

DETERMINAÇÃO DE TOXICIDADE DE CIANOBACTERIAS DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA DO AÇUDE SÍTIOS NOVOS, CAUCAIA- CE

Ismael Keslley Carloto Lopes ^{1*} & José Capelo Neto² & Ana Zélia Abreu³

Resumo – A principal fonte de água para abastecimento humano no nordeste brasileiro tem sido os reservatórios artificiais de superfície, açudes. Devido a aspectos climáticos e de uso e ocupação das bacias hidrográficas, muitos desses reservatórios têm apresentado um crescimento exacerbado de cianobactérias. O presente artigo visa identificar cianobactérias tóxicas na comunidade fitoplanctônica de manancial de abastecimento público – Açude Sítios Novos, Caucaia-Ce. Monitorou-se a composição da comunidade fitoplanctônica do reservatório. Realizou-se, também, o isolamento e cultivo de cianobactérias potencialmente tóxicas para posteriormente analisar os extratos das cepas e identificar sua toxicidade. Devido ao destaque dos táxons *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Planktothrix agardhii*, decidiu-se isolá-las. O isolamento se deu por pesca. Para testar a toxicidade, utilizou-se o teste ELISA e o bioensaio em camundongos. Todos os organismos-teste morreram com sintomas de agitação motora, e os extratos das cepas isoladas indicaram presença das neurotoxinas do tipo saxitoxina, através do teste ELISA.

Palavras-Chave – Reservatórios, Cianotoxinas, Cianobactérias, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*.

DETERMINATION OF CYANOBACTERIAL TOXICITY IN SÍTIOS NOVOS RESERVOIR PHYTOPLANKTON, CAUCAIA-CE.

Abstract – The main source of human water supply, in Brazilian northeast, has been artificial surface reservoirs, weirs. Due to climatic aspects, the use and occupation of the watershed, many of these reservoirs have submitted an overgrowth of cyanobacteria. This article aims to identify toxic cyanobacteria in the phytoplankton community of a public water supply source – Sítios Novos Dam, CAUCAIA-Ce. We monitored the composition of the phytoplankton community of the reservoir. Held also the isolation and cultivation of potentially toxic cyanobacteria to subsequently analyze the strains extracts and identify toxicity. Due to the prominence of taxa *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*, it was decided to isolate them. The isolation was made for fishing. To test the toxicity, we used ELISA and bioassay in mice. All test organisms died with symptoms of agitation, and the extracts of the strains indicated the presence of neurotoxins (saxitoxins), using the ELISA test.

Keywords – No mínimo duas e no máximo três.

1. INTRODUÇÃO

No semi-árido brasileiro, devido às características climáticas, ao regime irregular de chuvas e às características do solo, a principal fonte de água para abastecimento humano tem sido os reservatórios artificiais de superfície, açudes. A ocupação e exploração desordenada dos recursos naturais nas bacia hidrográficas, além da alta evaporação e da radiação solar, interferem negativamente na qualidade da água armazenada. Como consequência, esses reservatórios

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Hidráulica, carlotolopes@gmail.com

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Hidráulica, capelo@ufc.br

³ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Hidráulica, anazeliabreup@gmail.com

apresentam um processo de eutrofização acelerado, levando frequentemente a florações de fitoplânctons, comunidade esta predominantemente dominada por Cianobactérias (Barros, 2013). Esses microrganismos têm a capacidade de produzir toxinas, porém o motivo dessa produção ainda é questão de debate entre os especialistas. Alguns apontam como motivo, a proteção contra a herbivoria (CAMACHO & THATCKER, 2006; PAUL *et al*, 2001), já outros identificar a alelopatia como motivo desta produção (PFLUGMACHER, 2002; OLIVEIRA, 2012), indicando que esses organismos produzem as toxinas para competirem por recursos.

Essas cianotoxinas estão predominantemente no meio intracelular, porém podem ser encontradas dissolvidas no meio líquido, após a lise celular (LAWTON *et al.*, 1994). Por isso, os órgãos de saúde pública apresentam grandes preocupações em relação a presença desses compostos em água de abastecimento humano. No Brasil, o Ministério da Saúde, desde o episódio da morte de pacientes de em tratamento renal (AZEVEDO *et al*, 2002), tem desenvolvido legislações que contemplam padrões de potabilidade de cianotoxinas. Atualmente a Portaria MS 2914 de 2011, estabelece limite máximo de concentração para as microcistinas e saxitoxinas em água para o consumo humano, $1\mu\text{g.L}^{-1}$ e $3\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Em virtude disso, é de fundamental importância monitorar a comunidade fitoplanctônica dos reservatórios e investigar a toxicidade destes organismos. O presente trabalho objetivou estudar a comunidade fitoplanctônica em reservatório eutrofizado, localizado no semi-árido brasileiro de usos múltiplos, identificar e isolar cepas de cianobactérias produtoras de toxinas e identificar as cianotoxinas produzidas por estes organismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar cianobactérias tóxicas na comunidade fitoplanctônica de manancial de abastecimento público – caso do açude Sítios Novos, município de Caucaia-Ce.

2.2. Objetivos específicos

- Monitorar a composição da comunidade fitoplanctônica do reservatório.
- Isolar e cultivar cianobactérias potencialmente tóxicas identificadas.
- Realizar análises dos extratos das cepas isoladas para identificar sua toxicidade

3. METODOLOGIA

3.1. Técnica e período de amostragem, acondicionamento e transporte de amostras

Foram coletadas amostras, quinzenalmente, entre janeiro de 2010 e junho de 2011, no ponto de captação da estação de tratamento de água a 30 cm de profundidade. Para a análise quantitativa foram coletados 1000mL de água bruta em frascos de vidro âmbar, contendo 5mL de lugol acético, para a fixação *in loco*. Posteriormente as amostras foram conservadas em isopor contendo gelo e encaminhadas para o laboratório, onde ficaram protegidas da luz até o processamento.

3.2. Análise quantitativa

Apesar de não ter sido realizada especificamente uma análise qualitativa, para o processo de contagem, precisou-se fazer uma identificação dos táxons quantificados. A densidade celular foi estimada utilizando câmara de sedgewick-rafter e microscópio ótico invertido, calibrado conforme APHA *et al* (2005) e CETESB (1978). As contagens foram feitas por faixas ou campos, segundo a

distribuição de Poisson, da qual foi obtida distribuição com intervalo de confiança de 95% ± 20%. Os resultados foram expressos em organismos/mL (org/mL) e células/mL (cél/mL). Antes da análise, as amostras foram concentradas por sedimentação em proveta de 1000mL, durante 24 horas, conforme JARDIM (1999).

3.3. Isolamento e cultivo de cianobactérias

As cepas foram isoladas utilizando microscópio ótico (100X), lâmina escavada, com o auxílio de capilar de vidro. O capilar de vidro foi obtido através do aquecimento de uma pipeta de Pasteur de vidro em chama de bico de Bunsen, e quando a parte aquecida alcançou a temperatura de fusão, promoveu-se uma extensão. Posteriormente quebrou-se cuidadosamente uma parte da região alongada, para evitar grandes imperfeições na ponta da pipeta, podendo danificar a células que se deseja isolar. Para inibir o crescimento de eucariontes nos cultivos, adicionou-se ciclohexamida, em concentração final de 70µg/mL, no meio de cultivo (ASM-1, pH= 8) onde foram depositadas as células apreendidas pelo capilar. O processo foi repetido até que se tivesse um cultivo uniespecífico.

3.4. Bioensaio em camundongos e teste ELISA.

Para as espécies isoladas, foram realizados os dois tipo de ensaios para identificação das toxinas. Os bioensaios em camundongos foram realizados em machos da espécie Swiss pesando entre 28 e 35g. O extrato da espécie isolada era injetado intraperitonealmente. Para cada espécie de cianobactéria foram utilizados 3 organismos. Com a identificação da toxicidade via bioensaio, realizou-se, a partir do mesmo extrato, determinação da cianotoxina através do método de imunoensaio enzimático ELISA específico, utilizando kit de microplacas da marca Abraxis®.

4. RESULTADOS

4.1. Análise Quantitativa

Ao longo de todo o período de amostragem (janeiro de 2010 a junho de 2011), foram identificados 41 táxons fitoplanctônicos, sendo 19 táxons de cianobactérias (46% dos organismos presentes) (Fig X), e 22 táxons de algas divididas em 5 classes, sendo essas *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae*, *Cryptophyceae*, *Euglenophyceae* e *Zignemaphyceae*. A classe mais representativa, entre as algas foram *Chlorophyceae* (32% de algas), seguida de *Bacillariophyceae* (10% de algas). Dentre as algas *Chlorophyceae*, destacaram-se *Monoraphidium contortum* e *Scenedesmus sp*, por estarem presentes em 21 e 24 das 45 amostragens realizadas, respectivamente (Tab. 1). Já no grupo *Bacillariophyceae*, destacou-se *Aulacoseira granula*, organismo com maior frequência de identificação, estando presente em 32 coletas.

A classe *Zignemaphyceae* apresentou somente 3 gêneros, sendo *Closterium* o mais representativo estando presente em 15 amostragens. Já as classes *Cryptophyceae* e *Euglenophyceae* foram representadas somente por um gênero, *Cryptomonas* e *Trachelomonas*, respectivamente. Ambos gêneros foram identificados em menos de 10 coletas.

Apesar da predominância das algas em função do número de táxons identificados, estas representaram menos de 10% dos organismos quantificados com exceção de 1 amostragem (11 de fevereiro de 2011), na qual o grupo compôs 30% da comunidade fitoplanctônica. O período de maiores concentrações de algas foi o primeiro bimestre de 2011, período com maior índice pluviométrico, apresentando uma média de 2807cél.mL⁻¹.

Percebeu-se uma maior continuidade da presença do grupo de cianobactérias durante o período em estudo, estando presente em todas as amostragens realizadas. As espécies

Cylindrospermopsis catemaco, *Cylindrospermopsis raciborskii* (CR), *Geitlerinema sp*, *Merismopedia sp* e *Planktothrix agardhii* (PA) destacaram-se por estarem presentes em 30, 31, 26, 28 e 32, respectivamente, das amostragens realizadas.

A abundância de PA ao longo de todo o período de amostragem variou de 0 a 5.83×10^5 cells.mL⁻¹, o que representou 94% da abundância total do fitoplâncton. A densidade média da PA foi 7.54.104 cells.mL⁻¹. A abundância CR no mesmo período variou de 0 a 3.32×10^4 cel.mL⁻¹, representando 18,9% do total da comunidade fitoplanctônica. A abundância média de CR foi 8.21.103 cel.mL⁻¹.

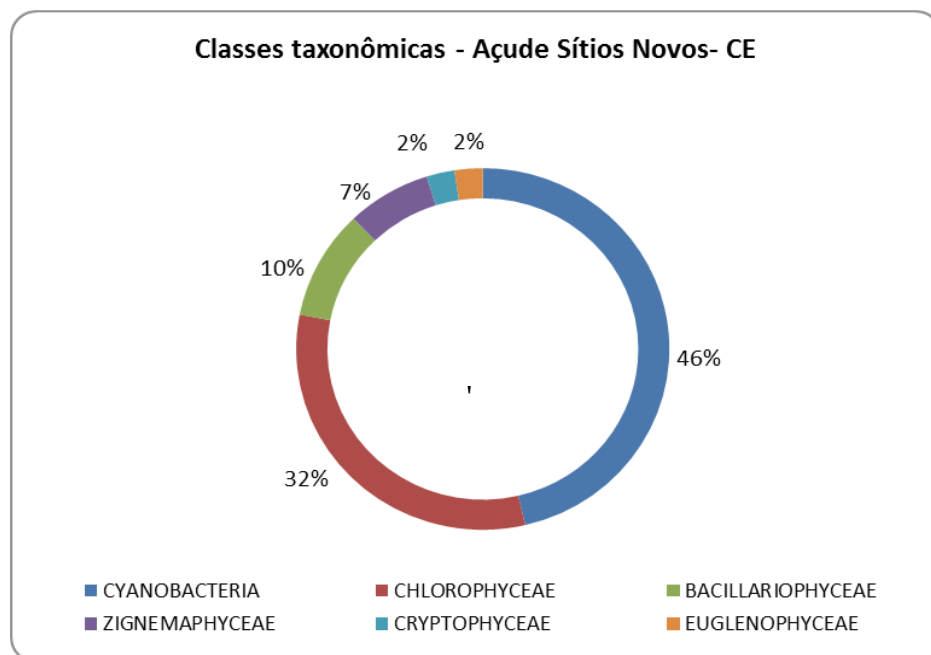


Figura 1 - Representação da divisão taxonômica dos organismos identificados durante o período de amostragem.

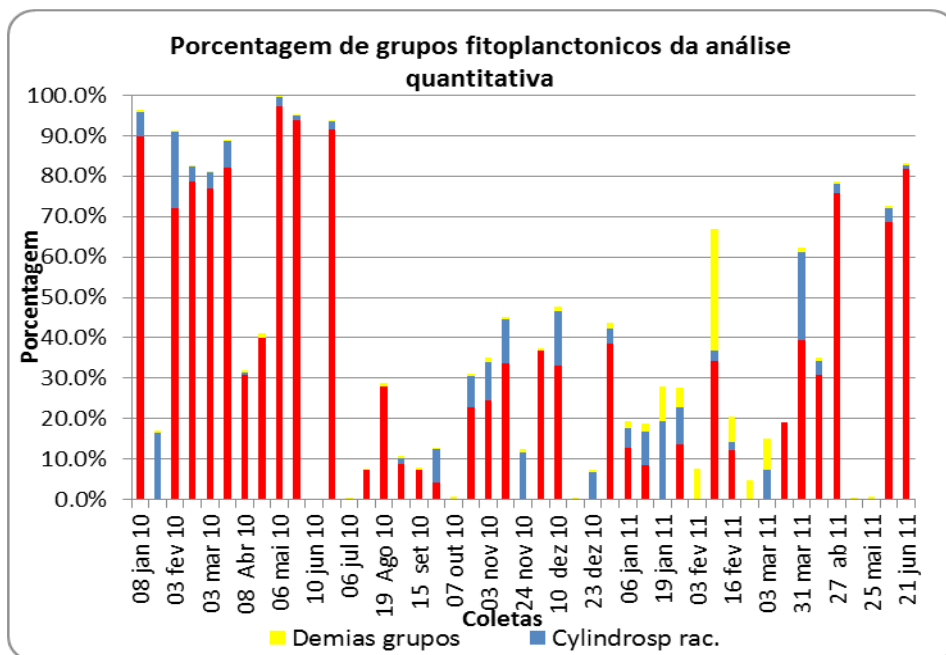


Figura 2: Porcentagem de grupos fitoplanctônicos quantificados durante o período de amostragem.

É válido salientar que, os dados da contagem e identificação de fitoplanctons aliados à intensa atividade de aquicultura no reservatório, mostram que o açude pode estar sofrendo aporte de nutrientes acima de sua capacidade suporte. Segundo Azevedo (1998), o aumento no número de cianobactérias concomitante com a diminuição da diversidade fitoplanctônica, são um bom indicativo da elevação do estado de eutrofização do manancial. De acordo Santos (2009) isso se dá pelas vantagens adaptativas deste grupo em relação aos outros grupos fitoplanctônicos, o que lhes possibilitam dominância do ambiente aquático e conseqüentemente a aparição de florações.

4.2. Isolamento de cianobactérias

Devido a predominância dos táxons *Cylindrospermopsis raciborskii* (CR) e *Planktothrix agardhii* (PA), e seus potenciais de produção de toxinas (HAWKINS *et al*, 1997; FALCONER *et al*, 1999; WILLIAMS, 2001; HISBERGUES *et al*, 2003; KOSOL, 2009; MANGANELLI *et al*, 2010), decidiu-se desenvolver o procedimento de isolamento para estas espécies. Obteve-se êxito neste intento para ambas as espécies, sendo necessárias duas repetições da metodologia de “pescaria” para o isolamento das cepas uniespecíficas seguida da aplicação de ciclohexamida para eliminação de organismos eucariontes. As cepas de CR e PA foram nomeadas respectivamente pelas siglas IRA 02 e IRA 07. A metodologia de isolamento através de placas não obteve o mesmo sucesso.

4.3. Bioensaio em camundongos e ELISA

Todos os organismos-teste morreram com sintomas de agitação motora com características epileptiformes, o que indica intoxicação por neurotoxinas. Os extratos das cepas isoladas indicaram presença das neurotoxinas do tipo saxitoxina, através do teste ELISA.

5. CONCLUSÕES

Observou-se a presença de 6 classes de organismos fitoplanctônicos no reservatório Sítios Novos, destacando-se o grupos Cyanobacteria e Chlorophyceae, sendo este último o que mais apresentou organismos identificados. Apesar dessa diversidade de classes, a comunidade foi caracterizada por uma dominância de cianobactérias filamentosas, mais especificamente PA e CR. Isso sugere um desequilíbrio ambiental no ecossistema aquático, levando as cianobactérias a dominarem o ambiente. A situação torna-se mais crítica devido ao fato de se ter constatado a toxicidade (saxitoxinas) das cepas isoladas, que em caso de uma eventual floração, poderá colocar em risco a saúde da população que direta ou indiretamente é beneficiada dos usos do reservatório.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, S. M. F. O. (1998). Cianobactérias tóxicas: causas e conseqüências para saúde pública. *Revista Virtual de Medicina*. Volume 1. Número 3. Ano I.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. (2002). Human Intoxication By Microcystins During Renal Dialysis Treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 661, pp. 441–46, 2002.

CAMACHO, F. A.; THACKER, R. W. (2006). Amphipod herbivory on the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei*: chemical stimulants and morphological defenses. *Limnology*

and *Oceanography*, 51, pp. 1870-1875.

CETESB, NT 06: L5.303. (1978). *Determinação da fitoplâncton de água doce – métodos qualitativos e quantitativos*. São Paulo.

HAWKINS, P.R.; CHANDRASENA, N.R.; JONES, G.J.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.A. (1997). Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35, pp.314-346.

JARDIM, F.A. (1999). Implantação e realização de análises de cianotoxinas com avaliação do potencial tóxico em estações de tratamento da COPASA, MG (*Dissertação*). Belo Horizonte (MG); UFMG.

KOSOL, S.; SCHMIDT, J.; KURMAYER, R. (2009) Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Eur. J. Phycol.* 44, pp.49–62.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. (1994). Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119, pp.1525-1530.

MANGANELLI, M.; SCARDALA, S.; STEFANELLI, M.; VICHI, S.; MATTEI, D.; BOGIALLI, S.; CECCARELLI, P.; CORRADETTI, E.; PETRUCCI, I.; GEMMA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. (2010) Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: an integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Res.* 44, pp.1297–1306.

OLIVEIRA. (2012). Efeitos alelopáticos de microcistinas sobre o crescimento de duas linhagens de microalgas verdes (Chlorococcales, Chlorophyta) em condições controladas. *Dissertação (Mestrado em Botânica)*. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

PAUL, V.J.; CRUZ-RIVERA, E.; THACKER, R.W. Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. *Marine Chemical Ecology, McClintock JB & Baker BJ*, pp. 227-265, 2001.

PFLUGMACHER, S. (2002) Possible Allelopathic Effects of Cyanotoxins, with Reference to Microcystin-LR, in Aquatic Ecosystems. *Wiley Periodicals, Inc. Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, AG: Detoxication/Metabolism, Muggelseedamm 301*, p. 12561 Berlin, Germany.

SANTOS, P.V. (2009) Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implicações no crescimento de cultura e produção de microcistinas. *Dissertação (Hidráulica e Saneamento)*, Escola de Engenharia de São Carlos- Universidade de São Paulo.

WILLIAMS, C.D.; BURNS, J.; CHAPMAN, A.; FLEWELLING, L.; PAWLOWICZ, M.; CARMICHAEL, W.W. (2001) Assessment of Cyanotoxins in Florida's Lakes, Reservoirs, and Rivers. Palatka, FL: *St. Johns River Water Management District*.