



## Parasita fúngico de cianobactérias isolado de uma albufeira portuguesa: possíveis implicações no controlo de florescências

Catarina Churro, Paulo Pereira

catarina.churro@insa.min-saude.pt

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

### Introdução

Os parasitas fúngicos zoospóricos são ubíquos nos sistemas aquáticos e a infeção de fitoplâncton por estes fungos é um fenómeno comum em águas doces. Os fungos parasitas de fitoplâncton pertencem principalmente ao filo Chytridiomycota (quitrídeos) e distinguem-se de outros fungos por produzirem zoósporos flagelados, o que lhes confere mobilidade e particular adaptação ao meio aquático (1-3). Os quitrídeos são parasitas obrigatórios dependentes do seu hospedeiro para a sua nutrição e desenvolvimento, pelo que após a infeção, as células hospedeiras ficam irreversivelmente danificadas, o que se traduz na morte do organismo infetado (1).

Estes fungos parasitas podem infetar vários tipos de fitoplâncton incluindo espécies de cianobactérias formadoras de florescências (1). Algumas destas florescências são tóxicas para o Homem e daí o impacto que estes fungos podem ter na saúde humana (4). Apesar da sua importância ser reconhecida, existe pouca informação sobre o efeito destas infeções na ocorrência, periodicidade e toxicidade das florescências cianobacterianas. A falta de informação deve-se, em parte, ao facto de a ocorrência destas infeções poder passar despercebida, mas é sobretudo a dificuldade de cultivar estes organismos e de obter culturas puras que impede o estudo aprofundado destas interações (2, 3). Alguns quitrídeos já foram isolados com sucesso (2, 10) mas ainda assim são considerados na sua maioria como um grupo de fungos não cultiváveis.

O desafio no cultivo destes organismos prende-se com o facto de serem parasitas obrigatórios, pelo que têm de ser co-cultivados com o seu hospedeiro sendo imprescindível manter o parasita e o hospedeiro simultaneamente saudáveis.

### Objetivo

Neste estudo descrevemos o isolamento e manutenção em cultura monoclonal de um parasita quitrídeo recolhido de uma florescência da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.

### Material e métodos

Em junho de 2014 foi observada uma infeção fúngica em células de *P. agardhii* em duas amostras provenientes de uma albufeira com uma florescência. Uma pequena quantidade (1mL) de cada amostra foi transferida para culturas puras de *P. agardhii*-Imecya230 isolado da mesma albufeira em maio de 2007 e mantido na coleção de algas Estela Sousa e Silva no Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

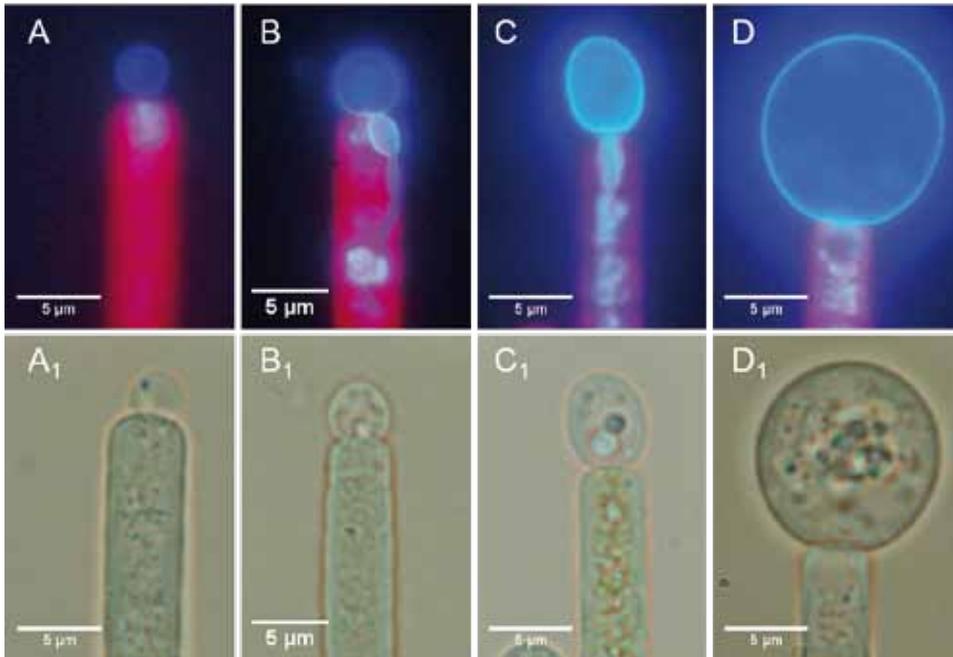
As culturas foram examinadas diariamente para observação da propagação da infeção. Ao fim de sete dias foi isolado, com uma pipeta capilar, um único filamento de *P. agardhii* infetado com apenas um esporângio. Este filamento infectado foi transferido para uma nova cultura pura de *P. agardhii*-Imecya230 para se obter culturas monoclonais deste fungo. As culturas inoculadas com o par parasita-hospedeiro foram mantidas a uma temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , com uma intensidade de luz de  $20 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e um ciclo de 14 h de luz e 10 h de escuro.

### Resultados

Duas culturas monoclonais de fungos quitrídeos foram obtidas com sucesso. De acordo com a descrição morfológica de Letcher e Powell (2012) (12) os quitrídeos isolados pertencem à ordem Rhizophydiales espécie *Rhizophyidium megarrhizum* já descrita como parasita da cianobactéria *P. agardhii*.

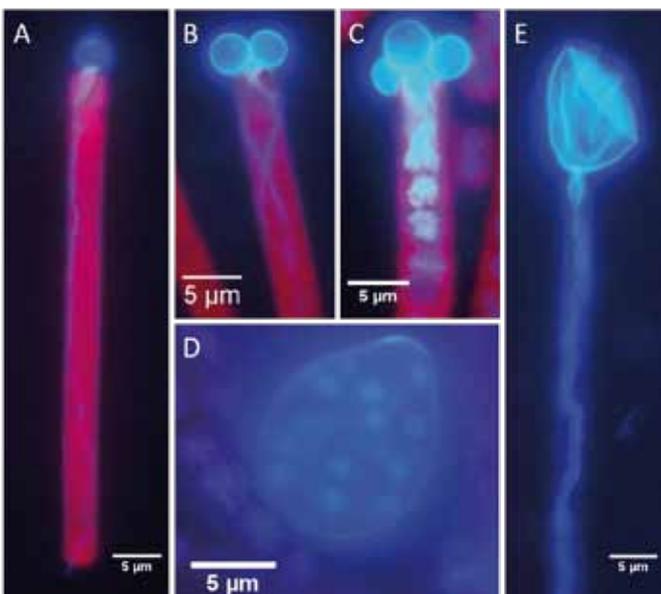
O processo infeccioso está representado na figura 1: os zoósporos ligam-se ao filamento de *P. agardhii* (figura 1A) e desenvolvem os seus rizóides no interior das células penetrando ao longo do

Figura 1: Desenvolvimento do esporângio do parasita *Rhizophydium megarrhizum* em filamentos da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.



(A e A<sub>1</sub>) zoósporo recentemente ligado ao filamento e início da formação do rizóide; (B e B<sub>1</sub>) início da expansão do esporângio e do rizóide que parasita o filamento; (C e C<sub>1</sub>) esporângio em expansão já com o rizóide intracelular bem desenvolvido; (D e D<sub>1</sub>) esporângio maduro; (A-D) imagens de microscopia de fluorescência sob luz UV que evidenciam a parede quitinosa do esporângio e dos rizóides corados com calcofluor; a cianobactéria é visível através da autofluorescência vermelha; (A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>) imagens de microscopia óptica de campo claro. Ampliação 1000x, escala de 5 µm.

Figura 2: Parasitismo do fungo quitrídeo *Rhizophydium megarrhizum* em filamentos da cianobactéria *Planktothrix agardhii*.



filamento (figura 1B-D), o esporângio é formado no exterior no qual são produzidos e libertados novos zoósporos (figura 2D). A ligação é feita sempre pelo topo do filamento e os rizóides perfuram todo o filamento (figura 2A), mesmo que o filamento seja longo, podendo os rizóides atingir 140 µm. O mesmo filamento pode ser infetado por vários zoósporos, tendo sido observados até quatro esporângios por filamento (figura 2B,C). A infeção resulta na morte da cianobactéria (figura 2E).

(A) filamento infetado em toda a sua extensão; (B) filamento infetado com dois esporângios; (C) filamento infetado com três esporângios; (D) esporângio maduro com zoósporos no seu interior; (E) esporângio vazio e rizóide num filamento já morto. Imagens de microscopia de fluorescência sob luz UV; a parede quitinosa do fungo foi corada com calcofluor emitindo fluorescência azul; a cianobactéria é visível através da autofluorescência vermelha; os zoósporos foram corados com NucBlue® emitindo fluorescência verde. Ampliação 1000x, escala de 5 µm.

## \_Discussão

As culturas de *R. megarrhizum* obtidas são provenientes de uma albufeira que é monitorizada relativamente à presença de cianobactérias e toxinas associadas no laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do INSA desde 2003. Esta albufeira tem uma florescência persistente de *P. agardhii* associada à presença de hepatotoxinas (microcistinas) desde 2006. Os isolamentos do fungo parasita foram efetuados em duas amostras colhidas durante o mês de junho de 2014 (dia 4 e 12). As amostras continham uma grande densidade de *P. agardhii* (14.14762 e 22.50476 céls.mL<sup>-1</sup> respetivamente) assim como uma elevada concentração de microcistinas (40,05 e 39,32 µg.L<sup>-1</sup> respetivamente). Um mês depois, a 23 de julho de 2014, registou-se a concentração de microcistinas mais elevada (134,60 µg.L<sup>-1</sup>) para esta albufeira desde o início da sua monitorização em 2003. Em junho de 2014 foi a primeira vez que foi observada a infeção fúngica da cianobactéria *P. agardhii* nesta albufeira. Desconhece-se se nesta albufeira as infeções fúngicas de *P. agardhii* já decorrem há algum tempo ou se surgiram agora, assim como, é desconhecida a sua influência na população da cianobactéria *P. agardhii*.

Estudos recentes em parasitismo quitridico em *P. agardhii* indicam que a infeção pode ser dependente do tipo de oligopéptidos produzidos e que a produção de microviridinas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas e microcistinas pode prevenir a infeção de *P. agardhii* (10, 11). Os zoósporos encontram o seu hospedeiro por meio de quimiotaxia (13) pelo que os compostos produzidos pelas cianobactérias podem de facto ser importantes na escolha do hospedeiro pelo fungo. Os resultados destes estudos indicam que a infeção pode exercer uma forte pressão seletiva sobre a população e resultar em subdivisão da mesma (10, 11). As florescências cianobacterianas são frequentemente compostas por estirpes produtoras e não produtoras de toxinas, dentro de uma mesma espécie, que competem pelos mesmos recursos. Assim, coloca-se a hipótese de que o facto de as estirpes serem produtoras de microcistinas impede a infeção pelo fungo, pode causar um desequilíbrio na densidade de estirpes tóxicas e não tóxicas podendo conduzir a uma toxicidade mais elevada das florescências. Outro fator ainda pouco estudado é se a presença destes fungos parasitas estimulará as estirpes a produzir maior quanti-

dade de toxina. Do ponto de vista da saúde pública, sendo a albufeira em estudo usada para produção de água para consumo humano, é importante perceber a influência da infeção fúngica na frequência, densidade e toxicidade das florescências da cianobactéria *P. agardhii*.

## \_Conclusões

As culturas de *R. megarrhizum* obtidas vão possibilitar a realização de trabalho experimental como por exemplo acesso ao ADN fúngico para estudos moleculares e o estudo de diversos fatores envolvidos neste parasitismo. Estes estudos laboratoriais permitirão compreender a influência destes parasitas na população de *P. agardhii* e perceber se a sua presença possibilita o aparecimento de florescências mais tóxicas com um elevado risco para a saúde humana.

### Referências bibliográficas:

- (1) Gerphagnon M, Latour D, Colombet J, et al. Fungal parasitism: life cycle, dynamics and impact on cyanobacterial blooms. *PLoS One*. 2013;8(4):e60894. [LINK](#)
- (2) Kagami M, Bruin A, Ibelings B, et al. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia*. 2007;578(1):113-29.
- (3) Marano AV, Gleason FH, Bärlocher F, et al. Quantitative methods for the analysis of zoospore fungi. *J Microbiol Methods*. 2012;89(1):22-32.
- (4) Chorus I, Bartram. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Geneva: World Health Organization, 1999. [LINK](#)
- (5) Sime-Ngando T. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. *Front Microbiol*. 2012;3:361. [LINK](#)
- (6) Gachon CM, Sime-Ngando T, Strittmatter M, et al. Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci*. 2010;15(11):633-40.
- (7) Grami B, Rasconi S, Niquil N, et al. Functional effects of parasites on food web properties during the spring diatom bloom in Lake Pavin: a linear inverse modeling analysis. *PLoS One*. 2011;6(8):e23273. [LINK](#)
- (8) Kagami M, Miki T, Takimoto G. Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Front Microbiol*. 2014;5:166. [LINK](#)
- (9) Rasconi S, Grami B, Niquil N, et al. Parasitic chytrids sustain zooplankton growth during inedible algal bloom. *Front Microbiol*. 2014;5:229. [LINK](#)
- (10) Sønstebo JH, Rohrlack T. Possible implications of chytrid parasitism for population subdivision in freshwater cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(4):1344-51. Epub 2010 Dec 17. [LINK](#)
- (11) Rohrlack T, Christiansen G, Kurmayer R. Putative antiparasite defensive system involving ribosomal and nonribosomal oligopeptides in cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(8):2642-7. [LINK](#)
- (12) Letcher PM, Powell MJ. A taxonomic summary and revision of Rhizophyidium (Rhizophydiales, Chytridiomycota). Tuscaloosa, AL : University Printing, The University of Alabama, 2012. (Zoospore Research Institute; 1)
- (13) Gleason H, Lilje O. Structure and function of fungal zoospores: ecological implications. *Fungal Ecology*. 2009;2(2):53-9.