

Abordagem multidisciplinar na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas

Catarina Churro, Elisabete Valério

catarina.churro@insa.min-saude.pt

Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Figura 1: ↓ Florescência das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* em uma albufeira portuguesa usada para fins recreativos.



Introdução

O que são cianobactérias?

Cianobactérias são organismos procariotas fotossintéticos, e como constituintes naturais do fitoplâncton são uma componente essencial na produção primária e cadeia alimentar em ambientes de água superficiais. Contudo são também responsáveis pela eutrofização dos recursos hídricos, uma vez que algumas espécies podem desenvolver-se rapidamente e formar grandes acumulações chamadas de florescências ou *blooms* (figura 1). Este desenvolvimento anómalo afeta adversamente a qualidade das águas superficiais que são usadas para captação de água para consumo humano, atividades recreativas e agricultura (1).

Porquê a monitorização de cianobactérias?

O risco que as florescências cianobacterianas representam para a saúde humana advêm do facto destes desenvolvimentos excessivos estarem frequentemente associados à produção de cianotoxinas (quadro 1) (1). As principais vias de exposição para o homem são através de água potável contaminada, diálise, consumo de

peixe e marisco contaminado e atividades recreativas (2). A toxicidade destes compostos é elevada, como pode ser constatado no gráfico 1 em que está representada a comparação da toxicidade, com base na dose-letal (LD50%) em murganhos, entre as cianotoxinas e algumas das toxinas mais conhecidas em relação ao cianeto (3).

Métodos

Identificação e quantificação tradicional de cianobactérias

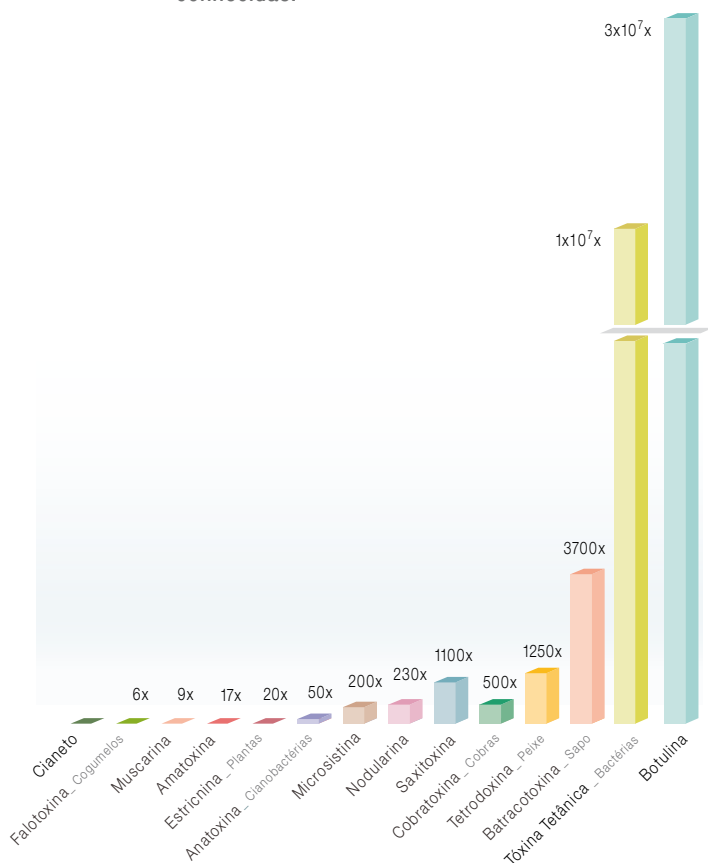
As cianobactérias são identificadas por taxonomia clássica usando microscopia ótica, com base em características morfológicas que são utilizadas para classificar as várias espécies. A quantificação celular é determinada pela contagem de células individuais em câmaras de sedimentação com volume conhecido usando o método de Utermöhl (4). Este processo é dependente do operador, sendo necessário uma pessoa com experiência e conhecimentos apro-

Quadro 1: ↓ Cianotoxinas produzidas por cianobactérias comuns nas albufeiras portuguesas.

Cianotoxina	Atividade	Cianobactéria
Hepatotoxinas		
Microcistinas	Inibição das fosfatases proteicas	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Anabaenopsis, Phormidium</i>
Cilindrospermopsina	Inibição da síntese proteica	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Anabaena, Raphidiopsis</i>
Neurotoxinas		
Anatoxina-a	Liga-se aos recetores de acetilcolina nicotínicos	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Raphidiopsis, Oscillatoria, Planktothrix, Cylindrospermum</i>
Anatoxina-a(s)	Inibe a acetilcolinesterase	<i>Aphanizomenon, Anabaena</i>
Saxitoxina	Liga-se aos canais de sódio	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Planktothrix, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>

Adaptado de Codd 2014) (3) e Merel et al. 2013 (5).

Gráfico 1: Comparação da toxicidade relativamente ao cianeto, com base na dose letal (LD50%) em murganhos, entre as cianotoxinas e algumas das toxinas mais conhecidas.



Adaptado de Metcalf e Codd 2014 (3).

fundados de taxonomia para conseguir uma correta identificação. Contudo, para algumas cianobactérias a distinção entre espécies é uma tarefa difícil mesmo para um taxonomista experiente assim como é difícil de distinguir o limite entre células, o que pode interferir com a sua estimativa.

Deteção e quantificação de cianotoxinas

A deteção e quantificação de muitas cianotoxinas (microcistinas, cilindropermopsina, anatoxina e saxitoxina) podem ser feitas através de imunoensaios-ELISA ou ensaios de ligação ao recetor-RBA. Estes ensaios detetam e quantificam através do reconhecimento e ligação a anticorpos ou recetores específicos. Estes métodos são rápidos e sensíveis contudo pode haver reações inespecíficas levando a uma sobrestimação da quantidade de toxina presente (5). A cromatografia líquida de alta eficiência-HPLC permite o estudo

aprofundado das toxinas e suas variantes. No entanto requer um extenso processamento da amostra e padrões específicos para cada toxina (3,5).

Classificação e identificação molecular de cianobactérias

A obtenção de sequências de ADN de genes envolvidos em diferentes processos celulares, como é o caso dos genes *house-keeping* rRNA 16S, *rpoC1* e *cpcB* providenciam a classificação e identificação molecular das espécies cianobacterianas. A similaridade das sequências destes genes com outras sequências presentes nas bases de dados dá uma indicação da identidade do organismo. A análise filogenética estabelece relações de proximidade e ancestralidade com base na similaridade das sequências de ADN. Recorrendo a uma análise filogenética *multilocus* destes marcadores, aumenta a resolução da identificação dos isolados de cianobactérias até à espécie. Contudo a classificação molecular requer monoculturas ou culturas puras de cianobactérias.

Deteção de genes associados à produção de toxinas

As cianotoxinas só são produzidas pelas estirpes que contêm os genes apropriados para o fazer. Já foram descobertos e sequenciados quase todos os *clusters* de genes que conferem às cianobactérias a capacidade de proceder à síntese da maior parte das cianotoxinas. A sequenciação completa destes *clusters* permitiu o desenvolvimento de sondas moleculares gerais para estirpes tóxicas das diversas toxinas e específicas para algumas espécies produtoras (6). A amplificação destes marcadores indica o potencial de produção de determinada toxina em amostras ambientais.

Quantificação por PCR em tempo-real

A quantificação do número de cópias de um determinado gene em amostras naturais é possível recorrendo à técnica de PCR em tempo-real. Várias sondas foram já desenvolvidas para a quantificação da população total de uma determinada cianobactéria usando o gene rRNA 16S, *cpcB* e *rpoC1* (6,7). Estão também disponíveis várias sondas para os genes envolvidos na produção das várias toxinas o que permite quantificar diversos génotipos e a sua proporção numa determinada amostra.

Expressão génica

A taxa de produção das cianotoxinas é também influenciada por fatores ambientais, tais como pH, nutrientes, temperatura e intensidade luminosa (8-10). Têm-se realizado vários estudos no sentido de compreender de que forma estes fatores ambientais afetam/alteram a expressão dos genes das cianobactérias, principalmente os genes dos *clusters* responsáveis pela produção de cianotoxinas.

Manutenção de culturas de cianobactérias

O isolamento e manutenção de culturas monoclonais de cianobactérias provenientes de florescências dão um apoio fundamental ao estudo e monitorização destes organismos. A existência dessas culturas permite avaliar a sua toxicidade, traçar o perfil de toxinas que produzem, obter o ADN para testar e desenvolver sondas moleculares e efetuar o estudo aprofundado da sua identificação.

_Conclusões

Desafios na monitorização de cianobactérias e multidisciplinaridade

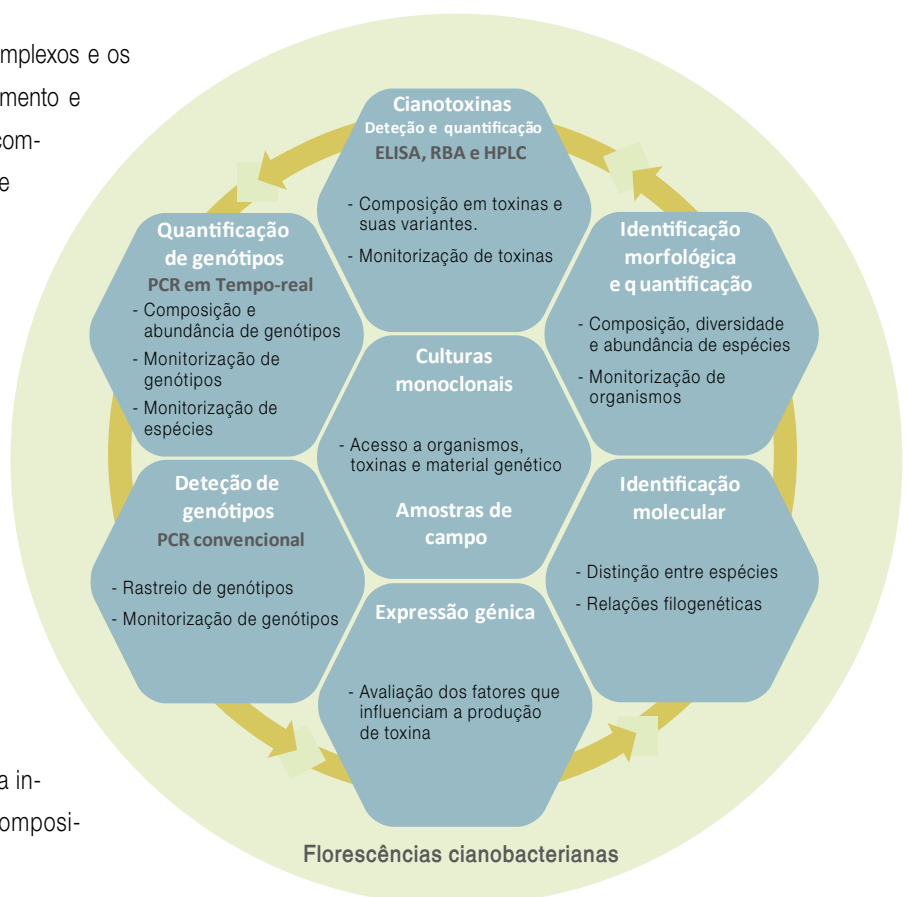
As florescências cianobacterianas são fenómenos complexos e os fatores que regulam o seu aparecimento, desenvolvimento e persistência nos sistemas aquáticos ainda não são completamente conhecidos. Compostas frequentemente por diferentes espécies produtoras e não produtoras de toxinas, acresce que dentro da mesma espécie existem estirpes tóxicas e não tóxicas. Além do mais, a regulação genética e fatores que influenciam a produção de cianotoxinas são ainda um desafio para os investigadores. Várias toxinas podem estar presentes e podem ter origem no mesmo ou em diferentes organismos. Neste contexto, é importante compreender que organismos estão presentes, averiguar se têm o potencial para produzir toxinas, que toxinas podem produzir e se estão ativamente em produção.

Todos os métodos anteriormente descritos dão uma informação diferente e pertinente para o estudo da composição das florescências cianobacterianas (figura 2).

A identificação e enumeração ao microscópio podem ser demoradas e trabalhosas mas fornece informação detalhada sobre a composição de espécies. A deteção imunológica de toxinas é um método rápido e sensível para a quantificação de toxinas na água potável antes e depois do tratamento. O imunoensaio em conjunto com a identificação e quantificação microscópica dá informação útil sobre a composição e abundância da comunidade e quantidade de toxina para as análises de rotina de amostras ambientais.

A deteção molecular de genes responsáveis pela produção de cianotoxinas informa se os organismos presentes na amostra têm ou não o potencial para a sua produção, o que se torna muito útil como ferramenta de rastreio para as várias toxinas que possam estar presentes e direcionando qual o imunoensaio que deverá ser aplicado para a deteção de uma toxina específica.

Figura 2: Multidisciplinaridade na identificação e monitorização de cianobactérias potencialmente tóxicas.





artigos breves_ n. 6

O PCR em tempo-real faculta a quantificação precisa de um determinado gene, permitindo assim obter informação sobre composição de genótipos tóxicos que aliado ao imunoensaio indica estirpes tóxicas e não tóxicas e se estão em produção ativa de toxina. Esta abordagem é também bastante útil na quantificação de espécies difíceis de identificar e contar por microscopia ótica.

Outros métodos que têm limitações para ser aplicados em rotina podem fornecer informações importantes para complementar e facilitar a monitorização. A análise aprofundada do perfil toxicológico dos isolados por HPLC, ou a identificação das espécies por análise filogenética permite saber que toxinas e que espécies podemos observar nas amostras de campo. O estudo da regulação genética da produção de cianotoxinas por PCR em tempo-real permite compreender em que condições os organismos produzem toxina, e que fatores influenciam a sua produção.

De forma a dar respostas na prevenção da exposição a cianotoxinas em saúde pública, o estudo e monitorização de cianobactérias e cianotoxinas deve recorrer às várias metodologias de uma forma multidisciplinar, em que cada uma delas se complementa e contribui com uma pequena peça do grande *puzzle* que são as florescências cianobacterianas.

Referências bibliográficas:

- (1) Chorus I, Bartram J (eds). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London; New York: E&FN Spon, behalf of UNESCO, WHO, UNEP, 1999. [LINK](#)
- (2) Codd G, Bell S, Kaya K, et al. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. Eur. J. Phycol. 1999;34(4):405-15.
- (3) Metcalf J, Codd G. Cyanobacterial toxins (cyanotoxins) in water: A review of current knowledge. United Kingdom: Foundation for Water Research, 2014. [LINK](#)
- (4) BS EN 15204:2006 - Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). London: British Standards Institution, 2006.
- (5) Merel S, Walker D, Chicana R, et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environ Int. 2013;59:303-27.
- (6) Kurmayer R, Christiansen G. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. Freshw Rev. 2009; 2:31-50. [LINK](#)
- (7) Churro C, Pereira P, Vasconcelos V, et al. Species-specific real-time PCR cell number quantification of the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. Arch Microbiol. 2012;194(9):749-57.
- (8) Sivonen, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl Environ Microbiol. 1990;56(9):2658-66. [LINK](#)
- (9) Song L, Sano T, Li R, et al. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycol. Res. 1998;46(Suppl 2): 19-23.
- (10) Wiedner C, Visser PM, Fastner J, et al. Effects of light on the Microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. Appl Environ Microbiol. 2003;69(3):1475-81. [LINK](#)