de cobra e em grãos de pólen apresentavam uma rede ectoplasmática bem desenvolvida, como pseudorizóides, enquanto que, em meio de cultura, esta rede ectoplasmática não é tão evidente.

As estruturas microscópicas foram visualizadas através de lâminas confeccionadas da cultura pura com cinco dias de crescimento. Presença de células esféricas de 7,5 x 20 µm diâm. a ovaladas, 12-30 x 8-20 µm diâm. (**Figura 25C**), as quais se dividem por contínua bipartição (**Figura 25D**); zoósporos encistados de 3,75 a 6,25 µm diâm. (**Figura 25E**).

***Aurantiochytrium* sp. nov.**

Material examinado: BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado IC86 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *Rhizophora mangle* em salinidade de 2,55% (P5); isolado IC96 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *R. mangle* em salinidade de 2,27% (P3); isolado IC97 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *Avicennia schaueriana* em salinidade de 2,55% (P5); isolado IC98 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *Laguncularia racemosa* em salinidade de 2,08% (P2); e isolado IC100 proveniente da sexta coleta, isolado a partir de folhas de *A. schaueriana* em salinidade de 2,27% (P3).

Cultura em PYGs de coloração salmão a laranja, opacas, com o crescimento superficial plano, algumas vezes espalhado em grumos (**Figura 24E-F**).

As estruturas microscópicas foram visualizadas através de lâminas confeccionadas da cultura pura com cinco dias de crescimento (**Figura 25F**). Presença de células esféricas em média com 5 µm diâm. a ovaladas, de 12,5-20 x 5-8 µm; se dividem por contínuas bipartições, formando agregações.

Labyrinthula Cienk., Archs Anat. microsc. 3: 274, 1867.

Material examinado: ***Labyrinthula* sp.** BRASIL. SÃO PAULO: Cananéia, Parque Estadual da Ilha do Cardoso, isolado A220 proveniente da segunda coleta, isolado a partir de folhas de *Rhizophora mangle* em salinidade de 2,17% (P4) e isolado PR4 proveniente da quinta coleta, isolado a partir de folhas de *Rhizophora mangle* em salinidade de 0,47% (P4).

Isolados iscados preferencialmente por sementes de *Sorghum* sp., onde se apresentavam em forma de pústulas (**Figura 26A**). As estruturas microscópicas foram observadas através de lâminas confeccionadas com epiderme de cebola. Presença de células fusiformes de 10-13,75 x 3,75-5 µm, locomovendo-se através da rede ectoplasmática (**Figura 26B**); liberação dos zoósporos observada após a formação de soros (**Figura 26C**); zoósporos encistados de 3,5 µm de diâm. (**Figura 26D**).

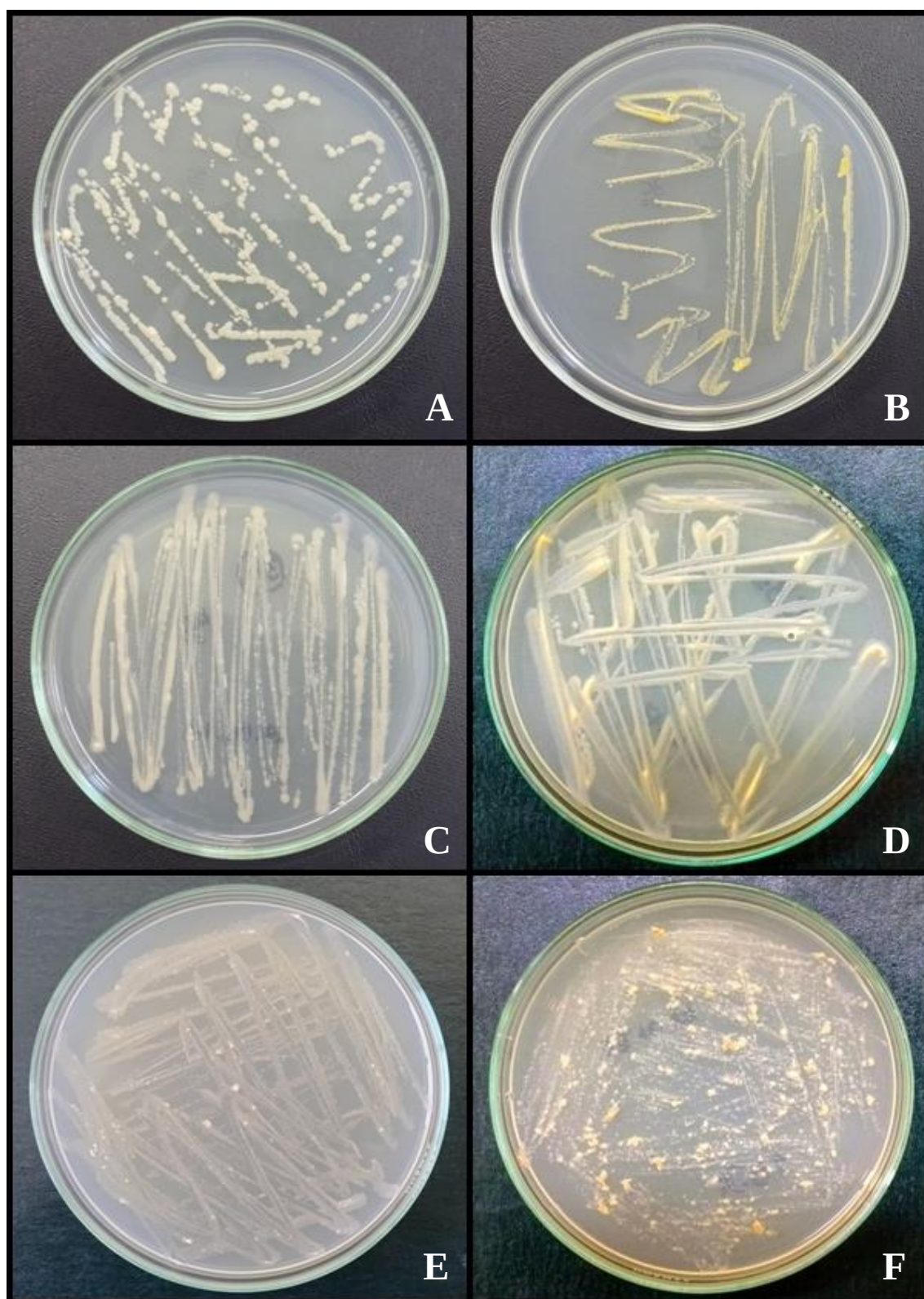


Figura 24. Culturas de células crescidas em meio de cultura sólido PYGs 50%. A e B – Culturas IC12 e IC7, respectivamente, de *Parietichytrium sarkarianum* com oito dias de crescimento; C e D – Culturas IC18 e IC1, respectivamente, de *Aurantiochytrium* sp. com quatro dias de crescimento; E e F – Cultura IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. com quatro dias de crescimento

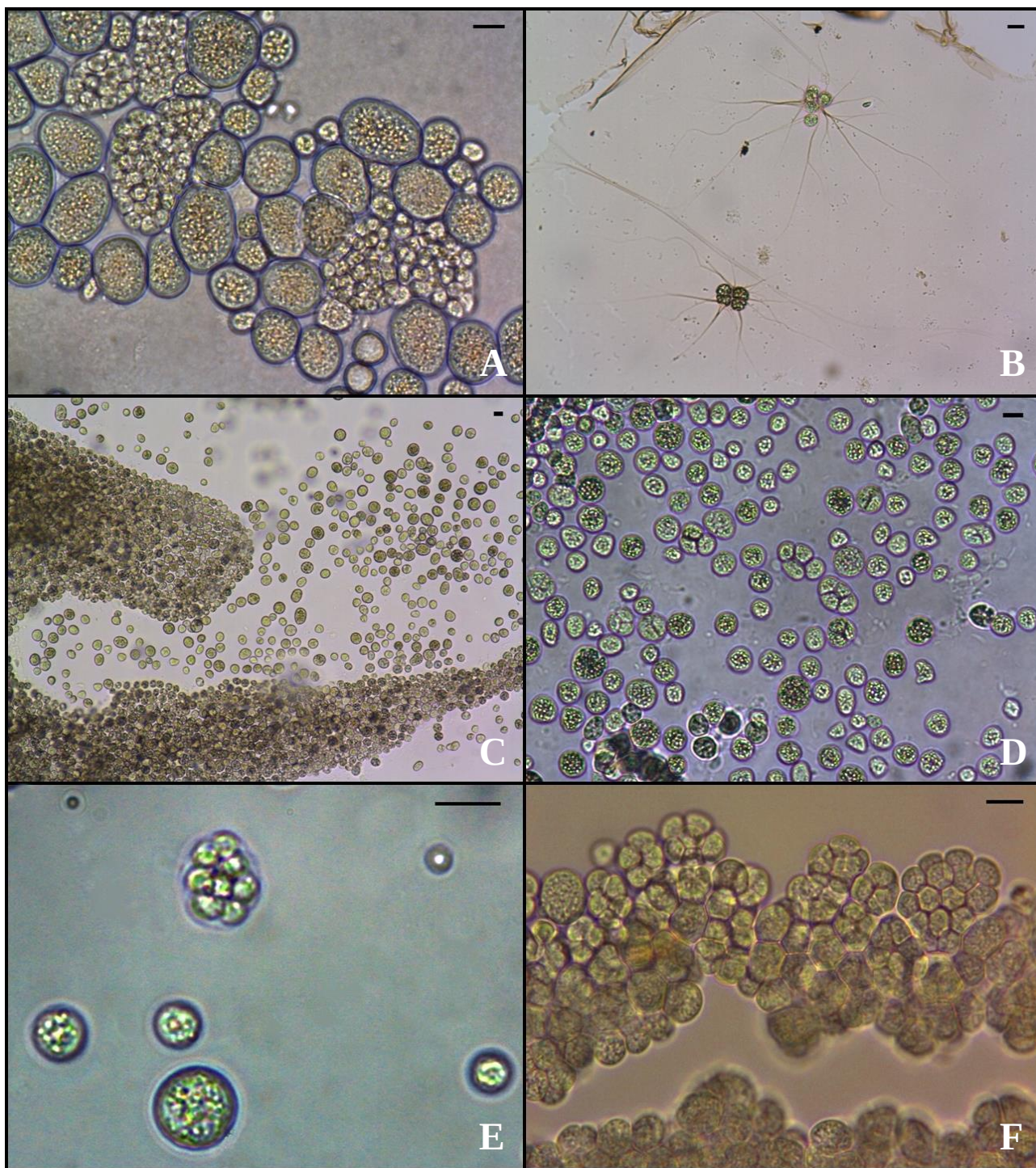


Figura 25. A – Zoosporângios de *Parietichytrium sarkarianum*, alguns com a formação de zoósporos em meio PYGs (isolado IC7); B – Células de *Aurantiochytrium* sp. fixadas pela rede ectoplasmática em epiderme de cebola (isolado IC1); C e D – Células de *Aurantiochytrium* sp., algumas apresentando divisões em meio PYGs (isolado IC1); E – Zoósporos de *Aurantiochytrium* sp. já formados em meio PYGs (isolado IC109); F – Células de *Aurantiochytrium* sp. nov., apresentando divisões e formando agregações em meio PYGs (isolado IC97). Barra = 10 μm

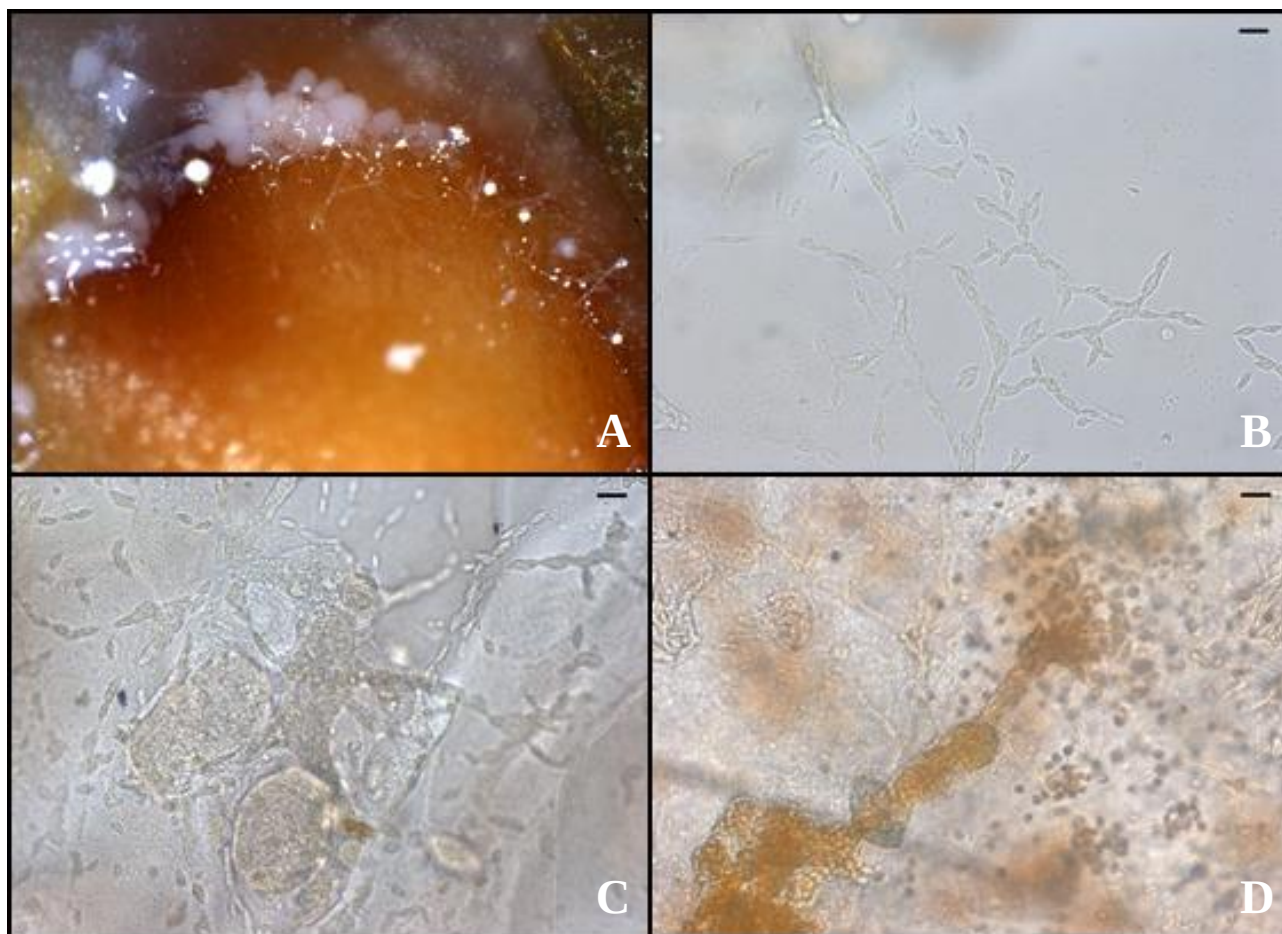


Figura 26. *Labyrinthula* sp. A – Pústulas formadas em semente de *Sorghum* sp. (isolado A220); B – Células vegetativas envoltas pela rede ectoplasmática em epiderme de cebola (isolado PR4); C – Formação de soros (zoosporângio) em epiderme de cebola (isolado PR4); D – Zoósporos sendo liberados em epiderme de cebola (isolado PR4). Barra = 10 μ m

5.5. Produção de ácidos graxos

5.5.1. Perfil de produção e quantificação de ácidos graxos

Para a análise do perfil de produção e quantificação dos ácidos graxos utilizou-se 12 isolados de *Aurantiochytrium* sp., cinco de *Aurantiochytrium* sp. nov. e oito de *Parietichytrium sarkarianum*, e nas condições de cultivo utilizadas, em um total de 300 mL de meio de cultura líquido PYGs, foi possível a obtenção de biomassa liofilizada suficiente para a extração de lipídios totais segundo a metodologia de Bligh & Dyer (1959) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida, em um total de 300 mL de meio líquido PYGs, pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados para a análise do perfil de produção e quantificação dos ácidos graxos

Espécie	Isolado	Biomassa liofilizada (g)
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC1	0,41
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC4	0,46
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC8	0,57
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC9	0,47
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC10	0,44
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC16	0,42
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC18	0,51
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC19	0,57
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC62	0,47
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC65	0,45
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	0,65

Espécie	Isolado	Biomassa liofilizada (g)
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	0,59
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC86	0,36
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC96	0,35
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	0,53
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC98	0,37
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC100	0,51
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC12	0,36
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC45	0,31
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC67	0,34
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC79	0,31
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC83	0,43
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC88	0,33
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC95	0,31
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC119	0,35

A quantidade de biomassa produzida evidencia que as condições de cultivo utilizadas são adequadas, como já reportado por Yang *et al.* (2010) em estudo realizado com isolados do mesmo gênero em condições similares.

Observou-se que os isolados de *Aurantiochytrium* sp. produziram quantidade um pouco maior de biomassa se comparado aos outros isolados (**Tabela 7**), como também já demonstrado por outros estudos, onde os autores afirmam que, ao mesmo tempo que os isolados de *Aurantiochytrium* produzem maior biomassa, produzem também maior quantidade de lipídios. Isto ocorre devido ao crescimento mais rápido consumir mais prontamente o nitrogênio do meio, resultando em menor tempo para atingir o estresse do nitrogênio, o que é responsável pela maior acumulação de lipídios na célula (Iida *et al.* 1996, Ling *et al.* 2015).

A proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos), produzidos por cada isolado testado, se encontra na **tabela 8**. Também estão apresentados nas **tabelas 9, 10 e 11**, o conteúdo dos principais ácidos graxos produzidos pelos isolados de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e de *Parietichytrium sarkarianum*, respectivamente, em mg/g de biomassa seca, sendo a partir destes resultados realizada a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se o limite de confiança de 95%, para comparação da quantidade de produção, de cada ácido graxo, entre os isolados.

Tabela 8. Produção de ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo

Isolado/Ácido graxo	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2 ω6	EPA ω3	DPA ω6	DPA ω3	DHA ω3	Outros AGs
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC1	1,23	3,36	21,23	0	2,03	4,03	0	0	2,64	11,79	0	52,87	0,82
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC4	1,77	15,54	23,23	0	7,32	1,20	0	0	1,97	5,30	0	43,11	0,57
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC8	2,95	16,31	24,15	0	7,93	3,75	0	0	1,57	9,89	0	30,54	2,91
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC9	2,79	12,54	13,80	0	5,68	1,47	0	0	0,52	19,44	0	42,69	1,06
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC10	9,06	21,88	22,22	0	15,41	6,65	0	0	0,79	5,48	0	14,77	3,74
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC16	8,44	7,39	24,89	0	2,93	1,78	0	0	1,90	2,73	0	49,06	0,90
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC18	4,30	19,46	39,69	0	7,71	1,94	0	0	0,31	1,92	0	24,38	0,28
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC19	4,95	16,60	26,72	0	6,97	3,71	0	0	1,24	7,76	0	29,97	2,10
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC62	2,41	10,33	27,35	0	3,70	1,70	0	0	1,63	4,19	0	48,22	0,47
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC65	1,48	16,50	19,74	0	6,87	1,10	0	0	1,90	4,66	0	47,29	0,44
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC91	1,86	10,68	25,10	0	4,80	1,15	0	0	2,71	3,63	0	49,92	0,43
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC109	2,23	16,07	23,60	0	6,05	1,20	0	0	1,65	4,55	0	44,25	0,42
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC86	7,82	10,91	22,00	5,33	3,04	2,60	15,85	0	2,48	1,14	1,33	23,15	4,36
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC96	9,68	25,38	22,47	0	8,43	3,44	0	0	0,80	7,99	0	18,05	3,77

C14:0 = Ácido mirístico; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C16:1 = Ácido palmitoléico; C17:0 = Ácido margárico; C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; C18:2 ω6 = Ácido linoléico (ômega 6); EPA ω3 = Ácido eicosapentaenóico (ômega 3); DPA ω6 = Ácido docosapentaenoico (ômega 6); DPA ω3 = Ácido docosapentaenoico (ômega 3); DHA ω3 = Ácido docosahexaenoico (ômega 3); AGs = Ácidos graxos

Tabela 8. Produção de ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo (continuação)

Isolado/Ácido graxo	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2 ω6	EPA ω3	DPA ω6	DPA ω3	DHA ω3	Outros AGs
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC97	14,10	26,66	17,67	3,67	4,85	1,24	10,67	0	1,19	2,22	0	12,74	4,99
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC98	3,70	1,96	25,90	1,12	0,96	7,72	30,17	0	0	0	0	9,18	19,29
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC100	2,96	13,36	25,14	0	6,85	15,42	0	0	0	9,17	0	24,56	2,55
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC12	1,56	5,22	16,79	1,02	8,42	18,95	20,52	5,14	2,72	2,23	0	9,30	8,12
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC45	2,50	2,66	17,95	2,00	4,61	21,40	27,50	1,84	1,65	3,18	0	3,56	11,14
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC67	3,35	1,29	22,60	3,76	1,54	12,12	30,90	6,54	2,13	1,35	0	10,17	4,23
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC79	3,21	1,50	22,31	3,22	1,66	9,45	27,60	7,01	2,66	2,07	0	11,85	7,46
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC83	2,36	8,23	20,02	1,11	6,56	8,47	13,04	4,90	5,41	3,83	0	15,96	10,12
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC88	1,60	5,09	26,59	0,24	8,15	15,51	5,31	0,62	5,09	7,00	0	19,64	5,15
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC95	5,11	22,51	25,86	0,72	10,32	16,55	5,29	0,72	1,10	1,48	0	8,59	1,75
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC119	2,44	5,91	21,42	1,59	4,29	8,87	14,42	7,60	5,00	3,30	0	16,00	9,15

C14:0 = Ácido mirístico; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C16:1 = Ácido palmitoléico; C17:0 = Ácido margárico; C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; C18:2 ω6 = Ácido linoléico (ômega 6); EPA ω3 = Ácido eicosapentaenóico (ômega 3); DPA ω6 = Ácido docosapentaenoico (ômega 6); DPA ω3 = Ácido docosapentaenoico (ômega 3); DHA ω3 = Ácido docosahexaenoico (ômega 3); AGs = Ácidos graxos

Tabela 9. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp. coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem à média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%

Isolado/Ácido graxo	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	EPA ω 3	DPA ω 6	DHA ω 3	Outros AGs	Total de AGs
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC1	0,36 $\pm$ 0,10e	0,98 $\pm$ 0,21e	6,20 $\pm$ 1,96g	0,59 $\pm$ 0,21f	1,18 $\pm$ 0,09ef	0,77 $\pm$ 0,27c	3,44 $\pm$ 1,17cd	15,43 $\pm$ 7,11e	0,24 $\pm$ 0,07c	29,19 $\pm$ 11,12f
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC4	4,33 $\pm$ 0,27bc	38,07 $\pm$ 3,53a	56,89 $\pm$ 4,96a	17,92 $\pm$ 2,41a	2,94 $\pm$ 0,17b	4,82 $\pm$ 0,36a	12,97 $\pm$ 0,84b	105,57 $\pm$ 5,16a	1,41 $\pm$ 0,15abc	244,89 $\pm$ 7,05a
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC8	1,52 $\pm$ 0,33cde	8,43 $\pm$ 2,24de	12,49 $\pm$ 1,31fg	4,10 $\pm$ 1,17de	1,94 $\pm$ 0,47cd	0,81 $\pm$ 0,20c	5,11 $\pm$ 1,51cd	15,79 $\pm$ 4,37e	1,51 $\pm$ 0,69abc	51,72 $\pm$ 10,27ef
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC9	2,82 $\pm$ 0,07cde	12,67 $\pm$ 3,68cd	13,94 $\pm$ 3,87efg	5,74 $\pm$ 0,38cd	1,49 $\pm$ 0,08cde	0,53 $\pm$ 0,05c	19,63 $\pm$ 2,99a	43,13 $\pm$ 11,32d	1,07 $\pm$ 0,51bc	101,02 $\pm$ 16,31c
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC10	5,72 $\pm$ 0,45b	13,81 $\pm$ 2,05cd	14,03 $\pm$ 0,77efg	9,73 $\pm$ 0,95b	4,20 $\pm$ 0,12a	0,50 $\pm$ 0,19c	3,46 $\pm$ 1,69cd	9,33 $\pm$ 4,47e	2,36 $\pm$ 0,91a	63,13 $\pm$ 5,90def
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC16	10,11 $\pm$ 3,36a	8,85 $\pm$ 2,23de	29,80 $\pm$ 4,17cd	3,50 $\pm$ 1,22de	2,14 $\pm$ 0,44c	2,27 $\pm$ 0,70b	3,26 $\pm$ 1,46cd	58,75 $\pm$ 13,56cd	1,07 $\pm$ 0,53bc	119,75 $\pm$ 27,56c
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC18	3,98 $\pm$ 0,38bc	18,03 $\pm$ 2,01c	36,79 $\pm$ 2,56bc	7,15 $\pm$ 0,78bcd	1,80 $\pm$ 0,05cde	0,29 $\pm$ 0,50c	1,78 $\pm$ 0,23d	22,60 $\pm$ 3,07e	0,26 $\pm$ 0,05c	92,68 $\pm$ 5,38cd
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC19	4,08 $\pm$ 0,88bc	13,67 $\pm$ 3,35cd	22,00 $\pm$ 9,46def	5,74 $\pm$ 1,46cd	3,05 $\pm$ 0,32b	1,02 $\pm$ 0,21c	6,39 $\pm$ 2,66cd	24,67 $\pm$ 3,27e	1,73 $\pm$ 1,03ab	82,34 $\pm$ 2,01cde
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC62	1,19 $\pm$ 0,32de	5,12 $\pm$ 1,08de	13,56 $\pm$ 3,24efg	1,83 $\pm$ 0,37ef	0,84 $\pm$ 0,15f	0,81 $\pm$ 0,09c	2,08 $\pm$ 0,39d	23,91 $\pm$ 4,29e	0,23 $\pm$ 0,06c	49,59 $\pm$ 9,90ef
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC65	1,75 $\pm$ 0,76cde	19,42 $\pm$ 9,63c	23,23 $\pm$ 4,73de	8,08 $\pm$ 3,05bc	1,30 $\pm$ 0,10def	2,24 $\pm$ 0,63b	5,48 $\pm$ 2,66cd	55,64 $\pm$ 19,53cd	0,52 $\pm$ 0,21bc	117,65 $\pm$ 40,12c
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC91	3,23 $\pm$ 0,23bcd	18,52 $\pm$ 3,48c	43,52 $\pm$ 2,79b	8,33 $\pm$ 1,35bc	1,99 $\pm$ 0,51cd	4,69 $\pm$ 0,73a	6,29 $\pm$ 0,45cd	86,56 $\pm$ 6,66b	0,75 $\pm$ 0,14bc	173,40 $\pm$ 8,31b
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC109	3,69 $\pm$ 0,22bcd	26,62 $\pm$ 2,18b	39,09 $\pm$ 3,84b	10,02 $\pm$ 0,70b	1,99 $\pm$ 0,26cd	2,73 $\pm$ 0,45b	7,53 $\pm$ 1,90c	73,28 $\pm$ 6,27bc	0,69 $\pm$ 0,24bc	165,62 $\pm$ 14,04b
Fator F	17,778	21,451	39,789	31,102	33,824	41,402	25,989	38,148	5,250	41,387
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

C14:0 = Ácido mirístico; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C17:0 = Ácido margárico; C18:0 = Ácido esteárico; EPA ω 3 = Ácido eicosapentaenoico (ômega 3); DPA ω 6 = Ácido docosapentaenoico (ômega 6); DHA ω 3 = Ácido docosahexaenoico (ômega 3); AGs = Ácidos graxos

Segundo Gupta *et al.* (2017), a maior presença de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, particularmente o ácido docosahexaenoico (DHA), no perfil de ácidos graxos dos microrganismos, é um marcador de Thraustochytriales. Como podemos observar nos resultados apresentados na **tabela 8**, todos os isolados coletados no PEIC apresentam quantidades significativas de DHA, sendo que alguns isolados apresentam também outros ômegas 3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA ω 3) e o ácido docosapentaenoico (DPA ω 3).

Os resultados também evidenciam que os isolados de *Aurantiochytrium* sp. possuem como padrão a produção em maior quantidade do DHA e do ácido palmítico (PA), corroborando o estudo de Gupta *et al.* (2012), os quais mencionam que o DHA e o PA são os principais ácidos graxos presentes no perfil de representantes de Thraustochytriales, constituindo de 70 a 90% dos ácidos graxos totais. No entanto, alguns estudos com isolados provenientes de áreas tropicais (Gupta *et al.* 2012, Yokochi *et al.* 1998), evidenciam que estes produzem mais PA do que DHA, ao contrário do que ocorre com os isolados de áreas temperadas, o que não corrobora o presente estudo, pois a maioria dos isolados do gênero *Aurantiochytrium* apresentou uma proporção maior de DHA, variando de 14,77% (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC10) a 52,87% (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC1) do total de ácidos graxos. Dos doze representantes de *Aurantiochytrium* sp. utilizados no ensaio de quantificação de ácidos graxos, somente os isolados *Aurantiochytrium* sp. IC10 e *Aurantiochytrium* sp. IC18 apresentaram maior proporção de PA (22,22% e 39,69%, respectivamente) do que DHA.

Os resultados do presente estudo são compatíveis com os existentes na literatura, onde a proporção de DHA produzida em espécies de *Aurantiochytrium* provenientes de áreas tropicais varia de 12,0% (Gupta *et al.* 2017) a 55,5% (Unagul *et al.* 2017) do total de ácidos graxos. No entanto, outros estudos mostraram que a proporção de DHA de um isolado proveniente de uma área equatorial foi de 7,5% do total de ácidos graxos (Ou *et al.* 2016), enquanto que de um isolado proveniente de uma área com clima temperado foi de 60,8% de DHA (Chang *et al.* 2012). O resultado do presente estudo também mostrou que nossos isolados produziram uma proporção

similar de DHA comparado ao estudo que utilizou o mesmo tempo de crescimento de 15 dias (Yang *et al.* 2010) onde o isolado, proveniente de uma área subtropical, produziu 47,0% do total de ácidos graxos de DHA.

Se observarmos os dados existentes na literatura, poucos estudos apresentam os resultados em mg/g de biomassa seca. Os poucos trabalhos que apresentaram os resultados desta forma (Fan *et al.* 2001, 2007) obtiveram, de isolados do gênero *Aurantiochytrium* provenientes de uma área subtropical, uma quantidade de produção de DHA variando de 118,10 mg/g a 204,30 mg/g de biomassa seca, resultados estes maiores se comparados com os obtidos neste estudo (**Tabela 9**), que foram de $9,33 \pm 4,47$ (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC10) a $105,57 \pm 5,16$ mg/g (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC4) de biomassa seca. Esta diferença de produção pode estar relacionada a origem e idade do isolado, às diferenças dos métodos de cultivo utilizados (meio de cultura e temperatura), bem como o método de extração de lipídios totais e de transesterificação de ácidos graxos.

A proporção de PA, comparada ao total de ácidos graxos, nos isolados de *Aurantiochytrium* sp. coletados no PEIC (**Tabela 8**), variou de 13,80% (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC9) a 39,69% (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC18), sendo um pouco menores dos apresentados na literatura, onde a quantidade produzida por isolados provenientes de áreas tropicais variou de 22,3% (Chang *et al.* 2012) a 49,4% (Yokochi *et al.* 1998) do total de ácidos graxos. Em mg/g de biomassa seca, produziram também uma alta quantidade de PA, chegando a 56,89 mg/g (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC4). Esta diferença de produção também pode estar relacionada a origem e idade do isolado, às diferenças dos métodos de cultivo utilizados, bem como o método de extração de lipídios totais e de transesterificação de ácidos graxos.

Tabela 10. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de *Aurantiochytrium* sp. nov. coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%

Isolado/Ácido graxo	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	EPA ω 3	DPA ω 6	DPA ω 3	DHA ω 3	Outros AGs	Total de AGs
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC86	3,45 $\pm$ 0,17c	4,82 $\pm$ 0,71b	9,72 $\pm$ 0,57ab	2,36 $\pm$ 0,67a	1,34 $\pm$ 0,14bc	1,15 $\pm$ 0,11a	7,00 $\pm$ 1,39a	1,10 $\pm$ 0,06a	0,50 $\pm$ 0,07b	0,59 $\pm$ 0,08a	10,23 $\pm$ 0,12a	1,93 $\pm$ 0,87a	44,18 $\pm$ 1,66ab
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC96	5,74 $\pm$ 0,89b	15,05 $\pm$ 5,53a	13,33 $\pm$ 0,97a	0,00 $\pm$ 0,00b	4,99 $\pm$ 0,76a	2,04 $\pm$ 0,48a	0,00 $\pm$ 0,00a	0,47 $\pm$ 0,17a	4,74 $\pm$ 1,33a	0,00 $\pm$ 0,00b	10,70 $\pm$ 1,25a	2,24 $\pm$ 0,72a	59,31 $\pm$ 7,67a
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC97	10,35 $\pm$ 1,56a	19,56 $\pm$ 3,12a	12,97 $\pm$ 1,96a	2,69 $\pm$ 0,98a	3,56 $\pm$ 0,73ab	0,91 $\pm$ 0,25a	7,83 $\pm$ 3,33a	0,87 $\pm$ 0,18a	1,63 $\pm$ 1,28b	0,00 $\pm$ 0,00b	9,35 $\pm$ 3,17a	3,66 $\pm$ 3,06a	73,39 $\pm$ 14,04a
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC98	0,64 $\pm$ 0,72d	0,34 $\pm$ 0,17b	4,48 $\pm$ 2,37b	0,19 $\pm$ 0,33b	0,17 $\pm$ 0,06c	1,34 $\pm$ 0,15a	5,22 $\pm$ 4,29a	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00b	0,00 $\pm$ 0,00b	1,59 $\pm$ 1,48b	3,34 $\pm$ 2,60a	17,31 $\pm$ 9,58b
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC100	0,43 $\pm$ 0,10d	1,92 $\pm$ 0,62b	3,62 $\pm$ 0,61b	0,00 $\pm$ 0,00b	0,99 $\pm$ 0,17bc	2,22 $\pm$ 1,79a	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00a	1,32 $\pm$ 0,70b	0,00 $\pm$ 0,00b	3,54 $\pm$ 0,37ab	0,37 $\pm$ 0,30a	14,40 $\pm$ 1,41b
Fator F	45,235	17,59	5,512	11,903	7,242	1,343	3,538	2,765	8,582	3,981	4,258	1,336	7,141
P	<0,001	<0,001	0,007	<0,001	0,002	0,312	0,034	0,069	0,001	0,023	0,019	0,314	0,003

C14:0 = Ácido mirístico; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C16:1 = Ácido palmitoléico; C17:0 = Ácido margárico; C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; EPA ω 3 = Ácido eicosapentaenoico (ω 3); DPA ω 6 = Ácido docosapentaenoico (ω 6); DPA ω 3 = Ácido docosapentaenoico (ω 3); DHA ω 3 = Ácido docosaheptaenoico (ω 3); AGs = Ácidos graxos

Os resultados apresentados na **tabela 8** mostram que os isolados de *Aurantiochytrium* sp. nov. apresentaram um perfil de produção de ácidos graxos diferente dos isolados de *Aurantiochytrium* sp., pois as proporções de DHA foram menores, de 9,18% (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC98) a 24,56% (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC86) do total de ácidos graxos e, em compensação, em alguns isolados houve um aumento da produção do ácido pentadecílico (C15:0), chegando até 26,66% (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC97) e superando a produção do DHA nos isolados *Aurantiochytrium* sp. nov. IC96 e IC97. Além disso, em três dos cinco isolados houve a produção do ácido oléico (C18:1), que não havia sido citada nos isolados de *Aurantiochytrium* sp., sendo que no isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC98 este foi o ácido graxo de maior produção (30,17% do total de ácidos graxos). Os resultados ainda mostram que o isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC86 foi o único espécime coletado que apresentou alguma produção de ácido docosapentaenoico (DPA) ômega 3, todos os outros apresentaram somente o DPA ômega 6.

A proporção de PA, comparada ao total de ácidos graxos, nos isolados de *Aurantiochytrium* sp. nov. (**Tabela 8**), tem uma média bem parecida com a dos isolados de *Aurantiochytrium* sp., porém os valores variam menos, de 17,67% (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC97) a 25,90% (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC98).

Ao compararmos os resultados de DHA em mg/g de biomassa seca dos isolados obtidos de *Aurantiochytrium* sp. nov. com os isolados de *Aurantiochytrium* sp., observamos também que a quantidade é bem menor, variando de $1,59 \pm 1,48$ (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC98) a $10,70 \pm 1,25$ mg/g de biomassa seca (isolado *Aurantiochytrium* sp. nov. IC96), sendo que os isolados de *Aurantiochytrium* sp. produziram de $9,33 \pm 4,47$ (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC10) a $105,57 \pm 5,16$ mg/g (isolado *Aurantiochytrium* sp. IC4) (**Tabela 10**).

Estes resultados evidenciam ainda mais a afirmação destes pertencerem a uma espécie nova do gênero.

Tabela 11. Conteúdo de ácidos graxos (mg/g de biomassa seca) produzidos pelos representantes de *Parietichytrium sarkarianum* coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, espécimes com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%

Isolado/Ácido graxo	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2 ω 6	EPA ω 3	DPA ω 6	DHA ω 3	Outros AGs	Total de AG
<i>P. sarkarianum</i> IC12	1,90 $\pm$ 0,84ab	6,39 $\pm$ 2,92b	20,54 $\pm$ 3,58a	1,25 $\pm$ 0,63cd	10,30 $\pm$ 5,95a	23,18 $\pm$ 6,92a	25,10 $\pm$ 13,40ab	6,29 $\pm$ 1,28ab	3,33 $\pm$ 1,32abc	2,72 $\pm$ 1,15abc	11,38 $\pm$ 1,34ab	9,93 $\pm$ 5,14a	122,32 $\pm$ 36,31a
<i>P. sarkarianum</i> IC45	2,00 $\pm$ 0,34a	2,13 $\pm$ 0,26c	14,39 $\pm$ 3,37ab	1,60 $\pm$ 0,31bc	3,70 $\pm$ 0,06b	17,16 $\pm$ 2,25ab	22,05 $\pm$ 2,26abc	1,48 $\pm$ 0,31bc	1,33 $\pm$ 0,22cd	2,55 $\pm$ 0,90abc	2,85 $\pm$ 0,46b	8,93 $\pm$ 2,74a	80,18 $\pm$ 4,33a
<i>P. sarkarianum</i> IC67	3,18 $\pm$ 1,33a	1,23 $\pm$ 0,57c	21,43 $\pm$ 9,77a	3,57 $\pm$ 0,87a	1,46 $\pm$ 0,64b	11,49 $\pm$ 6,45bc	29,30 $\pm$ 13,32a	6,20 $\pm$ 3,59ab	2,02 $\pm$ 1,16bcd	1,28 $\pm$ 0,90abc	9,64 $\pm$ 6,84ab	4,01 $\pm$ 2,41ab	94,80 $\pm$ 47,29a
<i>P. sarkarianum</i> IC79	2,70 $\pm$ 1,35a	1,27 $\pm$ 0,09c	18,79 $\pm$ 7,55a	2,71 $\pm$ 1,12ab	1,40 $\pm$ 0,32b	7,96 $\pm$ 5,75bc	23,25 $\pm$ 15,97abc	5,91 $\pm$ 4,69ab	2,24 $\pm$ 0,54bcd	1,75 $\pm$ 0,83abc	9,98 $\pm$ 4,41ab	6,29 $\pm$ 2,32ab	84,25 $\pm$ 44,19a
<i>P. sarkarianum</i> IC83	1,88 $\pm$ 0,48ab	6,56 $\pm$ 1,28b	15,96 $\pm$ 4,74a	0,88 $\pm$ 0,25cd	5,23 $\pm$ 0,36b	6,75 $\pm$ 0,90bc	10,39 $\pm$ 3,00abc	3,90 $\pm$ 1,33abc	4,31 $\pm$ 2,05ab	3,05 $\pm$ 0,95ab	12,72 $\pm$ 5,55ab	8,07 $\pm$ 1,60a	79,72 $\pm$ 18,69a
<i>P. sarkarianum</i> IC88	0,24 $\pm$ 0,08b	0,76 $\pm$ 0,53c	3,99 $\pm$ 1,39b	0,04 $\pm$ 0,06d	1,22 $\pm$ 0,66b	2,33 $\pm$ 1,05c	0,80 $\pm$ 0,63c	0,09 $\pm$ 0,16c	0,76 $\pm$ 0,41d	1,05 $\pm$ 0,37bc	2,95 $\pm$ 1,43b	0,77 $\pm$ 0,38b	15,00 $\pm$ 6,64b
<i>P. sarkarianum</i> IC95	2,80 $\pm$ 0,07a	12,34 $\pm$ 0,60e	14,17 $\pm$ 0,58ab	0,40 $\pm$ 0,03cd	5,66 $\pm$ 0,40b	9,07 $\pm$ 0,16bc	2,90 $\pm$ 0,09bc	0,40 $\pm$ 0,04c	0,61 $\pm$ 0,05d	0,81 $\pm$ 0,02c	4,71 $\pm$ 0,49b	0,96 $\pm$ 0,03b	54,80 $\pm$ 1,99ab
<i>P. sarkarianum</i> IC119	2,41 $\pm$ 0,08a	5,84 $\pm$ 0,20b	21,14 $\pm$ 0,13a	1,57 $\pm$ 0,05bc	4,23 $\pm$ 0,01b	8,76 $\pm$ 0,92bc	14,23 $\pm$ 0,32abc	7,50 $\pm$ 0,08a	4,93 $\pm$ 0,71a	3,26 $\pm$ 0,20a	15,78 $\pm$ 2,25a	9,03 $\pm$ 0,54a	98,65 $\pm$ 2,59a
Fator F	4,145	34,068	3,977	12,697	6,061	7,827	4,299	5,399	7,513	4,639	5,131	6,724	4,175
P	0,009	<0,001	0,011	<0,001	0,001	<0,001	0,007	0,003	<0,001	0,005	0,003	<0,001	0,009

C14:0 = Ácido mirístico; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C16:1 = Ácido palmitoléico; C17:0 = Ácido margárico; C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; C18:2 ω 6 = Ácido linoléico (ômega 6); EPA ω 3 = Ácido eicosapentaenoico (ômega 3); DPA ω 6 = Ácido docosapentaenoico (ômega 6); DHA ω 3 = Ácido docosahexaenoico (ômega 3); AGs = Ácidos graxos

Os resultados apresentados na **tabela 8** mostram que os isolados de *Parietichytrium sarkarianum* do PEIC produziram em maior proporção ácidos graxos saturados, como o PA e o ácido esteárico, chegando a 26,59% (isolado *P. sarkarianum* IC88) e 21,40% (isolado *P. sarkarianum* IC45) do total de ácidos graxos, respectivamente, e monoinsaturado, como o ácido oléico, chegando a 30,90% (isolado *P. sarkarianum* IC67) do total de ácidos graxos. Os dados mostram também que 50% dos isolados produziram como ácido graxo de maior proporção o PA (*P. sarkarianum* IC83, IC88, IC95 e IC119) e 50% o ácido oléico (*P. sarkarianum* IC12, IC45, IC67 e IC 79). A produção de DHA de todos os isolados de *P. sarkarianum* foi bem menor se comparada aos isolados de *Aurantiochytrium* sp., variando 3,56% (isolado *P. sarkarianum* IC45) a 19,64% (isolado *P. sarkarianum* IC88) do total de ácidos graxos.

Os resultados apresentados corroboram os demonstrados no estudo de Unagul *et al.* (2017), onde isolados de *P. sarkarianum* provenientes de uma área de manguezal em clima tropical produziram uma proporção de DHA inferior (de 13,00 a 15,80% do total de ácidos graxos) a do ácido graxo saturado PA (de 20,39 a 24,49% do total de ácidos graxos), porém esta diferença foi menor se comparada à apresentada por alguns dos isolados do presente estudo. Ou *et al.* (2016) demonstraram em seu estudo que um isolado de *Parietichytrium* sp. proveniente de uma área de manguezal na Malásia (clima equatorial) produziu 67,40% do total de ácidos graxos de PA, ao mesmo tempo que não produziu DHA. Esta diferença de produção pode ser um resultado do clima, pois segundo alguns autores (Huang *et al.* 2003, Jain *et al.* 2004, Sakata *et al.* 2000, Singh *et al.* 1996) as baixas temperaturas estimulam a produção do DHA em Thraustochytriales, assim, consequentemente, quanto maior a temperatura, menor a produção deste ácido.

Se fizermos uma comparação entre os isolados de *P. sarkarianum*, percebemos que o isolado IC95 teve uma produção atípica do ácido pentadecílico (22,51% do total de ácidos graxos), sendo mais similar à produção pelos isolados de *Aurantiochytrium* sp. nov.

Com relação aos resultados em mg/g de biomassa seca, podemos observar na **tabela 11**, que a quantidade de produção de PA, ácido esteárico e ácido oléico variaram, respectivamente, de

3,99±1,39 (isolado *P. sarkarianum* IC88) a 21,43±9,77 mg/g (isolado *P. sarkarianum* IC67), 2,33±1,05 (isolado *P. sarkarianum* IC88) a 23,18±6,92 mg/g (isolado *P. sarkarianum* IC12) e 0,80±0,63 (isolado *P. sarkarianum* IC88) a 29,30±13,32 mg/g (isolado *P. sarkarianum* IC67). O DHA variou de 2,85±0,46 (isolado *P. sarkarianum* IC45) a 15,78±2,25 mg/g de biomassa seca (isolado *P. sarkarianum* IC119).

Os resultados do presente estudo corroboram Yokochi *et al.* (1999), os quais afirmam que os ácidos graxos dominantes produzidos são dependentes dos gêneros dos microrganismos pertencentes ao grupo, e Huang *et al.* (2003) e Gupta *et al.* (2017), que utilizam os perfis dos ácidos graxos como uma característica efetiva no agrupamento dos isolados de Thraustochytriales.

Assim como em outros estudos realizados com o grupo, demonstramos que para um estudo taxonômico eficiente é necessária a combinação de estudos morfológicos, filogenéticos e bioquímicos.

Quanto a produção específica de DHA, os resultados apresentados no presente estudo, de uma proporção de até 52,87% de DHA entre o total de AGs, demonstraram-se compatíveis com outros estudos realizados com o grupo, em condições não otimizadas, que apresentaram isolados com até 60,80% de produção de DHA (Chang *et al.* 2012).

5.5.2. Produção dos principais ácidos graxos em menor tempo de crescimento e em diferentes temperaturas finais de cultivo

Dos 25 isolados utilizados para a análise de perfil de produção e quantificação de ácidos graxos, cinco foram escolhidos para este segundo ensaio (dois isolados de *Aurantiochytrium* sp., um de *Aurantiochytrium* sp. nov. e dois de *Parietichytrium sarkarianum*), tendo em vista a melhor produção dos principais ácidos graxos, especialmente o DHA e o PA.

Os ácidos graxos analisados, neste segundo ensaio, foram os mais expressivos para os isolados escolhidos, ou seja, os que apareceram em maior quantidade no ensaio anterior: ácido pentadecílico (C15:0), ácido palmítico – PA (C16:0) e ácido docosahexaenoico (DHA) para os dois isolados de *Aurantiochytrium* sp.; C15:0, PA, ácido oléico (C18:1) e DHA para o isolado de *Aurantiochytrium* sp. nov.; e PA, ácido esteárico (C18:0), C18:1 e DHA para os dois isolados de *P. sarkarianum*.

Apesar da maior produção dos principais AGs (DHA e PA) ter ocorrido no isolado de *Aurantiochytrium* sp. IC4, os dois isolados de *Aurantiochytrium* sp. selecionados para o presente ensaio foram os isolados IC91 e IC109, pois além da produção de uma alta quantidade destes ácidos, produziram uma quantidade superior de biomassa. O isolado de *Aurantiochytrium* sp. nov. utilizado foi somente o IC97, pois os outros tiveram suas culturas perdidas e os dois isolados de *Parietichytrium sarkarianum* selecionados foram os isolados IC12 e IC83, especialmente pela boa quantidade de biomassa produzida.

5.5.2.1. Menor tempo de crescimento

Neste ensaio verificamos a influência do tempo, comparando os 15 dias de crescimento em 25 °C, utilizado no ensaio de perfil de produção e quantificação de AGs, com um menor tempo de crescimento do isolados, cinco dias a 25 °C, na produção dos principais ácidos graxos. A escolha do

tempo de cinco dias levou em consideração resultados de trabalhos de otimização de parâmetros de cultivo, especialmente para as espécies de *Aurantiochytrium*, que visaram uma maior produção de ácidos graxos (Arafiles *et al.* 2011, Chodchoey & Verduyn 2012, Fan *et al.* 2007, Kim *et al.* 2013, Luderverse-Pascual *et al.* 2016, Manikan *et al.* 2014, 2015, Yaguchi *et al.* 1997), assim como o estudo de Burja *et al.* (2006) que concluiu que quando o isolado é cultivado por um longo período de tempo os PUFA's intermediários são sintetizados em maior quantidade, enquanto que quando cultivados por um curto período de tempo estão predispostos a sintetizar em maior quantidade PUFA's de armazenamento essencial, como o DHA.

Os isolados selecionados e a quantidade de biomassa liofilizada produzida por estes em 5 dias a 25 °C, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs nas condições de cultivo descritas, e em 15 dias a 25 °C (resultados do ensaio anterior) constam na **tabela 12**.

Tabela 12. Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs, por espécimes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados no ensaio de produção de ácidos graxos em menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C). Comparação realizada com os 15 dias de crescimento a 25 °C, em um total de 300 mL de meio de cultura líquido PYGs, dos mesmos isolados no ensaio anterior

Espécie	Isolado	Biomassa liofilizada (g)	
		15 dias	5 dias
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	0,65	0,70
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	0,59	0,67
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	0,53	0,71
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC12	0,36	0,41
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC83	0,43	0,46

A quantidade de biomassa produzida em cinco dias pelos cinco isolados selecionados foi semelhante à quantidade produzida em 15 dias, levando-se em consideração que o volume de

cultivo foi bem maior. Da mesma forma que no ensaio de perfil de produção e quantificação de AGs, observou-se que os isolados de *Aurantiochytrium* spp. produziram uma quantidade um pouco maior de biomassa se comparado aos isolados de *P. sarkarianum* (**Tabela 12**).

Os resultados da influência do menor tempo de crescimento na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos), produzidos pelos cinco isolados testados, estão demonstrados na **tabela 13**. Também são apresentados os resultados da influência do menor tempo de crescimento no conteúdo total e dos principais ácidos graxos em mg/g de biomassa seca, sendo que, com estes resultados foi realizado o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student, para a obtenção dos dados estatísticos. Os resultados (mg/g de biomassa seca) correspondentes ao isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp. estão demonstrados na **tabela 14**, os correspondentes ao isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp. na **tabela 15**, os correspondentes ao isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. na **tabela 16** e os correspondentes aos isolados IC12 e IC83 de *P. sarkarianum* nas **tabelas 17 e 18**, respectivamente.

Tabela 13. Influência do menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) produzidos pelos cinco espécimes selecionados de Labyrinthulomycota coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo

Isolado/Ácido graxo	C15:0		C16:0		C18:0		C18:1		DHA ω3	
Tempo de crescimento	15 d	5 d	15 d	5 d	15 d	5 d	15 d	5 d	15 d	5 d
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC91	10,65	6,86	25,03	27,48	*	*	*	*	49,78	50,41
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC109	16,07	4,90	23,60	29,61	*	*	*	*	44,24	48,88
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC97	26,66	9,32	17,67	22,90	*	*	10,67	0	12,74	44,99
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC12	*	*	16,79	17,27	18,95	5,48	20,52	3,10	9,30	36,08
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC83	*	*	20,02	17,48	8,47	4,12	13,04	2,20	15,96	35,90

*Ácido graxo que não foi considerado neste ensaio para o espécime; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; DHA ω3 = Ácido docosaheptaenoico (ômega 3)

Tabela 14. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	15 Dias	5 Dias	t-test
Total de ácidos graxos	173,88 $\pm$ 8,31a	11,12 $\pm$ 2,65b	32,217 <0,001
C15:0 (Ácido pentadecílico)	18,52 $\pm$ 3,48a	0,76 $\pm$ 0,15b	8,823 <0,001
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	43,52 $\pm$ 2,79a	3,06 $\pm$ 0,67b	24,454 <0,001
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	86,56 $\pm$ 6,66a	5,61 $\pm$ 1,57b	20,490 <0,001

Tabela 15. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	15 Dias	5 Dias	t-test
Total de ácidos graxos	165,63 $\pm$ 14,03a	6,88 $\pm$ 1,13b	19,541 <0,001
C15:0 (Ácido pentadecílico)	26,62 $\pm$ 2,18a	0,34 $\pm$ 0,09b	20,844 <0,001
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	39,09 $\pm$ 3,84a	2,04 $\pm$ 0,24b	16,695 <0,001
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	73,28 $\pm$ 6,27a	3,36 $\pm$ 0,68b	19,208 <0,001

Como podemos observar nas **tabelas 14 e 15**, houve uma queda significativa na produção do total de ácidos graxos pelos dois isolados de *Aurantiochytrium* sp. (IC91 e IC109), quando estes

foram cultivados pelo período de tempo menor (5 dias), o que também foi observado na produção dos ácidos graxos analisados para estes dois isolados (C15:0, PA e DHA). Estes resultados não corroboram os dados da literatura, onde, segundo Jiang *et al.* (2004), após o 5º dia de cultura ocorre uma fase de declínio em isolados de *A. mangrovei*, diminuindo assim o rendimento dos ácidos graxos devido a lise das células. Além disso, a maioria dos estudos de otimização utilizam até cinco dias de crescimento para a produção dos ácidos graxos estudados (Arafiles *et al.* 2011, Burja *et al.* 2006, Chodchoey & Verduyn 2012, Fan *et al.* 2007, Kim *et al.* 2013, Luderverse-Pascual *et al.* 2016, Manikan *et al.* 2014, 2015, Yaguchi *et al.* 1997).

A proporção do DHA e do PA, em relação ao total de ácidos graxos, praticamente não foi alterada (**Tabela 13**), ocorrendo somente um declínio na produção do C15:0, o que também não corrobora dados da literatura que mostram que o conteúdo de SFAs é maior nos primeiros dias de crescimento, ao contrário do que ocorre com os PUFA's (Chang *et al.* 2013 e Jiang *et al.* 2004).

Tabela 16. Conteúdo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	15 Dias	5 Dias	t-test	
Total de ácidos graxos	73,39 $\pm$ 14,04a	14,48 $\pm$ 2,24b	7,177	0,002
C15:0 (Ácido pentadecílico)	19,56 $\pm$ 3,12a	1,35 $\pm$ 0,36b	10,039	<0,001
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	12,97 $\pm$ 1,96a	3,32 $\pm$ 0,31b	8,428	0,001
C18:1 (Ácido oléico)	7,83 $\pm$ 3,33a	0,00 $\pm$ 0,00b	4,069	0,015
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	9,35 $\pm$ 3,17a	6,52 $\pm$ 0,60a	1,519	0,203

A **tabela 16** nos mostra que também houve uma queda significativa na produção do total de ácidos graxos pelo isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov., quando este foi cultivado por um período de tempo menor (5 dias). Observamos queda na produção dos SFAs (C15:0 e PA) e do MUFA C18:1, porém o DHA não apresentou queda significativa.

Estes resultados com isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. também não corroboraram os dados da literatura citados anteriormente e mostraram que este se comportou de maneira diferente dos isolados de *Aurantiochytrium* sp. utilizados neste mesmo ensaio, evidenciando que o comportamento desta nova espécie de *Aurantiochytrium* é bem diferente do comportamento dos isolados das espécies já descritas para o gênero.

Se compararmos os dados de proporção de produção de cada ácido graxo em relação ao total, verificamos que esta foi maior no 5º dia de crescimento, em comparação ao 15º dia, para o PA e para o DHA, enquanto que para o C15:0 essa proporção caiu bastante, além de não ocorrer a produção do C18:1 no isolado com 5 dias de crescimento (**Tabela 13**).

Tabela 17. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC12 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	15 Dias	5 Dias	t-test	
Total de ácidos graxos	122,32 $\pm$ 36,32a	52,20 $\pm$ 11,82b	3,18	0,034
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	20,54 $\pm$ 3,58a	9,01 $\pm$ 2,37b	4,65	0,01
C18:0 (Ácido esteárico)	23,18 $\pm$ 6,92a	2,86 $\pm$ 0,39b	5,079	0,007
C18:1 (Ácido oléico)	25,10 $\pm$ 13,41a	1,62 $\pm$ 0,32b	3,034	0,039
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	11,38 $\pm$ 1,34a	18,83 $\pm$ 4,64a	-2,675	0,056

Tabela 18. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca) produzidos no menor tempo de crescimento (5 dias a 25 °C), comparados com o tempo de crescimento do ensaio anterior (15 dias a 25 °C), pelo isolado IC83 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, os tempos de crescimento (15 dias e 5 dias) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	15 Dias	5 Dias	t-test	
Total de ácidos graxos	79,71 $\pm$ 18,69a	44,43 $\pm$ 12,71a	2,704	0,054
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	15,96 $\pm$ 4,74a	7,77 $\pm$ 1,93a	2,775	0,05
C18:0 (Ácido esteárico)	6,75 $\pm$ 0,90a	1,83 $\pm$ 0,35b	8,859	<0,001
C18:1 (Ácido oléico)	10,39 $\pm$ 3,00a	0,98 $\pm$ 0,23b	5,413	0,006
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	12,72 $\pm$ 5,55a	15,95 $\pm$ 5,64a	-0,707	0,518

Como observamos nas **tabelas 17 e 18**, para os isolados de *P. sarkarianum* houve uma queda significativa na produção do total de ácidos graxos pelo isolado IC12, quando este foi cultivado por 5 dias, porém não houve esta queda na produção pelo isolado IC83, nos mostrando que cada isolado se comporta de maneira específica. Consequentemente, no isolado IC12, verificamos a queda significativa na produção dos SFAs, PA e C18:0, e do MUFA C18:1, no entanto não houve diferença na produção do DHA. No isolado IC83 também ocorreram quedas significativas na produção do SFA C18:0 e do MUFA C18:1, sem queda na produção do PA e DHA. Estes resultados não corroboram os resultados de Jiang *et al.* (2004) e Chang *et al.* (2013), onde, nos isolados testados por eles, o conteúdo de SFAs foi maior nos primeiros dias de crescimento, no entanto, não há dados específicos de otimização para este gênero/espécie.

A proporção de produção do PA, em relação ao total de ácidos graxos, no isolados *P. sarkarianum* praticamente não foi alterada (**Tabela 13**), porém houve um declínio na proporção do C18:0 e C18:1, e um aumento na proporção do DHA.

5.5.2.2. Diferentes temperaturas finais de cultivo

Neste ensaio verificamos a influência da temperatura final (último dia) de cultivo, 25 °C e 10 °C, na produção dos principais ácidos graxos. A escolha da diminuição da temperatura no último dia de crescimento levou em consideração trabalhos, especialmente com espécies de *Aurantiochytrium*, que relataram que as baixas temperaturas estimulam a produção ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (Bowles *et al.* 1999, Huang *et al.* 2003, Jain *et al.* 2004, Sakata *et al.* 2000, Singh *et al.* 1996), apesar da temperatura ideal de crescimento ser em torno de 25 °C (Burja *et al.* 2006, Kumon *et al.* 2002, Perveen *et al.* 2006, Rosa 2010, Yokochi *et al.* 1998).

Os isolados selecionados e a quantidade de biomassa liofilizada produzida por estes, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs, nas condições de cultivo utilizadas (nas duas diferentes temperaturas finais, 25 °C e 10 °C) estão demonstrados na **tabela 19**.

Tabela 19. Quantidade de biomassa liofilizada (g) produzida em 5 dias, em um total de 750 mL de meio de cultura líquido PYGs, por espécimes de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Pariatichytrium sarkarianum*, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo, utilizados para o ensaio de produção de ácidos graxos em diferentes temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C)

Espécie	Isolado	Biomassa liofilizada (g)	
		25 °C	10 °C
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	0,70	0,75
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	0,67	0,63
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	0,71	0,69
<i>Pariatichytrium sarkarianum</i>	IC12	0,41	0,40
<i>Pariatichytrium sarkarianum</i>	IC83	0,46	0,49

Não houve diferença na quantidade de biomassa produzida em 5 dias, pelos cinco isolados selecionados, nas diferentes temperaturas finais de cultivo, sendo que, da mesma forma que nos ensaios anteriores, os isolados de *Aurantiochytrium* spp. produziram uma quantidade de biomassa maior se comparado com os de *P. sarkarianum* (**Tabela 19**).

Os resultados da influência da temperatura final de cultivo na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos), produzidos pelos cinco isolados testados, constam na **tabela 20**.

Os resultados, em mg/g de biomassa seca, com os dados apresentados pela análise estatística (teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student), da influência da temperatura final de cultivo no conteúdo dos principais ácidos graxos, correspondentes ao isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp., constam na **tabela 21**, ao isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp. na **tabela 22**, ao isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. na **tabela 23** e aos isolados IC12 e IC83 de *P. sarkarianum* nas **tabelas 24 e 25**, respectivamente.

Tabela 20. Influência da temperatura final de cultivo (25 °C e 10 °C) na proporção dos principais ácidos graxos (% - porcentagem em relação ao total de ácidos graxos) produzidos pelos cinco espécimes selecionados de Labyrinthulomycota coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo

Isolado/Ácido graxo	C15:0		C16:0		C18:0		C18:1		DHA ω3	
Temperatura final de cultivo	25°C	10°C	25°C	10°C	25°C	10°C	25°C	10°C	25°C	10°C
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC91	6,86	10,67	27,48	28,39	*	*	*	*	50,41	45,14
<i>Aurantiochytrium</i> sp. IC109	4,90	3,48	29,61	22,95	*	*	*	*	48,88	55,57
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov. IC97	9,32	11,54	22,90	21,75	*	*	0	0	44,99	42,21
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC12	*	*	17,27	15,05	5,48	5,97	3,10	8,98	36,08	28,08
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> IC83	*	*	17,48	12,35	4,12	4,59	2,20	2,19	35,90	43,49

*Ácido graxo que não foi considerado neste ensaio para o espécime; C15:0 = Ácido pentadecílico; C16:0 = Ácido palmítico (PA); C18:0 = Ácido esteárico; C18:1 = Ácido oléico; DHA ω3 = Ácido docosahexaenoico (ômega 3)

Tabela 21. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC91 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	25 °C	10 °C	t-test	
Total de ácidos graxos	11,12 $\pm$ 2,65a	17,21 $\pm$ 2,83a	2,713	0,053
C15:0 (Ácido pentadecílico)	0,76 $\pm$ 0,15b	1,84 $\pm$ 0,31a	5,42	0,006
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	3,06 $\pm$ 0,67b	4,89 $\pm$ 0,64a	3,425	0,027
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	5,61 $\pm$ 1,57a	7,77 $\pm$ 1,51a	1,723	0,16

Tabela 22. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	25 °C	10 °C	t-test	
Total de ácidos graxos	6,88 $\pm$ 1,13a	8,61 $\pm$ 0,32a	2,55	0,063
C15:0 (Ácido pentadecílico)	0,34 $\pm$ 0,09a	0,30 $\pm$ 0,03a	-0,704	0,52
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	2,04 $\pm$ 0,24a	1,98 $\pm$ 0,19a	-0,338	0,753
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	3,36 $\pm$ 0,68b	4,79 $\pm$ 0,27a	3,361	0,028

A proporção de produção de cada ácido graxo em relação ao total, nos isolados de *Aurantiochytrium* sp. (IC91 e IC109) não variou muito (**Tabela 20**), na temperatura de 10 °C

ocorreu um pequeno aumento na produção do C15:0 e do PA e uma pequena queda na produção do DHA, no isolado IC91, sendo que, no isolado IC109 ocorreu exatamente o contrário. Estes resultados corroboram Jiang *et al.* (2004) e Chang *et al.* (2013), que verificaram que os PUFA's aumentam proporcionalmente a diminuição dos SFAs e vice-versa, ocorrendo sempre uma inversão de produção.

Apesar da pouca diferença na proporção de produção, as **tabelas 21 e 22** evidenciam um aumento significativo na produção (mg/g de biomassa seca) em 10 °C, comparada a 25 °C, do C15:0 e do PA no isolado IC91 e do DHA no isolado IC109. Este aumento do DHA no isolado IC109 de *Aurantiochytrium* sp. corrobora estudos que indicam que baixas temperaturas estimulam a produção de PUFA's de cadeia longa (Bowles *et al.* 1999, Huang *et al.* 2003, Jain *et al.* 2004, Sakata *et al.* 2000, Singh *et al.* 1996).

Tabela 23. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov., coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	25 °C	10 °C	t-test	
Total de ácidos graxos	14,48 $\pm$ 2,24b	19,62 $\pm$ 0,91a	3,675	0,021
C15:0 (Ácido pentadecílico)	1,35 $\pm$ 0,36b	2,26 $\pm$ 0,26a	3,558	0,024
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	3,32 $\pm$ 0,31b	4,27 $\pm$ 0,45a	3,032	0,039
C18:1 (Ácido oléico)	0,00 $\pm$ 0,00a	0,00 $\pm$ 0,00a	0	1
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	6,52 $\pm$ 0,60b	8,28 $\pm$ 0,34a	4,445	0,011

O isolado IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov. apresentou um aumento significativo na produção (mg/g de biomassa seca) total de ácidos graxos em 10 °C, comparada a 25 °C (**Tabela 23**), e assim, conseqüentemente, um aumento significativo na produção (mg/g de biomassa seca) de todos os ácidos graxos comparados neste estudo, exceto o C18:1, que não foi produzido em nenhuma das temperaturas no cultivo em de cinco dias, apesar de ter apresentado uma alta produção no cultivo em 15 dias. Assim como no caso dos isolados de *Aurantiochytrium* sp., o resultado de aumento da produção do DHA corrobora os estudos que indicam que baixas temperaturas estimulam a produção PUFA's (Bowles *et al.* 1999, Huang *et al.* 2003, Jain *et al.* 2004, Sakata *et al.* 2000, Singh *et al.* 1996). No entanto, a proporção de produção de todos os ácidos graxos, em relação ao total, não variou muito (**Tabela 20**), apresentando, na temperatura de 10 °C, um aumento na produção do C15:0 e uma pequena queda na produção do PA e do DHA.

Tabela 24. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC12 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	25 °C	10 °C	t-test	
Total de ácidos graxos	52,20 $\pm$ 11,82a	70,95 $\pm$ 8,14a	2,264	0,086
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	9,01 $\pm$ 2,37a	10,68 $\pm$ 1,84a	0,964	0,39
C18:0 (Ácido esteárico)	2,86 $\pm$ 0,39a	4,24 $\pm$ 0,91a	2,403	0,074
C18:1 (Ácido oléico)	1,62 $\pm$ 0,32b	6,37 $\pm$ 1,35a	5,93	0,004
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	18,83 $\pm$ 4,64a	19,92 $\pm$ 1,03a	0,396	0,712

Tabela 25. Contéudo total e dos principais ácidos graxos (mg/g biomassa seca), em duas diferentes temperaturas finais de cultivo, produzidos pelo isolado IC83 de *Parietichytrium sarkarianum*, coletado no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo. Os valores correspondem a média $\pm$ o desvio padrão. Para cada ácido graxo, as temperaturas finais de cultivo (25 °C e 10 °C) com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação de duas médias Teste *t* de Student

Ácido graxo	25 °C	10 °C	t-test	
Total de ácidos graxos	44,43 $\pm$ 12,71a	36,43 $\pm$ 1,41a	-1,084	0,339
C16:0 (Ácido palmítico - PA)	7,77 $\pm$ 1,93a	4,50 $\pm$ 0,11b	-2,929	0,043
C18:0 (Ácido esteárico)	1,83 $\pm$ 0,35a	1,67 $\pm$ 0,41a	-0,509	0,637
C18:1 (Ácido oléico)	0,98 $\pm$ 0,23a	0,80 $\pm$ 0,04a	-1,311	0,26
DHA ω 3 (Ácido docosahexaenoico ω 3)	15,95 $\pm$ 5,64a	15,84 $\pm$ 0,65a	-0,0326	0,976

A proporção de produção do MUFA C18:1 e do PUFA DHA, em relação ao total de ácidos graxos, foi diferente nos dois isolados de *P. sarkarianum* (IC12 e IC83) (**Tabela 20**), mostrando que, assim como no ensaio de diferentes tempos de crescimento, estes dois isolados se comportam de maneira diferente. O isolado IC12 teve um aumento um pouco maior somente na proporção de produção do C18:1 e uma diminuição na do DHA, e o isolado IC83 manteve a proporção de produção do C18:1 e aumentou a proporção de produção do DHA. A produção do PA teve uma pequena queda nos dois isolados e a do C18:0 praticamente não foi alterada.

As **tabelas 24 e 25** nos mostram que não houve diferença significativa na produção total (mg/g de biomassa seca) dos ácidos graxos na temperatura final de 10 °C, comparada a 25 °C, e nem de cada ácido graxo comparado neste ensaio, exceto do C18:1 que apresentou um aumento significativo no isolado IC12 e o PA que apresentou uma queda significativa no isolado IC83, no entanto, como já mencionado, não há dados específicos de otimização para este gênero/espécie.

5.6. Preservação dos espécimes obtidos

Como já citado anteriormente, não foi possível manter o cultivo de nenhum isolado do gênero *Labyrinthula*, devido a sua curta viabilidade em meio de cultura. No entanto, 42 isolados pertencentes a *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *Parietichytrium sarkarianum*, estão sendo mantidos em meio de cultura sólido PYGs a aproximadamente 20 °C e repicados quinzenalmente, pois a viabilidade em meio de cultura é curta (máximo 20 dias) e mesmo com o uso dos antibióticos, ocorre uma alta contaminação por bactérias e leveduras, por isso, ao longo do tempo, vários isolados foram perdidos. Com isso, pensando-se em uma maior viabilidade e facilidade de preservação, além da manutenção dos isolados em meio de cultura sólido PYGs, outros métodos de preservação estão sendo conduzidos.

5.6.1. Preservação do isolados pelo método de *Castellani* e em meio líquido PYGs

O método de *Castellani* não foi efetivo para a preservação de nenhum dos 10 isolados testados (*Aurantiochytrium* sp. IC1, IC4, IC8, IC9, IC10, IC17, IC18, IC19, IC28 e *P. sarkarianum* IC12), sendo que, após um mês de preservação, não foi possível reativar nenhum dos espécimes, além de ser observada uma alta contaminação por bactérias. O mesmo ocorreu com os sete isolados preservados em meio de cultura líquido PYGs (*Aurantiochytrium* sp. IC28, IC17, *Aurantiochytrium* sp. nov. IC86, IC97, IC100 e *P. sarkarianum* IC12, IC45), que após reativação, depois de um mês de preservação, nenhum dos espécimes estava viável. Com isso, foi demonstrado que nenhum destes dois métodos é efetivo para a preservação de isolados pertencentes ao grupo.

5.6.2. Preservação dos isolados em óleo mineral e em papel filtro armazenado a -80 °C (ultrafreezer) e/ou a -20 °C (freezer frost-free)

Estes dois métodos foram os que se mostraram mais viáveis para uma manutenção efetiva dos isolados pertencentes ao grupo, sendo a preservação em óleo mineral viável por até seis meses e a preservação em papel filtro, armazenado a -80 °C e/ou -20 °C, viável por nove meses, para os isolados do gênero *Aurantiochytrium*.

No método de preservação em óleo mineral os 10 isolados preservados (*Aurantiochytrium* sp. IC1, IC4, IC8, IC10, IC16, IC18, IC19, IC62, *Aurantiochytrium* sp. nov. IC86 e *P. sarkarianum* IC12) mantiveram-se viáveis por até três meses, sendo que, após a reativação no sexto mês, apenas o isolado *Aurantiochytrium* sp. IC10 ainda permanecia viável.

No método de preservação em papel filtro, em ultrafreezer a -80 °C, dos sete isolados preservados (*Aurantiochytrium* sp. IC8, IC10, IC19, *Aurantiochytrium* sp. nov. IC97 e *P. sarkarianum* IC12, IC45, IC95) os três isolados de *Aurantiochytrium* sp. (IC8, IC10 e IC19) mantiveram-se viáveis por pelo menos seis meses e continuam em preservação. O isolado de *Aurantiochytrium* sp. nov. (IC97) mostrou-se viável após um mês de preservação, porém uma alta contaminação por bactérias impediu o seu crescimento. Os isolados de *P. sarkarianum* (IC12, IC45 e IC95) não estavam viáveis mesmo após um mês de preservação, também apresentando contaminação por bactérias e leveduras.

Os resultados apresentados pela preservação em papel filtro em freezer frost-free (aproximadamente -20 °C) dos 20 isolados preservados (*Aurantiochytrium* sp. IC1, IC4, IC8, IC9, IC10, IC16, IC18, IC19, IC62, IC65, IC91 e IC109, *Aurantiochytrium* sp. nov. IC97 e *Parietichytrium sarkarianum* IC12, IC45, IC67, IC79, IC83, IC88 e IC119) estão apresentados na **tabela 26**. A **figura 27** mostra o crescimento do isolado IC4, após um mês de preservação.

Tabela 26. Viabilidade de preservação em papel filtro armazenado em freezer frost-free (aproximadamente -20 °C) de 20 isolados, coletados no Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), Cananéia, São Paulo

Espécie	Isolado	Tempo de viabilidade
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC1	3 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC4	1 mês
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC8	9 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC9	Contaminou
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC10	9 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC16	3 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC18	Contaminou
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC19	9 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC62	6 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC65	1 mês
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC91	6 meses
<i>Aurantiochytrium</i> sp.	IC109	Contaminou
<i>Aurantiochytrium</i> sp. nov.	IC97	3 meses
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC12	Não viável em 1 mês
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC45	3 meses
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC67	Não viável em 1 mês
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC79	3 meses
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC83	Não viável em 1 mês
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC88	Não viável em 1 mês
<i>Parietichytrium sarkarianum</i>	IC119	Não viável em 1 mês

Todos os isolados preservados em papel filtro, armazenados em ultrafreezer -80 °C e/ou freezer frost-free (aproximadamente -20 °C), que estavam viáveis após 9, 6 e 3 meses e após 1 mês, sem contaminação, continuam sendo preservados. Para os isolados contaminados e os que não estavam viáveis na primeira tentativa, o método de preservação vai ser repetido e testado novamente.

Como podemos observar na **figura 27**, no método de preservação em papel filtro, tanto em -80 °C como em -20 °C, o crescimento não ocorre em todos os pedaços de papel filtro, mesmo que estes contenham células do isolado, isto nos indica uma mortalidade destas durante o processo de preservação, mesmo para os isolados cuja a preservação foi efetiva, sendo assim, é necessário um grande número de réplicas na preservação dos isolados por este método.

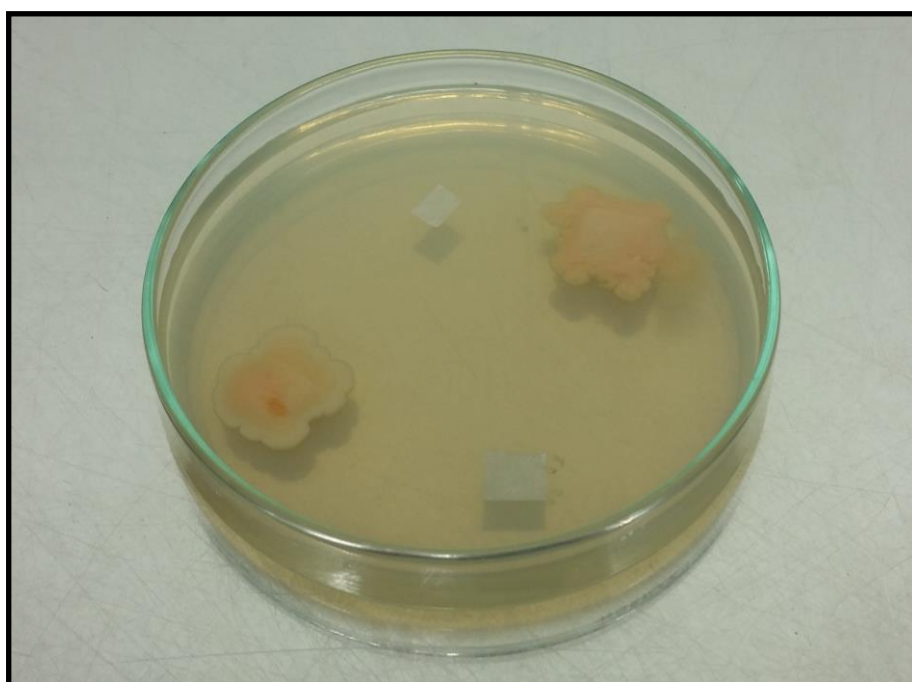


Figura 27. Crescimento do isolado IC4 de *Aurantiochytrium* sp. preservado em papel filtro armazenado em freezer frost-free (-20 °C)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo mais detalhado de representantes do filo Labyrinthulomycota no Brasil, com a inclusão das primeiras sequências gênicas (região SSU rDNA) de isolados brasileiros no banco de dados GenBank.

Os espécimes, provenientes das seis coletas realizadas no PEIC, no período de agosto de 2012 a setembro de 2015, foram identificados como *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov., *Labyrinthula* sp. e *Parietichytrium sarkarianum*, todos primeira citação para o Brasil. *Aurantiochytrium* sp. nov. é uma espécie nova para a ciência e será brevemente publicada.

A quantidade de biomassa produzida pelos isolados do presente estudo demonstra que as condições de cultivo utilizadas foram adequadas, sendo que, nestas condições, os isolados de *Aurantiochytrium* sp. produzem maior biomassa que os isolados de *P. sarkarianum* e os de *Aurantiochytrium* sp. nov.

Todos os espécimes coletados no PEIC apresentaram quantidades significativas de DHA, sendo que, alguns espécimes apresentaram também outros ácidos graxos poli-insaturados ômega 3.

O isolado IC4 produziu, em 15 dias na temperatura de 25 °C, a maior quantidade de DHA (105,57 mg/g) dentre os espécimes de *Aurantiochytrium* sp., no entanto os isolados IC91 e IC109 produziram uma quantidade superior de biomassa, com uma alta quantidade de DHA (até 86,56 mg/g), mostrando-se mais viáveis para futuros estudos.

Entre os isolados de *Parietichytrium sarkarianum*, 50% produziram, em 15 dias na temperatura de 25 °C, o PA como ácido graxo de maior quantidade e 50% produziram o DHA como ácido graxo de maior quantidade.

Devido à produção de biomassa relativamente alta, a maioria dos isolados brasileiros de *Aurantiochytrium* sp. e *Parietichytrium sarkarianum*, provenientes deste estudo, podem ser futuramente utilizados como potenciais produtores de DHA e PA, respectivamente.

A análise comparativa do perfil de ácidos graxos dos isolados revela que os isolados de *Parietichytrium sarkarianum* são mais adequados para a produção de biodiesel, uma vez que estes isolados possuem maior teor de SFAs e MUFAs (PA, ácido esteárico e ácido oléico) do que os isolados de *Aurantiochytrium* sp., que por sua vez mostraram-se mais adequados para a produção de DHA.

O ácido palmitoléico (C16:1) e ácido oléico (C18:1) só foram produzidos por *Parietichytrium sarkarianum* e *Aurantiochytrium* sp. nov., o ácido linoléico (C18:2) só por *P. sarkarianum* e o ácido docosapentaenoico ω 3 (DPA ω 3) só por um isolado de *Aurantiochytrium* sp. nov.

Os isolados de *Aurantiochytrium* sp. nov. apresentaram um perfil de ácidos graxos diferente dos isolados de *Aurantiochytrium* sp., as quantidades de DHA produzidas foram bem menores, sendo que, em alguns isolados, a produção do ácido pentadecílico (C15:0) supera a de DHA. Além disso, três dos cinco isolados produziram ácido oléico (C18:1) e um dos isolados produziu o ácido docosapentaenoico ω 3, os quais não foram produzidos pelos isolados de *Aurantiochytrium* sp. Este perfil de ácidos graxos evidencia ainda mais a afirmação destes isolados pertencerem a uma espécie nova de *Aurantiochytrium*.

Em condições de cultura idênticas, o perfil de ácidos graxos dos isolados podem ser utilizados como ferramenta para agrupamentos taxonômicos, pois há diferença no perfil de ácidos graxos entre isolados de espécies diferentes. Sendo assim, conclui-se que os Thraustochytriales podem ser agrupados por meio das características morfológicas combinadas com as moleculares (SSU rDNA) e com os perfis de ácidos graxos, pois a árvore filogenética proveniente deste estudo evidencia que os isolados com características morfológicas e perfil de ácidos graxos semelhantes formam um clado monofilético.

A quantidade de biomassa produzida em cinco dias, por isolados de *Aurantiochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. nov. e *P. sarkarianum*, foi semelhante a quantidade produzida em 15 dias (levando-se em consideração o volume e as condições de cultivo utilizadas em cada período).

Porém, o rendimento do DHA (mg/g de biomassa seca) dos isolados de *Aurantiochytrium* sp. cultivados por cinco dias foi menor que o rendimento do DHA obtido, pelos mesmos isolados, em 15 dias de cultivo.

A temperatura final não interferiu na quantidade de biomassa produzida pelos isolados e só teve efeito no rendimento do DHA (mg/g de biomassa seca) nos isolados IC109 de *Aurantiochytrium* sp. e IC97 de *Aurantiochytrium* sp. nov.

Estudos adicionais devem ser realizados, com os isolados provenientes deste estudo, visando a otimização das condições de cultivo (tempo de crescimento, temperatura, meio de cultura, salinidade e pH) especialmente para uma melhor produção do DHA, por isolados de *Aurantiochytrium* sp., e do PA, por isolados de *Parietichytrium sarkarianum*.

Dos métodos de preservação testados neste estudo, o mais efetivo, especialmente para o gênero *Aurantiochytrium*, foi o método de preservação em papel filtro congelado em -80 °C (ultrafreezer) e/ou -20 °C (freezer frost-free), proporcionando uma viabilidade de até nove meses; seguido do método de preservação em óleo mineral, o qual também foi efetivo para o gênero, proporcionando uma viabilidade de até seis meses.

Este estudo contribuiu para a ampliação do conhecimento da diversidade brasileira do filo Labyrinthulomycota, para o enriquecimento de sequências no banco de dados GenBank, para o conhecimento do perfil de ácidos graxos de isolados brasileiros, bem como conhecimento dos melhores métodos, dentre os testados, na preservação de isolados pertencentes ao grupo, podendo estes serem utilizados em futuros estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasen, I.M., Ertesvag, H., Heggeset, T.M.B, Liu, B., Brautaset, T., Vadstein, O. & Ellingsen, T.E.** 2016. Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 4309-4321. DOI 10.1007/s00253-016-7498-4
- Ab'Saber, A.N.** 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia* 52: 1-21.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L.L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A. & Spiegel, F.W.** 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59 (5): 429-493.
- Aki, T., Hachida, K., Yoshinaga, M., Katai, Y., Yamasaki, T., Kawamoto, S., Kakizono, T., Maoka, T., Shigeta, S., Suzuki, O. & Ono, K.** 2003. Thraustochytrid as potential source of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80: 789-794.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M.M.** 1996. *Introductory Mycology* (4ª edição). John Wiley & Sons, New York. 868p.
- Anderson, O.R. & Cavalier-Smith, T.** 2012. Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a new small freshwater species, and a revised analysis of Labyrinthulea (Heterokonta). *Acta Protozoologica* 51: 291-304.
- Anderson, A. & Wynn, J.** 2001. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids, In: Ratledge, C. & Kristiansen, B. (Eds.). *Basic Biotechnology* (2ª edição editada). Cambridge University Press, England. 679p.

- Aparecido, C.C. & Figueiredo, M.B.** 1997. Manutenção das características originais de diferentes fitopatógenos preservados por períodos superiores a vinte anos. In: 10 Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico 64: 59-59.
- Aparecido, C.C., Camilo, C. & Vaz Lobo, R.S.** 2013a. Preservação de *Pythium* e *Phytophthora* - 80 °C. Biológico, São Paulo 75 (1): 5-10.
- Aparecido, C.C., Camilo, C. & Furtado, E.L.** 2013b. Preservação de uredinosporos de *Puccinia psidii* sob ultracongelamento (-80 °C) e avaliação da viabilidade patogênica. Biológico, São Paulo 75 (1): 11-16.
- Arafiles, K.H.V., Alcantara, J.C.O., Cordero, P.R.F., Batoon J.A.L., Galura, F.S., Leão, E.M. & Dedeles, G.R.** 2011. Cultural optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. Mycosphere 2 (5): 521-531.
- Atienza, G.A.M.V., Arafiles, K.H.V., Carmona, M.C.M., Garcia, J.P.C., Macabago, A.M.B., Peñacerrada, B.J.D.C., Cordero, P.R.F., Bennett, R.M. & Dedeles, G.R.** 2012. Carotenoid analysis of locally isolated thraustochytrids and their potential as an alternative fish feed for *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). Mycosphere 3 (4): 420-428. DOI 10.5943/mycosphere/3/4/5
- Bahnweg, G. & Sparrow Jr., F.K.** 1974. Four new species of *Thraustochytrium* from Antarctic regions, with notes on the distribution of zoosporic fungi in the Antarctic marine ecosystems. American Journal of Botany 61: 754-766.
- Barchay, W. & Zeller, S.** 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. Journal of the World Aquaculture Society 27 (3): 314-322.
- Barros, F., Melo, M.M.R.F., Chiea, S.A.C., Kirizawa, M., Wanderley, M.G.L. & Jung-Mendaçolli, S.L.** 1991. Flora fanerogâmica da Ilha do Cardoso: caracterização geral da vegetação e listagem das espécies ocorrentes. Hucitec, São Paulo. 184p.

- Bennett, R.M., Honda, D., Beakes, G.W. & Thines M.** 2017. Labyrinthulomycota. In: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B. & Slamovits C.H. (Eds.). Handbook of the Protists. Springer, Boston. Pp. 507-542. DOI 10.1007/978-3-319-32669-6_25-1
- Bergmann, N., Fricke, B., Schmidt, M.C., Tams, V., Beining, K., Schwitte, H., Boettcher, A.A., Martin, D.L., Bockelmann, A.C., Reusch, T.B. & Rauch, G.** 2011. A quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the seagrass pathogen *Labyrinthula zosterae*. Molecular Ecology Resources 11 (6): 1076-1081.
- Bernardi, J.V.E., Landim, P.M.B., Barreto, C.L. & Monteiro, R.C.** 2005. Spatial study of the vegetation gradiente from Cardoso Island State Park, SP, Brazil. Holos Environment, Rio Claro 5: 1-22.
- Bigelow, D.M., Olsen, M.W. & Gilbertson, R.L.** 2005. *Labyrinthula terrestris* sp. nov., a new pathogen of turf grass. Mycologia 97 (1): 185-190.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J.** 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37: 911-917.
- Bongiorni, L., Jain, R., Raghukumar, S. & Aggarwal, R.K.** 2005. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. Protist 156: 303-315.
- Booth, T.** 1979. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. Revista de Microbiologia 10 (4): 123-138.
- Boro, M.C.** 2004. Estudo dos métodos de preservação utilizados na Micoteca de fungos fitopatogênicos do Instituto Biológico de São Paulo e desenvolvimento de culturas axênicas de espécies de ferrugens (Uredinales). Monografia de Conclusão de Curso, Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Grande ABC, Santo André.
- Boro, M.C. & Figueiredo, M.B.** 2005. Teste de viabilidade e patogenicidade de *Phytophthora citrophthora* preservada em laboratório. In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, São Paulo. Summa Phytopathologica 2005.

- Boro, M.C., Passador, M.M., Aparecido, C.C. & Figueiredo, M.B.** 2004. Teste de viabilidade e patogenicidade de culturas preservadas na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo pelo método de óleo mineral (implantado em julho de 2003), repicagens periódicas e *Castellani* (água destilada). In: 15º Encontro de Biólogos do CRBio-1, São Pedro. 15º Encontro de Biólogos do CRBio-1 2004.
- Boro, M.C., Harakava, R. & Pires-Zottarelli, C.L.A.** 2018. Labyrinthulomycota from Brazilian mangrove swamps and coastal waters. *Botanica Marina* (on line) DOI 10.1515/bot-2017-0052
- Bower, S.M.** 1987. *Labyrinthuloides haliotidis* n. sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in British Columbia mariculture facility. *Canadian Journal of Botany* 65: 1996-2007.
- Bowles, R.D., Hunt, A.E., Bremer, G.B., Duchars, M.G. & Eaton, R.A.** 1999. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *Journal of Biotechnology* 70: 193-202.
- Braden, L.M. & Carroll, K.K.** 1986. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids* 21: 285-288.
- Bremer, G.** 2000. Isolation and culture of thraustochytrids. In: Hyde, K.D. & Pointing, S.B. (Eds.). *Marine Mycology – A Practical Approach*. Fungal Diversity Press, Hong Kong. Pp. 49-61.
- Burja, A.M., Radianingtyas, H., Windust, A. & Barrow, C.J.** 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 1161-1169.
- Byreddy, A.R.** 2016. Thraustochytrids as an alternative source of omega-3 fatty acids, carotenoids and enzymes. *Lipid Technology* 28 (3-4): 68-70. DOI 10.1002/lite.201600019
- Campos, L.P.** 2009. Preservação ambiental e ecoturismo na comunidade do Marujá, Ilha do Cardoso-SP. 13º Simpósio brasileiro de geografia e física aplicada, Viçosa: 4-5.

- Cañavate, J.P. & Lubian, L.M.** 1995. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology* 124: 325-334.
- Cañavate, J.P. & Lubian, L.M.** 1997. Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae. *Cryobiology* 35: 143-149.
- Carlton, J.T., Vermeij, G.J., Lindberg, D.R., Carlton, D.A. & Dudley, E.C.** 1991. The 1st historical extinction of a marine invertebrate in an ocean-basin - the demise of the eelgrass limpet *Lottia alveus*. *Biological Bulletin* 180 (1): 72-80.
- Carter, C.G., Bransden, M.P., Lewis, T.E. & Nichols, P.D.** 2003. Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Marine Biotechnology* 5: 480-492.
- Castellani, A.** 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 225-226.
- Cavalier-Smith, T. & Chao, E.E-Y.** 2006. Phylogeny and Megasytematics of Phagotrophic Heterokonts (Kingdom Chromista). *Journal of Molecular Evolution* 62: 388-420. DOI 10.1007/s00239-004-0353-8
- Chang, K.J.L., Mansour, M.P., Dunstan, G.A., Blackburn, S.I., Koutoulis, A. & Nichols P.D.** 2011. Odd-chain polyunsaturated fatty acids in thraustochytrids. *Phytochemistry* 72: 1460-1465.
- Chang, K.J.L., Dunstan, G.A., Abell, G.C.J., Clementson, L.A., Blackburn, S.I., Nichols P.D. & Koutoulis, A.** 2012. Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 2215-2231.
- Chang, G., Luo, Z., Gu, S., Wu, Q., Chang, M. & Wang, X.** 2013. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium* sp. S31 cultured on glycerol. *Bioresource Technology* 142: 255-260.

- Chang, K.J.L., Nichols C.M., Blackburn, S.I., Dunstan, G.A., Koutoulis, A. & Nichols P.D.** 2014. Comparison of Thraustochytrids *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide. *Marine Biotechnology* 16: 396-411.
- Chen, G., Fan, K.W., Lu, F.P., Li, Q., Aki, T., Chen, F. & Jiang, Y.** 2010. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *New Biotechnology* 27 (4): 382-389.
- Chodchoey, K. & Verduyn, C.** 2012. Growth, fatty acid profile in major lipid classes and lipid fluidity of *Aurantiochytrium mangrovei* SK-02 as a function of growth temperature. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (1): 187-200.
- Cienkowski, L.** 1867. Ueber den bau und die entwicklung der Labyrinthuleen. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 3: 274-310.
- Coleman, N.K. & Vestal, J.R.** 1987. An epifluorescent microscopy study of enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate associated with the ectoplasmic net elements of the protist *Thraustochytrium striatum*. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 841-843.
- Cox, S.L., Hulston, D. & Maas, E.W.** 2009. Cryopreservation of marine thraustochytrids (Labyrinthulomycetes). *Cryobiology* 59: 363-365 (Brief Communication).
- Craven, C.D., Peterson, P.D., Windham, D.E., Mitchell, T.K. & Martin, S.B.** 2005. Molecular identification of the turf grass rapid blight pathogen. *Mycologia* 97: 160-166.
- Damare, V.S.** 2015. Diversity of thraustochytrid protists isolated from brown alga, *Sargassum cinereum* using 18S rDNA sequencing and their morphological response to heavy metals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 95: 265-276.
- Damare, V.S. & Raghukumar, S.** 2006. Morphology and physiology of the marine straminipilan fungi, the aplanochytrids isolated from the equatorial Indian Ocean. *Indian Journal of Marine Sciences* 35: 326-340.

- Damare, V.S. & Raghukumar, S.** 2010. Association of the stramenopilan protists, the aplanochytrids, with zooplankton of the equatorial Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 399: 53-68.
- Day J.G. & Brand, J.J.** 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In: Anderson, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, Academic Press, Oxford. Pp.165-187.
- Dick, M.W.** 1973. Saprolegniales. In: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. (Eds.). *The Fungi: an advanced treatise*. Academic Press, New York. Pp. 113-144.
- Dick, M.W.** 2001. Straminipilous fungi: systematic of the peronosporomycetes, including counts of the marine protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Kluwer Academic Publishers: The Netherlands. 670p.
- Douhan, G.W., Olsen, M.W., Herrell, A., Winder, C., Wong, F. & Entwistle, K.** 2009. Genetic diversity of *Labyrinthula terrestris*, a newly emergent plant pathogen, and the discovery of new Labyrinthulid organisms. *Mycological Research* 113 (10): 1192-1199.
- Dupont, J., Holub, B.J., Knapp, H.R. & Meydani, M.** 1996. Fatty acid-related functions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 9918-9938.
- Estudillo-del Castillo, C., Gapasin, R.S.J. & Leño, E.M.** 2009. Enrichment potential of PUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 293: 57-61.
- Fan, K.W., Chen, F., Jones, E.B.G. & Vrijmoed, L.L.P.** 2001. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 199-202.
- Fan, K.W., Vrijmoed, L.L.P. & Jones, E.B.** 2002. Physiological studies of subtropical mangrove Thraustochytrids. *Botanica Marina* 45: 50-57.

- Fan, K.W., Jiang, Y., Faan, Y.W. & Chen, F.** 2007. Lipid characterization of mangrove thraustochytrid – *Schizochytrium mangrovei*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 2906-2910.
- Fan, K.W., Jiang, Y., Ho, L.T. & Chen, F.** 2009. Differentiation in fatty acid profiles of pigmented and nonpigmented *Aurantiochytrium* isolated from Hong Kong mangroves. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 6334-6341.
- Fan, K.W., Aki, T., Chen, F. & Jiang, Y.** 2010. Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 1303-1309.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 1994. Relatório FAO 1994 (disponível em <http://www.fao.org/brasil/pt/>)
- Figueiredo, M.B.** 1967. Estudos sobre a aplicação do método de *Castellani* para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33: 9-13.
- Figueiredo, M.B.** 2001. Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico, São Paulo, 63 (1-2): 73-82.
- Fiorito, R., Leander, C. & Leander, B.** 2016. Characterization of three novel species of Labyrinthulomycota isolated from ochre sea stars (*Pisaster ochraceus*). Marine Biology (in press).
- Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J. & Hippen, A.R.** 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. Journal of Nutrition 129: 2048-2054.
- Fuller, M.S. & Jaworski A.** 1987. Zoosporic Fungi in teaching and research. Palfrey Contributions in Botany 3. Southeastern Publishing Corporation, Athens, GA. 303p.
- Funari, F.L., Struffaldi-de-Vuono, Y. & Salum, S.T.** 1987. Balanço hídrico de duas áreas de Mata Atlântica: Reserva Biológica de Paranapiacaba e Parque Estadual da Ilha do Cardoso

(Estado de São Paulo). In: Pereira M.F.A. & Massei M.A.S. (Eds.). Anais do 6º Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo. Sociedade Botânica de São Paulo, Campinas. Pp. 95-101.

Furlan, V.J.M., Maus, V., Batista, I. & Bandarra, N.M. 2017. Production of docosahecanoic acid by *Aurantiochytrium* sp. ATCC PRA-276. Brazilian Journal of Microbiology 48: 359-365.

Gaertner, A. 1972. Characters used in the classification of thraustochytriaceous fungi. Veröffentlichungen des Institutes für Meeresforschung in Bremerhaven 13: 183-194.

Gaertner, A. 1977. Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi) I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. Veröffentlichungen des Institutes für Meeresforschung in Bremerhaven 16: 139-157.

Goldstein, S. 1963. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. American Journal of Botany 50 (3): 271-279.

Goldstein, S. & Belsky M. 1964. Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. American Journal of Botany 51 (1): 72-78.

Gomes, M.M.R. 2009. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 75p.

Gomes, F.H., Vidal-Torrado, P., Macías, F., Gherardi, B. & Perez, X.L.O. 2007. Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP). I – Caracterização e Classificação. Revista Brasileira de Ciência do Solo 31: 1563-1580.

Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52: 679-704.

Gunderson, J.H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K. & Sogin, M.L. 1987. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (16): 5823-5827.

- Gupta, A., Barrow, C. J. & Puri, M.** 2012. Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnology Advances* 30: 1733-1745.
- Gupta, A., Singh, D., Barrow, C. J. & Puri, M.** 2013. Exploring potential use of Australian thraustochytrids for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production. *Biochemical Engineering Journal* 78: 11-17.
- Gupta, A., Singh, D., Byreddy, A.R., Thyagarajan, T., Sonkar, S.P., Mathur, A.S., Tuli, D.K., Barrow, C. J. & Puri, M.** 2017. Exploring omega-3 fatty acids, enzymes and biodiesel producing thraustochytrids from Australian and Indian marine biodiversity. *Biotechnology Journal* 11 (3): 345-355. DOI 10.1002/biot.201500279
- Harrison, K.E.** 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research* 9: 1-28.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Erata, M. & Higashihara, T.** 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycological Research* 102: 439-448.
- Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Raghukumar, S., Nakagiri, A., Schaumann, K. & Higashihara, T.** 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (6): 637-647.
- Huang, J., Aki, T., Hachida, K., Yokochi, T., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. & Suzuki, O.** 2001. Profile of polyunsaturated fatty acids produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 605-610.
- Huang, J., Aki, T., Yokochi, T., Nakahara, T., Honda, D., Kawamoto, S., Shigeta, S., Ono, K. & Suzuki, O.** 2003. Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. *Marine Biotechnology* 5: 450-457.

- Hubálek, Z.** 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
- Iida, I., Nakahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M. & Suzuki, O.** 1996. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Traustochytrium aureum* by medium optimisation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81: 76-78.
- Jain, R., Raghukumar, S. & Chandramohan, D.** 2004. Enhanced production of polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid by thraustochytrid protists (resumo). AGRIS. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jain, R., Raghukumar, S., Tharanathan, R. & Bhosle, N.B.** 2005. Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. *Marine Biotechnology* 7: 184-192.
- Jakobsen, A. N., Aasen, I. M. & Strom, A. R.** 2007. Endogenously synthesized (–)-proto-gercitol and glycine betaine are principal compatible solutes of *Schizochytrium* sp. strain S8 (ATCC 20889) and three new isolates of phylogenetically related thraustochytrids. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5848-5856.
- Jiang, Y., Fan, K.W., Wong, R.T.Y. & Chen, F.** 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1196-1200.
- Johnson, T.W. & Sparrow, F.K.** 1961. *Fungi in oceans and estuaries*. J. Cramer, New York, USA. 668p.
- Kalidasan, K., Sunil, K.S., Narendran, R. & Kathiresan, K.** 2015. Antioxidant activity of mangrove-derived marine thraustochytrids. *Mycosphere* 6 (5): 602-6011.
- Karling, J.S.** 1981. Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate phycomycetes (2^a edição revisada). J. Cramer Publishing, Berlin. 252p.
- Kazutaka K. & Daron M.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability (disponível em <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>)

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A.** 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Kerrigan, J.L., Olsen, M.W. & Martin, S.B.** 2012. Rapid blight of Turfgrass. The Plant Health Instructor. DOI 10.1094/PHI-I-2012-0621-01
- Kim, K., Kim, E.J., Ryu, B-G., Park, S., Choi, Y-E. & Yang, J-W.** 2013. A novel fed-batch process based on the biology of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 for the production of biodiesel and docosahexaenoic acid. *Bioresource Technology* 135: 269-274.
- Kimura, H., Fukuba, T. & Naganuma, T.** 1999. Biomass of thraustochytrid protocists in coastal water. *Marine Ecology Progress Series* 189: 27-33.
- Kobayashi, Y. & Ookubo, M.** 1953. Studies on the marine phycomycetes. *Bulletin of the National Science Museum (Tokyo)* 33: 51-65.
- Kobayashi, T., Sakaguchi, K., Matsuda, T., Abe, E., Hama, Y., Hayashi, M., Honda, D., Okita, Y., Sugimoto, S., Okino, N. & Ito, M.** 2011. Increase of eicosapentaenoic acid in thraustochytrids through thraustochytrid ubiquitin promoter-driven expression of a fatty acid $\Delta 5$ desaturase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (11): 3870-3876.
- Konno, K.** 1972. Studies of Japanese lower aquatic phycomycetes. *The Science Report of the Tokyo Kyoiku Daigaku. Sec. B.*, 14 (219): 227-292.
- Kremer, J.M., Bigauoette, J., Michale, A.V., Timchalk, M.A., Lininger, L., Rynes, R.I., Huyck, C., Zieminski, J. & Bartholomew, L.E.** 1985. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *The Lancet* 1: 184-187.
- Kumon, Y., Yokochi, T., Nakahara, T., Yamaoka, M. & Mito, K.** 2002. Production of long-chain polyunsaturated fatty acids by monogenic growth of labyrinthulids on oil-dispersed agar medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 275-80.

- Ladurner, P., Egger, B., Mulder, K., Pfister, D., Kuaes, G., Salvenmoser, W. & Schärer, L.** 2008. The stem cell system of the basal flatworm *Macrostomum lignano* (Chapter 5). In: Bosch, T.C.G. (Ed.). Stem cells: from hydra to man. Springer Science. Pp. 75-95.
- Langdon, C. & Onal, E.** 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 180: 283-294.
- Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H. & Michaelsen, K.F.** 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research* 40: 1-94.
- Leander, C.A.** 2001. Phylogeny of the Labyrinthulomycota. Tese de Doutorado, The University of Georgia, Athens.
- Leander, C.A. & Porter, D.** 2000. Redefining the genus *Aplanochytrium* (Phylum Labyrinthulomycota). *Mycotaxon* 76: 439-444.
- Leander, C.A. & Porter, D.** 2001. The Labyrinthulomycota is comprised of three distinct lineages. *Mycologia* 93: 459-464.
- Leander, C.A., Porter, D. & Leander, B.S.** 2004. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *European Journal of Protistology* 40: 317-328.
- Leaño, E.M. & Damare, V.S.** 2012. Labyrinthulomycota. In: Jones, E.B.G. & Pang, K.L. Marine fungi e fungal-like organisms. De Gruyter, Berlin/Boston. Pp. 317-328.
- Leaño, E.M., Gapasin, R.S.J., Polohan, B. & Vrijmoed, L.L.P.** 2003. Growth ad fatty acid production of thraustochytrids from Panay mangroves, Philippines. *Fungal Diversity* 12: 111-122.
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S.B. & Park, W.J.** 2016. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* 8 (23). Review 13p.
- Leipe, D.D., Wainright, P.O., Gunderson, J.H., Porter, D., Patterson, D.J., Valois, F., Himmerich, S. & Sogin, M.L.** 1994. The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-

like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia* (In press).

- Lewis, T.E., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A.** 1999. The biotechnological potential of thraustochytrids. *Marine Biotechnology* 1: 580-587.
- Lewis, T.E., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A.** 2001. Sterol and squalene content of a docosahexaenoic-acid-producing thraustochytrid: influence of culture age, temperature, and dissolved oxygen. *Marine Biotechnology* 3: 439-447.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. & Jiang, Y.** 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102: 771-776.
- Li, Q., Chen, G.Q., Fan, K.W., Lu, F.P., Aki, T. & Jiang, Y.** 2009. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrid from Hong Kong mangroves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4267-4272.
- Ling, X., Guo, J., Liu, X., Zhang, X., Wang, N. Lu, Y. & Ng, I.S.** 2015. Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and DHA by *Schizochytrium* sp. LU310. *Bioresource Technology* 184: 139-147.
- Liu, Q., Allam, B. & Collier, J. L.** 2009. Quantitative real-time PCR assay for QPX (Thraustochytriidae), a parasite of the hard clam (*Mercenaria mercenaria*). *Applied and Environmental Microbiology* 75 (14): 4913-4918.
- Liu, Y., Singh, P., Sun, Y., Luan, S. & Wang, G.** 2014. Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 3241-3255.
- Ludeverse-Pascual, G., Peña, M.D. & Tornalejo J.** 2016. Biomass production, proximate composition and fatty acid profile of the local marine thraustochytrid isolate *Schizochytrium* sp. LEY7 using low-cost substrates at optimum culture conditions. *Aquaculture Research* 47: 318-328.

- Manikan, V. & Hamid, A.A.** 2013. Identification of significant medium components that affect docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. SW1. AIP Conference Proceedings 1571: 277-282. DOI 10.1063/1.4858668
- Manikan, V., Kalil, M.S., Isa, M.H.M. & Hamid, A.A.** 2014. Improved prediction for medium optimization using factorial screening for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. SW1. American Journal of Applied Sciences 11 (3): 462-474. DOI 10.3844/ajassp.2014.462.474
- Manikan, V., Nazir, M.Y.M., Kalil, M.S., Isa, M.H.M., Kader, A.J.A., Yusoff, W.M.W. & Hamid, A.A.** 2015. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. Algal Research 9: 40-47.
- Mann, K.H.** 1988. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. Limnology and Oceanography 33: 910-930.
- Marchan, L.F., Chang, K.J.L., Nichols, P.D., Polglase, J.I., Mitchell, W.J. & Gutierrez, T.** 2017. Screening of new British thraustochytrids isolates for docosahexaenoic acid (DHA) production. Journal of Applied Phycology 29. DOI 10.1007/s10811-017-1149-8
- Martins, D.A., Custódio, L., Barreira, L., Pereira, H., Ben-Hamadou, R., Varela, J. & Abu-Salah, K.M.** 2013. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. Marine Drugs 11: 2259-2281.
- Mataix, J.** 2002. Los ácidos grasos omega-3. Mundo científico 235: 46-51.
- McLean, I.N. & Porter, D.** 1982. The yellow-spot disease of *Tritonia diomedea* Bergh, 1894 (Mollusca: Gastropoda: Nudibranchia): encapsulation of the thraustochytriaceous parasite by host amoebocytes. Journal of Parasitology 68: 243-252.
- Mehta, J., Lopez, L.M. & Wargovich, T.** 1987. Eicosapentaenoic acid: its relevance in atherosclerosis and coronary artery disease. American Journal of Cardiology 59: 155-159.

- Meyer, B.J., Tsivis, E., Howe, P.R.C., Tapsell, L. & Calvert, G.D.** 1999. Polyunsaturated fatty acid content of foods: differentiating between long and short chain omega-3 fatty acids. *Food Australia* 51: 82-95.
- Milanez, A.I.** 1989. Fungos de águas continentais. In: Fidalgo, O. & Bononi, V.L. (Coords.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo. Pp. 17-20.
- Milanez, A.I.** 1999. Diversidade no Reino Stramenopila. In: Joly, C.A & Bicudo, C.E.M. (Orgs.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Vol.1. In: Canhos, V.P. & Vazoller, R.F. (Eds.): Microorganismos e Vírus. Fapesp, São Paulo. Pp. 57-68.
- Mooney, J.W., Hirschler, E.M., Kennedy, A.K., Sams, A.R. & Van Elswyk, M.E.** 1998. Lipid and flavour quality of stored breast meat from broilers fed marine algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 134-140.
- Moro, I., Negrisol, E., Callegaro, A. & Andreoli, C.** 2003. *Aplanochytrium stocchini*: a new Labyrinthulomycota from the southern ocean (Ross Sea, Antarctica). *Protist* 154 (3-4): 331-340.
- Moss, S.T.** 1986. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales. In: Moss, S.T. (Ed.). The biology of marine fungi. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 105-129.
- Muehlstein, L.K. & Porter D.** 1991. *Labyrinthula zosterae* sp. nov., the causative agent of wasting disease of eelgrass, *Zostera marina*. *Mycologia* 83 (2): 180-191.
- Muehlstein, L.K., Porter, D. & Short, F.T.** 1988. *Labyrinthula* sp., a marine slime mold producing the symptoms of wasting disease in eelgrass, *Zostera marina*. *Marine Biotechnology* 99: 465-472.
- Mycobank.** 2017. Acesso em 25 de setembro de 2017 (disponível em <http://www.mycobank.org/>)

- Nagano, N., Taoka, Y., Honda, D. & Hayashi, M.** 2009. Optimization of culture conditions for growth and docosahexaenoic acid production by a marine thraustochytrid, *Aurantiochytrium limacinum* mh0186. *Journal of Oleo Science* 58 (12): 623-628.
- Nakahara, T., Yokochi, T., Higasshihara, T., Tanaka, S., Yaguchi, T. & Honda, D.** 1996. Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 1421-1426.
- Nakazawa, A., Kokubun, Y., Matsuura, H., Yonezawa, N., Kose, R., Yoshida, M., Tanabe, Y., Kusuda, E., Thang, D.V., Ueda, M., Honda, D., Mahakhant, A., Kaya, K. & Watanabe, M.M.** 2014. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *Journal of Applied Phycology* 26: 29-41.
- Negreiros, O.C., Carvalho, C.T., Cesar, S.F., Duarte, F.R., Deshler, W.O. & Thelen, K.D.** 1974. Plano de manejo para o Parque Estadual da Ilha do Cardoso. *Boletim Técnico do Instituto Florestal, São Paulo*. Pp. 1-57.
- Norday, A. & Hansen, J.B.** 1994. Omega-3 fatty acids and cardiovascular risk factors. *World Review of Nutrition and Dietetics* 76: 51-54.
- Olive, L.S.** 1975. *The Mycetozoon*. Academic Press, New York.
- Oliveira, A.B.** 2009. Decomposição das folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* em um manguezal de Ilhéus. Bahia. Ilhéus: UESC.
- Ou, M.C., Yeong, H.Y., Pang, K.L. & Phang, S.M.** 2016. Fatty acid production of tropical thraustochytrids from Malaysian mangroves. *Botanica Marina* 59: 321-338.
- Pan, J., Campo J. & Keeling, P.J.** 2017. Reference tree and environmental sequence diversity of labyrinthulomycetes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 64: 88-96.
- Pandey, A. & Bhatena, Z.** 2014. Prevalence of PUFA rich thraustochytrids sps. along the coast of Mumbai for production of bio oil. *Journal of Food and Nutrition Research* 2 (12) 993-999.

- Papadopoulos, G., Goulas, C., Apostolaki, E. & Abril, R.** 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewe. *Journal of Dairy Research* 69: 357-365.
- Passador, M.M., Coutinho, L.N. & Figueiredo, M.B.** 2000. Avaliação da viabilidade, esporulação e patogenicidade de culturas de *Verticillium fungicola* preservadas pelo método de *Castellani*. In: 13º Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico 67: 134.
- Patterson, D.J. & Sogin, M.L.** 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. In: Hartman, H. & Matsuno K. (Eds.). *The origin and evolution of the cell*. World Scientific, Singapore. Pp. 13-46.
- Pereira, H., Barreira, L., Mozes, A., Florindo, C., Polo, C., Duarte, C.V., Custódio, L. & Varela, J.** 2011. Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. *Biotechnology for Biofuels* 4: 1-12.
- Perkins, F.O.** 1972. The ultrastructure of holdfasts, “rhizoids”, and “slime tracks” in thraustochytriaceous fungi and *Labyrinthula* spp. *Archives of Microbiology* 84: 95-118.
- Perveen, Z., Ando, H., Ueno, A., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yamada, Y., Takagi, T., Kaneko, T., Kogame, K. & Okuyama, H.** 2006. Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology Letters* 28: 197-202.
- Pino, N.L., Socias, C. & González, R.R.** 2015. Marine fungoid producers of DHA, EPA and carotenoids from central and southern Chilean marine ecosystems. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 50 (3): 507-520. DOI 10.4067/S0718-19572015000400009
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibanez, E.** 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 7159-7170.
- Porter, D.** 1989. Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis, L., Corlins, J.O., Melkonian, M. & Chapman, J. (Eds.). *Handbook of Protoctista*. Jones and Barlett Publishers, Boston. Pp. 388-398.

- Posada, D.** 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Qian, H., Liu, Q., Allam, B. & Collier, J. L.** 2007. Molecular genetic variation within and among isolates of QPX (Thraustochytridae), a parasite of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Disease of Aquatic Organisms* 77: 159-168. DOI 10.3354/dao01848
- Raghukumar, S.** 1988. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Transactions of the British Mycological Society* 90 (4): 627-631.
- Raghukumar, S.** 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *European Journal of Protistology* 38: 127-145.
- Raghukumar, S.** 2008. Thraustochytrid marine protist: production of PUFAs and others emerging technologies. *Marine Biotechnology* 10: 631-640.
- Raghukumar, C. & Raghukumar, S.** 1998. Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquatic Microbiol Ecology* 15: 153-163.
- Raghukumar, S., Anil, A.C., Khandeparker, L. & Patil, J.S.** 2000. Thraustochytrid protists as a component of marine microbial films. *Marine Biology* 10: 631-640.
- Ratledge, C.** 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815.
- Rosa, S.M.** 2010. Las thraustochytriales (labyrinthulomycetes, heterokonta): caracterización de su biodiversidad en humedales salinos de la Argentina mediante un enfoque multidisciplinario y diseño de un bioproceso para la producción de ácidos grasos omega 3. Tese de Doutorado, Universidade de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires.
- Rosa, S.M., Galvagno M.A. & Vélez C.G.** 2006. Primeros aislamientos de Thraustochytriales (Labyrinthulomycetes, Heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de la Argentina. *Darwiniana* 44 (1): 81-88.

- Rosa, S.M., Galvagno, M.A. & Vélez, C.G.** 2011. Adjusting culture conditions to isolate thraustochytrids from temperate and cold environments in southern Argentina. *Mycoscience* 52: 242-252.
- Sakata, T., Fujisawa, T. & Yoshikawa, T.** 2000. Colony formation and fatty acid composition of marine labyrinthulid isolates grown on agar media. *Fisheries Science* 66: 84-90.
- Salem Jr., N., Litman, B., Kim, H. Y. & Gawrisch, K.** 2001. Mechanism of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36: 945-959.
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P. & Coley, M.L.** 2016. Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Plos One* 11(6): e0156684. DOI 10.1371/journal.pone.0156684
- Schärer, L., Knoflach, D., Vizoso, D.B., Rieger, G. & Peintner, U.** 2007. Thraustochytrids as novel parasitic protists of marine free-living flatworms: *Thraustochytrium caudivorum* sp. nov. parasitizes *Macrostomum lignano*. *Marine Biology* 152 (5): 1095-1104.
- Schneider, V.J.** 1967. Ein neuer mariner phycomycet aus der Kieler Bucht (*Thraustochytrium striatum* spec. nov.). Aus dem Institut für Meereskunde der Universität Kiel. 23 (1): 16-20.
- Scholz, E.** 1958. Über morphologische modifikationen bei niederen erdphycomyceten und beschreibung zweier neuer arten von *Rhizophydium* und *Thraustochytrium*. *Archiv für Mikrobiologie* 29: 354-362.
- Shene, C., Leyton, A., Esparza, Y., Flores, L., Quilodran, B., Hinzpeter, I. & Rubilar, M.** 2010. Microbial oils and fatty acids: effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA) production by thraustochytrid strains. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 207-216.
- Shimidzu, N., Goto, M. & Wataku, W.** 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science* 62: 134-137.

- Siboni, N., Rasoulouniriana, D., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Sivan, A., Loya, Y., Hoegh-Guldberg, O. & Kushmaro, A.** 2010. Stramenopile microorganisms associated with the massive coral *Favia* sp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57 (3): 236-244.
- Sim, J.S., Nakai, S. & Guenter, W.** 2000. Egg nutrition and biotechnology. CABI Publishing. Wallingford, UK. New York, USA. 512p.
- Simopoulos, A.P.** 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition* 54: 438-463.
- Singh, A. & Ward, O.P.** 1997. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 370-373.
- Singh, A., Wilson, S. & Ward, O.P.** 1996. Docosahexaenoic acid (DHA) production by *Thraustochytrium* sp. ATCC20892. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 76-83.
- Sola, M.C., Oliveira, A.P., Feistel, J.C. & Resende, C.S.M.** 2012. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer* 8 (14): 1389-1418.
- Somatawin, J., Jones, E.B.G. & Bremer, G.B.** 1997. Thraustochytrids as a food source for aquaculture. In: *Proceedings of the Asia - Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology*. Hua Hin, Thailand. Pp. 163-169.
- Song, X., Zhang, X., Guo, N., Zhu, L. & Kuang, C.** 2007. Assessment of marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* OUC88 for mariculture by enriched feeds. *Fisheries Science* 73: 565-573.
- Souza, T.A.B., Clemente, G., Moura, F., Garcia, F. & Flynn M.** 2006. Mapeamento de manguezal em Cananéia, São Paulo – Brasil. *Environmental and Health World Congress*: 691-692.
- Sparrow Jr., F.K.** 1936. Biological observations on the marine fungi of woods hole waters. *The Biological Bulletin* 70: 236-263.
- Sparrow Jr., F.K.** 1960. *Aquatic Phycomycetes* (2ª edição revisada). Ambassador Books, Toronto.

- Sparrow Jr., F.K.** 1976. The present status of classification of biflagellate fungi. In: Jones E.B.G. (Ed.). Recent advances in aquatic mycology. Wiley, New York. Pp. 213-222.
- Sprague, M., Dick, J.R. & Tocher, D.R.** 2016. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006-2015. Scientific Reports 6:21892. DOI 10.1038/srep21892
- Stowell, L.J., Martin, S.B., Olsen, M., Bigelow, D., Kohout, M., Peterson, P.D., Camberato, J. & Gelernter, W.D.** 2005. Rapid blight: A new plant disease. APSnet Features (disponível em www.apsnet.org)
- Student.** 1908. The probable error of a mean. Biometrika 6: 1-25.
- Sullivan, B.K., Robinson, K.L., Trevathan-Tackett, S.M., Lilje, E., Gleason, F.H. & Lilje, O.** 2016. The first isolation and characterization of the protist *Labyrinthula* sp. in southeastern Australia. Journal of Eukaryotic Microbiology 64: 504-513.
- Tacon, A.G.J.** 1995. Feed ingredients for carnivorous fish species: Alternatives to fishmeal and other fishery resources, In: Reinertsen, H. & Harlaand, H. (Eds.). Sustainable fish farming: Proceedings of the first international symposium on sustainable fish farming, Rotterdam. Pp. 89-116.
- Takao, Y., Tomaru, Y., Nagasaki, K., Sasakura, Y., Yokoyama, R. & Honda, D.** 2007. Fluorescence in situ hybridization using 18S rRNA targeted probe for specific detection of thraustochytrids (*Labyrinthulomycetes*). Plankton & Benthos Research 2: 91-97.
- Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S. & Hayashi, M.** 2009. Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. strain mh0186. Marine Biotechnology 11: 368-374.
- Topuz, O.K.** 2016. Algal Oil: A novel source of omega-3 fatty acids for human nutrition. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies 20: 178-183.
- Tsui, C.K., Marshall, W., Yokoyama, R., Honda, D., Lippmeier, J.C., Craven, K.D., Peterson, P.D. & Berbee, M.L.** 2009. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the

evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50 (1): 129-140.

Ulken, A. 1966. Untersuchungen über marine pilze im äquatorialen Atlantik vor der Küste Brasiliens. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 10: 107-116.

Ulken, A. 1970. Phycomyceten aus der mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven* 12: 313-319.

Ulken, A. 1990. Marine thraustochytrids and Chytridiomycetes in the North Sea area and in selected others regions. *J. Cramer Publishing, Berlin*. 93p.

Ulken, A.M., Viquez, R., Valiente, C. & Campos, M. 1990. Marine Fungi (Chytridiomycetes and Thraustochytriales) from a mangrove area at Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica, América Central. *Revista de Biología Tropical* 38: 243-250.

Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M. & Verduyn, C. 2005. Properties of the docosahexaenoic acid producer *Schizochytrium mangrovei* Sk-02: effects of glucose, temperature and salinity and their interaction. *Botanica Marinha* 48: 387-394.

Unagul, P., Suetrong, S., Preedanon, S., Klaysuban, A., Gundool, W., Suriyachadkun, C. & Sakayaroj, J. 2017. Isolation, fatty acid profiles and cryopreservation of marine thraustochytrids from mangrove habitats in Thailand. *Botanica Marina* 60 (4): 363-379. DOI 10.1515/bot-2016-0111

Varela, G., Perez, M. & Ruiz, R.B. 1990. Changes in the quantitative and qualitative composition in fat from fish, due to seasonal and industrial and culinary processing. In: Somogy, J.C. & Hotzael, D. (Eds.). *Marine Foods. Bibliotheca Nutritio et Dieta*. Basel, Karger. Pp. 104-109.

Vazhappilly, R. & Chen, F. 1998a. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75: 393-397.

- Vazhappilly, R. & Chen, F.** 1998b. Heterotrophic production potential of omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalgae and algae-like microorganisms. *Botanica Marina* 41: 553-558.
- Ward, O.P. & Singh, A.** 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40: 3627-3652.
- Weete, J.D., Kim, H., Gandhi, S.R., Wang, Y. & Dute, R.** 1997. Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. *Lipids* 32: 839-845.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press Inc. Pp. 315-322.
- Whyte, S.K., Cawthorn, R.J. & McGladdery, S.E.** 1994. QPX (Quahaug Parasite X), a pathogen of northern quahaug *Mercenaria mercenaria* from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Disease of Aquatic Organisms* 19: 129-136.
- Yaguchi, T., Tanaka, S., Yocochi, T., Nakahara, T. & Higashihara, T.** 1997. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 1431-1434.
- Yang, H.L., Lu, C.K., Chen, S.F., Chen, Y.M. & Chen, Y.M.** 2010. Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Marine Biotechnology* 12: 173-185.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. & Nakahara, T.** 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4: 72-76.
- Yokochi, T., Honda, D., Nakahara, T. & Higashihara, T.** 1999. Classification of DHA-producing thraustochytrids by their fatty acid profile. The 4th International Marine Biotechnology Conference, Italy, September 22-29. Pp. 263.

- Yokoyama, R. & Honda, D.** 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 199-211.
- Yokoyama, R., Salleh, B. & Honda, D.** 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 329-341.

8. Anexo I

Artigo publicado *on line* na revista Botanica Marina em 10 de janeiro de 2018

Labyrinthulomycota from Brazilian mangrove swamps and coastal waters

Boro, Marcela Castilho; Harakava, Ricardo & Pires-Zottarelli, Carmen Lidia Amorim

DOI 10.1515/bot-2017-0052

Marcela Castilho Boro*, Ricardo Harakava and Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli

Labyrinthulomycota from Brazilian mangrove swamps and coastal waters

<https://doi.org/10.1515/bot-2017-0052>

Received 4 July, 2017; accepted 6 December, 2017

Abstract: The phylum Labyrinthulomycota is composed of three distinct groups of fungus-like organisms: the labyrinthulids, the thraustochytrids and the aplanochytrids. They are present in marine and brackish waters as saprobes and/or parasites. In recent years, there was an increased interest in studying these organisms due to the ability that some have to produce large amounts of lipids, particularly polyunsaturated fatty acids. However, in spite of their importance and diversity, in Brazil only four species were reported in the 1970s. Due to their ecological and economic importance globally and the limited knowledge of them in the country, this study aimed to evaluate the diversity of the Labyrinthulomycota in mangrove swamps and coastal waters of São Paulo State, Brazil. The specimens were isolated from water and leaf samples using different methodologies, and purified in an agar medium prepared with half-strength sterile seawater, peptone, yeast extract and glucose. After purification, they were identified by means of morphology and phylogenetic analysis of the SSU rDNA region. A total of 193 specimens representing five genera were observed, 26 specimens were incorporated into the culture collections and 29 sequences of the SSU rDNA region were deposited in GenBank. *Labyrinthula* sp., *Aurantiochytrium* sp., *Parietichytrium sarkarianum* and *Thraustochytrium striatum* are new records for Brazil, contributing to our knowledge of the diversity of fungus-like organisms in the country.

Keywords: Atlantic rainforest; Labyrinthulales; Thraustochytriales; zoosporic organisms.

Introduction

Labyrinthulomycota (Labyrinthista) is a group of fungus-like organisms classified within the kingdom Straminipila, in the super-group SAR (Stramenopiles, Alveolata, and Rhizaria; Adl et al. 2012). They are characterized by having an absorptive nutrition and production of heterokont biflagellate zoospores (Bennett et al. 2017) and, although they are heterotrophic organisms, they are called microalgae by many researchers (Fan et al. 2007, Li et al. 2009, Chen et al. 2010, Yang et al. 2010, Manikan et al. 2015, Topuz 2016). This phylum comprises three distinct groups, labyrinthulids, thraustochytrids and aplanochytrids, which are segregated by morphological and molecular characteristics (Leander et al. 2004), but a recent taxonomic analysis of the phylogeny of Labyrinthulomycota (using small subunit ribosomal DNA data) showed that the taxonomic subdivision of the Labyrinthulomycota is unsatisfactory, with several additional lineages being discovered (Pan et al. 2017). Currently, the single class, Labyrinthulomycetes, is composed of two well-accepted families, Labyrinthulaceae and Thraustochytriaceae (Kirk et al. 2008, Mycobank 2017). In addition to the presence of biflagellate zoospores possessing an anterior flagellum with mastigonemes, the main characteristics of these organisms include the multilamellate cell walls, composed of scales derived from the Golgi apparatus, and the presence of an ectoplasmic net, an extension of the plasma membrane secreted by a specialized organelle, the bothrosome (Alexopoulos et al. 1996).

The labyrinthulids possess spindle-shaped cells that slide freely in a well-developed ectoplasmic net, where they absorb nutrients. Multiplying by biflagellate zoospores and aplanospores, respectively, thraustochytrids and aplanochytrids have vegetative cells that are globose to sub-globose, and that use the ectoplasmic net to move (Moss 1986, Leander 2001, Rosa et al. 2006, Leaño and Damare 2012). Morphological identification of these organisms is quite difficult due to the simplicity of many of their representatives (Raghukumar 1992, Leander 2001, Yokoyama and Honda 2007).

The labyrinthulomycetes have been isolated from a wide variety of ecosystems and habitats around the world, such as marine and brackish waters, and terrestrial

*Corresponding author: **Marcela Castilho Boro**, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil, e-mail: marcelaboro@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-0555-8957>

Ricardo Harakava: Instituto Biológico, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, 04014-900, São Paulo, SP, Brazil

Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli: Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil

environments (Damare and Raghukumar 2010, Anderson and Cavalier-Smith 2012, Leaño and Damare 2012, Liu et al. 2014, Sullivan et al. 2016). They are considered important components of marine microbial communities, acting as decomposers of organic debris (Raghukumar 2002, Leaño and Damare 2012). However, some are also parasites of algae, plants and invertebrates (Bower 1987, Muehlstein et al. 1988, Raghukumar 2002, Scharer et al. 2007, Damare 2015).

Currently, there is an increased interest in studying these organisms, especially the thraustochytrids, due to their biotechnological potential. Some species have the ability to produce large amounts of lipids, such as polyunsaturated fatty acids (PUFA), mainly docosahexaenoic acid (DHA; Lewis et al. 1999, Jiang et al. 2004, Burja et al. 2006, Fan et al. 2007, Yang et al. 2010, Arafiles et al. 2011, Chodchoey and Verduyn 2012, Kalidasan et al. 2015, Ou et al. 2016). These organisms have been considered as an alternative source of PUFAs, which are currently mainly extracted and marketed from fish oil. However, PUFAs from thraustochytrids, besides having a less fishy smell, are capable of being easily purified because they contain low concentrations of PUFAs with related chemical structures. Several lineages of the Labyrinthulomycetes have already been used in commercial preparations and production of DHA-rich products, in aquaculture (Barclay and Zeller 1996, Langdon and Onal 1999, Carter et al. 2003, Estudillo-del Castillo et al. 2009), livestock feed (Mooney et al. 1998, Franklin et al. 1999, Sim et al. 2000, Papadopoulos et al. 2002) and supplementation of human nutrition (Raghukumar 2008, Martins et al. 2013, Topuz 2016). Thraustochytrids can also synthesize the bioactive compound squalene (Weete et al. 1997, Jiang et al. 2004, Li et al. 2009, Fan et al. 2010, Nakazawa et al. 2014), carotenoid pigments (Shimidzu et al. 1996, Raghukumar 2008, Atienza et al. 2012), proteases, amylases, lipases, chitinases (Damare and Raghukumar 2006) and extracellular polysaccharides (EPS; Jain et al. 2005).

In Brazil, only four species of the Labyrinthulomycota have been previously reported: *Schizochytrium aggregatum* S. Goldst. et Belsky, *Oblongichytrium multirudimentale* (S. Goldst.) R. Yokoy. et D. Honda, *Thraustochytrium pachydermum* Erh. Scholz and *Thraustochytrium proliferum* Sparrow, all from the municipality of Cananéia, São Paulo State (Ulken 1970, 1972, Booth 1979). Due to the ecological and economic importance of these organisms and the lack of knowledge of this group in the country, this study aimed to evaluate the diversity of Labyrinthulomycota specimens collected from mangrove swamps and coastal waters in the Brazilian Atlantic rainforest areas, based on morphological and molecular analyses.

Materials and methods

Sampling in Brazilian Atlantic rainforest areas

Six collections were carried out in the mangrove area of the Perequê River, located in the “Núcleo Perequê” at the “Parque Estadual da Ilha do Cardoso” (PEIC; 25°18'18" S, 48°05'42" W), Cananéia municipality, on the southern coast of São Paulo State, Brazil, and four sporadic samplings were also conducted in coastal areas of “Núcleo Perequê” and “Núcleo Marujá” at the PEIC, at Enseada Beach in Guarujá municipality (23°59'35" S, 46°15'23" W) and in the “Poçinho de Anchieta”, Itanhaém municipality (24°10'59" S, 46°47'20" W). The last two areas are located in the central coast of São Paulo. All collections were carried out between 2012 and 2015.

In the mangrove area of the Perequê River, samples of water and fallen mangrove leaves of *Rhizophora mangle* L., *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. and *Avicennia schaueriana* Stapf et Leechman were collected in different salinity ranges (determined with Horiba®U-10 and U-51) along the river (Table 1). These tree species were selected due to their high abundance in this mangrove area (Souza et al. 2006). In the coastal areas, water samples, submerged mixed leaves and grasses were collected.

Isolation of Labyrinthulomycota

In the laboratory, aliquots (30 ml) of the water samples were baited with *Sorghum* sp. seeds, discs (1 cm diam.) of onion (*Allium cepa* L.) skin and snakeskin and pollen grains (Sparrow 1960, Milanez 1989), all sterilized with UV light.

The leaves collected (classified according to the plant species) were cut with a cork borer into discs (1 cm diam.) and washed five times with a mixture composed of 50% distilled water and 50% sterile seawater. After washing, the leaves were processed as follows: (i) placed into Petri dishes with 30 ml of a mixture composed of 50% distilled water and 50% sterile seawater and baited as above; (ii) placed onto an agar medium containing 1.25 g l⁻¹ of bacteriological peptone (Oxoid™, Hampshire, England), 1.25 g l⁻¹ of yeast extract (Oxoid™), 3 g l⁻¹ of glucose (Dinâmica®, São Paulo, Brazil) and 12 g l⁻¹ of agar (Difco™, MI, USA) prepared with half-strength sterile seawater (PYG; Fuller and Jaworski 1987) with 0.4 g l⁻¹ of penicillin G potassium (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) and 0.4 g l⁻¹ of streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich®).

Table 1: Collection data, “Coleção de Culturas do Instituto de Botânica” (CCIBt) numbers, “Micoteca Mário Barreto Figueiredo” (MMBF) numbers and GenBank database accession numbers for the Labyrinthulomycota collected in this study.

Isolates (strain no.)	Locality	Date (mm/yy)	Substrate	Salinity ^a (%)	CCIBt	MMBF	GenBank
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC01)	PEIC	08/12	LR	3	4268	67/17	MF170001
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC04)	PEIC	11/12	RM	3	4269	68/17	MF170002
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC08)	PEIC	02/13	LR	0.8	4270	69/17	MF170003
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC09)	PEIC	02/13	RM	0.8	4271	70/17	MF170004
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC10)	PEIC	02/13	RM	0.8	4272	71/17	MF170005
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC16)	PEIC	06/13	RM	1.6	4273	72/17	MF170006
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC18)	PEIC	06/13	RM	1	4274	73/17	MF170007
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC19)	PEIC	06/13	RM	0.8	4275	74/17	MF170008
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC62)	PEIC	03/15	RM	0.02	4276	75/17	MF170009
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC65)	PEIC	03/15	W	1	4277	76/17	MF170010
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC91)	PEIC	09/15	AS	2.5	4278	77/17	MF170011
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (IC109)	PEIC	09/15	LR	2	4279	78/17	MF170012
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G29)	Guarujá	02/15	ML	3	4280	79/17	MF170013
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G34)	Guarujá	02/15	ML	3	4281	80/17	MF170014
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G42)	Guarujá	02/15	ML	3	4282	81/17	MF170015
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G48)	Guarujá	02/15	ML	3	4283	82/17	MF170016
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G49)	Guarujá	02/15	ML	3	4284	83/17	MF170017
<i>Aurantiochytrium</i> sp. (G51)	Guarujá	02/15	ML	3	4285	84/17	MF170018
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC12)	PEIC	02/13	LR	2.8	4286	85/17	MF170019
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC45)	PEIC	03/15	RM	0.45	4287	86/17	MF170020
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC67)	PEIC	03/15	LR	0.6	4288	87/17	MF170021
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC79)	PEIC	03/15	G	0.04	4289	88/17	MF170022
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC83)	PEIC	09/15	AS	3	4290	89/17	MF170023
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC88)	PEIC	09/15	LR	2	4291	90/17	MF170024
<i>Parietichytrium sarkarianum</i> (IC119)	PEIC	09/15	AS	2.5	4292	91/17	MF170025
<i>Schizochytrium aggregatum</i> (G53)	Guarujá	02/15	ML	3	4293	92/17	MF188246
<i>Thraustochytrium striatum</i> (PA)	Itanhaém	—	W	—	—	—	MF188250
<i>Labyrinthula</i> sp. (A220)	PEIC	11/12	RM	2.8	—	—	MF168948
<i>Labyrinthula</i> sp. (PR4)	PEIC	03/15	RM	0.45	—	—	MF168947

PEIC, “Parque Estadual da Ilha do Cardoso”; RM, *Rhizophora mangle* L. leaves; LR, *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. leaves; AS, *Avicennia schaueriana* Stapf et Leechman leaves; ML, mixed leaves; G, grasses; W, water.

^aWater salinity of the collection site.

For each sample, triplicates were prepared. The plates were incubated at room temperature (20–22°C) and, after 7–15 days, the baits and the colonies present (on PYG culture medium) were observed under a microscope. The specimens of the Labyrinthulomycota isolated by these methodologies were purified on PYG and then identified.

Morphological identification and preservation of the Labyrinthulomycetes

Morphological structures of taxonomic value (vegetative cells, arrangement of cells, zoosporangia and zoospore discharge) of the pure cultures were observed, measured and documented using Leica Qwin V3 imaging software. The morphological identification of the isolates was based on specific literature and the original descriptions of the species (Cienkowski 1867, Kobayashi and Ookubo 1953, Scholz 1958, Sparrow 1960, Goldstein 1963, Goldstein and Belsky 1964, Schneider 1967, Konno 1972, Gaertner 1972, 1977, Karling 1981, Raghukumar 1988, Ulken 1990, Honda et al. 1998, Leander and Porter 2000, Leander et al. 2004, Bongiorno et al. 2005, Rosa et al. 2006, Leaño and Damare 2012). Cultures of the representative species of each genus identified were preserved and incorporated into the CCIBT (“Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica”, São Paulo, Brazil) and MMBF (“Micoteca Mário Barreto Figueiredo”, São Paulo, Brazil) culture collections, the last belonging to WFCC (World Federation for Culture Collections).

Biomass production, DNA extraction, amplification, sequencing and phylogenetic analysis

Molecular characterization of the SSU region (18S) of the rDNA of the representative isolates, frequently analyzed by specialists in the group (Leander and Porter 2001, Leander et al. 2004, Craven et al. 2005, Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Yang et al. 2010, Kobayashi et al. 2011, Damare 2015, Sullivan et al. 2016), was performed to corroborate the morphological identification.

Biomass for DNA extraction was obtained by cultivating each isolate on PYG culture medium, supplemented with penicillin G 0.4 g l⁻¹ and streptomycin sulfate 0.4 g l⁻¹, for 7 days at 21°C. After incubation, the cells were harvested using a platinum loop and transferred to Eppendorf microtubes for extraction of genomic DNA. The DNA extraction followed the protocol described in the “PureLink Genomic DNA Kit” (Invitrogen®, CA, USA) and

the amount of DNA extracted (between 5.3 and 212 µg) was evaluated by I-Quant v.2.0.0 (Loccus Biotechnology®, São Paulo, Brazil).

The SSU rDNA region of the thraustochytrid specimens was amplified using the primers NSF370 and LAB1017R (Siboni et al. 2010, Chang et al. 2012) and for labyrinthulids using the primers 16S1N and NS4 (Craven et al. 2005, Chodchoey and Verduyn 2012). PCR amplification was performed with the “PCR SuperMix Kit” (Invitrogen®) for a final volume of 25 µl in a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) following the conditions described by Siboni et al. (2010). PCR products were evaluated by electrophoresis (1% agarose gel) and purified with “AxyPrep PCR Clean-up Kit” (Axygen®, NY, USA). Sequencing was performed using the same PCR primers in a 3500×L Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, CA, USA). Assembly of contigs and correction of ambiguous bases were performed manually using Sequencher™ version 4.1.4.

The SSU rDNA sequences obtained (with a length between 572 and 1463 bp) were compared with sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using the BLASTn (“Basic Local Alignment Search Tool”). For phylogenetic reconstruction, the SSU rDNA sequences of our isolates were compared with sequences deposited in GenBank, using *Ochromonas danica* E.G. Pringsheim as the outgroup. Sequences were aligned using MAFFT version 7 (Kazutaka and Daron 2013), and the ambiguously aligned characters were removed manually using Geneious version 8 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). The final alignment length of the SSU region had a total of 1567 characters. The best fitting model of evolution was selected using the Akaike Information Criterion in jModeltest 0.1.1 (Posada 2008). The Maximum Likelihood (ML) analysis was conducted in PhyML 3.1 (Guindon and Gascuel 2003) using the GTR + G substitution model, branch swapping by best of NNI and SPR, and bootstrap support was evaluated with 1000 pseudo-replicates.

Results and discussion

All 193 specimens were observed and firstly classified to generic level based on morphological analysis, viz. *Aurantiochytrium* R. Yokoyama et D. Honda (135 isolates), *Labyrinthula* Cienk. (21), *Parietichytrium* R. Yokoyama, Salleh et D. Honda (31), *Schizochytrium* S. Goldst. et Belsky (1) and *Thraustochytrium* Sparrow (5), showing high morphological similarity with the respective isolates originally described (Sparrow 1936, Johnson and Sparrow 1961, Goldstein and Belsky 1964, Porter 1989, Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007). A predominance of isolates

of *Labyrinthula* in *Sorghum* sp. seed baits was observed, and the isolates of *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium* and *Thraustochytrium* preferentially grew on onion skin, snakeskin and/or pollen grains.

Of the 193 specimens observed, it was possible to isolate and sequence the SSU rDNA region of 95, and the BLASTn query confirmed the morphological identification of these five genera, *Aurantiochytrium* (73), *Labyrinthula* (2), *Parietichytrium* (18), *Schizochytrium* (1) and *Thraustochytrium* (1) and enabled us to identify them to species level (Figures 1 and 2).

For the phylogenetic reconstruction of the SSU rDNA region, we used 66 sequences from 25 species, including 29 sequences of our isolates (18 belonging to *Aurantiochytrium*, two to *Labyrinthula*, seven to *Parietichytrium*,

one each to *Schizochytrium* and *Thraustochytrium*; Table 1) and the outgroup was *Ochromonas danica*.

The maximum likelihood tree showed that our isolates clustered with other isolates of the same genus, with members of the genera *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium* and *Labyrinthula*, each forming a monophyletic group supported by high bootstrap values (100%) and members of the genus *Thraustochytrium* forming a polyphyletic group (Figure 3). These results are similar with results demonstrated in other phylogenetic studies of this group (Yokoyama and Honda 2007, Yokoyama et al. 2007, Tsui et al. 2009).

In the SSU rDNA analysis, the sequences of *Parietichytrium* isolates from this study grouped with isolates of *Parietichytrium sarkarianum* (A. Gaertn.)

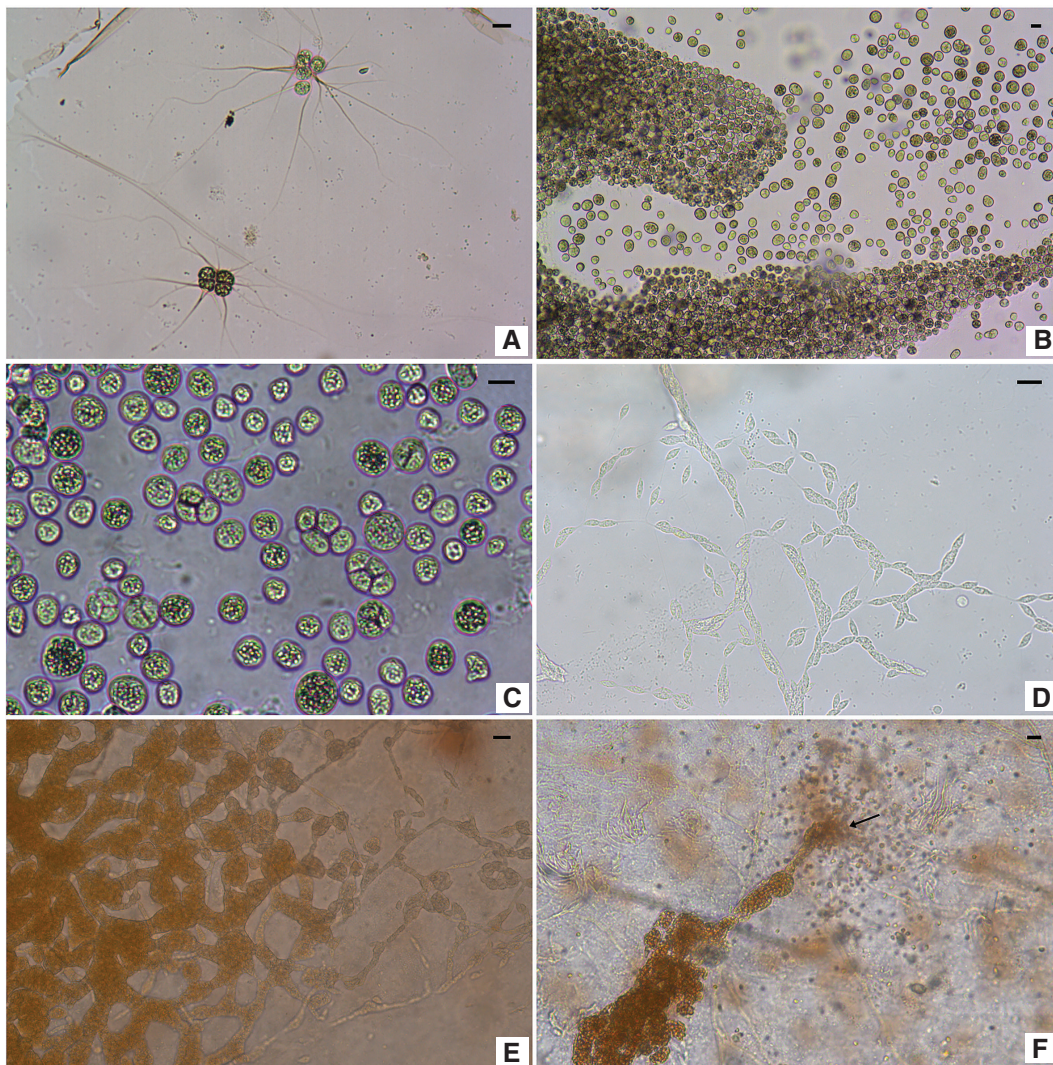


Figure 1: Light micrographs of the isolates.

(A–C) *Aurantiochytrium* sp.: (A) cluster of cells with well-developed ectoplasmatic nets on onionskin; (B) large cluster of cells; (C) binary cell division. (D–F) *Labyrinthula* sp.: (D) vegetative cells; (E) sori (zoosporangia); (F) sporulation (indicated by the arrow). Bars = 10 µm.

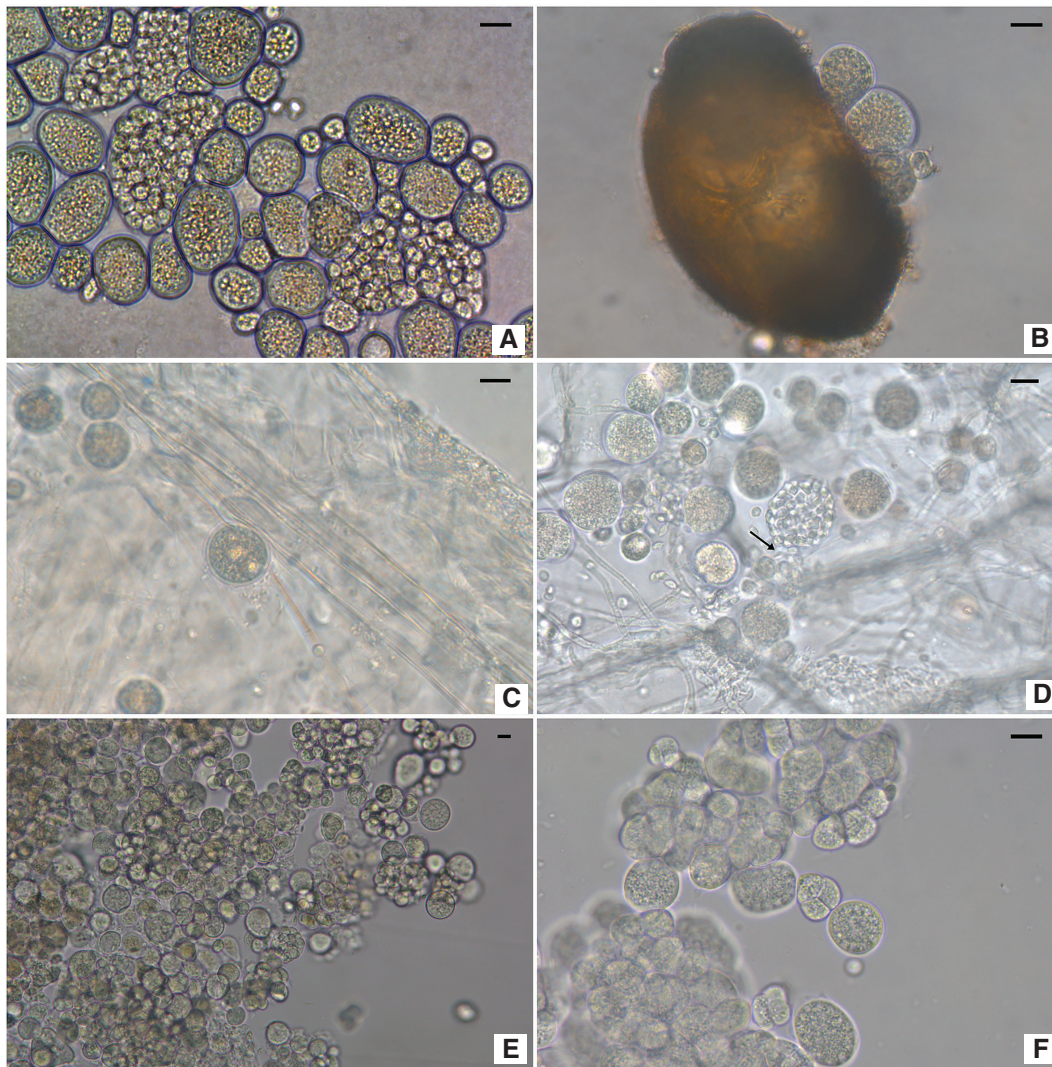


Figure 2: Light micrographs of the isolates.

(A–B) *Parietichytrium sarkarianum*: (A) zoosporangia and zoospore; (B) zoosporangia on pine pollen. (C–D) *Thraustochytrium striatum*: (C) zoosporangia; (D) zoospore discharge of the zoosporangia (indicated by the arrow). (E–F) *Schizochytrium aggregatum*: (E) aggregated cells; (F) binary division of the aggregated cells. Bars = 10 µm.

R. Yokoyama, Salleh *et* D. Honda (the only species of the genus) available in GenBank. Our isolate of *Thraustochytrium* (PA) grouped with *Thraustochytrium striatum* Joa. Schneid. and *Thraustochytrium* aff. *striatum* (100% bootstrap support) and the *Schizochytrium* (G53) species isolated in this study grouped (100% bootstrap support) with *Schizochytrium aggregatum*.

Aurantiochytrium mangrovei (Raghuk.) R. Yokoy. *et* D. Honda and *Aurantiochytrium limacinum* (D. Honda *et* Yokochi) R. Yokoy. *et* D. Honda were not phylogenetically distinct using the sequences obtained from GenBank and, consequently, it was impossible for us to determine the species name for our isolates. This probably occurs due to the use of a single gene locus (partial SSU rDNA), which has been shown to have insufficient resolution for the

deeper splits of Labyrinthulomycota (Bennett *et* al. 2017, Pan *et* al. 2017).

The sequences of the *Labyrinthula* isolates from this study grouped with other isolates of *Labyrinthula* available in GenBank (100% bootstrap support), separated from *L. zosterae* and *L. terrestris*, the only two species of the genus with SSU rDNA sequences available in GenBank.

In Latin America, there has been only one other study of the diversity of the Labyrinthulomycetes (Rosa *et* al. 2006). These authors isolated five specimens of the Thraustochytriales from continental saline environments and estuaries of Argentina which were identified as *Thraustochytrium* aff. *antarcticum*, *Ulkenia* aff. *radiata* and *U.* aff. *visurgensis* (three isolates).

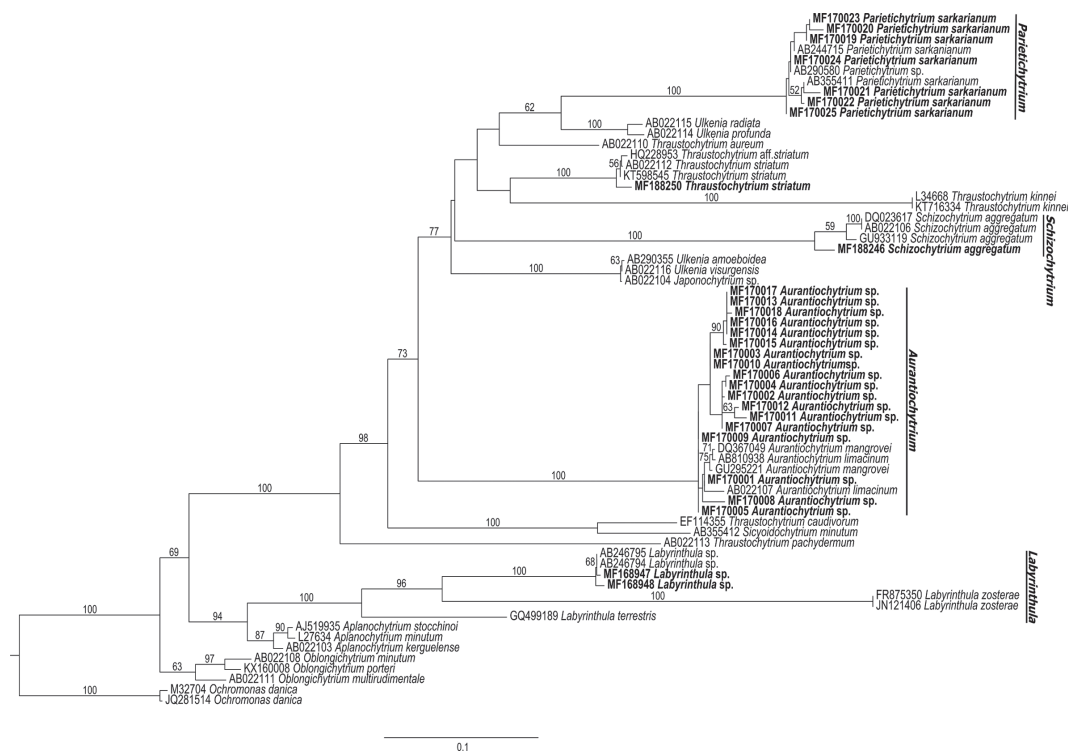


Figure 3: Maximum likelihood phylogenetic tree of the SSU region rDNA of the isolates of the Labyrinthulomycota.

Values close to the branches indicate the bootstrap (%) support of 1000 pseudo-replicates. Only branches with support of >50% are highlighted. The bottom bar indicates the number of substitutions per site. Taxa of the isolates sequenced in this study are in bold.

Twenty-six isolates (18 of *Aurantiochytrium*, seven of *P. sarkarianum* and one of *S. aggregatum*) were incorporated into the collections “Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica” (CCIBt) and “Micoteca Mário Barreto Figueiredo” (MMBF; Table 1). It was not possible to maintain the cultures of *Thraustochytrium striatum* and *Labyrinthula*.

Conclusion

This is the first detailed study of the Labyrinthulomycota associated with seawater and fallen mangrove leaves in Brazil, with the inclusion of the first sequences of Brazilian isolates (SSU rDNA region) in the gene database (GenBank). The isolates were identified as *Aurantiochytrium* sp., *Labyrinthula* sp., *Parietichytrium sarkarianum*, *Schizochytrium aggregatum* and *Thraustochytrium striatum*. The genera *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium* and *Labyrinthula* and the species *P. sarkarianum* and *T. striatum* are new records for Brazil. This study contributes to the knowledge of the group in Brazil, with the provision of new sequences of tropical isolates in GenBank, and preservation of these isolates in pure culture allows future bioprospecting studies.

Acknowledgments: We are indebted to Dr. Agostina Virginia Marano and MSc Ana Lucia de Jesus for help in the collection and processing of samples and to Manoel Osório Neves Júnior for his valuable help during sampling. We also thank the “Instituto Florestal” for the permission given to collect samples at PEIC and FAPESP (“Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”) for the financial support given to C.L.A. Pires-Zottarelli (Process no. 2012/50222-7).

References

- Adl, S.M., A.G. Simpson, C.E. Lane, J. Lukes, D. Bass, S.S. Bowser, M.W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L.L. Gall, D.H. Lynn, H. McManus, E.A.D. Mitchell, S.E. Mozley-Stanridge, L.W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C.L. Schoch, A. Smirnov and F.W. Spiegel. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59: 429–493.
- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims and M.M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. 4th edition. John Wiley & Sons, New York. pp. 868.
- Anderson, O.R. and T. Cavalier-Smith. 2012. Ultrastructure of *Diplophrys parva*, a new small freshwater species, and a revised analysis of Labyrinthulea (Heterokonta). *Acta Protozool.* 51: 291–304.

- Arafiles, K.H.V., J.C.O. Alcantara, P.R.F. Cordero, J.A.L. Batoon, F.S. Galura, E.M. Leaño and G.R. Dedeles. 2011. Cultural optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. *Mycosphere* 2: 521–531.
- Atienza, G.A.M.V., K.H.V. Arafiles, M.C.M. Carmona, J.P.C. Garcia, A.M.B. Macabago, B.J.D.C., Peñacerrada, P.R.F. Cordero, R.M. Bennett and G.R. Dedeles. 2012. Carotenoid analysis of locally isolated thraustochytrids and their potential as an alternative fish feed for *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Mycosphere* 3: 420–428.
- Barclay, W. and S. Zeller. 1996. Nutritional enhancement of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia Nauplii* by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. *J. World Aquacult.* 27: 314–322.
- Bennett, R.M., D. Honda, G.W. Beakes and M. Thines. 2017. Labyrinthulomycota. In: (J.M. Archibald, A.G.B. Simpson and C.H. Slamovits, eds) *Handbook of the protists*. Springer, Boston. pp. 507–542.
- Bongiorni, L., R. Jain, S. Raghukumar and R.K. Aggarwal. 2005. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist* 156: 303–315.
- Booth, T. 1979. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. *Rev. Microbiol.* 10: 123–138.
- Bower, S.M. 1987. *Labyrinthuloides haliotidis* n. sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in British Columbia mariculture facility. *Can. J. Bot.* 65: 1996–2007.
- Burja, A.M., H. Radianingtyas, A. Windust and C.J. Barrow. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1161–1169.
- Carter, C.G., M.P. Bransden, T.E. Lewis and P.D. Nichols. 2003. Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Mar. Biotechnol.* 5: 480–492.
- Chang, K.J.L., G.A. Dunstan, G.C.J. Abell, L.A. Clementson, S.I. Blackburn, P.D. Nichols and A. Koutoulis. 2012. Biodiscovery of new Australian thraustochytrids for production of biodiesel and long-chain omega-3 oils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 2215–2231.
- Chen, G., K.W. Fan, F.P. Lu, Q. Li, T. Aki, F. Chen and Y. Jiang. 2010. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. *N. Biotechnol.* 27: 382–389.
- Chodchoey, K. and C. Verduyn. 2012. Growth, fatty acid profile in major lipid classes and lipid fluidity of *Aurantiochytrium mangrovei* SK-02 as a function of growth temperature. *Braz. J. Microbiol.* 43: 187–200.
- Cienkowski, L. 1867. Ueber den bau und die entwicklung der Labyrinthuleen. *Archiv f. mikrosk. Anatomie. Bd.* 3: 274–310.
- Craven, C.D., P.D. Peterson, D.E. Windham, T.K. Mitchell and S.B. Martin. 2005. Molecular identification of the turf grass rapid blight pathogen. *Mycologia* 97: 160–166.
- Damare, V.S. 2015. Diversity of thraustochytrid protists isolated from brown alga, *Sargassum cinereum* using 18S rDNA sequencing and their morphological response to heavy metals. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 95: 265–276.
- Damare, V.S. and S. Raghukumar. 2006. Morphology and physiology of the marine stramenipilan fungi, the aplanochytrids isolated from the equatorial Indian Ocean. *Indian J. Mar. Sci.* 35: 326–340.
- Damare, V.S. and S. Raghukumar. 2010. Association of the stramenopilan protists, the aplanochytrids, with zooplankton of the equatorial Indian Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 399: 53–68.
- Estudillo-del Castillo, C., R.S.J. Gapasin and E.M. Leaño. 2009. Enrichment potential of PUFA-rich thraustochytrid *Schizochytrium mangrovei* for the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 293: 57–61.
- Fan, K.W., Y. Jiang, Y.W. Faan and F. Chen. 2007. Lipid characterization of mangrove thraustochytrid – *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2906–2910.
- Fan, K.W., T. Aki, F. Chen and Y. Jiang. 2010. Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1303–1309.
- Franklin, S.T., K.R. Martin, R.J. Baer, D.J. Schingoethe and A.R. Hippen. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* 129: 2048–2054.
- Fuller, M.S. and A. Jaworski. 1987. *Zoosporic Fungi in teaching and research*. Palfrey Contributions in Botany 3. Southeastern Publishing Corporation, Athens, GA. pp. 303.
- Gaertner, A. 1972. Characters used in the classification of thraustochytriaceous fungi. *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven* 13: 183–194.
- Gaertner, A. 1977. Revision of the Thraustochytriaceae (lower marine fungi) I. *Ulkenia* nov. gen., with description of three new species. *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven* 16: 139–157.
- Goldstein, S. 1963. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. *Am. J. Bot.* 50: 271–279.
- Goldstein, S. and M. Belsky. 1964. Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing an unusual type of asexual reproduction. *Am. J. Bot.* 51: 72–78.
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 679–704.
- Honda, D., T. Yokochi, T. Nakahara, M. Erata and T. Higashihara. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycol. Res.* 102: 439–448.
- Jain, R., S. Raghukumar, R. Tharanathan and N.B. Bhosle. 2005. Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. *Mar. Biotechnol.* 7: 184–192.
- Jiang, Y., K.W. Fan, R.T.Y. Wong and F. Chen. 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1196–1200.
- Johnson, T.W. and F.K. Sparrow. 1961. *Fungi in oceans and estuaries*. J. Cramer, New York, USA. pp. 668.
- Kalidasan, K., S.K. Sahu, K. Kayalvizhi and K. Kathiresan. 2015. Polyunsaturated fatty acid-producing marine thraustochytrids: a potential source for antimicrobials. *J. Coastal Life Med.* 3: 848–851.
- Karling, J.S. 1981. *Predominantly holocarpic and eucarpic simple biflagellate phycomycetes*. 2th revised edition. J. Cramer Publishing, Berlin. pp. 252.
- Kazutaka, K. and M. Daron. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Available in: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>. Accessed on April 4 2017.

- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kirk, P.M., P.F. Cannon, D.W. Minter and J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of fungi*. 10th edition. CABI Bioscience, Wallingford. pp. 771.
- Kobayashi, Y. and M. Ookubo. 1953. Studies on the marine phycomycetes. *Bull. Nat. Sci. Mus.* 33: 51–65.
- Kobayashi, T., K. Sakaguchi, T. Matsuda, E. Abe, Y. Hama, M. Hayashi, D. Honda, Y. Okita, S. Sugimoto, N. Okino and M. Ito. 2011. Increase of eicosapentaenoic acid in thraustochytrids through thraustochytrid ubiquitin promoter-driven expression of a fatty acid $\Delta 5$ desaturase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3870–3876.
- Konno, K. 1972. Studies of Japanese lower aquatic phycomycetes. *The Science Report of the Tokyo Kyoiku Daigaku. Sec. B.14*: 227–292.
- Langdon, C. and E. Onal. 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 180: 283–294.
- Leander, C.A. 2001. Phylogeny of the Labyrinthulomycota. PhD Dissertation. The University of Georgia, Athens.
- Leander, C.A. and D. Porter. 2000. Redefining the genus *Aplanochytrium* (Phylum Labyrinthulomycota). *Mycotaxon* 76: 439–444.
- Leander, C.A. and D. Porter. 2001. The Labyrinthulomycota is comprised of three distinct lineages. *Mycologia* 93: 459–464.
- Leander, C.A., D. Porter and B.S. Leander. 2004. Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). *Eur. J. Protistol.* 40: 317–328.
- Leaño, E.M. and V. Damare. 2012. Labyrinthulomycota. In: (E.B.G. Jones and K.L. Pang, eds) *Marine fungi and fungal-like organisms*. De Gruyter, Berlin/Boston. pp. 317–328.
- Lewis, T.E., P.D. Nichols and T.A. McMeekin. 1999. The biotechnological potential of thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.* 1: 580–587.
- Li, Q., G.Q. Chen, K.W. Fan, F.P. Lu, T. Aki and Y. Jiang. 2009. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrid from Hong Kong mangroves. *J. Agric. Food Chem.* 57: 4267–4272.
- Liu, Y., P. Singh, Y. Sun, S. Luan and G. Wang. 2014. Culturable diversity and biochemical features of thraustochytrids from coastal waters of Southern China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 3241–3255.
- Manikan, V., M.Y.M. Nazir, M.S. Kalil, M.H.M. Isa, A.J.A. Kader, W.M.W. Yusoff and A.A. Hamid. 2015. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. *Algal Res.* 9: 40–47.
- Martins, D.A., L. Custódio, L. Barreira, H. Pereira, R. Ben-Hamadou, J. Varela and K.M. Abu-Salah. 2013. Alternative sources of *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Mar. Drugs* 11: 2259–2281.
- Milanez, A.I. 1989. Fungos de águas continentais. In: (O. Fidalgo and V.L. Bononi, eds) *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 17–20.
- Mooney, J.W., E.M. Hirschler, A.K. Kennedy, A.R. Sams and M.E. Van Elswyk. 1998. Lipid and flavour quality of stored breast meat from broilers fed marine algae. *J. Sci. Food Agric.* 78: 134–140.
- Moss, S.T. 1986. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales. In: (S.T. Moss, ed) *The biology of marine fungi*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 105–129.
- Muehlstein, L.K., D. Porter and F.T. Short. 1988. *Labyrinthula* sp., a marine slime mold producing the symptoms of wasting disease in eelgrass, *Zostera marina*. *Mar. Biotechnol.* 99: 465–472.
- Mycobank (2017): <http://www.mycobank.org>. Accessed in: February 20, 2017.
- Nakazawa, A., Y. Kokubun, H. Matsuura, N. Yonezawa, R. Kose, M. Yoshida, Y. Tanabe, E. Kusuda, D.V. Thang, M. Ueda, D. Honda, A. Mahakhant, K. Kaya and M.M. Watanabe. 2014. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *J. Appl. Phycol.* 26: 29–41.
- Ou, M.C., H.Y. Yeong, K.L. Pang and S.M. Phang. 2016. Fatty acid production of tropical thraustochytrids from Malaysian mangroves. *Bot. Mar.* 59: 321–338.
- Pan, J., J. del Campo and P.J. Keeling. 2017. Reference tree and environmental sequence diversity of labyrinthulomycetes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64: 88–96.
- Papadopoulos, G., C. Goulas, E. Apostolaki and R. Abril. 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewe. *J. Dairy Res.* 69: 357–365.
- Porter, D. 1989. Phylum Labyrinthulomycota. In: (L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian and D.J. Chapman, eds). *Handbook of protocista*. Jones and Bartlett Publishers, Boston. pp. 914.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.
- Raghukumar, S. 1988. *Schizochytrium mangrovei* sp. nov., a thraustochytrid from mangroves in India. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 90: 627–631.
- Raghukumar, S. 1992. Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in the sea. *Mar. Biotechnol.* 113: 165–169.
- Raghukumar, S. 2002. Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). *Eur. J. Protistol.* 38: 127–145.
- Raghukumar, S. 2008. Thraustochytrid marine protist: production of PUFAs and others emerging technologies. *Mar. Biotechnol.* 10: 631–640.
- Rosa, S.M., M.A. Galvagno and C.G. Vélez. 2006. Primeros aislamientos de thraustochytriales (Labyrinthulomycetes, Heterokonta) de ambientes estuariales y salinos de la Argentina. *Darwiniana* 44: 81–88.
- Scharer, L., D. Knoflach, D.B. Vizoso, G. Rieger and U. Peintner. 2007. Thraustochytrids as novel parasitic protists of marine free-living flatworms: *Thraustochytrium caudivorum* sp. nov. parasitizes *Macrostomum lignano*. *Mar. Biol.* 152: 1095–1104.
- Schneider, V.J. 1967. Ein neuer mariner phycomycet aus der Kieler Bucht (*Thraustochytrium striatum* spec. nov.). *Aus dem Institut für Meereskunde der Universität Kiel.* 23: 16–20.
- Scholz, E. 1958. Über morphologische modifikationen bei niederen erdphycomyceten und beschreibung zweier neuer arten von *Rhizophydium* und *Thraustochytrium*. *Archiv. für Mikrobiologie* 29: 354–362.
- Shimidzu, N., M. Goto and W. Wataku. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Sci.* 62: 134–137.

- Siboni, N., D. Rasoulouniriana, E. Ben-Dov, E. Kramarsky-Winter, A. Sivan, Y. Loya, O. Hoegh-Guldberg and A. Kushmaro. 2010. Stramenopile microorganisms associated with the massive coral *Favia* sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57: 236–244.
- Sim, J.S., S. Nakai and W. Guenter. 2000. *Egg nutrition and biotechnology*. CABI Publishing, Wallingford, UK; New York, USA. pp. 512.
- Souza, T.A.B., G. Clemente, F. Moura, F. Garcia and M. Flynn. 2006. Mapeamento de manguezal em Cananéia, São Paulo – Brasil. *Environmental and Health World Congress*: 691–692.
- Sparrow, Jr., F.K. 1936. Biological observations on the marine fungi of woods hole waters. *Biol. Bull.* 70: 236–263.
- Sparrow, Jr., F.K. 1960. *Aquatic phycomycetes*. 2nd revised edition. Ambassador Books, Toronto. pp. 1228.
- Sullivan, B.K., K.L. Robinson, S.M. Trevathan-Tackett, E. Lilje, F.H. Gleason and O. Lilje. 2016. The first isolation and characterization of the protist *Labyrinthula* sp. in southeastern Australia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64: 504–513.
- Topuz, O.K. 2016. Algal Oil: A novel source of omega-3 fatty acids for human nutrition. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* 20: 178–183.
- Tsui, C.K., W. Marshall, R. Yokoyama, D. Honda, J.C. Lippmeier, K.D. Craven, P.D. Peterson and M.L. Berbee. 2009. Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50: 129–140.
- Ulken, A. 1970. Phycomyceten aus der mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven* 12: 313–319.
- Ulken, A. 1972. Physiological studies on a phycomycete from the mangrove swamp at Cananéia, São Paulo, Brazil. *Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven* 13: 217–230.
- Ulken, A. 1990. *Marine Thraustochytrids and Chytridiomycetes in the North Sea area and in selected others regions*. J. Cramer Publishing, Berlin. pp. 93.
- Weete, J.D., H. Kim, S.R. Gandhi, Y. Wang and R. Dute. 1997. Lipids and ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. *Lipids* 32: 839–845.
- Yang, H.L., C.K. Lu, S.F. Chen, Y.M. Chen and Y.M. Chen. 2010. Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Mar. Biotechnol.* 12: 173–185.
- Yokoyama, R. and D. Honda. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 199–211.
- Yokoyama, R., B. Salleh and D. Honda. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia sensu lato* based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. nov. *Mycoscience* 48: 329–341.

Bionotes



Marcela Castilho Boro

Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil, marcelaboro@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-0555-8957>

Marcela Castilho Boro is a biologist. She is working at the “Instituto de Botânica” of State of São Paulo as research assistant, where nowadays is the curator of the Fungal Culture Collection. She earned her Master’s degree from “Instituto Biológico” in plant health and food and environmental security in agribusiness. Currently, she is finishing her PhD thesis on morphology/molecular diversity and quantification of fatty acids of the Labyrinthulomycota isolated from Brazilian mangrove swamps and coastal waters belonging to Atlantic rainforest.



Ricardo Harakava

Instituto Biológico, Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, 04014-900, São Paulo, SP, Brazil

Ricardo Harakava is a molecular biologist with an emphasis on plant pathology. Since 1997 he works as a scientific researcher at “Instituto Biológico”, São Paulo, Brazil. He earned his PhD in plant pathology at the University of Florida in 2000. He applies molecular tools to solve a variety of problems in plant pathology such as disease diagnosis, identification and taxonomy of plant pathogens and pests, and plant-microbe interactions.



Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli

Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Micologia, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-012, São Paulo, SP, Brazil

Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli is a mycologist with more than 30 years of experience. She is a researcher of the “Instituto de Botânica”, São Paulo, Brazil, focusing her studies on taxonomy, systematic and ecology of the zoospore fungi and fungus like organisms.

Graphical abstract

Marcela Castilho Boro, Ricardo Harakava
and Carmen Lidia Amorim Pires-Zottarelli
**Labyrinthulomycota from Brazilian
mangrove swamps and coastal waters**

<https://doi.org/10.1515/bot-2017-0052>
Botanica Marina 2018; x(x): xxx–xxx

Research article:

Labyrinthulomycota are organisms with the ability to produce polyunsaturated fatty acids and are present in marine and brackish waters. Labyrinthulomycota species from Brazil are reported, contributing to the knowledge of the diversity of these organisms in the country.

Keywords: Atlantic rainforest; Labyrinthulales; Thraustochytriales; zoosporic organisms.

