

Cianobactérias e cianotoxinas em água tratada: conhecer para prevenir

Cyanobacteria and cyanotoxins in treated water: to know in order to prevent

Elsa Dias, Konstantina Sarioglou, Miriam Ortiz, Carina Menezes

elsa.dias@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A monitorização da qualidade da água para consumo humano relativamente à presença de cianobactérias é uma das atribuições do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde. A proliferação massiva de cianobactérias (*bloom*) em reservatórios de água doce superficial tem impactos no ecossistema aquático, nos procedimentos operativos das estações de tratamento de água e acarreta riscos para a saúde humana e animal devido à capacidade toxigénica de algumas espécies cianobacterianas.

Neste trabalho descreve-se a deteção de uma densidade elevada da espécie *Dolichospermum planctonicum* numa amostra de água tratada, bem como a presença de anatoxina-a (neurotoxina).

A legislação portuguesa apenas contempla um valor paramétrico de referência para microcistinas (hepatotoxinas). Porém, de acordo com os valores-guia da Organização Mundial da Saúde, a anatoxina-a foi detetada numa concentração abaixo do valor recomendado para água de consumo humano.

Os resultados alertam para a importância da monitorização regular de cianobactérias em água bruta e tratada e da adequação da monitorização de cianotoxinas em função do potencial tóxico das espécies presentes. Por outro lado, salienta-se a necessidade de integrar os dados de monitorização a nível do país, pois só assim será possível conhecer o cenário real de ocorrência de *blooms* tóxicos em Portugal, e, em conformidade, adequar a legislação nacional.

_Abstract

Monitoring the quality of water for human consumption regarding the presence of cyanobacteria is one of the attributions of the Department of Environmental Health of the National Institute of Health (Portugal). The massive proliferation of cyanobacteria (*bloom*) in freshwater bodies has impacts on aquatic ecosystems, on operative procedures at water treatment stations and presents human and animal health risks due to the toxigenic potential of some cyanobacterial species.

In this work, we describe the detection of a high density of the cyanobacterium *Dolichospermum planctonicum* in a treated water sample, as well as the presence of anatoxin-a (neurotoxin).

Portuguese legislation only includes a mandatory level for microcystins (hepatotoxins). However, according to the World Health Organization guidelines, anatoxin-a was detected at a concentration below the recommended value for drinking water.

These results alert to the importance of the regular monitoring of cyanobacteria in raw and treated water and to the adequacy of cyanotoxins monitoring according to the toxic potential of the species present in the samples. Furthermore, the need to integrate data at the country level is emphasized, as this is the only way to understand the real scenario of toxic bloom occurrences in Portugal and, accordingly, adapt national legislation.

_Introdução

As cianobactérias são microrganismos fotossintéticos que povoam diversos habitats, em particular reservatórios de água doce superficial. Nestes reservatórios, as cianobactérias ocorrem sobretudo na forma planctónica, fazendo parte do fitoplâncton e desempenhando papéis ecológicos relevantes, uma vez que estão na base da cadeia trófica e produzem oxigénio.

Em massas de água eutrofizadas, as cianobactérias podem desenvolver-se massivamente e formar densas quantidades de biomassa, à superfície, na coluna de água e/ou na margem, designadas de florescências ou *blooms*. Este tipo de ocorrências pode representar um risco para a saúde humana e animal, visto que algumas espécies são produtoras de toxinas (cianotoxinas), com potenciais efeitos agudos ou crónicos. As toxinas mais comuns induzem efeitos hepatotóxicos (microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina) ou neurotóxicos (saxitoxinas e anatoxina-a).

O estudo da ocorrência de cianobactérias em reservatórios de água doce em Portugal remonta à década de 1930, mas só nos anos 90 teve início o estudo da toxicidade e distribuição de espécies tóxicas com os trabalhos de Vasconcelos e colaboradores, sobretudo no centro e norte do país (1). A primeira descrição da ocorrência de cianobactérias tóxicas em Portugal data de 1993, após a análise de um *bloom* dominado por *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas ocorrido na albufeira de Crestuma (Rio Douro) em 1989 (2). Também em 1993 um episódio associado à morte de 20 pacientes numa unidade de hemodiálise em Évora foi atribuído à presença de um *bloom* de cianobactérias na albufeira que abastecia a água à cidade, embora à data não tenham

sido recolhidas amostras em tempo útil para a devida análise, não tendo sido possível demonstrar aquela relação causa-efeito (3-5). A única descrição em Portugal do impacto de cianobactérias tóxicas na saúde animal foi publicada em 2019 (6).

O Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia do Departamento de Saúde Ambiental do INSA tem desenvolvido, desde 1996, atividade de diagnóstico de fitoplâncton e toxinas associadas a cianobactérias em amostras de água doce superficial destinadas ao consumo humano, incluindo amostras de água bruta, amostras recolhidas nas várias fases de tratamento e amostras de água tratada, ou a atividades balneares. Por outro lado, desenvolve atividades de investigação associadas a cianobactérias, dispondo de uma coleção de culturas de cianobactérias vivas, um recurso biológico com cerca de 180 estirpes isoladas sobretudo de albufeiras portuguesas (7).

A ocorrência de *blooms* tóxicos é comum em águas doces superficiais em Portugal (3-5) e embora os vários tipos de toxinas sejam detetados, a legislação portuguesa (8) apenas contempla o valor paramétrico de referência para as microcistinas em água destinada ao consumo humano. Para águas balneares não foi estabelecido, ainda, qualquer valor paramétrico de referência em Portugal. As microcistinas são consideradas as toxinas mais comuns e mais estudadas. Porém, o facto das outras toxinas não estarem contempladas na legislação limita a sua monitorização e, conseqüentemente, impede o conhecimento acerca da sua ocorrência e do risco real que representam. Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) procedeu a uma atualização dos valores-guia de cianotoxinas (incluindo cilindrospermopsina, anatoxina-a e saxitoxina) para águas de consumo humano e balneares (9). Estas recomendações revelam-se importantes dado o seu papel na sensibilização das entidades competentes na área da distribuição e controlo da qualidade da água, relativamente à monitorização de um painel de cianotoxinas e não apenas das que têm um valor limite legislado (10).

Em 2020, descrevemos o isolamento e estabelecimento de culturas vivas de estirpes da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, a partir de amostras de água tratada recolhidas

à saída de uma estação de tratamento de água (11). Este resultado demonstrou a capacidade destas estirpes de resistir aos processos de tratamento e de poderem disseminar-se no ambiente. A elevada resistência e capacidade de adaptação desta espécie, previamente considerada tropical, tem sido associada à sua expansão para regiões de clima temperado, como Portugal. Esta espécie está descrita como produtora de vários tipos de cianotoxinas, mas as estirpes que foram isoladas não revelaram potencial tóxico.

Neste trabalho voltamos a reportar a ocorrência de elevadas concentrações de cianobactérias numa amostra de água recolhida à saída da estação de tratamento de água para abastecimento público. Neste caso, para além da cianobactéria da espécie *Dolichospermum planctonicum*, foi detetada a presença de anatoxina-a na água tratada.

Estes resultados alertam para o interesse de monitorizar os vários tipos de cianotoxinas em águas destinadas ao consumo humano e atividades balneares e de proceder à análise dos dados do país que, presentemente, se encontram dispersos por várias entidades, de forma a traçar o panorama nacional relativamente à ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas nas massas de água doce superficial. Este conhecimento permitirá avaliar a adequação da legislação, ou a necessidade de a ajustar, relativamente aos valores legais para cianobactérias e cianotoxinas na água, tendo em conta as suas várias utilizações e os riscos que podem apresentar para a saúde humana, animal e ambiental.

_Objetivo

Neste trabalho descreve-se a deteção de uma densidade elevada da espécie *Dolichospermum planctonicum* numa amostra de água tratada, bem como a presença de anatoxina-a (neurotoxina).

_Materiais e métodos

Amostragem e processamento das amostras

A colheita das amostras foi efetuada no ponto de saída de uma Estação de Tratamento de Água (não identificada por motivos de confidencialidade) e as amostras foram mantidas refrigeradas até ao laboratório. A amostra inicial de 1L foi subdividida em alíquotas e processada de acordo com as análises a efetuar: 300 mL de amostra foram fixados com uma solução de Lugol e mantidos à temperatura ambiente para análise de fitoplâncton; 5 mL de amostra, em duplicado, foram mantidos a -20°C até determinação de cianotoxinas; 40 mL de amostra fresca foram usados para avaliar a viabilidade de cianobactérias e a eventual germinação de acinetos (esporos de resistência) presentes na amostra.

Análise de fitoplâncton

A Identificação e quantificação de fitoplâncton foi realizada por microscopia ótica com contraste de fase (microscópio Olympus CK40) pelo método de Utermöhl (12). Resumidamente, a amostra fixada foi sedimentada em câmara de sedimentação de 50mL durante 48h e observada ao microscópio. As espécies fitoplanctónicas presentes foram identificadas e quantificadas. A identificação taxonómica baseou-se em características morfológicas distintivas e chaves de identificação de acordo com o anexo D da norma EN 15204:2006 (12).

A caracterização morfométrica de cianobactérias de interesse foi realizada por microscopia ótica pela medição das dimensões celulares das células vegetativas (n=50), acinetos (n=27) e heterocistos (n=32). Adicionalmente, foram adquiridas imagens da amostra e das cianobactérias presentes. Foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse Ts2R com câmara DS-Fi3 e as medições foram realizadas com o software Nikon NIS-Elements.

Determinação de cianotoxinas

A análise de cianotoxinas foi realizada por método imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA), recorrendo a kits comerciais ABRAXIS® específicos para cada toxina (Cilindrospermopsina, 522011; Saxitoxinas, 52255B; Microcistinas, 520011; Anatoxina-a, 520060, Gold Standard Diagnostics, Horsham, PA, USA).

Avaliação da viabilidade de cianobactérias presentes na água tratada

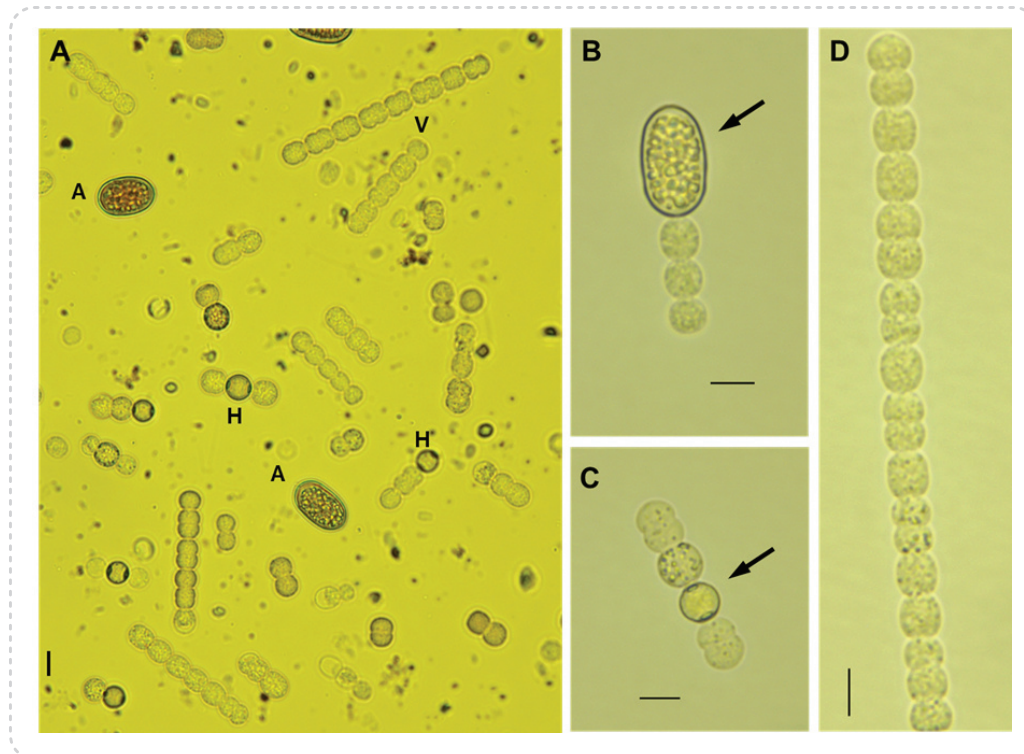
Uma alíquota de 20 mL da amostra fresca foi filtrada sob vácuo ligeiro através de membranas de 0,45 µm (MF-Millipore, Darmstat, Germany) de forma a concentrar a biomassa cianobacteriana. Os filtros foram lavados com um volume de 20 mL de meio Z8 (13) para um frasco de cultura, que foi mantido numa câmara de cultura em condições de luz e temperatura controladas (20 ± 1°C; 20 ± 4 µmol m⁻² s⁻¹; ciclo 14 h luz/10 h escuro). Este frasco foi observado ao microscópio ao longo do tempo para avaliar a capacidade de crescimento (viabilidade) das células vegetativas e a eventual germinação dos acinetos (esporos de resistência). Em paralelo foi também inoculado um volume de 20 mL de amostra diretamente em meio Z8, sem o passo de filtração, para salvaguardar eventuais danos celulares das espécies presentes na amostra induzidos pelo vácuo. Adicionalmente, foram isolados acinetos da amostra para placas de 6 poços contendo 6 mL de meio Z8 para avaliar a sua capacidade de germinação.

_Resultados

Identificação e quantificação de fitoplâncton

Na figura 1A pode observar-se o aspeto microscópico da amostra de água tratada. A análise de fitoplâncton revelou a presença de quatro grupos de organismos fitoplanctónicos, maioritariamente cianobactérias (tabela 1). A espécie dominante foi *Dolichospermum planctonicum*, descrita como produtora de anatoxina-a (14). A densidade de cianobactérias de 926 células/mL corresponde a cerca de metade do valor regulamentado - 2000 células/mL - para as massas de água doce superficiais destinadas ao consumo humano (8).

Figura 1: Características morfológicas da cianobactéria *Dolichospermum planctonicum* observada na amostra de água tratada (após fixação).



A) Aspeto geral da amostra com células vegetativas (V), acinetos (A) e heterocistos (H) característicos desta espécie; B) Tricoma com acineto (seta); C) Tricoma com heterocisto intercalar (seta); D) Tricoma com células vegetativas. Ampliação de 200x (A) e 600x (B-D). Barra de escala = 10 µm.

Tabela 1: Identificação e quantificação de organismos fitoplanctónicos.

Grupo Fitoplanctónico	Densidade (células/mL)
Cianobactérias	926
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	886
Outras cianobactérias	40
Diatomáceas	5
Clorófitas	75
Criptófitas	2
Total	1008

Determinação de cianotoxinas

Os resultados da quantificação de cianotoxinas por ELISA (tabela 2) revelaram a presença de anatoxina-a (neurotoxina) na amostra, compatível com a espécie cianobacteriana dominante (*Dolichospermum planctonicum*). Foi detetada uma concentração de 0,23 µg/L, inferior ao valor-guia proposto pela OMS para água bruta para consumo humano, relativamente a uma exposição aguda (30 µg/L).

Tabela 2: Quantificação de cianotoxinas por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Cianotoxina	Resultado (µg/L)
Microcistinas	< 0,15 (LQ)
Cilindrospermopsina	< 0,02 (LQ)
Saxitoxina	< 0,05 (LQ)
Anatoxina-a	0,23

LQ – Limite de quantificação

Caracterização morfométrica de *Dolichospermum planctonicum*

A espécie *Dolichospermum planctonicum* detetada na amostra forma colónias filamentosas (tricomatas) compostas por células vegetativas de forma circular (figura 1B) e com diâmetro de $8,5 \pm 0,3$ µm (tabela 3). Para além de células vegetativas, os tricomas desta espécie podem apresentar heterocistos (células diferenciadas com capacidade para fixar o azoto atmosférico) e acinetos (células diferenciadas que sobrevivem em condições ambientais adversas e que germinam quando as condições são novamente favoráveis, garantindo a sobrevivência da espécie). A forma dos vários tipos celulares e as respetivas dimensões estão de acordo com o que está escrito na bibliografia para esta espécie (15).

Tabela 3: Dimensões celulares das células vegetativas, heterocistos e acinetos da espécie *Dolichospermum planctonicum* (µm).

Tipo celular	Dimensões celulares (µm) Média ± dp (mínimo;máximo)	
	Células Vegetativas (n=50)	Diâmetro
Heterocistos (n=32)	Diâmetro	$10,3 \pm 0,3$ (9,7;10,9)
Acinetos (n=27)	Comprimento	$26,6 \pm 2,0$ (20,4;27,7)
	Largura	$15,5 \pm 1,2$ (13,9;19,5)

Viabilidade de *Dolichospermum planctonicum* após inoculação em meio de cultura

A inoculação de amostra fresca em meio Z8 (com ou sem filtração prévia) não resultou no crescimento de colónias de *D. planctonicum*. O facto de as células não terem tido a capacidade de se dividir quando colocadas num meio de cultura (Z8) e em condições de luz e temperatura adequados ao crescimento cianobacteriano indica que as células vegetativas já não estariam viáveis. De facto, observou-se que os tricomas (colónias filamentosas de células vegetativas) perderam a sua integridade ao longo do tempo.

Os acinetos inoculados em meio Z8 mantiveram a sua morfologia ao longo do tempo, embora não tenham germinado. Ressalve-se, porém, que a germinação de acinetos pode ser um processo moroso, mesmo quando colocados em condições de luz, temperatura e meio de cultura adequados. A germinação destes acinetos continuará a ser monitorizada.

_Discussão e conclusões

Neste trabalho descrevemos a deteção de cianobactérias numa amostra de água tratada colhida à saída de uma estação de tratamento de água (ETA) para abastecimento público. A densidade de cianobactérias registada (926 células/mL) está acima do que é expectável encontrar em águas tratadas, de acordo com a monitorização realizada no DSA ASBE. Esta situação acontece ocasionalmente, quando ocorrem blooms

intensos de cianobactérias na massa de água doce superficial de origem (água bruta), e o respetivo sistema de tratamento não é totalmente eficaz na remoção de densidades fitoplanctónicas tão elevadas.

Já previamente tínhamos reportado uma situação similar (11). Nesse caso, identificou-se a presença de cianobactérias numa densidade de 2514 células/mL, maioritariamente de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Isolaram-se tricomas desta espécie, a partir da amostra de água tratada, para meio de cultura e, após 30 dias da inoculação, observou-se o crescimento celular, indicando que as células estavam viáveis e com capacidade para se multiplicarem.

No presente caso, a espécie dominante foi *Dolichospermum planctonicum*, uma cianobactéria descrita na literatura como produtora de várias cianotoxinas, incluindo a anatoxina-a. Este composto alcaloide, com ação neurotóxica, foi detetado neste estudo, embora existam ainda poucas descrições da sua ocorrência em Portugal (5). De acordo com os valores-guia das cianotoxinas para água de consumo humano publicados pela OMS, verificamos que a concentração de anatoxina-a detetada na amostra é inferior ao valor-guia para uma exposição aguda (30 µg/L) (10).

A legislação portuguesa relativa à qualidade da água para consumo humano inclui apenas as microcistinas, com um valor-guia de 1 µg/L, visto serem consideradas as cianotoxinas mais comuns e mais estudadas. No entanto, o estabelecimento de valores de referência para outras cianotoxinas (incluindo a anatoxina-a) pela OMS reforça a necessidade de monitorizar mais do que microcistinas. O facto de não haver regulamentação nacional relativa às outras toxinas implica que não se proceda à sua devida monitorização, o que não contribui para gerar evidência científica sobre a sua real ocorrência e que justifique a sua inclusão na legislação. É uma “pescadinha de rabo na boca”.

De qualquer forma, uma análise pontual não nos permite inferir o histórico de contaminação da massa de água na origem e à saída da estação de tratamento com cianobactérias tóxicas, e, consequentemente, não nos permite inferir o risco de exposição humana a cianotoxinas nesse sistema de abastecimento.

A tentativa de obter uma cultura viva das cianobactérias presentes na amostra, em condições laboratoriais controladas, foi infrutífera, revelando que as células não resistiram ao tratamento na ETA. Porém, a presença de acinetos indica o potencial desta espécie para germinar, quando as condições voltarem a ser favoráveis, o que pode significar que a ETA pode “concentrar” estas células e libertá-las para o meio exterior, inoculando células dormentes da espécie *D. planctonicum* no solo ou em massas de água doce superficial.

Em conclusão, este trabalho alerta para a importância de proceder a uma monitorização regular de cianobactérias e, quando justificável, das suas toxinas associadas em água para consumo humano (água bruta e tratada), de forma a identificar o risco potencial de exposição das populações a este tipo de toxinas. De salientar, também, a importância da integração dos dados a nível do país, pois só assim será possível conhecer o cenário real de ocorrência de *blooms* tóxicos em Portugal, e, em conformidade, adequar a legislação nacional.

Referências bibliográficas:

- (1) Vasconcelos V. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. *Limnetica*. 2001;20(1):45-58. <https://www.limnetica.com/documentos/limnetica/limnetica-20-1-p-45.pdf>
- (2) Vasconcelos VM, Evans WR, Carmichael WW, et al. Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis* (cyanobacteria) waterbloom collected in the drinking water reservoir for Porto, Portugal. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 1993;28(9):2081-94. <https://doi.org/10.1080/10934529309375996>
- (3) Menezes C, Churro C, Dias E. Risk Levels of Toxic Cyanobacteria in Portuguese Recreational Freshwaters. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 18;9(10):327. <https://doi.org/10.3390/toxins9100327>
- (4) Moreira C, Campos A, Martins JC, et al. Review on Cyanobacterial Studies in Portugal: Current Impacts and Research Needs. *Applied Sciences*. 2021;11(10):4355. <https://doi.org/10.3390/app11104355>
- (5) Moreira C, Gomes C, Vasconcelos V, et al. Cyanotoxins Occurrence in Portugal: A New Report on Their Recent Multiplication. *Toxins (Basel)*. 2020 Feb 29;12(3):154. <https://doi.org/10.3390/toxins12030154>
- (6) Menezes C, Nova R, Vale M, et al. First description of an outbreak of cattle intoxication by cyanobacteria (blue-green algae) in the South of Portugal. *Bov Pract*. 53, 66-70. 2019 feb;53(1):66-70. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol53no1p66-70>
- (7) Menezes C, Churro C, Paulino S, et al. Coleção de culturas de algas Estela Sousa e Silva. 2º Congresso Ibérico de Cianotoxinas, 7,8 jul. de 2011. (Poster). <http://hdl.handle.net/10400.18/459>
- (8) Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 de agosto. Regime jurídico da qualidade da água destinada ao consumo humano. DR n.º 161/2023, 1ª Série 2023-08-21:10-73. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/69-2023-220113533>
- (9) Chorus I, Welker M. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. 2nd ed. London: CRC Press, 2021. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>

artigos breves_ n. 14

- (10) Dias E, Rosado T, Menezes C. Novos valores-guia da Organização Mundial de Saúde para cianotoxinas em águas para consumo humano e balneares. Boletim Epidemiológico Observações. 2021;10(30):5-14.
<http://hdl.handle.net/10400.18/7778>
- (11) Menezes C, Valério E, Botelho MJ, et al. Isolation and Characterization of *Cylin-drospermopsis raciborskii* Strains from Finished Drinking Water. *Toxins* (Basel). 2020 Jan 8;12(1):40. <https://doi.org/10.3390/toxins12010040>
- (12) EN 15204:2006. Water Quality – Guidance Standard on Enumeration of Phytoplankton Using Inverted Microscopy (Utermöhl Technique)
- (13) Skulberg R, Skulberg OM. Forskning med algekulturer: NIVAs kultursamling av alger = Research with algal cultures: NIVA's culture collection of Algae. Oslo: Norsk Institutt for Vannforskning, 1990.
- (14) UNESCO. *Dolichospermum planctonicum* (Brunnthalier) [Internet]. In: Taxonomic Reference List of Harmful Microalgae.
<https://www.marinespecies.org/hab/aphia.php?p=taxdetails&id=625407>
- (15) Komárek J, Anagnostidis K. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd 19/2: Cyanoprocaryota, Part 2: Oscillatoriales. Spektrum Akademischer Verlag, 2005.