

Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas

Simone Maciel da Costa*

Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo*

RESUMO

Um banco de culturas de espécies e/ou cepas de cianofíceas tóxicas está sendo implantado no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, (NPPN-UFRJ), objetivando a realização de estudos ecofisiológicos e toxicológicos com cepas isoladas de corpos d'água brasileiros. A identificação da toxicidade das espécies e/ou cepas é realizada por bioensaios em camundongos "Swiss". Foi verificada a produção de toxinas em 75% das cepas já testadas.

Palavras-chave: Cianofíceas, isolamento, toxinas, coleção.

ABSTRACT

Setting up of a culture collection of toxic Cyanophyta

A culture collection of toxic Cyanophyta is being set up in the Laboratory of Culture and Physiology of Microalgae Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN-UFRJ). The goal of this collection is to permit ecophysiological and toxicologic studies on toxic strains isolated from Brazilian freshwater bodies. Toxicity tests with different species and/or strains of Cyanophyta are carried on by means of "Swiss" mice bioassays. Toxin production was verified in 75% of the tested strains.

Key-words: Cyanophyta, isolation, toxins, collection.

INTRODUÇÃO

Várias espécies de cianofíceas (algas azuis ou cianobactérias), que comumente apresentam um grande crescimento em ambientes de água doce ou estuarina, têm sido descritas como responsáveis por casos de envenenamento animal ou humano em muitos países (HUGHES et al., 1958; TOERIEN et al., 1976; CARMICHAEL & GORHAM, 1980; ODRIOZOLA et al., 1984; SIVONEN, 1990; FALCONER, 1991; LAWTON & COOD, 1991; ZHANG et al., 1991).

* Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais — CCS, Bl. H, UFRJ — CEP 21949-900 Ilha da Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ.

As toxinas de cianofíceas até agora caracterizadas podem ser incluídas em dois grupos: neurotoxinas formadas por alcalóides ou compostos organofosforados e hepatotoxinas heptapeptídicas ou pentapeptídicas, sendo que as hepatotoxinas são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação (CARMICHAEL, 1992).

No Brasil, temos até o momento apenas dois relatos confirmados de ocorrência de morte de aves, relacionadas com florações de *Microcystis* em dois lagos situados no Estado de São Paulo (BEYRUTH et al., 1992). Entretanto, o aumento de eutroficação de nossos corpos d'água naturais e reservatórios, principalmente nos grandes centros urbanos, tem permitido um rápido crescimento destas espécies que estão se tornando cada vez mais comuns e dominantes nestes ambientes que apresentam as condições ideais para o aparecimento de florações de cianofíceas (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1992).

Os estudos que vêm sendo realizados no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas (NPPN-UFRJ) têm confirmado a ocorrência de espécies de cianofíceas tóxicas em diferentes corpos d'água brasileiros (AGUIAR et al., 1993; AZEVEDO et al., 1993). Portanto, a implantação e manutenção de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas facilitará a realização de estudos ecofisiológicos e toxicológicos, bem como permitirá o intercâmbio destes organismos entre pesquisadores nacionais e estrangeiros.

Este procedimento torna-se fundamental quando se verifica a existência de apenas 13 bancos de culturas com estas características em todo o mundo e não se tem conhecimento da existência de nenhum banco semelhante em toda a América Latina.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas para isolamento são realizadas em ambientes continentais, principalmente no Estado e Município do Rio de Janeiro (RJ), com algumas coletas no Lago Batata, Amazonas (AM), e em corpos d'água do Distrito Federal (DF) e dos Estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), e Bahia (BA).

Após a coleta, parte do material é analisada em microscópio óptico para identificação das espécies e parte diluída em meio de cultivo ASM-1 (GORHAM et al., 1964) para posterior isolamento.

O isolamento é realizado por técnica de microcapilares e também através de diluições sucessivas.

Para melhor purificação das culturas, foi desenvolvida uma metodologia que envolve a lavagem das células, por centrifugação a 3.000 rpm, em uma solução aquosa de detergente neutro a 0,1%. Uma vez isoladas, as culturas são iniciadas com volume de inóculo de 10% em relação ao volume do meio.

A catalogação das espécies e cepas segue o seguinte critério: letras iniciais (NP) indicando a localização do banco; duas letras indicando local de coleta; o número de acordo com a ordem de isolamento deste local.

Além do catálogo são feitas fichas individuais para cada cepa. A manutenção das cepas está sendo feita por repiques quinzenais em meio de cultura novo.

A identificação de toxicidade das diferentes espécies e/ou cepas é realizada através de bioensaios em camundongos "Swiss". Para tanto, o material celular liofilizado é dissolvido em solução salina a 0,9%, em diferentes concentrações, e injetado intraperitonealmente (i.p.) nos animais. Os sintomas são observados, assim como a dose mínima $|DL_{\min}|$ (mg/kg) para ocorrência de morte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados os dados referentes à coleção de cianofíceas mantidas no Banco de Culturas do NPPN-UFRJ, com indicação das espécies já isoladas, seu código de referência e origem (Tab. 1) e bioensaios de toxicidade (Tab. 2).

Das 16 cepas da divisão Cyanophyta já testadas quanto à toxicidade, 12 delas mostraram-se tóxicas nos bioensaios realizados, o que representa 75% do total já analisado. Este resultado concorda com os dados obtidos por pesquisadores estrangeiros que vêm demonstrando um aumento da percentagem de ocorrência de cepas de cianofíceas tóxicas nas espécies analisadas, ficando este valor na maioria dos casos acima de 50% (LAWTON & COOD, 1991; CARMICHAEL, 1992).

Pelos dados até agora obtidos, fica clara a necessidade da continuidade deste trabalho para que a implementação desse Banco de Culturas possa ser realizada de forma contínua e ininterrupta e permita o intercâmbio deste material entre pesquisadores nacionais e estrangeiros. Além disso, este trabalho possibilitará também a realização de estudos com espécies de cianofíceas representativas dos nossos diferentes ecossistemas aquáticos, permitindo a verificação de parâmetros ecofisiológicos possivelmente envolvidos com a produção de toxinas por essas espécies.

AGRADECIMENTOS

Ao Banco de Culturas de Microalgas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Setor de Toxicologia Aquática da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), por nos terem cedido gentilmente algumas culturas. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Recursos Humanos em Áreas Estratégicas (CNPq/RHAE) pela bolsa de Estágio/Especialização (E.P.) para a primeira autora (Processo nº 16083/92-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.G.; BOBEDA, C.R. & AZEVEDO, S.M.F.O. 1993. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* strains isolated from bodies of water in Rio de Janeiro. *Toxicon*, Oxford, **31**(2):107-8.

IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, (45):69-74, ago. 1994

- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W. & CARMICHAEL, W.W. 1993. Isolation purification and characterization of hepatotoxic microcystins – cyclic peptides from a Brazilian *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacterium, blue-green algae). *Toxicon*, Oxford, **31**(2):110.
- BEYRUTH, Z. et al. 1992. Toxic algae in freshwaters of São Paulo State. In: CORDEIRO-HARINO, M. et al. *Algae and Environment: a general approach*. São Paulo, Soc. Bras. Ficologia. p. 53-64.
- CARMICHAEL, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites: The Cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**: 445-59.
- CARMICHAEL, W.W. & GORHAM, P.R. 1980. Freshwater Cyanophyte Toxins: Types and their effects on the use of micro algae biomass. In: SHELEFG & SOEDER, C.J., ed. *Algal Biomass, Production and Use*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. p.437-48.
- FALCONER, I.R. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Envir. Toxic. Wat. Quality*, **6**:177-84.
- GORHAM, P.R. et al. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. Verh. *Int. Verein theor. angew. Limnol.*, Stuttgart, **15**:798-804.
- HUGHES, E.O.; GORHAM, P.R. & ZEHNDER, A. 1958. Toxicity of a Unialgal Culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, **4**:225-36.
- LAWTON, L.A. & COOD, G.A. 1991. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Water. *J. IWEN. UK.*, p.460-5.
- ODRIOZOLA, E.; BALLABENE, N. & SALAMANCO, A. 1984. Intoxicacion en ganado bovino por algas verde-azuladas. *Revta argent. Microbiol.*, V. Buenos Aires, (4):219-24.
- SIVONEN, K. et al. 1989. Occurrence of the Hepatotoxic Cyanobacterium *Nodularia spumigera* in the Baltic Sea and Structure of the Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**:1990.
- TOERIEN, D.F.; SCOTT, W.E. & PITOUT, M.J. 1976. *Microcystis* toxins: isolation identification, implications. *Wat. S. Afr.*, Pretoria, **2**(4):160-3.
- TUNDISI, J.G. & MATSUMURA-TUNDISI, T. 1992. Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In: CORDEIRO-MARINO, M. et al. ed. *Algae and Environment: a general approach*. São Paulo, Soc. Bras. de Ficologia. p.1-33.
- ZHANG, Q.Z. et al. 1991. Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected in Central China. *Envir. Toxic. Chemistry*. **10**:313-21.

Recebido em 22.IV.1993. Aceito para publicação em 17.II.1994.

IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, (45):69-74, ago. 1994

TABELA 1 – Cepas de cianofíceas mantidas no banco de culturas NPPN-UFRJ.

| Código | Nome da espécie | Origem |
|-----------|---|------------------------------|
| * NPBR-1 | <i>Anabaena flos-aquae</i> (Lyngbe) Breb. | Rep. Broa – SP |
| NPCG-1 | <i>Arthrospira platensis</i> (Nordst.) Gomont | Campo Grande – RJ |
| MPBT-2 | <i>Gloeothece</i> sp. | Lago Batata – AM |
| * NPBR-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kuetzing) Lemmermann | Rep. Broa – SP |
| NPDF-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Lago Paranoá – DF |
| NPJB-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Jardim Botânico – SP |
| NPTA-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | CEDAE – Taquara – RJ |
| NPRE-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Rep. Funil – Resende – RJ |
| NPLJ-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Lagoa de Jacarepaguá – RJ |
| NPLJ-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Lagoa de Jacarepaguá – RJ |
| ** NPRI-1 | <i>Microcystis viridis</i> (A. Braum) Lemmermann | Rep. Ibitanga – BA |
| NPLS-1 | <i>Microcystis</i> sp. | Lagoa Santa – MG |
| NPCD-1 | <i>Microcystis</i> sp. | Cidade de Deus – RJ |
| * NPBR-3 | <i>Nostoc muscorum</i> Agardh ex. Bornet | Rep. Broa – SP |
| NPDF-2 | <i>Oscillatoria</i> sp. | Lagoa Paranoá – DF |
| ** NPRG-1 | <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> Bruhl et Biswas | Rep. Guarapiranga – SP |
| NPRE-3 | <i>Oscillatoria</i> sp. | Rep. Funil – Resende – RJ |
| NPBT-1 | <i>Oscillatoria</i> sp. | Lago Batata – Amazonas – AM |
| NPRE-2 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | Rep. Funil – Resende – RJ |
| NPLB-1 | <i>Synechococcus elongatus</i> Näg. | Lagoa da Barra – Maricá – RJ |
| NPBS-3 | <i>Synechocystis</i> sp. | Baía de Sepetiba – RJ |
| NPLB-2 | <i>Synechocystis aquatilis</i> Sauv. | Lagoa da Barra – Maricá – RJ |

* Culturas cedidas pelo Banco de Culturas da UFSCar.

** Culturas cedidas pelo Setor de Toxicologia Aquática – CETESB – SP.

TABELA 2 — Bioensaios de toxicidade realizados com injeção i.p. da suspensão de células em camundongos "Swiss".

| Código | Espécie | DL _{min.} (mg/kg) |
|--------|--------------------------------------|-------------------------------|
| NPBR-1 | <i>Anabaena flos-aquae</i> | * |
| NPBR-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 431,01 |
| NPDF-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 89,69 |
| NPJB-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 31,06 |
| NPTA-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 9,09 |
| NPLJ-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 16,83 |
| NPLJ-2 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 18,00 |
| NPRI-1 | <i>Microcystis viridis</i> | * |
| NPCD-1 | <i>Microcystis aeruginosa</i> | 577,00 |
| NPBR-3 | <i>Nostoc muscorum</i> | * |
| NPDF-2 | <i>Oscillatoria</i> sp. | 312,50 |
| NPRG-1 | <i>Oscillatoria quadripunctulata</i> | 495,05 |
| NPRE-2 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | * |
| NPLB-1 | <i>Synechococcus elongatus</i> | 312,50 |
| NPBS-3 | <i>Synechocystis</i> sp. | 15,32 |
| NPLB-2 | <i>Synechocystis aquatilis</i> | 114,70 |

* Não houve morte de animais em todas as concentrações testadas.