

CIANOPROCARIOTOS AEROFÍTICOS DE FLORESTA TROPICAL ATLÂNTICA: CULTIVO, PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CEPAS DE NOSTOCALES PARA ESTUDOS MOLECULARES. Joana Pozzetti

Teixeira, Luis Henrique Zanini Branco. – Microbiologia – Ciências Biológicas – Departamento de Zoologia e Botânica – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-IBILCE - Campus de São José do Rio Preto.

Cianoprocariotos são especialmente bem distribuídos e abundantes em ambientes terrestres e têm funções ecológicas importantes nos ecossistemas onde ocorrem. Estudos têm mostrado que estes organismos: 1. promovem retenção de limo impedindo erosões; 2. são colonizadores primários importantes; 3. apresentam papel relevante no enriquecimento de nitrogênio em arrozais; 4. produzem substâncias promotoras de crescimento semelhantes a auxinas e vitaminas e; 5. produzem de compostos potencialmente úteis para a medicina. Entretanto, os cianoprocariotos são pouco estudados do ponto de vista taxonômico, especialmente em regiões tropicais.

Um dos problemas para estudos mais aprofundados, como abordagens ultra-estruturais e moleculares, é a grande dificuldade em se obter culturas puras das espécies deste grupo de organismos provenientes de habitats aerofíticos. Desta maneira, este projeto objetivou: 1. proceder triagem e limpeza dos organismos de interesse pertencentes à ordem Nostocales; 2. inocular os organismos em diferentes tipos de meio, procurando-se avaliar o mais adequado; 3. efetuar a purificação das culturas, buscando-se a constituição de culturas unialgais; 4. manter a coleção em condições de uso para outras finalidades, como, por exemplo, estudos moleculares. o desenvolvimento de técnicas específicas para realizar tais cultivos, com posterior aplicação em trabalhos mais aprofundados de taxonomia.

O material utilizado neste trabalho foi proveniente de etapa anterior, onde foram coletadas amostras de cianoprocariotos que cresciam em região de floresta ombrófila densa do litoral paulista. As massas de cianoprocariotos visíveis foram coletadas aleatoriamente nas áreas escolhidas, com auxílio de espátula ou canivete e, preferencialmente, foram mantidas secas. Neste estado, muitas amostras mantêm-se vivas em estado de imobilidade metabólica, mas retornam a suas atividades assim que rehidratadas. Os espécimes coletados foram cultivados em meio BG11 desprovido de nitrogênio e/ou meio Básico de Bold com a finalidade de obtenção de culturas unialgais. Os inóculos foram inicialmente submetidos a temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e irradiância ($80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) constantes, sob regime de luz de 14 horas/claro:10 horas/escuro. Outras variações destas condições foram utilizadas procurando-se pelas condições de crescimento mais adequadas aos diferentes táxons. Foram também testados meios de cultura líquido e sólido (adição de agar) para o crescimento dos cianoprocariotos aerofíticos e observados aqueles que produziram os melhores resultados. Os inóculos iniciais foram feitos a partir de material reidratado durante 24 horas em placas de Petri contendo apenas água destilada e mantidas em condição ambiente. Depois de hidratado, os materiais foram separados inicialmente sob microscópio estereoscópico, com auxílio de pinças e estiletes, e o(s) táxon(s) de interesse isolado(s). Neste passo foi importante uma separação cuidadosa para minimizar possíveis contaminações, desde as primeiras etapas do processo. Depois de separados, os espécimes (filamentos) triados foram lavados repetidas vezes em água destilada e colocados em tubos com tampa de rosca, devidamente esterilizados, com 1/3 de seu volume ocupado com água destilada. Depois de fechado e com os filamentos em seu interior, o tubo foi vigorosamente agitado, ainda com o intuito de se retirar possíveis contaminantes. Em seguida, o material limpo foi observado em microscópio (montado em lâminas e lamínulas esterilizadas) previamente ao inóculo ou ser inoculado diretamente. Esta etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar, com a utilização de bico de Bunsen para a esterilização de todo o material usado no procedimento.

Foram realizados cultivos de 10 diferentes cepas de cianoprocariotos da ordem Nostocales (*Scytonema* cf. *guyanense* Bornet et Flahault (três localidades), *S. hofmanii* West & West, *S. millei* Bornet, *Scytonema* cf. *mirabile* (Dillwyn) Bornet, *Scytonema myochrous* Agardh ex Bornet et Flahault, *S. pseudopunctatum* Skuja, *S. punctatum* Gardner e *Petalonema velutinum* (Rabenhorst) Migula). Foi procedida a catalogação das amostras em cultivo e foram feitas anotações periódicas de informações importantes para o histórico da cepa. Inicialmente, foram descritas as condições originais do material (aspecto macroscópico e microscópico) e todos os eventos posteriores (repicagens, data da purificação,

trocas de meio, etc.) e alterações nas características das algas foram anotadas para fornecer subsídios para estudos taxonômicos. Todos os táxons têm sido tratados sob o sistema de classificação proposto por KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989), para a ordem Nostocales.

Em geral, vários cultivos, sob as condições descritas acima, além de conterem muitos contaminantes, morreram antes mesmo de apresentarem um crescimento, enquanto outros apresentaram um aumento muito pequeno da biomassa. Para as primeiras tentativas de cultivo e purificação foram utilizados dois diferentes meios de cultura (BG-11 e Bold) nas formas sólida (com agar) e líquida, pois há diferenças na composição específica de nutrientes que podem favorecer ou desfavorecer a diferentes espécies. Para a produção dos meios BG-11 e Bold foram utilizadas as formulações de acordo com RIPPKA (1979) e de BOLD (1970), respectivamente. Em todos os casos, utilizamos o meio BG-11 desprovido de nitrogênio (BG-11₀), ou seja, sem a adição de NaNO₃ para o cultivo das Nostocales, principalmente nos estágios iniciais de cultivo das cepas. Como os organismos a serem cultivados são providos de heterocitos, acreditamos inicialmente que a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico pudesse ser uma característica vantajosa para estas algas em meio pobre no nutriente, resultando em um melhor desenvolvimento das cepas e conseqüente maior facilidade no isolamento inicial. Entretanto, nem sempre esta premissa foi realmente constatada em nossos cultivos, onde freqüentemente observamos a presença de contaminantes de diversos grupos de cianoprocariotos, em especial de membros de Oscillatoriales. De acordo com nossa teoria, tal supressão de nitrogênio combinado deveria ter limitado o desenvolvimento de contaminantes, o que, em regra, não aconteceu. Em geral, vários de nossos cultivos, sob as condições descritas acima, além de conterem muitos contaminantes, morreram antes mesmo de apresentarem um crescimento, enquanto outros apresentaram um aumento muito pequeno da biomassa. Diante desses problemas, fomos alterando as condições procurando achar o melhor ambiente para o desenvolvimento, crescimento e purificação das algas.

Como mudança inicial, alteramos a temperatura de 23°C para 25°C, tentando aproximar ao máximo as condições de cultivo as condições do campo (habitat natural). Logo após alteramos a irradiância de 80 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para 45 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Concomitantemente, em função dos resultados observados em condição de ausência de nitrogênio combinado, decidimos variar as concentrações de nitrato no meio. Deste modo, além de meios sem nitrogênio, também foram produzidos meios com 25% e 50% da concentração total de nitrogênio combinado prevista na formulação original do meio.

Tratando de Nostocales, não constatamos diferenças na quantidade de contaminantes utilizando-se de meios desprovidos de nitrogênio e com concentrações até 50%. Com as alterações, mudanças satisfatórias foram observadas, mas as condições ótimas de cultivo ainda não foram encontradas e novos testes continuam a ser feitos. Contaminações ainda são freqüentes, mas com diversos plaqueamentos culturas puras (*Scytonema myochrous* e *Scytonema guyanense*) já foram obtidas, enquanto outras apresentam nível de contaminação cada vez menor. Outras já estão isoladas e estão compondo nosso banco de culturas. Algumas das cepas de cianobactérias cujos cultivos foram tentados, como *Petalonema*, por exemplo, não responderam com nenhum crescimento. Nestas situações testes adicionais de cultivo são necessários, procurando-se encontrar a combinação de condições adequadas para o desenvolvimento dos organismos. Nota-se que o processo de isolamento é bastante trabalhoso e difícil entre os cianoprocariotos e, em especial, para organismos que crescem em ambientes aerofíticos. As principais complicações são conseqüência 1. do tamanho reduzido dos organismos, 2. da exigência de condições ambientais específicas para o desenvolvimento adequado, 3. do crescimento relativamente lento e, principalmente, 4. da grande quantidade de organismos que vivem epifiticamente sobre estas Nostocales, que têm requisições similares e que são de difícil remoção dos cultivos. Desta maneira, o trabalho em questão está ainda em andamento e o aprimoramento das técnicas vem ocorrendo de maneira satisfatória. Nossa expectativa é que, mesmo diante das muitas dificuldades, o trabalho alcance os objetivos inicialmente propostos e que esta atividade possa viabilizar estudos mais aprofundados sobre as Nostocales de ambientes aerofíticos brasileiros.

Referências Bibliográficas

Bolsa: CNPq/PIBIC

BOLD, H.C. Some aspects of the taxonomy of soil algae. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 175, n. 2, p. 601-616, 1970.

FLETCHER, J.E.; MARTIN, W.P. Some effects of algae and molds in the rain-crust of desert soils. **Ecology**, Washington, v. 29, p. 95-100, 1948.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/ Algological Studies**, Stuttgart, v. 56, p. 247-345, 1989.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 111, p. 1-16, 1979.

STEIN, J. (ed.) **Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University Press., 1973, 448p.