



Estudos taxonômicos *in vitro* e prospecção de toxinas de cianobactérias isoladas de reservatórios do estado de São Paulo

Raquel Ieda Lopes⁽¹⁾, Luciana Retz de Carvalho⁽²⁾, Andréa Tucci⁽²⁾

⁽¹⁾ Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente,
Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia;

São Paulo, SP., raquel_opes@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Instituto de Botânica – Núcleo de Pesquisa em Ficologia

Resumo: As cianobactérias são organismos procariontes, comumente encontrados em corpos de água doce, que sintetizam numerosas substâncias bioativas e formam florações. Suas toxinas podem permanecer na água, deteriorando sua qualidade, ou ainda podem ser bioacumuladas na cadeia trófica. Dessa maneira, com o objetivo de identificar e investigar a potencial produção de toxinas foram estudadas cinco cepas de cianobactérias, provenientes de diferentes reservatórios do Estado de São Paulo. As cepas da Coleção de Cultura de Cianobactérias do Instituto de Botânica foram mantidas em meio de cultura líquido ASM-1, em temperatura, irradiância e fotoperíodo controlados. A cada 30 dias, durante a repicagem, foram retiradas alíquotas para a observação dos organismos para análise taxonômica. A pesquisa de cianotoxinas foi realizada por cromatografia planar para teste de microcistinas, saxitoxinas e betametilaminoalanina. As cianobactérias foram identificadas como: *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3085); *Rhabdoderma sancti-pauli* (CCIBt 3244); *Leptolyngbya angustissima* (CCIBt 3102); *Phormidium formosum* (CCIBt 3246) e *Calothrix elenkinii* (CCIBt 3287). Em nenhum dos extratos foi detectada microcistinas ou saxitoxinas. Porém as cepas CCIBt3085, CCIBt3244, CCIBt3246 e CCIBt3287 apresentaram resultados positivos para o aminoácido neurotóxico betametilaminoalanina, relacionado à doença de Alzheimer.

Palavras-Chave: betametilaminoalanina, *Cyanosarcina*, *Phormidium*, *Rhabdoderma*.

INTRODUÇÃO

Grande parte dos reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo encontra-se em meio a uma avançada e desordenada ocupação urbana, que agrava os impactos e adiciona inúmeros danos à qualidade da água (Tundisi 2005). O despejo de efluentes orgânicos e industriais é um dos fatores que interferem na qualidade da água, promovendo

especialmente a eutrofização artificial com o desenvolvimento de florações de microalgas e principalmente de cianobactérias (Tundisi 2003).

De acordo com Paerl & Huisman (2008), as mudanças climáticas podem potencializar a ocorrência das florações. A elevação da temperatura (acima de 25°C) favorece as cianobactérias tanto no crescimento, duplicação celular quanto na extensão temporal da fotossíntese. Por isso, as florações ou mesmo a constante presença das cianobactérias podem significar riscos à saúde pública, principalmente se ocorrerem em reservatórios destinados ao abastecimento público, pois durante a senescência das células pode ocorrer a liberação de cianotoxinas na água (Carvalho 2006). Devido à presença de lipopolissacarídeos (LPS), constituintes da parede celular, todas as cianobactérias são tóxicas, porém cerca de 60% das espécies sintetizam, também, outras substâncias tóxicas, as cianotoxinas (Van Apeldoorn *et al.* 2007). Estas são classificadas segundo sua ação farmacológica em: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas. Recentemente se iniciou estudos sobre β -metilaminoalanina, aminoácido neurotóxico de efeito crônico (BMAA), devido a sua relação com doenças neurodegenerativas e sua bioacumulação (Cox *et al.* 2005).

Dessa maneira, com o objetivo de identificar, acompanhar a variabilidade fenotípica e investigar a potencial produção de toxinas foram estudadas cinco cepas de cianobactérias, provenientes de diferentes reservatórios do Estado de São Paulo, em especial, de três Represas destinadas ao abastecimento público (Guarapiranga, Billings e Atibainha).

MATERIAL E MÉTODOS

As cinco cepas de cianobactérias estudadas pertencem a Coleção de Cultura do Instituto de Botânica (CCIBt). Estas foram mantidas em meio ASM-1 sob as seguintes condições: temperatura de 23±2°C, irradiância de 40-50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 - 10h claro-escuro (Azevedo & Sant'Anna 2003).



Estudos taxonômicos

A cada 30 dias, durante a repicagem, foram retiradas alíquotas para a observação dos organismos. Parte deste material foi mantida viva e parte fixada com formol a 4% para análise taxonômica e depósito no acervo do Herbário Científico (SP) do Instituto de Botânica de São Paulo.

O sistema de classificação utilizado foi o de Hoffman *et al.* (2005) e a identificação foi realizada com base em bibliografia especializada, incluindo floras (Desikachary 1959, Komárek & Anagnostidis, 1999 e 2005), artigos, revisões e teses.

Prospecção de cianotoxinas

Para a pesquisa de cianotoxinas foram cultivados 10 litros de biomassa, por cerca de três semanas (Stanier *et al.* 1971). Esta foi liofilizada, dividida, e parte foi submetida à extração em ácido acético 0,1M e outra parte em metanol 100% (Pyo & Shin 2002). Os extratos de cada uma das cepas passaram pelas pesquisas por cromatografia planar de: microcistinas (Pelander *et al.* 2000), saxitoxinas (Buckley *et al.* 1976), e betametilaminoalanina (Merck 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos taxonômicos

SYNECHOCOCCOPHYCIDAE

SYNECHOCOCCALES

Synechococaceae

Rhabdoderma sancti-pauli Azevedo, Sant'Anna, Senna, Komárek & Komárková. *Hoehnea* 30: 286. figs. 5-7. 2003. Figura 1a. **CCIBt 3244.**

Colônias irregulares, formadas por numerosas células irregularmente distribuídas em envelope mucilaginoso. Células cilíndricas, arcuadas ou sigmóides com extremidades arredondadas, 0,5-3,3 vezes mais longa que larga, 1,1-4,5 µm compr., 0,6-1,7µm diâm.; conteúdo celular verde azulado, homogêneo. Pseudofilamentos presentes. **Material examinado:** BRASIL, SÃO PAULO: São Paulo, Reservatório Billings, III-2003. *CETESB, s.n.* (SP401471).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: Lago do IAG, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Honda & Azevedo 2004, Ferragut *et al.* 2005); como *R. sigmoidea* var. *minor* (Azevedo *et al.* 1996). Primeira citação da espécie para o Reservatório Billings.

PSEUDANABAENALES

Pseudanabaenaceae

Leptolyngbya angustissima (West & G.S.West) Anagnostidis & Komárek, *Algolog. Stud.*, 80: 390. 1988. Figura 1b. **CCIBt 3102.**

Filamentos densamente emaranhados. Tricomas cilíndricos retos ou flexuosos, não atenuados, não captados, constrictos. Bainha mucilagínosa estreita, hialina 1,4-1,7(2,2) µm. Células 1-3,5 vezes mais longas que largas, 1,5-4,3 µm compr., 1,0-1,4 µm diâm.; conteúdo celular homogêneo, verde-azulado pálido, sem grânulos; célula apical com ápice arredondado. **Material examinado:** BRASIL, SÃO PAULO: Nazaré Paulista, Reservatório Atibainha, IV-1998, *M.T.P. Azevedo s.n.* (SP401468).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: Lago do IAG, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Ferragut *et al.* 2005); Pesqueiros em diferentes municípios: Embu das Artes, São Paulo e Caucaia do Alto (Rosini 2010). Primeira citação da espécie para o Reservatório de Atibainha

OSCILLATORIOPHYCIDAE

CHROOCOCCALES

Chroococaceae

***Cyanosarcina* sp.** Figura 1c. **CCIBt 3085.**

Colônias jovens esféricas, posteriormente irregulares formando pacotes de células densamente agregados. Células esféricas a subsféricas, 3,0-5,9 µm diâm.; após divisão celular agrupadas em colônias tridimensionais facilmente dissociáveis, conteúdo celular homogêneo, verde-azulado. **Material examinado:** BRASIL: SÃO PAULO, São Paulo, Reservatório Guarapiranga, IV-1997, *CETESB s.n.* (SP401467). Trata-se da primeira citação do gênero para o Reservatório Guarapiranga.

OSCILLATORIALES

Phormidiaceae

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis & Komárek *Algolog. Stud.*, 40: 405. 1988. Figura 1d. **CCIBt 3246.**

Tricomas dispostos paralelamente em feixes, retos, emaranhados. Tricomas curvos apenas nas duas últimas células, levemente atenuado em direção ao ápice, levemente constrictos. Células subquadráticas 0,4-2,2 vezes mais longa que larga, (1,6) 2,0-4,2 (6,0) µm compr., 2,0-4,4 (5,0) µm diâm. Célula apical cônico-arredondada. Conteúdo celular verde oliva, homogêneo. Motilidade intensa. **Material examinado:** BRASIL, SÃO PAULO: São Paulo, Instituto de Botânica, Lago das Garças, IX-2003, *C.L.Sant'Anna s.n.* (SP401470).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: como *Oscillatoria formosa* Bory ex Gomont (Sant'Anna & Azevedo 1995). Primeira citação da espécie para o Lago das Garças.



NOSTOCHOPHYCIDAE
NOSTOCALES
Rivulariaceae

CCIBt 3102	-	-
CCIBt 3244	BMAA	-
CCIBt 3246	BMAA	-
CCIBt 3287	BMAA	-

Calothrix elenkinii Kossinskaja Not. Syst. Crypt. Inst. Horti Bot. Petropol., 3:11, 1924. Figura 1d. **CCIBt 3287.**

Tricomatas heteropolares freqüentemente agregados. Bainha mucilaginosa firme, homogênea, incolor, não lamelada, aberta no ápice. Tricomatas intumescidos na base, curvos, constrictos, sem formação de pêlo terminal. Células subquadráticas, em forma de barril, 0,5-2,0 vezes mais longa que larga, na base; (2,9) 3,5-7,8 µm compr.; (3,5) 4,0-6,0 (7,5) µm diâm. Conteúdo celular granuloso, verde oliva. Heterocitos basais cônico-arredondado a subcônicos, raramente hemisféricos, 0,8-2,0 (2,3) vezes mais longo que largo; (3,0) 4,0-6,0 (7,0) µm compr., (3,0) 3,8-6,0 µm diâm. **Material examinado:** BRASIL, SÃO PAULO: Pindamonhangaba, Instituto de Pesca, viveiro de piscicultura experimental, II-2009, C.T.J. *Mercante s.n.* (SP401472).

Distribuição geográfica no Estado de São Paulo: primeira citação para o Estado.

Honda & Azevedo (2004) discutem sobre a microbiota potencial de ambientes, ou seja, espécies que não são registradas por sua baixa densidade, mas se desenvolvem quando mantidas em culturas. No presente estudo quatro táxons constituem novas ocorrências para os respectivos ambientes de origem (apesar dos estudos neles já realizados), e muito provavelmente correspondem a esta microbiota potencial.

Prospecção de cianotoxinas

Em nenhum dos extratos foi detectada a presença de microcistinas, ou saxitoxinas. Porém quatro das cinco cepas estudadas apresentaram resultados positivos para o aminoácido neurotóxico betametilaminoalanina (tabela 1).

Tabela 1. Resultados das análises de cianotoxinas nos diferentes extratos das cepas estudadas.

Cepas	Extrato ácido	Extrato metanólico
CCIBt 3085	BMAA	-

Cox *et al.* (2005) investigaram a produção de BMAA em diversas cepas de cianobactérias: nas marinhas, nas de água doce, nas simbiontes, e de vida livre. Dentre as cianobactérias simbiontes 73% produziram BMAA; enquanto 95% daquelas de vida livre também produziram. Muitas destas cepas não estavam identificadas em nível específico, porém os autores também estudaram cepas de *Phormidium* e *Calothrix* que apresentaram resultados positivos. Este é o primeiro relato da ocorrência deste aminoácido em cepas de *Cyanosarcina* e *Rhabdoderma*.

CONCLUSÕES

Trabalhos como este demonstram a importância de estudos taxonômicos que revelam a microbiota potencial dos ecossistemas aquáticos. Além disso, todos os táxons apresentaram suas medidas entre valores mínimos estabelecidos pela literatura; o que pode estar relacionado ao longo período em que estes organismos estão mantidos em cultura. Ressalta-se ainda, os resultados inéditos de síntese de BMAA por espécies de cianobactérias brasileiras.

AGRADECIMENTOS

CAPES, pela bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C.L. 2003. *Sphaerocavum* a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algological Studies* 109:79-92.
- BUCKLEY, L.J., IKAWA, M. & SASNER, J.R. 1976. Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24(1): 107-110.
- CARVALHO, L.R. 2006. Cianotoxinas In: Sant'Anna C.L.; Azevedo M.T.P.; Agujaro, L.F.; Carvalho, M.C.; Carvalho, L.R. & Souza, R.C.R. (Orgs.). Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. Interciência, Rio de Janeiro.
- COX, P.A., BANACK, S.A. & MURCH, S.J. 2005. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- DESIKACHARY, T.V. 1959. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research. pp.686.

- HOFFMANN, L., KOMARÉK, J. & KASTOVSKY, J.** 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algological Studies* 117:95-115.
- HONDA, R.I. & AZEVEDO, M.T.P.** 2004. Estudos taxonômicos em cultura de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, (PEFI), São Paulo, SP. Brasil. *Hoehnea* 31:151-169
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. *In: Süßwasserflora von Mitteleurop.* H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Möllenhauer (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K.** 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. *In: Süßwasserflora von Mitteleuropa.* B. Büdel, G. Gärtner, L. Krientitz & M. Schagerl (eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- MERCK.** 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 118.
- PAERL, H.W. & HUISMAN, J.** 2008. Blooms like it hot. *Science* 320:57-58.
- PELANDER, A., OJANPERÄ, I., LAHTI, K., NINIVAARA, K. & VUORI, E.** 2000. Visual detection of cyanobacterial hepatotoxins by thin-layer chromatography and application to water analysis. *Water Research* 34: 2643-2652.
- PYO, D. & SHIN, H.** 2002. Extraction and analysis of microcystins RR and LR in cyanobacteria using a cyano cartridge. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 103-109.
- STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. & COHEN-BAZIRE, G.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35:171-205.
- TUNDISI, J. G.** 2005. Gerenciamento Integrado de Bacias Hidrográficas e Reservatórios. *In: NOGUEIRA, Marcos Gomes et al. (Org.). Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata.* São Carlos : FUNDIBIO, pp. 19-38.
- TUNDISI, J.G.** 2003. Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez. Rima, São Carlos.
- VAN APELDOORN, M.E., VAN EGMOND, H.P., SPEIJERS, G.J.A. & BAKKER, G.J.I.** 2007. Review – Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res* 51: 1-60.

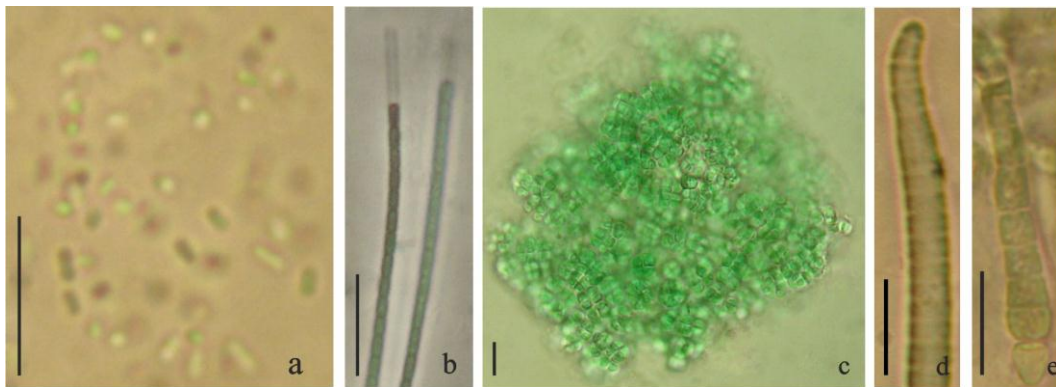


Figura 1 a-d. a. *Rhabdoderma sancti-pauli*, b. *Leptolyngbya angustissima*, c. *Cyanosarcina* sp., d. *Phormidium formosum*, e. *Calothrix elenkinii*. Escalas: 10 µm.