



## Tratamento de águas para consumo humano: um episódio de sobrevivência de cianobactérias

### Treatment of water for human consumption: a case of cyanobacterial survival

Carina Menezes<sup>1</sup>, Olga Martins<sup>2</sup>, Elsa Dias<sup>1</sup>

elsa.dias@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) AgdA – Águas Públicas do Alentejo, S.A.

#### \_Resumo

No verão de 2015 ocorreu um episódio de mau odor/sabor na água de abastecimento proveniente da albufeira do Roxo. Este episódio foi atribuído à presença de um *bloom* cianobacteriano que incluía espécies produtoras de compostos voláteis (geosmina, MIB). De facto, foi detetada a presença de cianobactérias na água tratada, à saída da ETA, ainda que em densidades relativamente baixas. No entanto, desconhecia-se se estes organismos mantinham a viabilidade celular e a capacidade de se desenvolver na rede de distribuição, a jusante da ETA e, desta forma, contaminar a água para consumo humano. Assim, amostras de água colhidas à saída da ETA e no Reservatório de abastecimento público foram inoculadas em meio de cultura e o crescimento celular foi seguido por microscopia ótica. Após 30 dias, verificou-se o crescimento algal, o que demonstra que algumas espécies resistiram ao tratamento na ETA e mantiveram a capacidade de se reproduzir. Curiosamente, uma dessas espécies foi o *Cylindrospermopsis raciborskii*, considerada até há pouco tempo uma espécie tropical. Irá proceder-se à caracterização molecular e toxigénica desta espécie. Atualmente está a decorrer um protocolo de colaboração entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e a AgdA, com o objetivo de se estudar a distribuição de cianobactérias, cianotoxinas e compostos voláteis na albufeira do Roxo.

#### \_Abstract

In the summer of 2015 an unpleasant odour/taste occurred in the water for human consumption supplied from Roxo Reservoir. This episode was attributed to the presence of a cyanobacterial bloom composed by species producing volatile compounds (geosmin, MIB). In fact, cyanobacteria were detected in treated water, at the exit of Water Treatment Plant (WTP), although at relatively low densities. However, it was unknown if these organisms maintained their viability and the growth capacity in the distribution network and, as such, to contaminate the drinking water. Thus, treated water samples collected at the WTP and at the water deposit were inoculated in culture medium and cell growth was followed by optical microscopy. Algal growth was observed 30 days after culturing, which shows that some species resisted the treatment in the WTP and maintained the capacity to reproduce. Interestingly, one of those species was *Cylindrospermopsis raciborskii*, considered until recently a tropical species. Molecular and toxigenic characterization of this species will be carried out. A collaboration protocol between INSA I.P. and AgdA, is currently being carried out with the aim of studying the distribution of cyanobacteria, cyanotoxins and volatile compounds in the Roxo reservoir.

#### \_Introdução

O desenvolvimento massivo de cianobactérias (florescências) em reservatórios de água doce superficial é um fenómeno muito comum em Portugal <sup>(1)</sup>. Trata-se de um problema de saúde pública, uma vez que é frequente a ocorrência de espécies produtoras de toxinas. As cianotoxinas predominantes são as microcistinas <sup>(1)</sup>, heptapéptidos cíclicos que induzem hepatotoxicidade aguda e que são potencialmente cancerígenos para o Homem <sup>(2)</sup>. Por outro lado, algumas espécies de cianobactérias produzem compostos orgânicos voláteis (COVs) que alteram as características organoléticas da água, uma vez que conferem um mau odor e sabor (a terra/mofo) à água. Na albufeira do Roxo ocorreu, no verão de 2015, um denso *bloom* cianobacteriano composto por uma grande diversidade de espécies. Inclusivamente, foi detetada a presença de algumas cianobactérias nas amostras de água tratada à saída da Estação de Tratamento (ETA). A água fornecida às populações abastecidas por essa albufeira apresentava um odor desagradável e a análise dos COVs (geosmina, MIB), foi positiva. As cianobactérias predominantes na albufeira (*Planktothrix* sp., *Aphanizomenon* sp. e *Cylindrospermopsis* sp.) estão descritas como produtoras desses compostos.

#### \_Objetivo

Foi objetivo do presente trabalho, determinar a viabilidade de cianobactérias sujeitas a processos de tratamento de água e avaliar a sua potencial capacidade de desenvolvimento massivo a jusante da ETA, podendo contaminar e alterar as características organoléticas da água distribuída à população.

## \_Materiais e métodos

Procedeu-se à colheita de amostras de 5 L à saída da ETA e no reservatório que serve a população afetada. As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), onde foram fixadas (100 mL) com uma solução de Lugol para identificação/quantificação das espécies fitoplanctónicas presentes (3). Para concentração e cultivo *in vitro* da biomassa, 100 mL de amostra foram filtrados sob vácuo ligeiro e os filtros (MF-Millipore) foram inoculados em placas de 6 poços com meio Z8 (4). Em paralelo, e porque a filtração poderia interferir com a viabilidade celular, 100 mL das amostras foram inoculados diretamente em frascos de cultura com 500 mL de meio Z8. As culturas foram mantidas em condições de temperatura e luz controladas

( $20 \pm 1$  °C;  $20 \pm 4$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; ciclo 14 h luz/10 h escuridão) e o crescimento algal foi seguido por microscopia ótica (Olympus CK 40) de forma a proceder-se ao isolamento/identificação das estirpes que se mantiveram viáveis.

## \_Resultados

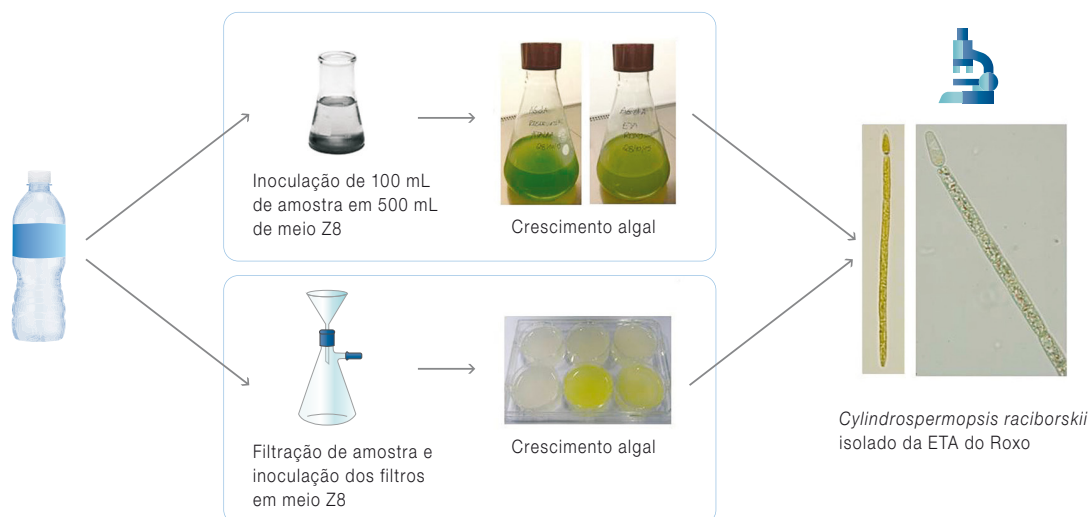
Na **tabela 1** indicam-se as espécies fitoplanctónicas presentes nas amostras fixadas com Lugol.

Cerca de 30 dias após a inoculação em meio Z8 (com ou sem filtração prévia), registou-se crescimento de diatomáceas e clorófitas nas culturas das amostras da ETA e do Reservatório (**figura 1**). Adicionalmente, observou-se o crescimento de *C. raciborskii* nas culturas da ETA (**figura 1**).

Tabela 1: ⚡ Espécies fitoplanctónicas presentes nas amostras recolhidas.

	Amostra	
	Saída da ETA	Reservatório
<b>Cianobactérias</b>		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	1472	651
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	1042	383
<i>Aphanizomenon gracile</i>	–	579
<b>Diatomáceas</b>		
<i>Nitzschia acicularis</i>	30	13
<b>Clorófitas</b>		
<i>Scenedesmus ellipticus</i>	26	–
<b>Total</b>	<b>2570</b>	<b>1627</b>

Figura 1: ⚡ Representação das etapas realizadas para confirmação da viabilidade das cianobactérias presentes nas amostras.





## \_Discussão

O presente trabalho demonstra que alguns organismos fitoplanc-  
tónicos, designadamente cianobactérias, podem sobreviver  
aos processos de tratamento na ETA, mantendo a sua capaci-  
dade de reprodução. Este facto pode significar que a habitual  
monitorização da água bruta e da água à saída da ETA pode  
subestimar eventuais riscos, uma vez que os organismos que  
sobrevivem ao tratamento, mesmo em concentrações muito re-  
duzidas na água tratada, podem potencialmente desenvolver-  
se a jusante, nos reservatórios ou rede de distribuição, e por  
em causa a qualidade da água fornecida às populações.

A ocorrência de cianobactérias na albufeira do Roxo esteve  
associada à degradação da qualidade hídrica devido à produ-  
ção de COVs, responsáveis pela alteração das características  
organoléticas da água. Os *blooms* cianobacterianos densos e  
persistentes, como neste caso, podem interferir com a eficiên-  
cia dos tratamentos na ETA, pondo em causa a qualidade da  
água para consumo humano. O problema agrava-se quando  
as espécies cianobacterianas que resistem aos tratamentos  
são potencialmente tóxicas, podendo constituir riscos para a  
saúde pública.

A espécie *C. raciborskii* manteve-se viável após o tratamento  
na ETA, facto que constitui um motivo de preocupação em  
termos de saúde pública. Para além de poder contribuir para  
a alteração das características organoléticas da água, esta  
espécie pode produzir alguns tipos de cianotoxinas, desig-  
nadamente cilindrospermopsina (hepatotoxina potencialmen-  
te carcinogénica) (5). A legislação nacional não contempla  
qualquer limite máximo relativamente a esta cianotoxina. De  
facto, o *C. raciborskii* foi considerado até há pouco tempo  
uma espécie tropical, mas atualmente está a disseminar-se  
para regiões temperadas (6), designadamente na Europa.  
Esta disseminação tem sido associada às alterações climáti-  
cas, bem como à grande plasticidade e resistência desta es-  
pécie (6). Em Portugal, nunca foi confirmada a presença de  
*C. raciborskii* tóxico. Desta forma, estamos a proceder ao  
isolamento de estirpes a partir de amostras de água bruta  
e tratada, de forma a identificar e confirmar, com base nas  
caraterísticas morfológicas e por métodos de biologia mo-

lecular, a variação e densidade de *C. raciborskii* na albufeira,  
a sua persistência na água tratada, bem como a sua capaci-  
dade toxigénica. Caso os resultados das análises de toxinas  
sejam positivos, estamos perante a primeira descrição de *C.*  
*raciborskii* tóxico em águas doces superficiais portuguesas.

## \_Conclusão

As cianotoxinas podem ser transmitidas ao Homem através das  
águas balneares e de consumo, bem como através de alimentos  
contaminados com água de rega contendo estes compostos.  
Está a decorrer um protocolo entre o INSA e a AgdA, com o ob-  
jetivo de estudar a distribuição de cianobactérias, cianotoxinas  
e COVs na albufeira do Roxo, utilizada para abastecimento públi-  
co e irrigação. Este projeto visa identificar as zonas de maior  
risco de ocorrência destes organismos e compostos, bem como  
perceber se estas ocorrências estão relacionadas com algum  
fator físico-químico associado à albufeira e/ou algum fator clima-  
térico. Pretende-se, portanto, identificar a eventual causa destes  
*blooms* persistentes. Em particular, a albufeira do Roxo constitui  
um interessante caso de estudo relativamente à ocorrência de  
*C. raciborskii*. Espera-se que esta colaboração entre as duas  
instituições permita resolver um problema que afeta o dia-a-dia  
das populações e que pôde por em causa a saúde pública.

## Agradecimentos:

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa SFRH/BPD/  
77981/2011 atribuída a Elsa Dias.

## Referências bibliográficas:

- (1) Vasconcelos VM. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(3):249-54.
- (2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2006: Lyon, France). Cyanobacterial peptide toxins. In: *Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins.* Lyon: IARC, 2010, pp. 329-412. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 94). <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf>
- (3) BS EN 15204:2006. Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermoehl technique)
- (4) Skulberg R, Skulberg OM. *Forskning Med Algekulturer NIVAs Kultursampling av Alger.* Norway: NIVA, 1990.
- (5) de la Cruz AA, Hiskia A, Kaloudis T, et al. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ Sci Process Impacts.* 2013;15(11):1979-2003.
- (6) Antunes JT, Leão PN, Vasconcelos VM. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Front Microbiol.* 2015;6:473. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435233/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435233/)