

# Influência de fatores climatológicos na ocorrência de microcistina

## Influence of climatic factors on the occurrence of microcystin

RIALA6/1315

Fernando Stopato da FONSECA<sup>1\*</sup>, Valter RUVIERI<sup>2</sup>, Eduardo Makoto ONAKA<sup>1</sup>, Rosana LISBOA Santana<sup>3</sup>, Maria Anita SCORSAFAVA<sup>3</sup>, Myrna SABINO<sup>2</sup>

Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro Avançado do Pescado Continental, Instituto de Pesca, São José do Rio Preto/SP, Brasil. (17) 3232-1777. E-mail: fstopato@pesca.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>CPDSA-LDBR, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 24.02.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

### RESUMO

As toxinas de cianobactérias têm sido um problema de saúde pública pela capacidade de contaminar águas dos reservatórios. Microcistinas (MCs) são compostos fortemente hepatotóxicos produzidos por diferentes cianobactérias, sendo a mais comum a *Microcystis aeruginosa*. Este estudo, realizado em 2005, pesquisou a ocorrência de MCs na região noroeste do Estado de São Paulo, bem como sua relação com a temperatura e o índice pluviométrico. A pesquisa de MCs nas amostras de água foi realizada por meio de ELISA (kit comercial), empregando-se anticorpo monoclonal. As concentrações de MCs mostraram variação temporal e foram relativamente menores durante as altas temperaturas. Apesar da contaminação detectada não ser considerada alta, recomenda-se a realização de constante monitoramento.

**Palavras-chave.** microcistina, *Microcystis aeruginosa*, cianobactéria, floração, ELISA, toxinas.

### ABSTRACT

Cyanobacteria toxins have been a public health problem, due to the ability in contaminating waters of reservoirs. Microcystins (MCs) are strongly hepatotoxic produced by various cyanobacteria, notably *Microcystis aeruginosa*. The present investigation, conducted in 2005, aimed at studying the occurrence of MCs in the northwestern region of São Paulo State, and also its relationship with temperature and rain falls, which favor the development of cyanobacteria. The MCs were determined in water samples by means of commercial ELISA kit using a monoclonal antibody. Concentrations of MCs showed temporal variation and being relatively lower during the high temperatures. In spite of the contamination has not been high, a constant monitoring is recommended.

**Key words.** microcystin, *Microcystis aeruginosa*, cyanobacteria, bloom, ELISA, toxins.

## INTRODUÇÃO

O enriquecimento de nutrientes nas massas de água é um processo natural que pode ocorrer em qualquer sistema aquático. No entanto, uma aceleração desse processo devido às ações antropogênicas tem sido observada nos últimos anos<sup>1</sup>. A ocorrência de florescimentos de cianobactérias em reservatórios eutrofizados tem sido um problema mundial<sup>2</sup>.

A proliferação de cianobactérias em ambientes eutróficos ocorre nos meses favorecidos pela temperatura da água em torno de 22°C, sendo chamada de floração ou proliferação de algas<sup>3</sup>. A cianobactéria *Microcystis* é a espécie mais encontrada em florações nestes ambientes, sendo que a maioria produz toxinas denominadas de microcistinas<sup>4</sup>. De 30 a 50% das espécies de cianobactérias produzem toxinas, entretanto, somente através da análise laboratorial é possível determinar se uma colônia de algas é produtora de toxinas<sup>5</sup>.

As microcistinas, juntamente com as neurotoxinas, são as principais toxinas de cianobactérias e, tanto podem ser letais em baixas concentrações, como, em doses sub-letais, podem levar a alguns tipos de câncer. Essas toxinas são extremamente resistentes e podem bioacumular nos alimentos<sup>6</sup>, como relatado em cultivo de alface irrigado por aspersão<sup>7</sup>.

A maioria das cianobactérias tem maior taxa de crescimento em temperaturas superiores a 25°C<sup>8</sup>, sendo que temperaturas entre 18 e 25°C ajudam na produção de cianotoxinas, enquanto temperaturas abaixo de 10°C e acima de 30°C diminuem sua produção<sup>9</sup>. Em testes laboratoriais para a determinação de produção de cianotoxinas, o parâmetro temperatura, aliado à idade da cultura de cianobactérias é um dos mais estudados, seguido dos parâmetros luminosidade, nutrientes, salinidade, pH e concentração de micronutrientes<sup>8</sup>.

O *bloom* de cianobactérias pode ser favorecido pelo uso excessivo de fertilizantes e esterco em produções agrícolas, que podem vir a contaminar a água na época das chuvas intensas ou tempestades – grande parte das perdas anuais de fósforo da terra pode ocorrer em apenas uma ou duas tempestades<sup>10</sup>, assim como pela baixa pluviosidade<sup>8</sup>.

Atualmente, os métodos mais promissores para quantificação e detecção de microcistinas são aqueles que envolvem imunoenaios, pois são capazes de monitorar nos níveis orientados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são específicos, exigem processo simples de transformação da amostra e são de fácil execução<sup>11</sup>.

Com base nestas informações, os objetivos deste trabalho foram detectar a presença de microcistinas em águas na região noroeste do Estado de São Paulo, local que apresenta poucos dados sobre a floração de cianobactérias e suas toxinas, e avaliar a influência dos fatores climatológicos (temperatura e índice pluviométrico) no desenvolvimento de cianobactérias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área estudada e amostras

Em São José do Rio Preto (SJRP) e região foram escolhidos 10 pontos potencialmente favoráveis à presença de cianobactérias, em três períodos distintos de coleta durante o ano de 2005 (totalizando 30 amostras). A escolha destes pontos foi feita a partir de informações obtidas em relatos pessoais sobre locais onde já ocorreram mortalidade de organismos aquáticos e *bloom* de cianobactérias, devido a diferentes fontes de poluição:

- Industrial (margem do rio Felicidade – SJRP);
- Agrícola (Pólo Centro Norte APTA no trapiche do reservatório em Pindorama);
- Resíduo industrial e extração de areia (margem do rio Turvo, em Icém);
- Aquicultura em tanque-rede (ribeirão Santa Bárbara, em Buritama, na margem e no meio do ribeirão a montante, jusante e dentro da produção);
- Poluição doméstica (reservatório de SJRP, nas barragens da represa nova e velha).

Também foi coletado em ponto que seria inicialmente considerado como controle, localizado em uma reserva ecológica onde não ocorreram *bloom* ou mortalidade de organismos aquáticos, porém descobriu-se possível contaminação ambiental via agricultura e pecuária (Instituto Penal Agrícola IPA-SJRP, no trapiche da represa), sendo então considerado como de contaminação agropastoril.

A Tabela 1 apresenta as indicações de latitude e longitude dos pontos de coleta obtidas por dispositivo GPS (Global Positioning System) IPS-760 – Sony.

Para determinar o período das chuvas e temperatura média mensal foram utilizados dados fornecidos pelo Escritório de Desenvolvimento Rural de São José do Rio Preto e Icém, além de informações do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) na região de Pindorama e de Buritama. Tomando por base esses dados, foram escolhidos três períodos de coleta de água para análise de microcistina, determinação da temperatura da água no local e obtenção da temperatura média e pluviometria com os órgãos já citados.

**Tabela 1.** Localização geográfica dos pontos de coleta

Local	Latitude			Longitude		
Buritama (ponto 1)	21°	0´	945S	50°	4´	211W
Buritama (ponto 2)	21°	1´	81S	50°	4´	568W
Buritama (ponto 3)	21°	2´	85S	50°	4´	960W
Buritama (ponto 4)	21°	0´	966S	50°	4´	610W
Represa velha*	20°	48´	731S	49°	22´	550W
Represa nova*	20°	43´	911S	49°	21´	345W
Pindorama	21°	13´	718S	48°	55´	675W
Rio Felicidade	20°	46´	646S	49°	21´	426W
IPA**	20°	50´	771S	49°	26´	483W
Icém	20°	25´	371S	49°	16´	60W

\*São José do Rio Preto

\*\*Instituto Penal Agrícola

A primeira coleta foi realizada no final de julho e início de agosto, que correspondeu ao período de precipitação e temperatura mais baixo. A segunda coleta foi realizada em outubro, que correspondeu ao começo das chuvas e altas temperaturas. A terceira coleta foi realizada em dezembro, no período de maior índice pluviométrico e de temperatura mais elevada.

Em cada um dos pontos definidos foram coletadas águas superficiais em potes de 100 mL. Em todas as 30 amostras foram efetuadas as análises de microcistina.

### Quantificação das microcistinas

Todas as amostras foram resfriadas e, posteriormente, congeladas em laboratório, sendo sonicadas antes da análise em disruptor de células ultrassônico durante 20 minutos, para homogeneizar a amostra e liberar a microcistina.

Para a quantificação foi utilizado o protocolo do Kit Beacon de Análise de Microcistina Totais em placa de imunoafinidade - Kit ELISA, sendo as amostras analisadas em triplicata. Este kit possui limite de quantificação (LQ) de 0,1 µg/L e limite de detecção (LD) de 0,083 µg/L, controle negativo (0 µg/L de microcistina LR), padrão de microcistina-LR de 0,1 µg/L, 0,3 µg/L,

0,8 µg/L e 2,0 µg/L e controle interno de microcistina de 1 µg/L.

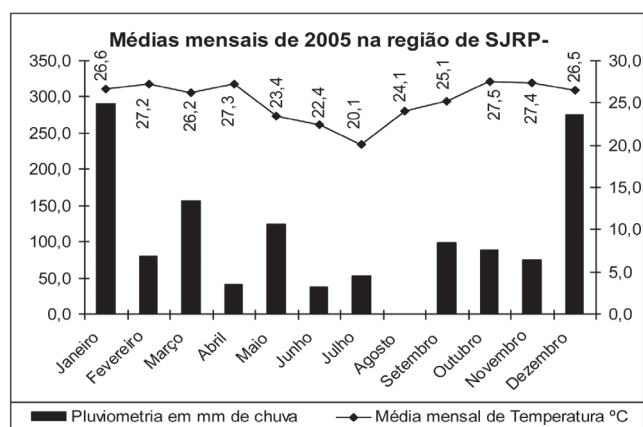
### Análise estatística

Foi realizada através do sistema de análise estatística SAS para Correlação de Pearson.

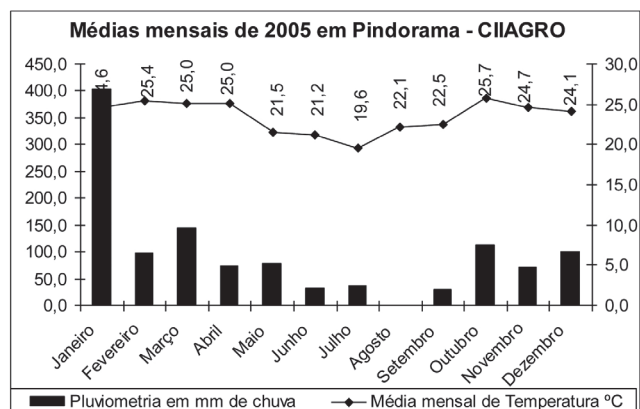
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período do estudo foi possível observar menor pluviosidade devido, aos efeitos de *La Niña*, fenômeno que esfria a massa de ar a partir do Oceano Pacífico e provoca chuvas na região nordeste do país, seca na região sul e deixa o ano atípico.

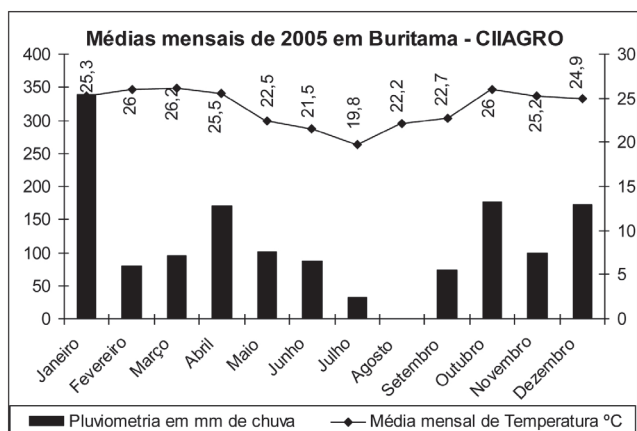
As chuvas que normalmente começam em setembro e, gradualmente, aumentam mês a mês até dezembro, tiveram um desempenho variável (Figuras 1, 2 e 3). A precipitação total no período de julho a dezembro de 2005 foi de 589,7 mm, em SJRP, 553,6 mm em Buritama e 350,5 mm em Pindorama. As maiores taxas de precipitações foram 275 mm na região de SJRP (em dezembro), 172 mm em Buritama (em dezembro) e 112,1 mm em Pindorama (em outubro), enquanto a menor pluviosidade verificada em SJRP e em Buritama foi 0 mm (em agosto) e 0,7 mm em Pindorama.



**Figura 1.** Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de São José do Rio Preto, em 2005 (fonte: Escritório de Desenvolvimento Rural de São José do Rio Preto)



**Figura 2.** Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de Pindorama, em 2005 (fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - CIIAGRO)



**Figura 3.** Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de Buritama, em 2005 (fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - CIIAGRO)

As temperaturas médias mais altas foram verificadas durante o estudo em outubro – 27,5°C na região de SJRP, 26,2°C na região de Buritama e 25,7°C em Pindorama – enquanto as temperaturas mais baixas foram verificadas em julho – seguindo a mesma ordem: 20,1°C, 19,8°C e 19,6°C.

A temperatura da água não foi constante durante o experimento (Tabela 2), sendo verificadas diferenças entre os pontos e o período de coleta. A temperatura da água não foi considerada homogênea, devido às diferentes profundidades dos corpos d’água e à incidência de chuvas.

Desta forma, podemos teorizar que a temperatura pode ser um fator limitante para o crescimento de organismos aquáticos nessas regiões, sendo que apenas espécimes resistentes apresentam vantagens nessas condições. De acordo com Kamogae et al<sup>12</sup>, o melhor desenvolvimento das cianobactérias ocorre em água pouco turbulenta com temperaturas entre 18°C e 30°C, condições estas muito próximas às verificadas no período deste estudo, em todos os pontos.

A curva padrão da microcistina foi construída conforme procedimento indicado no kit, utilizando seus padrões e ajuste por análise de regressão não linear. Os resultados obtidos indicaram leitura do controle interno de microcistina 1 µg/L, dentro da faixa recomendada pelo kit (0,8 a 1,3 µg/L), e com a seguinte equação da reta para cálculo da concentração de microcistina nas amostras:  $Y = -49189X + 42766$ , onde X é o logaritmo da concentração da amostra, Y é a leitura de absorbância da amostra ( $r = -0,9983$ ). A Tabela 2 apresenta também os valores médios de concentração de microcistina obtidas nas amostras.

A detecção de microcistinas deve servir como advertência às instituições que trabalham com saúde pública. No ponto de Pindorama foram detectadas concentrações de microcistinas acima do limite máximo recomendado pela OMS, de 1 mg/L de água potável, sendo esta uma região onde os residentes queixam-se de frequentes *blooms* de algas em reservatórios e lagos, utilizados em atividades recreativas, como pesca e natação e/ou utilizados como fonte de água para produção agropastoril.

Apesar desta elevada prevalência, 73% de presença de microcistina, não foram encontrados valores elevados de microcistina como aqueles obtidos por Kamogae et al<sup>12</sup> na represa de Itaipu em Santa Terezinha/PR, cuja concentração foi de 30236 µg/L. Entretanto, a concentração obtida na região de São José do Rio Preto, de 3,18 µg/L, foi acima daquela encontrada por Kamogae et al<sup>12</sup> em Capivari/PR, de 1,7 µg/L.

**Tabela 3.** Temperatura da água (em °C) verificada durante a coleta e concentração média de microcistina obtida nas amostras

Amostra	Temperatura (°C)			Concentração (µg/L)*		
	Agosto	Outubro	Dezembro	Agosto	Outubro	Dezembro
Buritama 1	20,4	27,2	26,1	0,28	0,17	0,32
Buritama 2	20,5	27,1	26,1	0,16	0,16	0,38
Buritama 3	20,5	27,1	26,4	0,14	0,12	0,31
Buritama 4	20,4	27,3	26,1	0,13	0,19	0,31
Represa Velha <sup>#</sup>	20	24,8	27	0,09	0,10	0,09
Represa Nova <sup>#</sup>	19,8	24,9	25,7	0,10	ND**	ND**
Pindorama	19,8	28,2	26,9	3,18	0,58	1,39
Felicidade	18,2	23,3	24	ND**	ND**	1,50
IPA <sup>##</sup>	21	32,7	26,9	0,34	0,54	ND**
Icém	18,4	26	25,9	0,29	ND**	2,47
Controle do kit				0,82		

Limite de quantificação (LQ): 0,1 µg/L

Limite de detecção (LD): 0,083 µg/L

<sup>#</sup>São José do Rio Preto

<sup>##</sup>Instituto Penal Agrícola

\*Média das triplicatas

\*\*ND = não detectado

O resultado do teste ELISA revelou uma variação média das concentrações de microcistina em amostras entre 0,09 µg/L em SJRP, e 3,18 µg/L em Pindorama, durante o período que diminuiu com o aumento da temperatura da água. Por outro lado, quando a temperatura da água diminui, a concentração de microcistina aumentou de forma significativa ( $p < 0,01$ ). Isto indica que a temperatura mais alta pode diminuir a produção de microcistina, entretanto é prudente verificar este fato mais detalhadamente.

O índice pluviométrico, que também está relacionado negativamente com a temperatura ( $p < 0,01$ ), pode ter influenciado a produção de microcistina, pois no período de amostragem, a concentração da microcistina na água pode ter sido diluída pela chuva, que também contribuiu na queda da temperatura. No último período, o decréscimo da temperatura e pluviosidade contribuíram para o aumento da concentração de microcistina.

A correlação negativa entre a temperatura (°C) e microcistina (52%), com nível de significância de 1%, pode ter ocorrido devido às altas temperaturas encontradas no local (acima de 22°C), que poderia ajudar no crescimento e reprodução de cianobactérias<sup>3</sup>.

A ocorrência de *bloom* foi observada com muita frequência em Pindorama nos anos anteriores. A concentração máxima de microcistina durante o período

de monitoramento chegou a 3,18 µg/L. Esta concentração é superior ao limite de segurança de 1 µg/L proposto pela OMS para água potável.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram a presença de cianotoxinas na região noroeste do Estado de São Paulo, em concentrações que apresentaram variação temporal e foram relativamente mais baixas durante as altas temperaturas para aquela região.

Embora o nível de contaminação de microcistina na região noroeste do Estado de São Paulo não tenha sido elevado, os resultados deste estudo indicam que, considerando o risco que a presença de microcistinas oferece ao ecossistema aquático e à saúde da população, é necessário o monitoramento rotineiro da concentração de microcistinas e o controle da taxa de eutrofização da água na região noroeste do Estado de São Paulo.

Apesar da legislação nacional para água potável determinar o valor máximo permitido de microcistina de 1 µg/L, não há limites definidos de microcistina para mananciais. Este estudo sugere que tal limite deve ser estabelecido, considerando que essas águas servem para irrigação e outros usos primordiais à humanidade.

---

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Maria do Rosário Lopes e Dra. Cecília Cristina Marques dos Santos pela guarda das amostras coletadas no presente trabalho e ao Dr. Titan (EUA) por ceder o kit de ELISA.

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto de Pesca APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) (Projeto nº 2195) e pelo Instituto Adolfo Lutz (projeto CCD-BQ nº 03/05).

---

### REFERÊNCIAS

1. Vieira JMS, Azevedo MT, Azevedo SMFO, Honda RY, Corrêa B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon*. 2005; 45:901-9.
2. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol*. 1992; 72: 455-9.
3. Kamogae M. Monitoramento de microcistina e estudo de parâmetros que favorecem o seu desenvolvimento em represa de Itaipu, Capivari e Três Bocas [tese de doutorado]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2002.
4. Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(2):787-95.
5. Ferreira RR, Cavenaghi AL, Velini ED, Corrêa MR, Negrisoli E, Bravin LFN et al. Monitoramento de fitoplâncton e microcistina no Reservatório da UHE Americana. *Planta Daninha*. 2005; 23(2):203-14.
6. Aboal M, Puig MA. Intracellular and dissolved microcystin in reservoir of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*. 2005; 45: 509-18.
7. Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 1999; 37(8): 1181-5.
8. Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.25-54.
9. Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial Toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.55-124.
10. Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. Human Health Aspects. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.125-160
11. McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 203, 219-30.
12. Kamogae M, Hashimoto H, Pádua CG, Soares FS, Bracarense APFL, Yabe MJS et al. Monitoring microcystin and physicochemical parameters: Role of agricultural-aquaculture activity in the water quality. In: Njapau H, Trujillo S, van Egmond HP, Park DL, editors. *Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management*. Proceedings of the XI<sup>th</sup> International IUPAC. EUA: Maryland; 2004.p.17-21.