

TOXINES CIANOBACTERIALS. PART II: FACTORS AMBIENTALS DECISIUS EN LA PRODUCCIÓ I L'ESTABILITAT DE LES MICROCISTINES

Maria del Carme Riva, Laboratori de Toxicologia Ambiental (INTEXTER, UPC),
Ctra. nac. 150, km 14,5, 08220 Terrassa

Els factors ambientals, tant físics com químics, són decisius en el creixement i en la producció dels cianobacteris. Això implica que les cianotoxines, i entre elles les microcistines, estiguin també influïdes pels factors que envolten l'hàbitat dels cianobacteris.

Segons la revisió feta per Christoffersen el 1996 [1] es coneix que a partir de mostres de *blooms* tòxics naturals recollides a vint llocs diferents d'ambdós hemisferis, les concentracions de toxines varien entre 3 i 8.600 µg/g de pes sec de cianobacteri. La diferència en el rang de concentracions és prou elevada, i per això es dedueix que són molts els factors que influeixen en els nivells de concentracions.

Introducció

Molts dels afloraments d'algues o *blooms* han estat detectats durant els períodes estivals i mostrejats de la superfície de l'aigua. En aquestes dades cal tenir en compte el factor de dilució per a tota la columna d'aigua, per poder apreciar la concentració real de la toxina.

Resulta difícil poder comparar els valors de concentració de toxina, ja que sempre hi ha diferències en la presa de mostra, en la instrumentació i en els mètodes de detecció. Si que es pot observar clarament, però, que la majoria d'aquests *blooms* contenen hepatotoxines i, sobretot, microcistines (-RR, -LR, -YR), i d'aquest tipus de dades prové la importància d'estudiar aquestes cianotoxines abans que d'altres.

Pel que sembla, la producció de toxines varia segons les estacions, probablement a causa de la variació dels factors que influeixen en la formació i la producció de les toxines algars. Els pics mesurats en la producció de toxines coincideixen generalment amb les mesures preses en períodes estivals, quan la radiació és més gran i el moviment de l'aigua és més estable, factors que segurament afavoreixen el creixement de cianobacteris. No obstant això, els pics de concentració de tòxic no sempre coincideixen amb els

pics de producció de biomassa cianobacterial, segons un estudi fet en un llac de Dinamarca [1]. La toxicitat dels cianobacteris varia per setmanes i per anys, i es conclou que encara no es coneixen les influències que aquests factors poden tenir sobre la producció de les cianotoxines.

D'altra banda, moltes vegades s'han donat casos de trencaments de *blooms*, a causa d'un descens de la radiació solar o d'una desestabilització de la columna d'aigua, cosa que ha permès que la toxina sigui alliberada dins l'aigua. Hi ha poques referències sobre concentracions de toxines dins l'aigua, però en alguns estudis es parla de concentracions superiors als 19 µg/l [1].

Els factors fisicoquímics que, en general, controlen els *blooms* dels cianobacteris es mostren a la taula 1 [1].

La turbulència: un important factor de limitació

Un factor important en el comportament dels cianobacteris és la seva capacitat de flotació, que fa que s'acumulin a la superfície de l'aigua i que amb el vent aconseguixin concentracions altes a les ribes. Els cianobacteris tenen la capacitat de controlar la seva flotació variant les vacuoles de gas. Gràcies a aquesta capacitat de controlar la seva posició en la columna d'aigua, les pèrdues de cianobacteris per sedimentació són negligibles [3]. L'estudi fet per Heiskanen i Ollin indica que en condicions deficientes de nitrogen i a radiacions elevades, certes poblacions de cianobacteris perden aquesta capacitat de flotació i s'enfonsen [3].

A causa d'aquesta propietat de control, els processos de mescla naturals verticals i horitzontals en les aigües (vent o marea), en el cas de cianobacteris marins, no generen efectes negatius en les poblacions de cianobacteris. Però s'ha comprovat que en aigües molt turbulentes aquesta capacitat de flotació es veu vençuda per la mescla violenta, i això representa un problema per al creixement d'aquestes poblacions, ja que les cèl·lules es veuen obligades a

competir pels nutrients i per les fonts o focus de radiació. Aquestes circumstàncies no afecten la resta del fitoplàncton, ja que aquest és capaç d'adaptar-se a condicions variables de nutrients i de llum. Aquest fet ha permès desenvolupar tècniques aplicables al control dels *blooms* en les aigües. Tractant les aigües amb un sistema d'agitació artificial continu durant els períodes favorables al seu creixement (primavera, estiu) s'aconsegueix una gran reducció de la població. En tractaments per agitació, discontinus, no s'aconsegueix l'efecte desitjat, perquè els cianobacteris tornen ràpidament a surar quan s'atura l'agitació.

Si l'agitació és lleugera, es pot aconseguir l'efecte contrari, ja que aquesta mescla suau promou la creació de zones en què els cianobacteris i els bacteris heteròtrofs es beneficien mútuament, suavitzant les condicions de manca de nutrients i afavorint el creixement cel·lular.

En canvi, els augments inesperats de la turbulència poden inhibir el creixement, ja que una turbulència excessiva causa disgregacions i danys en les cèl·lules i els filaments, a més de trencar les relacions amb els bacteris heteròtrofs. L'agitació excessiva també trenca les unions entre els heritròcits del cianobacteri que fixen el nitrogen i les cèl·lules vegetals, per raó de la seva feblesa. Aquesta ruptura fa que els heritròcits perdin la capacitat de fixar el nitrogen i siguin expulsats.

A continuació es mostren les dades recollides d'un estudi sobre l'impacte de la velocitat d'agitació en el trencament dels filaments que fixen el nitrogen a la clorofil·la (taula 2) [2].

Efectes de la llum en la descomposició i la isomerització de les toxines

En el transcurs de l'aïllament de microcistines d'un *bloom* natural, es van aïllar isòmers geomètrics de la microcistina-LR i de la M-RR. Aquests isòmers es van identificar com un canvi en la disposició geomètrica del doble enllaç (carboni 6). Es van anomenar 6(Z)-Adda microcistina-LR i 6(Z)-Adda microcistina-RR. Al Japó, els *blooms* naturals contenen normalment d'un 5 a un 15 % d'aquests isòmers. En l'estudi que es va fer sobre aquests isòmers geomètrics [4], es va identificar quin era l'efecte de la radiació solar en la isomerització i/o descomposició de les microcistines.

Els cianobacteris tenen diversos pigments per a la fotosíntesi, entre els quals es troben la clorofil·la a i el B-carotè. També s'han avaluat els efectes que aquests pigments poden tenir a diverses concentracions en la fotòlisi de la microcistina durant un període de quinze dies.

Els resultats de l'estudi van indicar:

a) Respecte a la degradació

a.1) La mostra de microcistina amb l'isòmer és estable sota les condicions de radiació solar.

a.2) La presència de pigments influeix favorablement en la descomposició i, segons quin sigui el pigment, la descomposició és major, malgrat que el grau de descomposició no sigui gaire elevat.

a.3) A més concentració de pigment, major grau de descomposició. Després de 29 dies, en les concentracions de 5 i 1 mg/ml només restava un 5 % de microcistina-LR.

TAULA 1. Factors que intervenen en el comportament dels cianobacteris

| FACTORS | | IMPACTES I EFECTES | |
|--|--|---|--|
| FACTORS FÍSICS | | | |
| Alteració del temps de residència de l'aigua | | Eliminació important dels <i>blooms</i> , si el temps de retenció n'impedeix la taxa de regeneració | |
| Mescla vertical a llarga escala | | Contraresta l'acumulació a la superfície dels <i>blooms</i> , creant forces competitives entre els cianobacteris pels nutrients i la llum | |
| Turbulència a petita escala | | Trenca els filaments dels cianobacteris, les colònies i les associacions que puguin tenir amb altres espècies de la microflora i la microfauna aquàtica | |
| Reducció de la superfície de radiació solar | | Pot alterar la composició del fitoplàncton i afectar negativament la taxa superficial de cianobacteris | |
| Temperatura | | Generalment, temperatures superiors a 20 °C afavoreixen el creixement de <i>blooms</i> | |
| FACTORS QUÍMICS | | | |
| Modificacions del pH | | Es pot alterar la comunitat del fitoplàncton segons el pH: el pH àcid (< 6) afavoreix els organismes eucariòtics i el pH (> 8) bàsic afavoreix els cianobacteris | |
| Entrada de nutrients (N i P) | | A llarg termini, la limitació de N i P resulta efectiva en la reducció dels <i>blooms</i> . Relacions baixes de N:P (< 20) poden potenciar la formació dels <i>blooms</i> | |
| Salinitat | | Una salinitat en excés de l'ordre de tant per cent (NaCl, p. ex.) pot ser un impediment per al desenvolupament d'algunes espècies de cianobacteris | |
| Metalls (a escala de traça) | | Sota condicions d'altres càrregues de N i P, la disponibilitat restringida de Fe pot controlar el creixement | |

b) Respecte a la isomerització

b.1) Els dos compostos es van isomeritzar gradualment fins que al cap de 18 dies van arribar a una espècie d'equilibri, amb presència de pigments que poden ser extrets amb aigua.

b.2) La taxa d'isomerització depèn proporcionalment de la concentració de pigment fins a vuit dies d'exposició. Després d'aquest temps, les dues toxines es descomponen completament.

Tot això indica que, en aquestes condicions, la microcistina-LR i la 6(Z) microcistina-LR es descomponen i s'isomeritzen simultàniament. La isomerització depèn de la concentració i del tipus de pigment i només es forma aquest isòmer geomètric. La microcistina-RR i la microcistina-YR van presentar el mateix comportament que la microcistina-LR.

Es va determinar la toxicitat (ratolí i. p.) de l'isòmer aïllat, de la microcistina-LR pura i de la microcistina-LR amb l'isòmer. La prova amb la 6(Z) microcistina-LR va donar un resultat de no tòxic (això indica que la posició geomètrica 4(E), 6(E) de l'Adda és decisiva en el seu efecte tòxic). En canvi, la toxicitat de la microcistina amb l'isòmer va donar una toxicitat semblant a la de la microcistina-LR pura. Això indica que en la mescla l'isòmer es torna a isomeritzar com a microcistina-LR.

Efectes del pH i de la temperatura

En l'estudi fet per Harada *et al.* [5], l'objectiu principal del qual era determinar quines eren les influències que podien tenir el pH i la temperatura en la descomposició de les toxines, es van exposar mostres de microcistina-LR pura (extretes d'un *bloom* que contenia, majoritàriament, *Microcystis*) a diferents condicions de pH i de temperatura. Aquestes condicions per trobar l'estabilitat de la microcistina-LR eren a pH 1, 5, 7 i 9 i a les temperatures de 5, 20, 30 i 40 °C.

S'ha pogut observar que les condicions òptimes per a la degradació de la toxina no són precisament les condicions habituals a què es veu exposada dintre l'aigua (pH = 9-10 i T^a = 20-30 °C). El percentatge més alt de degradació té lloc a una temperatura de 40 °C tant a pH = 1 com a pH = 9 [5]. Després d'aquestes exposicions, es van preparar els compostos de cada mostra i posteriorment es van identificar mitjançant la tècnica de la ressonància magnètica nuclear. Els compostos trobats són els següents: microcistina LR, MW 994; MW 942; MW 1008; MW 1012; MW 629 i MW 616 [5].

En la preparativa de la microcistina per HPLC, el tòxic va estar en contacte amb la fase mòbil (62:38 MeOH: H₂O, 0,05 % TFC) durant set dies a la temperatura ambient. Durant aquest període de temps es va observar que la microcistina-LR s'isomeritzava fàcilment en l'isòmer 6-monometilo ester sota aquestes

condicions. Més tard es va fer un test de toxicitat de l'ester (en ratolí i. p.), que va donar com a resultat una toxicitat menor que la microcistina-LR (DL >3 mg/kg a una concentració superior a 10 nM).

Les conclusions d'aquest estudi van ser les següents:

1. Les hidrolitzacions inicials es produeixen en el medi del Mdha per formar uns pèptids lineals; perquè el Mdha és una estructura namida i, per tant, fàcil de trencar pel doble enllaç.

2. Amb la presència de metanol i en condicions àcides, l'esterificació predomina sobre la hidròlisi.

3. El temps de vida mitjana de la microcistina-LR és, aproximadament, d'unes deu setmanes, en condicions similars a les ambientals.

4. El metil ester resultant no és tòxic i no provoca efectes d'inhibició en la proteïna fosfatasa 1 i 2A. Malgrat no haver-se assajat la toxicitat dels pèptids lineals formats, alguns pèptids lineals han estat aïllats a partir de la *Nodularia spumigena* Mertens i de *blooms* de *Microcystis* i en cap cas no han resultat tòxics [6, 7].

TAULA 2. Impacte de la velocitat d'agitació en el trencament dels filaments que fixen el N₂ a la clorofil·la a [2]

| VELOCITAT D'AGITACIÓ DE LA NITROGENASA | ACTIVITAT DE LA NITROGENASA (mmol C ₂ H ₄ /mg clorofil·la a/hora) |
|--|---|
| 50 | 7,5 ± 0,5 |
| 100 | 7,2 ± 0,7 |
| 250 | 5,8 ± 1,2 |
| 400 | 3,2 ± 0,5 |
| 550 | 2,4 ± 0,7 |
| 750 | 1,2 ± 0,4 |

Salinitat

Es parla de la salinitat com d'un potent regulador de la fixació de nitrogen, ja que, pel que sembla, aquests organismes són bastant sensibles a les condicions osmòtiques. Alguns *blooms* d'espècies de cianobacteris formats en aigües dolces han presentat una alta sensibilitat respecte a concentracions de %0 de NaCl en llançar-se a l'interior de diverses aigües marines [8, 9].

Concentració de ferro (Fe)

Juntament amb el N₂ i el P, el ferro és un dels elements que més limita el creixement dels cianobacteris en els medis aquàtics. El ferro és un component de les proteïnes que formen part del procés de la fotosíntesi, de la respiració biosintètica cromòfora i de la síntesi dels desoxiribonucleòides [10]. Les conseqüències sobre el cianobacteri per la variació de la concentració de Fe en les aigües són una mica contradictòries. Utkilen i Gjølme [11] van trobar una disminu-

ció en la producció de toxines en un cultiu de *Microcystis aeruginosa* en el qual es va donar una concentració de Fe de 10 a 0,3 µM de FeCl₃. Per una altra banda, Lukac i Aegerter [12] van trobar que la *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 creixia més lentament, però produïa més toxines en haver-hi major concentració de Fe. Aquesta contradicció podria ser deguda al fet que en el primer cas el cultiu era en continu, mentre que en el segon era en discontinu. El comportament de les cèl·lules en cultius continus i discontinus és diferent i això pot ser la causa de les diferències esmentades.

Un estudi més recent que pretenia aclarir aquestes discrepàncies, efectuat per Lyck *et al.* [13], ha demostrat que durant períodes de baixes concentracions de Fe la quantitat de proteïnes en el cultiu disminueix i la producció toxina/proteïna augmenta. En èpoques en què la quantitat de Fe és elevada, l'efecte és el contrari: la quantitat de proteïna augmenta, però la proporció toxina/proteïna disminueix.

Sulfats

A dosis elevades de SO₄²⁻ en aigua, es pot inhibir la fixació de nitrogen, ja que el sulfat té una estructura semblant a la del MoO₄²⁻, que és molt necessari per a la fixació del nitrogen, i per això es crea una relació competitiva entre els dos anions, tot provocant una inhibició de la fixació [9].

Conclusió

Per tot el que s'ha exposat, es pot indicar com a conclusió que la presència de cianotoxines, entre les quals les microcistines, es veu influïda per tots els factors ambientals que envolten l'hàbitat dels cianobacteris.

Agraïments

Aquest treball forma part de l'estudi finançat per la CICYT, Projecte AMB 96 - 0987. L'autora agraeix al senyor Domingo Bayona i a la senyora Nelida Bofill la seva col·laboració en la cerca bibliogràfica.

Bibliografia

1. CHRISTOFFERSEN, K. (1996). «Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs». *Phycologia*, vol. 35, supl. 6, p. 42-50.
2. PEARL, H. W. (1996). «A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater estuarine and marine environments». *Phycologia*, vol. 35, supl. 6, p. 25-35.
3. HEISKANEN, A.; OLLIN, K. (1996). «Sedimentation of *Aphanizomenon* cf. *flos-aquae* Nostocales, (Cyanophyta) in nutrient - replete and nutrient - depleted coastal area of the Baltic Sea». *Phycologia*, vol. 35, supl. 6, p. 94-101.
4. TSUJI, K.; NALTO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M.F.; SUZUKI, M.; HARADA, K. 1994. «Stability of Microcystins from *Cyanobacteria*: Effect of the light on Decomposition and Isomerization». *Environmental Science Technology*, vol. 28, p. 173-177.
5. Harada, K.; Tsuji, K.; WATANABE, M. F.; KONDO, F. (1996). «Stability of microcystins from cyanobacteria-III. Effect of pH and temperature». *Phycologia*, vol. 35, supl. 6, p. 83-88.
6. RINEHART, K. L.; NAMILOSHI, M.; CHOI, B. W. (1994). «Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria)». *Journal of Applied Phycology*, vol. 6, p. 159-176.
7. CHOI, W.; NAMILOSHI, M.; SUN, F.; RINEHART, K. L.; CARMICHAEL, W. W.; KAUP, A. M.; EVANS, W. R.; BEASLEY, V. R. (1993). «Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins, nodularin and microcystins». *Tetrahedron Letters*, vol. 34, p. 7881-7884.
8. PEARL, H. W.; BLAND, P. T.; BLACKWELL, J.; BOWLES, N. D. 1984. «The effects of salinity on the potential of a blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) bloom in the Neuse river estuary, N. C.». *North Carolina Sea Grant Report* [Carolina del Nord; EUA], 84-1, p. 84.
9. HOWARTH, R. W.; COLE, J. J. (1985). «Molybdenum availability, nitrogen limitation, and phytoplankton growth in natural water». *Science*, vol. 229, p. 653-655.
10. STRAUSS, N. A. (1994). «Iron deprivation: physiology and gene regulation». A: Bryant, D. A. [ed.]. *Molecular Biology of Cyanobacteria*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, p. 731-750.
11. UTKILEN, H.; GJOLME, N. (1995). «Iron stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, p. 797-800.
12. LUKAC, M.; AEGERTER, R. (1993). «Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*». *Toxicon*, vol. 31, p. 293-305.
13. LYCK, S.; GJOLMEN, N.; UTKILEN, H. (1996). «Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae)». *Phycologia*, vol. 35, supl. 6, p. 120-124.