



CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS

Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira
Prof.ª. Dra. do Dep. Ciências Biológicas da UNESP,
campus de Assis, SP.
mbitt@assis.unesp.br

Mariana Cabral de Oliveira
Prof.ª. Dra. do Dep. Botânica da USP, SP.
mcoliveira@usp.br

João Sarkis Yunes
Prof. Dr. da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias,
FURG, RS.
dqmsarks@super.furg.br

Fotos cedidas pelos autores

O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética

Em determinadas condições ambientais, tais como temperaturas médias diárias acima de 25°C, concentrações de nutrientes numa razão N:P (nitrogênio:fósforo) entre 20:1 e 10:1 e pH acima de 7,5, algumas populações de cianobactérias apresentam um intenso crescimento, conhecido como florações (Figura 1), as quais podem ser fenômenos naturais regionais de ocorrência sazonal, mas que, na maior parte das vezes, estão relacionadas à eutrofização artificial causada por excesso de nutrientes vindos de efluentes domésticos e rejeitos industriais.

As florações de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradável na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. No entanto, o mais grave é que certas espécies são capazes de produzir toxinas que podem ser acumuladas na rede trófica e produzir diferentes sintomas de intoxicação, atingindo conjuntos de organismos muito além da comunidade aquática.

Entre as cianobactérias que podem causar florações em corpos de água continentais, destacam-se aquelas que produzem as cianotoxinas (Figura 2). As cianotoxinas são liberadas para o ambiente quando as células se rompem. Essas toxinas não são retiradas da água pelos tratamentos convencionais das redes públicas de abastecimento e são resistentes à fervura. As cianotoxinas produzem efeitos especiais nos mamíferos, sendo classificadas como neurotoxinas e hepatotoxinas. Foram as hepatotoxinas que ocasionaram a morte de mais de 60 pacientes em uma clínica de hemodiálise em Caruaru, estado de Pernambuco, em 1996 (Jochimsen et al. 1998).

Monitoramento da água

A Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), em colaboração com a Organi-

zação Panamericana da Saúde (OPAS), redigiu uma atualização da portaria 36/MS/90, que definiu as normas e os padrões de potabilidade da água para consumo humano no Brasil, incluindo a obrigatoriedade do monitoramento da ocorrência de cianobactérias potencialmente nocivas, testes de toxicidade e análises de algumas cianotoxinas (microcistina, cilindrospermopsina, saxitoxina) tanto na água bruta do manancial utilizado para a captação de água, como na água tratada para consumo doméstico (Portaria MS/1.469, de 29 de dezembro de 2000).

O monitoramento dos mananciais e reservatórios de água pode incluir a identificação das espécies potencialmente tóxicas e o acompanhamento de sua densidade, através de contagem. No entanto, a identificação desses micror-

ganismos baseada em características morfológicas, apesar de amplamente utilizada e recomendada (Chorus & Bartram 1999), tem-se mostrado inadequada, devido à extensa plasticidade fenotípica de algumas espécies (Figura 3) (Otsuka et al. 2000; Bittencourt-Oliveira 2000). Além disso, o uso de características morfológicas é inadequado, visto que a toxicidade é uma característica intra-populacional (Bittencourt-Oliveira & Yunes 2001). Por isso, outras técnicas também podem ser empregadas, e são recomendadas como padrões: bioensaios com camundongos, detecção de toxinas através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) ou análises imunoenzimáticas específicas. Porém nenhuma destas análises são preditivas, ou seja, elas só são efetuadas quando a floração tóxica já se estabeleceu.

A predição desses fenômenos, porém, torna-se extremamente importante, tendo em vista o aumento da ocorrência de florações tóxicas em grandes sistemas de abastecimento de água e o alto custo da tecnologia atual para remover as toxinas quando implementada na rotina do monitoramento. Portanto, uma das alternativas seria buscar marcadores moleculares que identificassem a presença de cepas de cianobactérias potencialmente tóxicas antes da ocorrência da floração.

Diversidade genética de *Microcystis aeruginosa*

Para entender a dinâmica das florações de cianobactérias em ecossistemas eutrofizados, é importante entender sua diversidade genética a fim de monitorar essas populações. *Microcystis aeruginosa* é uma das espécies potencialmente tóxicas capazes de produzir a microcistina e uma das responsáveis por grande parte dos relatos de intoxicação (CETESB 1997).

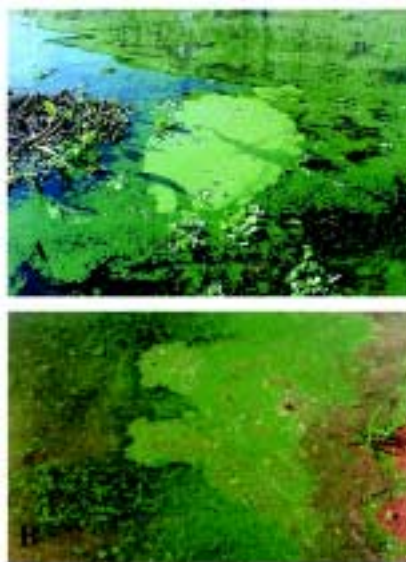


Figura 1. Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas. A. reservatório destinado ao abastecimento público, estado de Pernambuco; B. tanque de piscicultura, estado de São Paulo

Tabela 1. Cepas clonais de *Microcystis* estudadas indicando a presença do marcador molecular (+) para o gene que codifica para microcistina sintetase e a constatação da toxicidade através da análise de imunoensaio. Cepas pertencentes ao mesmo local e data foram isoladas a partir da mesma população coletada em um único ponto do corpo d'água.

LG-SP: Lagoa das Garças, Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP; CT-SP: Reservatório do Sistema Cantareira, Mairiporã, SP; LJ-RJ: Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ; TB-PE: Reservatório de Tabocas, São Lourenço da Mata, PE; TP: Reservatório de Tapacurá, Vitória de Santo Antão, PE; LS-MG: Lagoa Santa, MG; BB-SP: Reservatório de Barra Bonita, Barra Bonita, SP; TM: Reservatório de Três Marias, BA.

FCLA: Coleção de Microrganismos da Faculdade de Ciências e Letras de Assis-UNESP. NPPN: Coleção do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais-UFRJ.

NA: não analisada.

Cepa	Espécie	Localidade	Data de Coleta	Marcador Molecular	Toxicidade
FCLA30	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Nov.96	-	Não tóxica
FCLA158	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Não tóxica
FCLA175	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Não tóxica
FCLA174	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Tóxica
FCLA199	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Não tóxica
FCLA03	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Não tóxica
FCLA154	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	-	Não tóxica
FCLA155	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	+	Tóxica
FCLA255	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	+	Tóxica
FCLA258	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Dez.96	+	Tóxica
FCLA299	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Fev. 97	+	Tóxica
FCLA236	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Mar.97	+	Tóxica
FCLA232	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Mar.97	+	NA
FCLA262	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Mar.97	+	Tóxica
FCLA235	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Abr.97	+	Tóxica
FCLA310	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Abr.97	-	Não tóxica
FCLA298	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Mai.97	+	Tóxica
FCLA450	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	Jul.97	-	Tóxica
NPPN-JB1	<i>M. aeruginosa</i>	LG-SP	1990	+	Tóxica
FCLA225	<i>M. aeruginosa</i>	CT-SP	Març.97	+	NA
FCLA296	<i>M. aeruginosa</i>	CT-SP	Març.97	-	Não tóxica
FCLA16	<i>M. cf. "panniformis"</i>	BB-SP	Nov.99	-	Tóxica
FCLA 97	<i>M. cf. "panniformis"</i>	BB-SP	Abr.00	-	NA
FCLA 98	<i>M. cf. "panniformis"</i>	BB-SP	Abr.00	-	NA
FCLA 99	<i>M. cf. "panniformis"</i>	BB-SP	Abr.00	-	NA
FCLA 100	<i>M. cf. "panniformis"</i>	BB-SP	Abr.00	+	NA
NPPN-IJ4	<i>M. aeruginosa</i>	LJ-RJ	1995	+	Tóxica
NPPN-IJ47	<i>M. aeruginosa</i>	LJ-RJ	1996	+	Tóxica
NPPN-LS1	<i>Microcystis</i> sp.	LS-MG	1993	+	NA
FCLA07	<i>Microcystis</i> sp.	TB-PE	1997	-	Não tóxica
FCLA17	<i>Microcystis</i> sp.	TP-PE	Set.99	-	Não tóxica
FCLA08	<i>Microcystis</i> sp.	TB-PE	Fev.99	-	Não tóxica
FCLA18	<i>Microcystis</i> sp.	TM-AL	_____	+	Tóxica

Bittencourt-Oliveira et al. (2001) analisaram 15 linhagens clonais e não axênicas da cianobactéria *M. aeruginosa*, coletadas em diversas localidades e em diferentes datas (amostras coletadas por C. Sant'Anna, C. Bicudo e D. Bicudo). Para isso, utilizaram como marcador molecular um fragmento de cerca de 580 pares de bases do operon da ficocianina (*cpcBA*), que se mostrou adequado em estudos comparativos utilizando espécies e populações. O *cpcBA* é específico de cianobactérias; dessa

forma, é possível utilizar culturas contaminadas com outras bactérias não-fotossintetizantes, fungos, microalgas verdes ou qualquer outro microrganismo, desde que não possua esse pigmento, e até mesmo em amostras coletadas diretamente da natureza.

Constatou-se que as seqüências de DNA do *cpcBA* nas populações brasileiras de *M. aeruginosa* são mais diversificadas do que aquelas disponíveis em bancos de dados. A diversidade de populações brasileiras de *Microcystis*

também foi confirmada com outras 18 cepas utilizando RFLP-PCR (Figura 4) (Cunha 2000).

Em uma pequena lagoa ornamental no município de São Paulo, estado de São Paulo, foram detectados 6 genótipos distintos (Figura 5), em coletas realizadas mensalmente em um único ponto amostrado (Bittencourt-Oliveira et al. 2000). Essas alterações nos genótipos podem ocorrer sem alteração correspondente dos fenótipos predominantes. Da mesma forma, fenótipos diferen-

tes, ou seja, de distintas morfologias de colônias, podem ter genótipos semelhantes (Figura 3).

Marcadores moleculares para microcistina

Nos procaríotos e em algumas linhagens de eucariotos primitivos, pequenos polipeptídeos de origem não-ribossomal podem ser sintetizados por enzimas denominadas peptídeos sintetases. A maioria dos genes de peptídeos sintetases tem uma estrutura modular, onde cada módulo codifica uma sintetase específica. A inativação de um gene de peptídeo sintetase (*mcyB*) de uma cepa hepatotóxica resultou na perda da produção de microcistina, demonstrando que o gene *mcyB* codifica para a microcistina sintetase (Dittmann et al. 1997). Dessa forma, a diferença básica entre as populações tóxicas e não-tóxicas de *Microcystis* estaria na presença de um ou mais genes que codificam para a microcistina sintetase (Nishizawa et al 1999, 2000). Sendo assim, as linhagens tóxicas poderiam ser localizadas através de marcadores moleculares para genes que codificam para essas enzimas.

Iniciou-se, então, um estudo abordando a possibilidade de utilização de marcadores moleculares para cianobactérias tóxicas ou potencialmente tóxicas, objetivando a detecção de linhagens cultivadas e de populações naturais capazes de expressar a microcistina, independentemente de sua categoria taxonômica e da produção dessa toxina no momento da

análise. Tais esforços também foram iniciados em outros centros de pesquisa no exterior (Del Campo et al. 2001, Rouhiainen et al. 2001, Song et al. 2001).

Linhagens pertencentes ao gênero *Microcystis* pertencentes à Coleção de

Microrganismos da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCLA), da Universidade Estadual Paulista (UNESP) estão sendo analisadas em relação à produção de microcistina, utilizando o método imunoenzimático, com o kit EnviroLogix™, correlacionadas com a presença ou a ausência do gene que codifica para a microcistina sintetase, o *mcyB*.

Utilizando-se a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com DNA iniciadores ("primers") específicos para o gene que codifica para a microcistina sintetase, observou-se que, em cepas que apresentaram diferentes níveis de concentração de microcistina (µg de toxina/mg de células), também foi detectada a presença de único produto amplificado com, aproximadamente, 780bp (Figura 6), indicando a presença do gene para produção de microcistina (Tabela 1).

Isolados de uma mesma população apresentaram genótipos distintos em relação à presença ou não do gene que codifica para a microcistina sintetase. Isso confirma nossa hipótese de que a população é formada por um mosaico de genótipos e a toxicidade é uma característica intra-populacional.

A composição desse mosaico, com indivíduos geneticamente diferentes dentro da mesma população, cada qual possivelmente com sua tolerância a fatores ambientais e potencialidade diferenciada de toxicidade, poderia explicar as alterações de microcistinas em florações já investigadas (Bittencourt-Oliveira & Yunes 2001) e a não correlação entre conteúdo de microcistina e número de células (Kotak

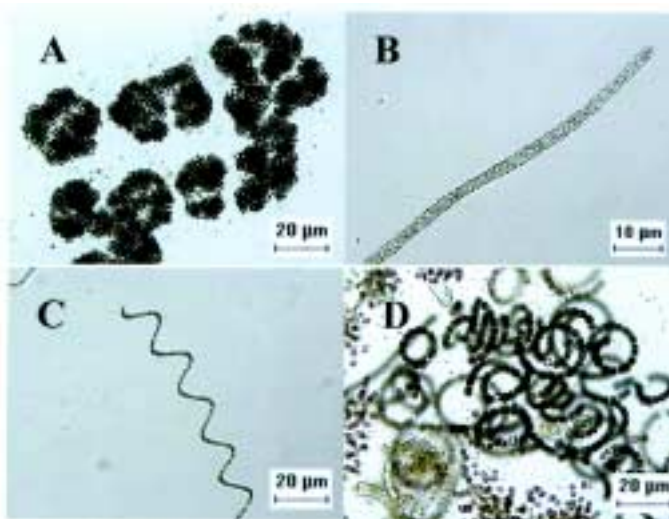


Figura 2. Cianobactérias potencialmente tóxicas. A. *Microcystis aeruginosa*; B. *Planktothrix agardii*; C. *Cylandrospermopsis raciborskii* (tricoma espiralado). D. *Anabaena circinalis*

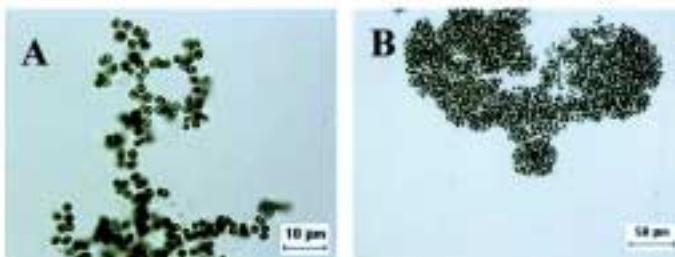


Figura 3. Colônias de *Microcystis aeruginosa* mantidas sob cultivo e isoladas de uma mesma população. A identificação tradicional de cianobactérias baseia-se em características morfológicas, como a forma da colônia, diâmetro celular, espessura da mucilagem, etc. Através da morfologia, essas duas colônias (A e B) seriam identificadas como duas espécies distintas. O seqüenciamento de DNA utilizando o operon *cpcBA*-IGS e regiões adjacentes indica que essas duas cepas pertencem à mesma espécie



Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose mostrando 6 genótipos de *Microcystis aeruginosa* (1-11 e 14-18) coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Pernambuco e 1 genótipo de *Microcystis wesenbergii*. Genótipo A corresponde às canaletas: 1, 3, 7, 10, 11. Genótipo B: 2. Genótipo C: 4, 5, 8, 14. Genótipo D: 6, 9, 15. Genótipo E: 17. Genótipo F: 18. O fragmento, correspondente a um trecho do *cpcBA* foi digerido com a enzima de restrição *MspI*. M: marcador molecular (Gibco BRL). *Microcystis wesenbergii* (12 e 13)

Data de coleta	Genótipo da população					
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
3/1996				■		
11/1996				■		
12/1996						■
2/1997	■					
3/1997	■	■				
4/1997			■	■		
5/1997	■					
7/1997						■

Figura 5. Ocorrência (quadros negros) de seis genótipos distintos (G1 a G6) de *Microcystis aeruginosa* em uma lagoa eutrófica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, no município de São Paulo-SP, constatados através do seqüenciamento do *cpcBA*-IGS. As coletas foram realizadas em um único ponto do corpo d'água. Várias cepas foram isoladas de uma mesma amostra

et al 1995).

Nem sempre houve correspondência entre as técnicas de imunoensaio e a de marcadores moleculares para a microcistina sintetase (Tabela 1), indicando que outros genes poderiam estar envolvidos na produção de microcistina.

Em vista da potencialidade dos recursos genéticos associados à diversidade biológica das cianobactérias no Brasil, faz-se necessário ampliar o estudo da variabilidade genética, bem como zelar pela sua conservação, através da implantação de bancos de germoplasmas de cianobactérias. Essas coleções de germoplasma permitirão assegurar a procura e conservação de novos genes de interesse biotecnológico, como aqueles associados à síntese de substâncias bioativas, tais como as cianotoxinas.

Referências Bibliográficas

Bittencourt-Oliveira, M.C. (2000). Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algolog. Stud.* 99:29-37.

Bittencourt-Oliveira, M.C; Oliveira, M.C.; Bolch, C.J.S. (2000). Sucessão de genótipos de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria/Cyanophyta) em um reservatório eutrófico. Resumos do Seminário Internacional do Instituto Internacional de

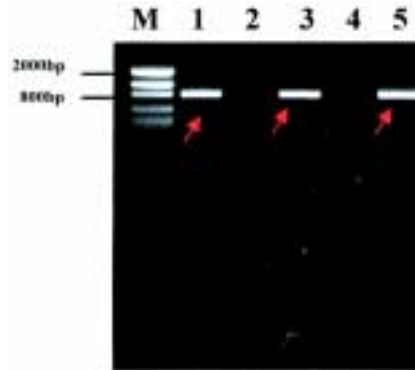


Figura 6. Identificação do marcador molecular *mcxB* em cepas de *Microcystis aeruginosa*. M: Marcador molecular (Gibco BRL). 1, 3 e 5: Cepa tóxica (FCLA236) mostrando o produto amplificado, correspondente ao *mcxB* (setas), utilizando, respectivamente, 100, 20 e 200ng de DNA. 2 e 4: Cepa não tóxica (FCLA30)

Ecologia, São Carlos, SP, Brasil, p. 46.

Bittencourt-Oliveira, M.C; Oliveira, M.C.; Bolch, C.J.S. (2001). Genetic variability of some Brazilian strains of *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanophyceae/Cyanobacteria) using the nucleotide sequence analysis of the intergenic spacer and flanking regions from *cpcBA*-phyco-cyanin operon. *J. Phycol.* 37(5): (in press).

Bittencourt-Oliveira, M.C. & Yunes, J.S. (2001). **Detecção de cianobactérias hepatotóxicas através de marcadores moleculares: dados preliminares. Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Limnologia, João Pessoa, Brasil, p. 230.**

CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (1997). *Manual de Orientações em Casos de Florações de Algas Tóxicas: um Problema Ambiental e de Saúde Pública.* Série Manuais, 14/CETESB. São Paulo

Chorus I. & Bartram J. (eds). (1999). *Toxic Cyanobacteria in water: A guide to the Public Health Consequences, Monitoring and Management.* E & FN Spon, London. p.416.

Cunha, M.C.C. (2000). *Estudo taxonômico de populações de Microcystis spp. (Cyanophyta) utilizando RFLP-PCR.* Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural de Pernam-

buco, Recife, 2000. 73p.

Del Campo, F.F., Sanz-Alfárez, S.; Padilla, C.; Hernández, L.E.; Chahlafi, Z.; Foronda, D.; Sanchis, D. (2001). Molecular characterization and peptide toxin analysis of *Microcystis* strain from a Spanish drinking water reservoir. Fifth International Conference On Toxic Cyanobacteria, Abstract Book, Noosa, Queensland, Australia, Julho 2001.

Dittmann, E.; Neilan, B.; Erhard, M.; Von Döhren, H.; Börner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Mol. Microbiol.* 26: 779-787.

Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, J.; Cardo, D.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, M.B.C.; Melo-Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.; Azevedo, S.M.F.O. & Jarvis, W.R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine.* 36:373-378.

Kotak, B.G., Lam, A. K-Y., Prepas, E.E., Kenefick, S.L. & Hrudý, S.E. (1995). Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. *J. Phycol.* 31:248-63.

Nishizawa, T.; Asayama, M. Fujii, K.; Harada, K.; Shirai, M. (1999). Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126: 520-529.

Nishizawa, T.; Ueda, A.; Asayama, M. Fujii, K.; Harada, K.; Ochi, K. Shirai, M. (2000). Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem.* 127: 779-789.

Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. & Watanabe, M. M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 39-50.

Rouhianen, L. ; Vakkilainen, T.; Siemer, B. Sivonen, K. (2001). Genes Encoding Microcystin Synthesis in *Anabaena*. Fifth International Conference On Toxic Cyanobacteria, Abstract Book, Noosa, Queensland, Australia, Julho 2001.

Song, L.; Pan, H.; Liu, P.; Lei, L. (2001). Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. Fifth International Conference On Toxic Cyanobacteria, Abstract Book, Noosa, Queensland, Australia, Julho 2001.