



Impacto das microcistinas no crescimento de bactérias aquáticas

Diana Miguéns, Daniel Salvador, Elisabete Valério

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

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

Introdução

As cianobactérias são organismos ubíquos, existindo principalmente em ambiente aquáticos, onde geralmente coocorrem com outros microrganismos, como bactérias heterotróficas (1). Em condições favoráveis de luz e nutrientes, as cianobactérias podem crescer rapidamente e atingir populações com elevadas densidades celulares designadas por florescências ou *blooms* (2). Estes fenómenos estão frequentemente associados à produção de toxinas causando assim problemas ecológicos, económicos e de saúde pública. As microcistinas (MC) são o tipo de hepatotoxinas mais abundantemente produzidas pelas cianobactérias. Existem cerca de 80 variantes destas toxinas, sendo a microcistina-LR, -RR e -YR as mais comuns.

Alguns estudos mostraram que muitas espécies de cianobactérias formadoras de *blooms* preferem crescer na presença de outras bactérias (3). Além disso, Giaramida *et al.* (1) relataram que a exposição à microcistina tem contribuído significativamente para a definição da estrutura das comunidades bacterianas e fisiologia microbiana dos corpos de água estudados. Isso atribui um papel de relevo às cianobactérias tóxicas no controlo da diversidade fitoplanctónica e abundância das espécies microbianas. Por outro lado, existem bactérias capazes de degradar as cianotoxinas, como por exemplo a microcistina (1, 3), tendo já sido levantada a hipótese de que a presença de bactérias heterotróficas na água pode desempenhar um papel importante na limpeza natural dessas hepatotoxinas quimicamente estáveis (3). Apesar destas evidências, o verdadeiro papel de cianobactérias e suas interações com bactérias heterotróficas ainda é pouco conhecido.

Objetivos

Por forma a colmatar o desconhecimento que existe relativamente ao impacto das microcistinas em bactérias heterotróficas de

água doce, pretendeu-se neste trabalho isolar algumas bactérias de água doce, algumas coexistindo com cianobactérias tóxicas. Após a confirmação da identificação de isolados, estas bactérias foram expostas a três concentrações diferentes de cada uma de três variantes (MC-LR, -RR, -YR) e o efeito sobre as suas curvas de crescimento foi avaliado.

Materiais e métodos

Amostragem

As amostragens decorreram primeiramente na Albufeira de Matos, Açude de Monte da Barca e Albufeira de Patudos, onde se observam frequentemente *blooms* de cianobactérias. A segunda amostragem foi feita na Albufeira de Castelo de Bode, um reservatório onde geralmente não ocorrem *blooms* de cianobactérias. As amostras foram recolhidas em frascos esterilizados de 1 L e transportadas numa mala térmica refrigerada, no escuro.

Isolamento de bactérias

As bactérias foram isoladas através do espalhamento de 100 µL das amostras de água de cada reservatório, usando esferas de vidro esterilizadas, em meio não seletivo Reasoner'2A (R2A). Todas as placas inoculadas foram incubadas a 20 ± 2°C no escuro, para impedir o crescimento de cianobactérias, durante quatro dias. Após este período, selecionaram-se duas a três colónias individualizadas diferentes que foram purificadas em meio Nutriente Agar (NA).

Caracterização e identificação dos isolados

A forma bacteriana foi avaliada microscopicamente, e os isolados classificados de acordo com o seu grupo Gram. Para identificar molecularmente os isolados, amplificou-se o gene do rRNA 16S, por PCR usando *primers* universais: 104F e 907R (4) ou o par 8F e 1492R (5). Os produtos de PCR foram purificados e enviados para sequenciar, em ambas as direções, na unidade UTI-INSA.

Crescimento bacteriano

As bactérias isoladas foram expostas a três concentrações diferentes de cada variante da MC (MCLR e MCRR: 1 nM, 10 nM e 1000 nM; MCYR: 1 nM, 10 nM e 300 nM), e os efeitos nas curvas de crescimento bacteriano foram avaliados em microplacas de 96 poços. As concentrações escolhidas situam-se em valores próximos dos normalmente encontrados em ambientes naturais.

Resultados e discussão

Tem-se pesquisado intensamente qual o impacto das microcistinas em animais e plantas, no entanto o seu impacto em bactérias, que coabitam com cianobactérias de água doce encontra-se ainda por esclarecer.

Neste trabalho avaliou-se o impacto de três variantes da MC (-LR, -RR, -YR) no crescimento de bactérias heterotróficas isoladas em três albufeiras portuguesas, onde frequentemente se observam *blooms* de cianobactérias, algumas produtoras de MC, assim como em bactérias isoladas de uma albufeira onde estes fenómenos geralmente não acontecem.

Primeiramente procedeu-se à caracterização morfológica das bactérias isoladas e à determinação do seu tipo de coloração Gram (figura 1).

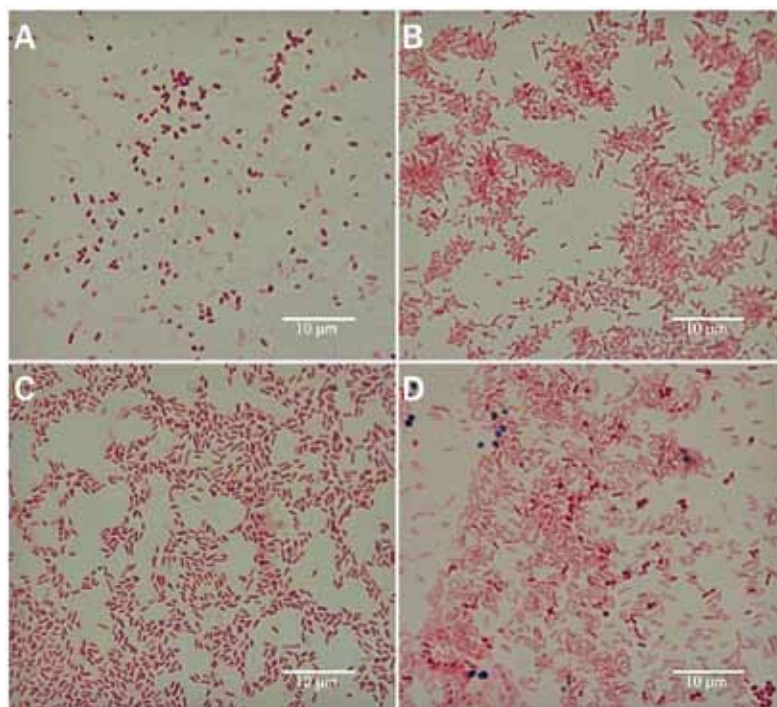
Os isolados foram de seguida identificados pelo seu posicionamento filogenético construído com base no gene rRNA 16S. Os isolados distribuíram-se por três filós: Firmicutes (*Bacillus*

sp.), β - proteobacteria (*Vogesella indigofera*), e γ - proteobacteria (*Raoultella terrigena*, *Aeromonas hydrophila*, e *Shewanella putrefaciens*). A diversidade e o tipo de bactérias heterotróficas isoladas neste estudo está de acordo com o que já foi descrito anteriormente, em habitats onde estas bactérias coabitam com cianobactérias (3,6,7).

De seguida, os isolados foram expostos a três concentrações diferentes de cada variante da MC, e os efeitos nas curvas de crescimento bacteriano foram avaliados (tabela 1). Verificou-se que as MC podem reduzir o crescimento da maioria das seis bactérias testadas (B6, P1 e P6), sendo que algumas bactérias cresceram sem efeito algum induzido (C4), enquanto outras reagiram de forma diferente consoante a variante e a concentração usada no mesmo isolado (M1 e M5).

Em relação às curvas de crescimento dos seis isolados testados, estas só apresentaram diferenças significativas entre as células expostas às microcistinas e as células controlo no final da fase exponencial/início da fase estacionária. Contudo, observou-

Figura 1: Imagens representativas dos isolados testados.



(A) *Aeromonas hydrophila* B6; (B) *Bacillus* sp. M1; (C) *Shewanella putrefaciens* P6; (D) *Vogesella indigofera* C4 (são visíveis os grãos de indigotina).

Tabela 1: Alterações observadas na fase final da curva de crescimento bacteriano, na presença de microcistinas, relativamente ao controlo.

	<i>Aeromonas hydrophyla</i> B6	<i>Bacillus sp.</i> M1	<i>Aeromonas hydrophyla</i> M5	<i>Raoultella terrigena</i> P1	<i>Shewanella putrefaciens</i> P6	<i>Vogesella indigofera</i> C4
	%	%	%	%	%	%
1 nM MCLR	-9,5*	-3,4*	-6,8	-4,9*	-6,3*	0
10 nM MCLR	-7,4*	-5,3*	-8,7	-4,4*	-7,4*	0
1000 nM MCLR	-6,5*	-2,0*	-3,1	-5,1*	-6,8*	0
1 nM MCRR	-6,1*	-2,0	-11,1*	-5,5*	-6,5*	0
10 nM MCRR	-7,1*	-1,4	-12,5*	-5,8*	-4,9*	0
1000 nM MCRR	-6,7*	-5,1	-6,8*	-4,3*	-4,7*	0
1 nM MCYR	-8,1*	-3,4*	-8,8	-5,2*	-6,2*	0
10 nM MCYR	-8,3*	-4,1*	-11,3	-7,5*	-8,2*	0
300 nM MCYR	-6,2*	-3,1*	1,6	-3,7*	1,1	0

* Significativamente diferente do controlo ($P < 0,05$).

-se maioritariamente uma diminuição do crescimento bacteriano. Não foi observada uma inibição como descrito por Yang *et al.* (8) quando expuseram *Escherichia coli* a 1000 e 5000 nM de MCRR. Porém, as concentrações de toxinas usadas neste estudo, foram mais próximas das concentrações inferiores testadas por Yang *et al.* (8), em que não observaram um efeito marcado da exposição da *E.coli* a MCRR. A inibição do crescimento bacteriano pelas MCs está de acordo com o que Giaramida *et al.* (1) sugeriram, em que as cianobactérias produtoras de microcistinas aparentam ter um papel no controlo da população de bactérias heterotróficas nos corpos de água doce.

O isolado de *Vogesella indigofera*, isolado a partir da albufeira onde geralmente não se observam blooms, não sofreu qualquer tipo de efeito na presença de cada uma das três variantes de MC (tabela 1). Perante este comportamento coloca-se a hipótese de que este isolado possa ser capaz de degradar as MC e por isso não manifestar nenhum efeito no seu crescimento na presença das mesmas.

Conclusões

Este estudo mostrou que as microcistinas-LR, -RR e YR podem induzir uma redução no crescimento dum grupo diversificado de

bactérias heterotróficas, não patogénicas, isoladas a partir de albufeiras. Este impacto induzido pelas microcistinas pode levar ao desequilíbrio da comunidade microbiana existente nos corpos de água doce, o que pode ter implicações ambientais e na qualidade da água para uso recreativo.

Referências bibliográficas:

- (1) Giaramida L, Managed PM, Edwards C, et al. Bacterial communities response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013; 84:111-17.
- (2) Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;203(3):264-72. Review.
- (3) Berg KA, Lyra C, Sivonen K, et al. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* 2009;3(3):314-25. Epub 2008 Nov 20.
- (4) Chaves S. Diversidade de procaríotas sulfato-redutores e desnitrificantes em amostras ambientais. [SI, s.n.], 2005. Tese de doutoramento-Universidade de Lisboa.
- (5) Turner S, Pryer KM, Miao VP, et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol.* 1999;46(4):327-38.
- (6) Parveen B, Ravet V, Djediat C, et al. Bacterial communities associated with Microcystis colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(5):716-24.
- (7) Eiler A, Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol.* 2004;6(12):1228-43.
- (8) Yang CY, Xia C, Zhou SW, et al. The permeability effect of microcystin-RR on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Chin. Sci. Bull.* 2010;55(18):1894-98.