

Presença de microcistina durante eventos de florações de microalgas na Lagoa de Araruama

Presence of microcystin during events of algal blooms in Araruama Lagoon

Manildo Marcião de Oliveira*
Maria Helena Campos Baeta Neves**
Rodolpho Mattos Albano***
Jayme da Cunha Bastos***
Moacelio Veranio Silva Filho****

Resumo

Florações de microalgas são fenômenos que, não obstante as possíveis causas naturais, são produzidas por ações antropogênicas. Na Lagoa de Araruama, florações ocorridas em 2005 e em anos subsequentes provocaram profunda mudança na comunidade fitoplanctônica¹, desencadeando eventos de mortandade de toneladas de peixes associada à baixa dos teores de oxigênio dissolvido. Além deste, outro efeito nocivo associado às florações é a produção de toxinas tais como as ficotoxinas, produzidas por microalgas eucariotas, e as cianotoxinas, produzidas por cianobactérias. Amostras de peixes (tainha e savelha) e de seston² apresentaram teores de microcistina pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), e uma amostra de seston (São Pedro d'Aldeia em 22/08/07), em período não relacionado à mortandade de peixes, apresentou células que possuem genes que codificam a microcistina sintetase, enzima responsável pela síntese de microcistina. A sucessão de microalgas com concomitante presença de cianobactérias potencialmente tóxicas aponta para o risco de exposição crônica por parte da população que utiliza peixe como principal fonte de proteína.

* Núcleo de Pesquisa em Gestão Ambiental - Unidade de Pesquisa e Extensão Agro-Ambiental – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense – campus Campos-Centro, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil. E-mail: manildo@ig.com.br.

** Departamento de Oceanografia Biológica - Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira – IEAPM.

*** Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - IBRAG - Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

**** Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - ENSP - Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

¹ Comunidade Fitoplanctônica: conjunto de organismos microscópicos marinhos fundamental para cadeia alimentar e para a produção de oxigênio. Disponível em <<http://www.agencia.fapesp.br/materia/12553/divulgacao-cientifica/fitoplancton-em-queda.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2011.

² Seston: Seston ou séston é o conjunto das partículas, orgânicas ou não, que se encontram dispersas na coluna de água e que, para além de poderem constituir alimento para alguns organismos, têm um papel importante na difusão da luz na água e, portanto, na produção primária. Disponível em:

<[Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 5 n. 1, p. 35-45, jan. / jun. 2011](http://www.mt.gov.br/wps/portal?cat=Meio+Ambiente&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FZona+Costeira+e+Marinha%2Fff8374804fe4ae5bfd8bf94d1d615af%2FPUBLISHED&con=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FZona+Costeira+e+Marinha%2Fbb6fba004fe4b1078f939f94d1d615af%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=In_cio&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/portalmt/eMatoGrosso/Estado/Informa__es/Zona+Costeira+e+Marinha.> . Acesso em: 18 fev. 2011.</p></div><div data-bbox=)

Palavras-chave: Cianobactérias. Florações. Toxinas.**Abstract**

Algal blooms are phenomena produced by anthropogenic activities, despite the possible natural causes. In Araruama Lagoon, blooms occurred in 2005 and in subsequent years, causing profound changes in phytoplankton communities. These episodes triggered events of extensive fish mortality associated with low levels of dissolved oxygen. Another adverse effect associated with blooms is the production of harmful toxins such as phycotoxins produced by eukaryotic microalgae and cyanotoxins produced by cyanobacteria. Samples of fish (mullet and menhaden) and seston showed levels of microcystin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), also a seston sample (São Pedro d'Aldeia on 08/22/2007), in a period not related to fish mortality, showed cells which contained genes encoding microcystin synthetase, an enzyme responsible for the synthesis of microcystin. The succession of microalgae with the concomitant presence of potentially toxic cyanobacteria draws attention to the risk of chronic exposure by the population that uses fish as their main protein source.

Key words: Cyanobacteria. Blooms. Toxins.

Introdução

A Lagoa de Araruama é uma laguna hipersalina que, até a década de 80, era caracterizada como ambiente mesotrófico (COUTINHO et al., 1999). Todavia, nos últimos 20 anos, esse ecossistema tem sofrido impactos antropogênicos decorrentes do aumento demográfico sem planejamento, que tornaram o ambiente eutrófico, e provocaram, a partir de 2005, eventos constantes de florações de microalgas. Nos meses em que a intensidade pluviométrica e a luminosa são maiores, ocorre, sistematicamente, mortandade de peixes devido à brusca queda nos níveis de oxigênio dissolvido decorrente desses eventos. Em janeiro de 2007, foi registrado um evento de mortandade na lagoa com mais de 3 toneladas de peixes e crustáceos. Embora os indícios da causa da mortandade tenham recaído sobre o baixo nível de oxigênio dissolvido na água (em alguns pontos da lagoa chegou a 0 ppm), não há um laudo definitivo da causa. A investigação sobre a presença de ficotoxinas tornou-se necessária, pois a laguna abriga algumas espécies de microrganismos potencialmente produtores de substâncias tóxicas, como: *Phormidium* e *Oscillatoria* (cianobactéria), *Prorocentrum* e *Protoberidinium* (dinoflagelados) (OLIVEIRA, 2009). Nessa ocasião, foram coletadas amostras de seston e peixes para análise. O objetivo deste trabalho foi realizar análise de ensaio imunoenzimático (ELISA) para a

presença da hepatotoxina microcistina de cianobactérias e analisar a presença do gene produtor da enzima microcistina sintetase *mcyB* e da ficocianina de cianobactérias na amostra de janeiro (período da mortandade) e de agosto (período sem mortandade) de 2007.

Estado trófico

O estado trófico de um manancial é um conceito híbrido. Refere-se ao *estado nutricional* (especialmente devido ao fósforo) de um lago ou reservatório, mas é sempre descrito em termos da *atividade biológica* que ocorre como resultado dos níveis nutricionais. Os principais estados tróficos são: oligotrófico, mesotrófico, eutrófico e hipertrófico.

Oligotrófico: bordas escarpadas; águas claras; baixo enriquecimento com nutrientes; pouco desenvolvimento planctônico; baixa produtividade; poucas plantas aquáticas; areia ou rochas ao longo da maior parte da costa; peixes de água fria; e elevado teor de oxigênio dissolvido.

Mesotrófico: moderado enriquecimento com nutrientes; moderado crescimento planctônico; alguma acumulação de sedimentos na maior parte do fundo; e, em geral, suporta espécies de peixes de águas mais quentes.

Eutrófico: elevado enriquecimento de nutrientes; muito crescimento planctônico (alta produtividade); extensa área coberta com plantas aquáticas; muita acumulação de sedimentos no fundo; baixos níveis de oxigênio dissolvido no fundo; e contém apenas espécies de peixes de águas quentes.

Hipereutrófico: enriquecimento máximo de nutrientes; número excessivo de algas e plantas aquáticas (ao ponto de impedir ou dificultar a navegação). Exige intervenção do homem.

Fonte: Disponível em : < <http://www.ufrjr.br/institutos/it/de/acidentes/eut.htm> >.
Acesso em: 18 fev. 2011

Metodologia

A Lagoa de Araruama localiza-se entre as latitudes 22°40'-22°57' e longitudes 42°00'-42°23'. Possui 220 km², com profundidade média de 2,5 m.

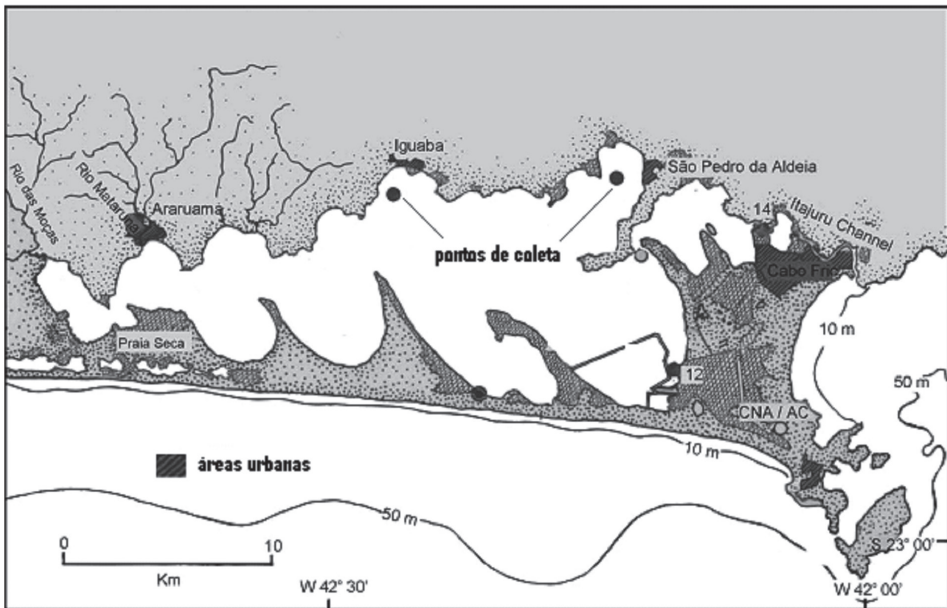


Figura 1: Área de estudo: Lagoa de Araruama
 Mapa adaptado de Souza et al., 2003

Coleta de seston

As amostras de seston (fitoplâncton, zooplâncton e material particulado) foram obtidas por rede de 20 μ m. Após a coleta as amostras foram armazenadas em frascos de polietileno de 250 mL e mantidas em banho de gelo até o laboratório. No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o pellet foi liofilizado e estocado em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a etapa de extração do DNA e preparação de extrato para o ELISA.

Coleta de peixes

Os peixes tainha (*Mugil Liza*) e savelha (*Brevoortia aurea*) foram obtidos durante a mortandade de 16 e 31 de janeiro de 2007. Os espécimes foram coletados e condicionados em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a realização da análise.

Preparo dos extratos de seston e músculo para ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A extração do material liofilizado foi realizada com metanol absoluto contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) na proporção de 50 mg de liofilizado das cianobactérias

para cada 2,5 mL de metanol. Esses extratos foram submetidos ao ultrassom (banho) em frequência máxima por 15 min e deixados em repouso por mais 30 min. Em seguida, os extratos foram centrifugados (500 x g por 10 min) e o sobrenadante foi recolhido. O sedimento da centrifugação foi submetido ao mesmo processo por mais duas vezes. O extrato metanólico obtido foi então evaporado sob corrente de nitrogênio, e o resíduo suspenso em água deionizada. O extrato aquoso assim obtido foi aplicado em uma coluna para *clean up* (C18) e extraído com várias concentrações de metanol em água (10%, 20%, 30% e 100%). As frações obtidas com 100% de metanol foram evaporadas e suspensas em 1 mL de água deionizada e as demais frações foram descartadas.

Quantificação de microcistinas por ELISA - As amostras do séston da Lagoa de Araruama e do músculo dos peixes foram, inicialmente, liofilizadas. A extração da microcistina do séston foi realizada conforme descrito anteriormente. O material de músculo de peixe, após evaporação do extrato metanólico e suspensão do resíduo em água deionizada, foi extraído com hexano na proporção 1:1. Ao final da extração, o extrato metanólico foi evaporado em corrente de nitrogênio e o resíduo ressuspense em 1 mL de água deionizada para a quantificação por ELISA (Microcystin Plate Kit, Envirologix®) de acordo com as instruções do fabricante. Em relação a esse tecido, foi realizada em paralelo a quantificação de microcistinas em peixes (tainhas) de um ambiente de referência (Maricá – RJ). Foi utilizada amostra da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* cepa NPLJ-4 (Laboratório de IBCCF/UFRJ) como controle positivo para a hepatotoxina microcistina.

Marcador Molecular

Extração do DNA

Amostras de 20 mg de seston liofilizado da Lagoa de Araruama foram colocadas em microtubo de 1,5 mL, ressuspensas em 400 µL de água autoclavada. Acrescentaram-se 400 µL de solução fenol:clorofórmio (1:1) em cada microtubo, que foi agitado (Vortex) por 10 s e centrifugado (14.000 rpm por 10 min). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, acrescentando-se 400 µL de clorofórmio. Esse microtubo foi agitado (Vortex) e em seguida centrifugado (14.000 rpm por 10 min). O sobrenadante (350 µL) de cada microtubo foi recolhido, acrescentando-se 35 µL de solução 5 M de acetato de amônio e 2 volumes de etanol absoluto. Esse material foi estocado a -20 °C por 12 horas. O tubo foi então centrifugado (14.000 rpm por 10 min) e o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70%. O precipitado foi então dissolvido em 100 µL de água estéril.

Amplificação por PCR dos genes de microcistina sintetase e ficocianina

As amplificações foram feitas em um volume final de 25 µL. Cada tubo continha 2 µL de DNA (20-50 ng de DNA), 2,5 µL de tampão 10X (Invitrogen), 1 µL de MgCl₂ a 50 mM; 1 µL de dNTP a 5 mM; 15 pmoles do oligonucleotídeo FAA (5 CTATGTTATTTATACATCAGG-3), 15 pmoles do oligonucleotídeo RAA (5 CTCAGCTTAACTTGATTATC 3) estes para o gene da microcistina sintetase (*mcyB*) e as mesmas concentrações de oligonucleotídeo para os PCbF (5 GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3) e PCaR (5-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3) para o gene da ficocianina; 0,15 µL de taq polimerase (0,75 U) e 14,35 µL de água deionizada. Os tubos foram colocados em um termociclador e os parâmetros usados nos ciclos de amplificação foram: desnaturação de 92 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 10 s, 50 °C a 20 s e 72 °C a 60 s. As alíquotas de produtos da reação de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo 10 µg/mL-1 de brometo de etídeo. Após a eletroforese³ o gel foi documentado por sistema digital através do software Kodak Digital Science 1D.

Resultados e Discussão

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado nas amostras de plâncton e indicou a presença de microcistina LR nas coletas de 16 de janeiro (19,9 µg/kg de biomassa seca) e de 31 de janeiro de 2007 (3,4 µg/kg de biomassa seca) com resultados muito abaixo dos valores encontrados em uma biomassa contendo somente células de uma microalga produtora de toxina (NPLJ4 – 374,4 µg/kg de biomassa seca). As amostras de peixe precisaram ser comparadas com controles pescados em áreas reconhecidamente sem florações. Para tanto, foram utilizadas tainhas pescadas no mar de Maricá-RJ. Os resultados da coleta do dia 16 de janeiro indicam a presença de microcistina no músculo de tainha (2,27 µg/kg de biomassa úmida) e de savelha (0,36 µg/kg de biomassa úmida). As amostras de 31 de janeiro de 2007, coletadas no mesmo lugar, deram resultados mais baixos que o controle, sendo consideradas negativas. Magalhães e colaboradores (2001), em três anos de estudo na Lagoa de Jacarepaguá analisando seston, vísceras, fígado e músculo de *Tilapia rendelli*, encontraram em músculo teores médios de 16,2 µg/kg (novembro de 1996), 10,7 µg/kg (janeiro 1997), 29,9 µg/kg (dezembro de 1998 a maio de 1999). Esses valores de microcistina em músculo ultrapassam o TDI (*tolerable daily intake*) - ingestão diária tolerável, recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 0,04 µg/kg/dia para água de consumo humano. Em outro estudo, Magalhães e colaboradores (2003) analisaram seston e músculos de crustáceos e peixes

³Eletroforese: Movimento de partículas em suspensão através de um fluido sob a ação de uma força eletromotriz aplicada a eletrodos em contato com a suspensão. Aplicações importantes são a separação de colóides e a deposição de revestimentos em um dos eletrodos; anaforese. Var: electroforese. Disponível em : < <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=eletroforese> >. Acesso em: 18 fev. 2011.

na Baía de Sepetiba-RJ e encontraram a cianobactéria *Synechocystis aquatilis f. aquatilis* produzindo microcistina. Em 19% dos animais coletados havia teores que superavam a TDI, considerando um adulto de 60 kg que consuma 300 g de músculo. Em nosso estudo, o teor de equivalente de microcistina em tainha e savelha não ultrapassaram a TDI para uma pessoa de 60 kg que consuma 300 g de músculo.

Tabela 1: Amostras para ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Data	Material	Local
16 de Janeiro 2007	Seston	Músculo Iguaba
31 de Janeiro 2007	Seston	Músculo Iguaba

Tabela 2: Amostras para Análise de Marcadores moleculares

Data	Material	Local
16 de Janeiro 2007	Seston	Iguaba
31 de janeiro 2007	Seston	Iguaba
22 de agosto 2007	Seston	São Pedro d'Aldeia
31 de agosto de 2006 e 30 de outubro de 2006	Seston	São Pedro d'Aldeia

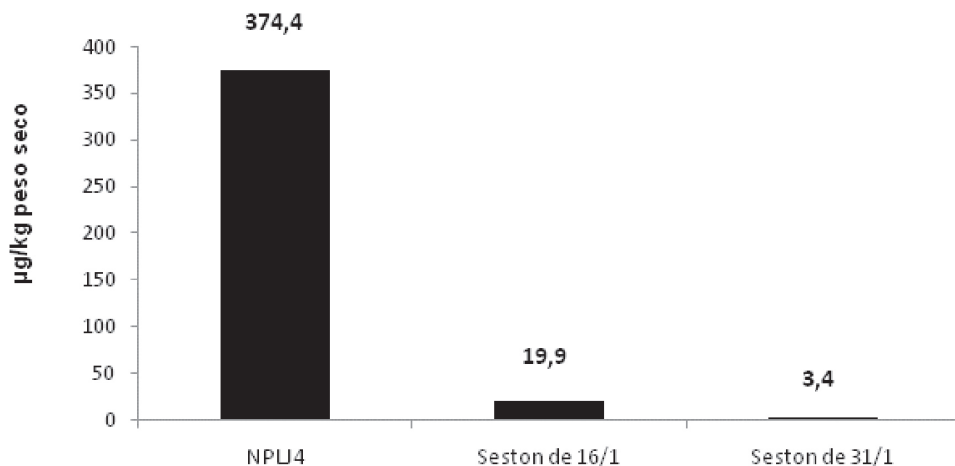


Figura 2: Determinação de microcistina LR pelo KIT ELISA da Envirologix® em amostras de seston coletados na Lagoa de Araruama em janeiro de 2007. Amostra de *Microcystis aeruginosa* da cepa NPLJ-4 (Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de cianobactérias – IBCCF/UFRJ) como controle positivo

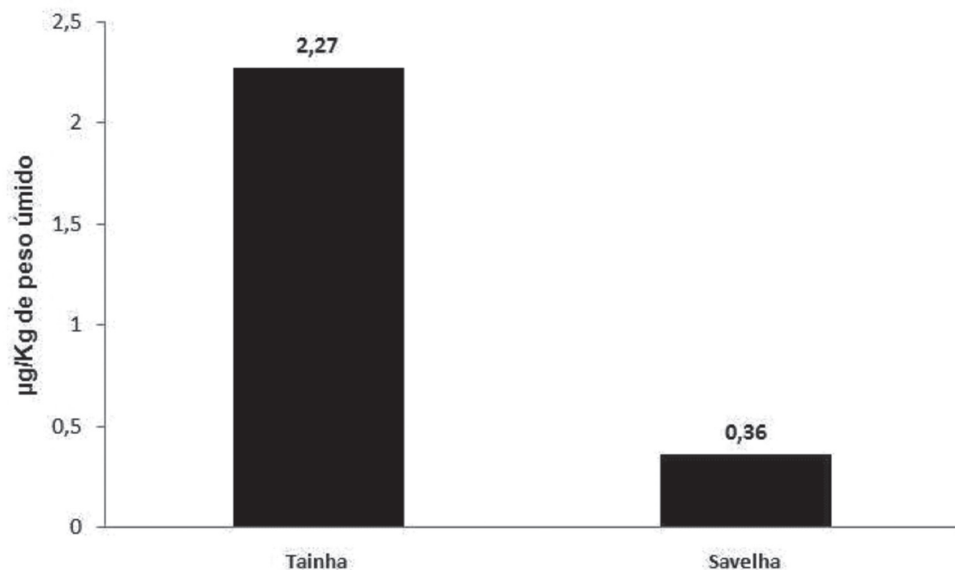


Figura 3: Determinação de microcistina LR pelo KIT ELISA da Envirologix® em amostras de músculo de peixes coletados na Lagoa de Araruama em 16 de janeiro de 2007. Esse método possui sempre uma leitura basal devido ao reconhecimento de epitopos⁴ de outras proteínas pelo anticorpo do kit. A determinação pelo mesmo método em músculo de animais vindos de ambientes reconhecidamente limpos de microcistina permite que essas leituras sejam descontadas

⁴Epitopos: Também conhecidos como determinantes antigênicos, os epitopos são porções do antígeno que reúnem aspectos físicos e químicos que favorecem o reconhecimento a regiões específicas dos anticorpos ou TCR's. Disponível em: < http://www.medicina.ufba.br/imuno/roteiros_imuno/Roteiro%20de%20ant%C3%ADgenos%2002-1.pdf >. Acesso em: 18 fev. 2011.

A amplificação do gene da microcistina sintetase identifica o potencial para produção de microcistina e a amplificação do gene da ficocianina identifica a presença de cianobactérias. O seston coletado na Lagoa de Araruama em 2006 e 2007 apresentou o gene da ficocianina, e somente na amostra de seston coletada no dia 22 de agosto de 2007 em São Pedro D'Aldeia, foi identificada a presença do gene para microcistina sintetase. Bittencourt-Oliveira (2003) determinou por PCR a presença de cianobactérias potencialmente produtoras de microcistina em oito reservatórios de água, sendo que dois eram de abastecimento público e os demais eram usados para recreação e pesca comercial. Nestes sempre houve correlação entre a presença do gene para a enzima microcistina sintetase e a detecção da toxina pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Em nosso estudo tal correlação não ocorreu, talvez pelo tempo de armazenamento a que as amostras liofilizadas de seston mais antigas (2006 e janeiro de 2007) foram submetidas (12 meses). Na laguna de Araruama não foi possível afirmar se a produção de microcistina ocorreu no local ou se a toxina foi arrastada de focos de água doce durante as fortes chuvas de janeiro de 2007. Todavia, o resultado da PCR de 22 de agosto de 2007, período em que a laguna não estava sofrendo com chuvas, fornece indicação considerável sobre a presença constante de espécies de cianobactérias produtoras de microcistina.

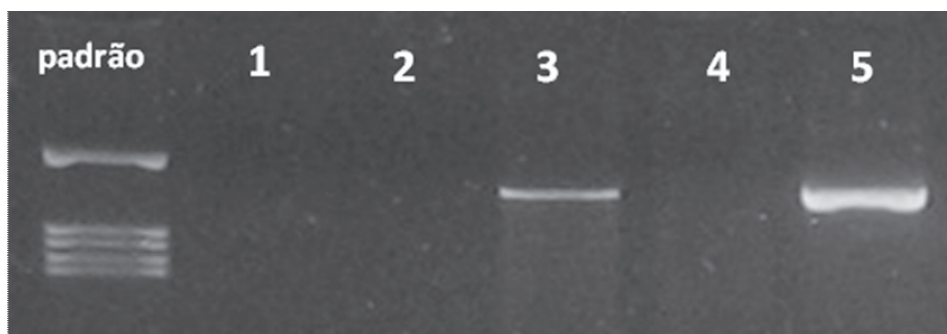


Figura 4: Fluorescência por brometo de etídio em eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando os produtos de amplificação do gene da microcistina sintetase (A).

Oligonucleotídeos: A = RAA e FAA de *Microcystis. aeruginosa* tóxica; padrão = padrão de peso molecular; 1 = 16/01/07 (Iguaba Grande); 2 = 31/01/07 (São Pedro d'Aldeia); 3 = 22/08/07 (São Pedro d'Aldeia); 4 = 31/08/06 e 30/10/06 (São Pedro d'Aldeia); 5 = cepa *M. aeruginosa* NPLJ-4 (UFRJ).

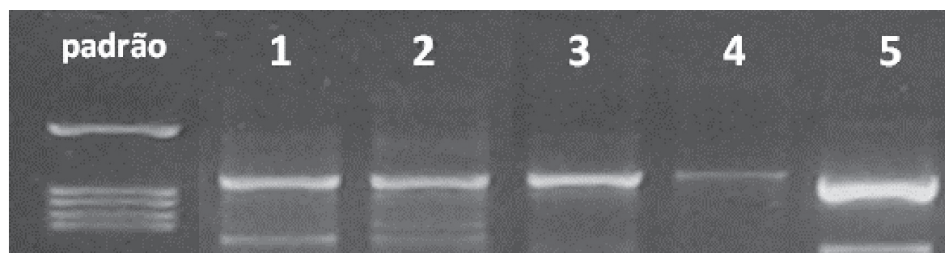


Figura 5: Fluorescência por brometo de etídio em eletroforese em gel 1% de agarose mostrando os produtos de amplificação do gene da ficocianina Oligonucleotídeos: 188F e 254R

Resultados obtidos pelo método ELISA e por marcadores moleculares indicaram a presença de cianobactérias produtoras de microcistinas na Lagoa de Araruama no ano de 2007. Esse registro não é o primeiro, mas é um dos poucos registros da presença de microcistina em ambiente hipersalino. Carmichael & Li (2006) detectaram microcistina LR e YR por ELISA e PCR, e a presença de dois gêneros de cianobactérias, *Synechococcus* e *Oscillatoria*, em um lago hipersalino da Califórnia (*Salton Sea*). Essas cianobactérias foram responsáveis pela morte de um grande número de aves da espécie *Podiceps nigricollis*, que passam por esse local durante sua migração.

Conclusão

Diante dos eventos sucessivos de mortandade de peixes ocorridos na Lagoa de Araruama, as atenções estão voltadas para os processos que limitem a utilização de oxigênio por parte dos organismos aquáticos. Entretanto, o intenso processo de eutrofização ocorrido na laguna, aliado a mudanças nos regimes de chuvas, ventos e nas características físico-químicas e biológicas, propiciaram mudanças marcantes no equilíbrio dos vários níveis (plactônico, bentônico e nectônico), e facilitaram o estabelecimento de diversas espécies de microalgas que se revezam como espécies majoritárias do fitoplâncton. O monitoramento é cada vez mais necessário, pois a simples presença de cianobactérias é preocupante, agravada com a possibilidade da produção de toxinas. Esse fato produz risco de contaminação à população que vive no entorno da laguna e utiliza a pesca de subsistência como atividade econômica.

Referências

BITTENCOURT-OLIVEIRA M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae*, v.2, p. 51–60, 2003.

CARMICHAEL, W.W.; LI, R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. Saline Systems, v.2, n. 5, p.1746-1448, 2006.

COUTINHO, R.; RIBEIRO, P.; KJERFVE, B.; KNOPPERS, B.; MUEHE, D.; VALENTIN, J.L. Araruama uma lagoa ameaçada. Ciência Hoje, v. 25, n. 149, p.24-31, 1999.

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. Toxicon, v.39, p. 1077-1085, 2001.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). Toxicon, v.42, p. 289–295, 2003.

OLIVEIRA, M.M. Enzimas em Organismos Aquáticos sob Efeito de Toxinas de Cianobactérias e Microalgas Marinhas. 2009. 75p. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Biologia: Área de concentração Biociências Nucleares. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA, M. F.L. KJERFVEA, B., KNOPPERS, B. SOUZA, W. F. L.; DAMASCENO, R. N. Nutrient budgets and trophic state in a hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. Estuarine, Coastal and Shelf Science, v.57, p. 843–858, 2003.