**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de
abastecimento público de água**

Marina Gumiere Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

Marina Gumiere Alves
Licenciatura em Ciências Biológicas

Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Orientadora:
Profª. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Alves, Marina Gumiere

Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água / Marina Gumiere Alves. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.

103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Biodegradação 2. Cianobactérias 3. Cromatografia líquida de alta eficiência
4. Microbiologia da água 5. RNA ribossômico 6. Toxinas I. Título

CDD 589.46
A474d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais Edimilson e Eva,
Aos meus irmãos Silvio e Thiago,*

*Sem vocês eu não teria chegado até aqui...
Por fazerem tudo valer à pena.*

Dedico

*Ao meu filho Henrique,
Hoje meu maior projeto, hoje minha vida...*

Com todo o meu amor

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação, oportunidade e apoio;

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares, pelo apoio e incentivo;

À Dra. Maria Estela Stenico pelas contribuições indispensáveis, sugestões, auxílio, revisão da tese e principalmente por sua amizade e paciência;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À Coordenação do PPG- Microbiologia Agrícola e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade da realização deste projeto;

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo pelo auxílio com as análises de LC/MS/MS;

Ao doutorando Danillo Alvarenga pelo auxílio com as análises de sequenciamento, revisão da tese e principalmente por sua amizade e apoio;

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Caroline Hoff, Caroline Pamplona, Adriana, Elaine, Diego, Marcelo, Ana Paula, Janaina, Mariana, Bruna, Isabela, Paula e Ana Claudia, pelo companherismo e por terem me recebido de braços abertos;

As queridas Luciana Mecatti e Natalia Nardelli pela alegria e principalmente pela amizade;

Aos amigos Dr. Luiz Humberto Gomes, Ana Maria Giacomeli e Marcos Gorga pela amizade, carinho e apoio;

Ao meu marido Edson, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida;

A minha amiga Annelise (Aspira) pelo auxílio com o inglês e principalmente pelo apoio e torcida;

Aos compadres Rafael e Clarissa por me fazerem sorrir nos momentos mais difíceis;

Ao meu irmão, Thiago, meu melhor amigo, que sempre está ao meu lado;

Ao meu irmão Silvio que mesmo distante se faz presente em minha vida;

Aos meus pais, Edimilson e Eva, pelas orações, incentivo e apoio;

A Deus, por fazer o impossível, possível;

A todos os amigos cujos nomes não foram citados, gostaria de agradecer o carinho e o incentivo.

OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão Bibliográfica	21
2.1.1 Cianobactérias	21
2.1.1.1 Florações de cianobactérias.....	22
2.1.2 Cianotoxinas.....	23
2.1.2.1 Microcistina (MCYST)	25
2.1.3 Técnicas de remoção de MCYST da água	29
2.1.4 Degradação de MCYST	35
2.2 Objetivos e Hipóteses	38
2.3 Material e Métodos	39
2.3.1 Cianobactérias e condições de cultivo.....	39
2.3.2 Extração e purificação da MCYST.....	41
2.3.3 Bactérias e condições de cultivo	41
2.3.4 Avaliação da capacidade de crescimento das bactérias na presença de MCYST	42
2.3.5 Avaliação da capacidade de degradação de MCYST	42
2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Performance.....	43
2.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS).....	43
2.3.8 Cinética da degradação da MCYST-XR	44
2.3.9 Identificação molecular das bactérias degradadoras de MCYST	44
2.3.9.1 Extração de DNA das bactérias	44
2.3.9.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S	44
2.3.9.3 Clonagem	45
2.3.9.4 Transformação	45

2.3.9.5 PCR usando colônias.....	46
2.3.9.6 Extração de DNA plasmidial.....	46
2.3.9.7 Sequenciamento.....	47
2.3.9.8 Processamento e análise filogenética das sequências	48
2.3.10 Detecção da presença do gene da microcistina e <i>mlrA</i>	48
2.3.10.1 Extração de DNA	48
2.3.10.2 Amplificação do gene da microcistinase <i>mlrA</i>	48
2.3.10.3 Sequenciamento do gene <i>mlrA</i>	49
2.3.11 Bioensaios de toxicidade dos produtos da biodegração da MCYST.....	49
2.3.11.1 Procedimento dos bioensaios.....	50
2.3.11.1.1 <i>Daphnia similis</i>	50
2.3.11.1.2 <i>Hydra attenuata</i>	50
2.4 Resultados e Discussão.....	51
2.4.1 Produção e Purificação do padrão da MCYST-XR.....	51
2.4.2 Avaliação da capacidade de degradação da MCYST.....	59
2.4.3 Cinética de degradação da MCYST	64
2.4.4 Identificação dos isolados degradadores de MCYST.....	67
2.4.5 Detecção da presença do gene da microcistinase <i>mlrA</i>	72
2.4.6 Toxicidade do subproduto da degradação da MCYST	76
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	97

RESUMO

Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água

Microcistinas são potentes hepatotoxinas e promotoras de tumores encontradas em águas doces que causam riscos à saúde pública e, portanto, representam um sério problema para as estações de tratamento de água. O gênero de cianobactéria *Microcystis* é o mais conhecido produtor dessas toxinas e também o mais comumente encontrado formando florações em reservatórios de água usados para abastecimento público. Entretanto, algumas bactérias são capazes de utilizar essas toxinas como fonte de carbono o que pode contribuir para a sua remoção da água. Neste estudo foi avaliado o potencial de degradação da microcistina-XR (MCYST-XR) por bactérias heterotróficas isoladas de um sistema de abastecimento público de água da cidade de Piracicaba-SP. A cianotoxina MCYST-XR avaliada foi isolada da linhagem *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 e purificada. Culturas puras de 35 bactérias isoladas do sistema de abastecimento de água foram testadas. Para isso, cada bactéria foi inoculada em meio mínimo de sais contendo $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MCYST-XR purificada e após 144 horas a degradação da toxina foi avaliada por análise em LC-MS/MS. Os picos indicando a massa da microcistina-XR (m/z 1037) não foram detectados no meio de cultura de seis bactérias, as quais foram identificadas pelo sequenciamento quase completo do gene de RNAr 16S como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Agromyces* sp., *Bacillus* sp. e *Acinetobacter* sp. Este é o primeiro relato de uma linhagem de *Acinetobacter* capaz de degradar MCYST. A cinética de biodegradação da MCYST-XR mostrou redução de 80% em 72 horas, período em que as bactérias apresentaram o máximo crescimento. A presença do gene *mlrA* codificante da enzima microcistinase envolvida no metabolismo da microcistina foi avaliada nos genomas dos seis isolados bacterianos usando iniciadores de PCR específicos. Fragmentos de aproximadamente 800 pb foram amplificados em dois isolados, *Bacillus* sp. e *Microbacterium* sp. Ensaios de toxicidade utilizando o cládocero *Daphnia similis* foram realizados para verificar a efetiva remoção da MCYST-XR e a não formação de subprodutos tóxicos na via de biodegradação. Os resultados negativos dos bioensaios após 48 horas indicaram a ausência de subprodutos tóxicos na via da degradação.

Palavras-chave: Cianobactéria; *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4; Cianotoxina; RNAr 16S

ABSTRACT

Microcystin-XR degradation by bacteria isolated from public water supply system

Microcystins are potent hepatotoxins and tumor promoters found in freshwaters that cause public health risks and thus represent a serious problem for water treatment plants. The cyanobacterium genus *Microcystis* is the most known toxin-producer and the most common bloom-forming in water reservoirs used for public supply. However, some bacteria are able to use these toxins as carbon source, which can contribute to its removal from water. This study assessed the potential for degradation of microcystin-XR (MCYST-XR) by heterotrophic bacteria isolated from a public water supply system of the city of Piracicaba-SP. The cyanotoxin MCYST-XR evaluated was isolated from *Microcystis aeruginosa* strain NPLJ-4 and purified. Pure cultures of 35 bacteria isolated from the water supply system were tested. For this, each bacterium was inoculated in minimal medium salts containing 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of purified MCYST-XR and after 144 hours the toxin degradation was evaluated by LC-MS/MS analysis. The peaks indicating the mass of microcystin-XR (m/z 1037) were not detected in the culture medium of six bacteria, which were identified by almost complete sequencing of the 16S rRNA gene as belonging to the genera *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Agromyces* sp., *Bacillus* sp. and *Acinetobacter* sp. This is the first report of an *Acinetobacter* strain able to degrade MCYST. The kinetic of the MCYST-XR biodegradation showed 80% reduction in 72 hours, period in which the bacteria showed the maximum growth. The presence of the *mlrA* gene encoding the microcystinase enzyme involved in the metabolism of microcystin was evaluated in the genomes of the six bacterial isolates using specific PCR primers. Fragments of approximately 800 bp were amplified in two isolates, *Bacillus* sp. and *Microbacterium* sp. Toxicity assays using the cladoceran *Daphnia similis* were conducted to verify the effective removal of MCYST-XR and the non formation of toxic by-products in the biodegradation pathway. The negative results of the bioassays after 48 hours indicated absence of toxic by-products in the biodegradation pathway.

Keywords: Cyanobacteria; *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4; Cyanotoxin; 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Agrupamento de genes responsáveis pela síntese de MCYST e nodularina.....	27
Figura 2 – Estrutura geral da MCYST.....	28
Figura 3 – Tanque de cultivo da <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4.	41
Figura 4 – Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de <i>H. attenuata</i>	51
Figura 5 – Cromatograma em LC-MS do extrato de <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4.....	54
Figura 6 – Curva de crescimento da linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4, em meio ASM-1.....	55
Figura 7 – Espectro de massas obtido em LC-MS de MCYST produzidas pela linhagem <i>M.aeruginosa</i> NPLJ-4 em meio ASM-1 e BG-11.....	56
Figura 8 - Espectro de massas obtido em LC-MS/MS após a fragmentação da variante -XR (m/z 1037) produzida pela linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4 no meio BG-11	57
Figura 9 - Espectro de massas obtido em LC-MS/MS após fragmentação da variante de MCYST produzida pela linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4 (m/z 1055) no meio BG-11	57
Figura 10 – Espectro de massas obtido em LC-MS dos testes de degradação de MCYST produzida pela linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4.....	60
Figura 11 – Cinética da degradação da MCYST-XR	64
Figura 12 – Comparação da velocidade de biodegradação da MCYST-XR.....	65
Figura 13 – Análise filogenética de sequencias do gene RNAr 16S	69
Figura 14 – Detecção do fragmento de 800pb	73
Figura 15 – Árvore filogenética de sequências de aminoácidos	74
Figura 16 – Gráficos de redução da concentração da MCYST-XR de cada isolado bacteriano e aumento da sobrevivência de <i>D. similis</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cianobacterias produtoras de toxinas.....	25
Tabela 2 - Composição do meio ASM-1.....	40
Tabela 3 – Composição do meio BG-11.....	40
Tabela 4 – Fragmentação do <i>m/z</i> 1037 por diferentes autores.....	52
Tabela 5 – Identificação das massas a partir da fragmentação em LC-MS/MS das variantes de MCYSTs produzidas pela linhagem <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4.....	58
Tabela 6 - Resultado da análise BLAST das sequências de RNAr 16S dos isolados utilizados neste trabalho.	68
Tabela 7 - Resultado da análise BLASTp da sequência de aminoácidos obtidas dos isolados que apresentaram fragmento de 800pb.....	73
Tabela 8 - Doses utilizadas do padrão -XR para estabelecimento da CL ₅₀ para <i>D. similis</i>	76
Tabela 9 - Doses utilizadas do padrão -XR para estabelecimento da CL ₅₀ para <i>H. attenuata</i>	77
Tabela 10 - Média do número de organismos mortos durante o ensaio de toxicidade com a <i>D. similis</i>	77
Tabela 11 - Alterações morfológicas apresentadas pela <i>H. attenuata</i> após exposição ao padrão MCYST-XR.....	78

1 INTRODUÇÃO

Florações de cianobactérias ocorrem frequentemente em corpos d'água eutrofizados. Sua proliferação causa sérios problemas, como o aumento do pH, redução da concentração de oxigênio dissolvido e odor desagradável. Além disso, algumas espécies de cianobactérias sintetizam toxinas que podem afetar outros organismos, acumulando-se ao longo da cadeia trófica e potencializando ainda mais o risco de contaminação humana. Estas toxinas são conhecidas como cianotoxinas.

As cianotoxinas são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Algumas têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos e outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos cíclicos ou alcalóides hepatotóxicos. De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Entretanto, por sua ação farmacológica, as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são: neurotoxinas e hepatotoxinas. Além dessas, alguns gêneros de cianobactérias também podem produzir toxinas irritantes ao contato. Essas toxinas têm sido identificadas como lipopolissacarídeos (LPS) que são também comumente encontradas nas membranas celulares de bactérias Gram negativas.

Dentre as cianotoxinas, as microcistinas (MCYSTs) têm recebido maior atenção uma vez que são encontradas com maior frequência em corpos d'água. São produzidas por cianobactérias, geralmente de água doce, dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis* e *Fischerella*.

As MCYSTs são um grupo de hepatotoxinas e sua estrutura foi determinada como sendo um heptapeptídeo cíclico sintetizado por enzimas funcionais do grupo das peptídeo sintetase e polipeptídeo sintase, através da via não-ribossomal. Existem aproximadamente 90 variantes de MCYSTs, as quais têm como estrutura cíclica geral o grupamento [-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha-] que é responsável por 25% da variação que contribuem para diferentes isoformas. A variável do resíduo do aminoácido X é comumente leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y), enquanto Z é usualmente arginina (R) ou alanina (A).

As MCYSTs são extremamente tóxicas para animais e já foram envolvidas em acidentes de intoxicação em humanos, levando-os à morte. São inibidoras de proteínas fosfatases 1 e 2A e

causam a hiperfosforilação das células do fígado. Esses danos são classificados como agudos ou crônicos, de acordo com a dose de ingestão. Os efeitos agudos, provenientes da ingestão em altas doses, são aqueles que provocam danos no fígado causado pela hiperfosforilação dos hepatócitos conduzindo a uma desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto. Esta desorganização leva a uma densa agregação desses microfilamentos para o centro da célula, que resulta na perda do suporte celular. A destruição das células parenquimais e sinusoidais do fígado causam uma hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, podendo causar a morte em poucas horas. Os efeitos crônicos, ou a intoxicação em baixas doses, podem levar ao desenvolvimento de tumores no fígado.

Casos de intoxicação humana por cianotoxinas por utilização de água contaminada de reservatórios de abastecimento de água já foram relatados, levando inclusive a fatalidades. O caso mais grave de contaminação humana envolvendo as cianotoxinas ocorreu no Brasil em 1996, quando 130 pacientes de uma clínica de hemodiálise em Caruaru (PE) foram intoxicados por hepatotoxinas durante sessões de hemodiálise, provavelmente devido à utilização de água contaminada de uma represa nas proximidades. Destes pacientes, 76 vieram a falecer devido a complicações hepáticas. Sendo assim, devido ao potencial de toxicidade crônica de MCYST, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um padrão máximo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentração de MCYST-LR em água potável.

Avanços significativos nas tecnologias de tratamento de água nas últimas duas décadas têm promovido soluções eficientes para a remoção destas toxinas. Contudo, a implementação destas instalações tem um custo elevado e a sua eficiência pode ser reduzida sob condições eutróficas, que são uma realidade na condição dos corpos d'água. A estrutura peptídica cíclica destas toxinas representa muitos desafios nas instalações de tratamento de água onde os processos convencionais têm limitado efeito na remoção de MCYST. Este é um problema que vem acontecendo em todo o mundo, onde a população está frequentemente exposta a cianotoxinas e a outros contaminantes microbianos. Existe uma necessidade de tecnologias de baixo custo e efetivas para melhorar o tratamento da água.

Uma técnica que tem recebido grande atenção é a utilização de bactérias capazes de degradar cianotoxinas. Na literatura existem poucos relatos de bactérias isoladas capazes de degradar MCYST, e a maioria destes organismos é classificada como pertencente ao gênero *Sphingomonas*. A estrutura cíclica da MCYST oferece resistência a muitas proteases comuns

produzidas por bactérias, e, portanto, a capacidade de certos microrganismos de degradar MCYST se deve à produção de enzimas específicas. Tratamentos como a degradação são essenciais para a remoção de cianotoxinas em corpos d'água, tratamentos como a degradação e para evitar danos causados por estas toxinas em humanos e animais.

Muitos estudos demonstram que uma das formas mais seguras para se eliminar cianotoxinas da água é a degradação, sendo assim de grande valia a identificação de novas bactérias que exibem a capacidade de degradação da MCYST para a eliminação desta toxina em reservatórios de água. Entretanto, antes de ser considerada uma possível remoção efetiva de MCYSTs, existe a necessidade de se averiguar a geração de algum subproduto tóxico gerado durante a degradação.

A investigação dentro da persistência e degradação das cianotoxinas tem se tornado cada vez mais importante, devido ao aumento da frequência de florações de cianobactérias em suprimentos públicos de água e seus potenciais efeitos à saúde.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos fotoautotróficos oxigênicos. Seus processos vitais requerem água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo. As cianobactérias são os únicos organismos capazes de realizar fotossíntese oxigênica e fixação de nitrogênio atmosférico simultaneamente (SCHOPF, 1994).

A origem das cianobactérias foi estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (CARMICHEL, 1994). A possível origem dos cloroplastos tem sido atribuída às cianobactérias por meio da endossimbiose (SCHOPF, 1994).

As cianobactérias são fotossintéticas aeróbicas, mas algumas espécies são heterotróficas facultativas, se desenvolvem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). O aparato fotossintético contém clorofila *a*, ficobiliproteínas e vários carotenóides (STAINER; COHEM-BAZIRE, 1977), sendo a água o doador de elétrons. Algumas espécies de cianobactérias podem se desenvolver em condições anaeróbicas, utilizando o sulfeto como doador de elétrons (STAINER; COHEM-BAZIRE, 1977).

Para auxiliar na adaptação a diversos ambientes, as cianobactérias podem desenvolver células especializadas, como os acinetos, células resistentes que desempenham o papel de “esporos” (THIEL; WOLK, 1983). Outras características morfológicas estruturais representam vantagens adaptativas para as cianobactérias, como os hormogônios e os aerótopos. O hormogônio (fragmento de um filamento) atua como elemento de dispersão e infecção no estabelecimento da associação cianobionte-hospedeiro (FIORE; HONDA, 2008). Os aerótopos (vesículas de ar) são responsáveis pela flutuabilidade e pela habilidade de regular a movimentação ao longo da coluna d’água, conforme as condições ambientais (OLIVER; GANF, 2000). As cianobactérias apresentam grande variedade fenotípica, sendo encontradas diversas formas e arranjos, como as unicelulares (cocóides e bacilos) e filamentosas (ramificadas ou não) (WHITTON; POTTS, 2000).

A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como a razão de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de habitat (SCHOPF, 1994). A grande diversidade metabólica das cianobactérias propiciou a sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também favoreceu a sua colonização nos ambientes atuais. Esses microrganismos são encontrados em todos os tipos de ecossistemas bem iluminados, inclusive em ambientes extremos (DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Podem ser encontrados em vida livre no ambiente, como nas florações planctônicas ou turfás, ou em associação com outros organismos como plantas, fungos, algas e bactérias, formando líquens e mantos microbianos (STAL, 1995; OLIVER; GANF, 2000; FIORE; HONDA, 2008). Podem também ser encontradas em solos e ambientes aerofíticos, como troncos e folhas de árvores e também rochas (WHITTON; POTTS, 2000; AGUIAR et al., 2008; BRANCO et al., 2009).

2.1.1.1 Florações de cianobactérias

A crescente eutrofização dos ambientes aquáticos tem sido produzida principalmente por atividades humanas, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e a poluição difusa originada nas regiões agricultáveis. Esta eutrofização artificial produz mudanças na qualidade da água, como florações de microalgas e cianobactérias, redução do oxigênio dissolvido, morte extensiva de peixes e perda das qualidades cênicas, ou seja, das características estéticas do ambiente e seu potencial para lazer, com conseqüências negativas sobre a eficiência e custo de tratamento da água, quando se trata de manancial de abastecimento público (GOMES; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2009).

Estas florações ou “blooms” se caracterizam pelo intenso crescimento desses microrganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade, com conseqüências relacionadas à saúde pública (SAITO et al., 2003). É amplamente aceito pelos microbiologistas e limnologistas que estudam a formação dessas florações que a carga de nutrientes, o tempo de retenção da água, a estratificação e a temperatura são os principais fatores que influenciam a formação e intensidade das florações. No Brasil, este problema é intensificado pelo fato de que a maioria dos reservatórios de água para abastecimento apresenta as características necessárias para o desenvolvimento intenso de cianobactérias durante o ano todo. De acordo com Sant’Anna e Azevedo (2000) já foi registrada a

ocorrência de pelo menos 20 espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, incluídas em 14 gêneros, em diferentes ambientes aquáticos brasileiros. De acordo com esses autores, a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta a distribuição mais ampla no Brasil e *Anabaena* é o gênero com o maior número de espécies potencialmente tóxicas (*A. circinalis*, *A. flos-aquae*, *A. planctonica*, *A. solitaria* e *A. spiroides*).

2.1.2 Cianotoxinas

As cianobactérias produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Estes são compostos que não são usados no metabolismo primário, como por exemplo, hormônios, antibióticos e toxinas. Vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações produzem toxinas, nomeadas de cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992).

As cianotoxinas são estruturas peptídicas elaboradas por um mecanismo enzimático de peptídeos não-ribossômicos. Na síntese ribossômica, a formação das pontes peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o RNAm funciona como molde determinando a sequência do aminoácido do produto. Na síntese de peptídeos não-ribossômicos, são as proteínas modulares que catalizam o agrupamento dos peptídeos e também servem como molde (WELKER; VON DÖHREN, 1996).

Enzimas multifuncionais denominadas peptídeos sintetases não-ribossômicas (NRPSs) e policetídeos sintases (PKSs) e/ou híbridos de NRPS/PKS são responsáveis por catalizar o mecanismo da síntese não-ribossômica de peptídeos (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Estas enzimas são caracterizadas por um arranjo modular dos genes que as codificam e contêm sequências altamente conservadas. Devido a este alto grau de conservação em suas estruturas primárias, e com a informação prévia sobre o agrupamento dos genes biossintéticos de um peptídeo é possível desenhar oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar regiões distintas dos demais genes. Para as cianobactérias isso foi possível a partir da descoberta dos genes *mcy*, responsáveis pela produção de MCYST em *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix* e *Fischerella*, e de nodularina em *Nodularia* (TILLET et al., 2000; MOFFITT; NEILAN, 2004; FIORE et al., 2009).

As cianobactérias constituem uma fonte de produtos naturais tóxicos e, embora ainda não esteja devidamente esclarecido o papel da produção destas toxinas, têm-se assumido que esses compostos tenham função protetora contra herbivoria, como acontece com alguns metabólitos de plantas vasculares (CARMICHAEL, 1992).

Cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos, assim como os órgãos ou sistemas que elas afetam, ou seja, com base nos seus efeitos biológicos (CODD; MORRISON; METCALF, 2005; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). De acordo com essa classificação, Funari e Testai (2008) dividem as cianotoxinas nos seguintes tipos: hepatotoxinas (mais de 90 variantes de MCYST e 6 variantes de nodularinas conhecidas); neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(S), 21 variantes de saxitoxinas conhecidas, também chamadas de toxinas paralisantes de moluscos); citotoxinas (cilindropermopsinas); toxinas irritantes e que atuam na região gastrointestinal (aplisiatoxina, debromoaplisiatoxina, lyngbyatoxina, endotoxinas lipopolissacarídicas - LPS); e outras cianotoxinas como a N-metilamino-L-alanina (BMAA).

Uma mesma cianotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de cianobactérias e uma mesma cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina. Kurmayer et al. (2002) demonstraram por meio das MCYSTs que dentro de uma mesma espécie ocorrem diferenças no genótipo, sendo que algumas delas possuem os genes para produção de determinada toxina e outras não. Em 50-75% das florações de cianobactérias, a toxicidade está associada com a produção simultânea de diversas cianotoxinas (AN; CARMICHAEL, 1994), sendo que a toxicidade das florações é determinada pela composição de suas linhagens (FUNARI; TESTAI, 2008).

Algumas dessas toxinas, que são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição, têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos (GOMES; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2009).

Tabela 1 – Cianobactérias produtoras de toxinas (FUNARI; TESTAI, 2008, modificado por SILVA, 2010)

Cianotoxina	Genes envolvidos	Efeito biológico	Linhagens produtoras
Microcistina	Microcistina sintetase	Hepatotoxina. Inibidora das fostatases PP1 e PP2A	<i>Microcystis</i> spp. <i>Planktothrix</i> spp., <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Cyanobium bacillare</i> , <i>Arthrospira fusiformis</i> , <i>Limnothrix redekei</i> , <i>Phormidium formosum</i> , <i>Hapalosiphon hibernicus</i> , <i>Fischerella</i>
Nodularina	Nodularina sintetase	Hepatotoxina	<i>Nodularia spumigena</i>
Cilindrospermopsina	Cilindrospermopsina sintetase	Inibidora da biossíntese protéica, dano citogenético (DNA)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Umezakia natans</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Raphidiopsis curvata</i> , <i>Anabaena lapponica</i> , <i>Anabaena bergii</i>
Anatoxina a-(S)	Ainda não descrito	Neurotoxina. Liga-se aos receptores de acetilcolinesterase	<i>Anabaena flos-aquae</i> e <i>A. lemmermannii</i>
Saxitoxina (PSP)	Saxitoxina sintetase	Neurotoxina. Bloqueia os canais de sódio nas células neurais	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Cylindrospermopsis</i> spp.
Lipopolissacarídeos LPS	-	Dermatotoxina. Irritante, efeito em qualquer tecido exposto	Todas cianobactérias
Lyngbyatoxina	NRPS com organização de domínios: A-NM-PCP-C-A-PCP-Redutase	Citotoxina	<i>Lyngbya majuscula</i> (águas marinhas), <i>Oscillatoria nigro-viridis</i>
β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)	-	Neurotoxina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Planktothrix</i> spp. e a maioria de cianobactérias simbiotes testadas.

As cianobactérias tóxicas liberam suas toxinas nos corpos d'água após um colapso momentâneo causado por condições desfavoráveis de crescimento, ou pela lise celular ocasionada pelo tratamento com algicidas para a remoção de algas. As toxinas, porém, no final acabam numa fase dissolvida na água independentemente do modo como ocorreu à lise (CHRISTOFFERSEN; LYCK; WINDING, 2002).

2.1.2.1 Microcistina (MCYST)

MCYSTs são produzidas por cianobactérias, geralmente de água doce, dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis* (IMANISHI et al., 2005) e *Fischerella* (FIORE et al., 2009).

As MCYSTs são heptapeptídeos cíclicos com massa molecular variando geralmente entre 800 e 1100 Da. São extremamente tóxicas para animais e já estiveram envolvidas em acidentes de intoxicação em humanos levando-os à morte e também em casos de envenenamento de animais.

Essas hepatotoxinas provocam danos no fígado por promoverem uma desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto. Esta desorganização leva a uma densa agregação desses microfilamentos para o centro da célula, que resulta na perda do suporte celular. A destruição das células parenquimais e sinusoidais do fígado causam uma hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, podendo causar a morte em poucas horas (DUY et al., 2000; CARMICHAEL, 1994; LAMBERT et al., 1994).

A base molecular da toxicidade da MCYST é a inibição específica das proteínas fosfatases serina/treonina, especialmente as fosfatases tipo 1 (PP1) e 2A (PP2A), são conhecidas como promotoras de tumores (CARMICHAEL, 1992; CODD et al., 1999). As MCYSTs acumulam-se em células do fígado de vertebrados devido ao transporte ativo por meio de um transportador de ânion orgânico não específico altamente expresso (sistema de transporte carreador de ácido biliar). Isto causa hiperfosforilação da citoqueratina, a qual leva a separação dos filamentos, ruptura da célula e hemorragia no fígado. A principal preocupação é a exposição crônica, em baixas concentrações de MCYSTs, através do consumo de água potável, pois esta exposição pode promover o desenvolvimento de tumores no fígado (BOURNE et al., 1996).

O mecanismo de ação das hepatotoxinas é bastante semelhante para todas as classes, produzindo disfunções hepáticas agudas e crônicas, com hemorragia e morte do animal em poucas horas em doses agudas. Além de atuarem no fígado, as MCYSTs podem alterar as funções de outros órgãos como rins, pulmão, timo e coração (CODD et al., 1999).

O grupo de genes que são codificados por essas enzimas foi recentemente descrito para *M. aeruginosa* PCC7806, que contém 10 genes (*mcyA-mcyJ*) organizados em dois operons transcritos em direção oposta, *mcyA-C* e *mcyD-J*. O maior dos dois operons, *mcyD-J*, codifica uma PKS modular (McyD), duas enzimas híbridas contendo módulos NRPS e PKS (McyE e McyG) e enzimas complementares (McyJ, F e I) e de transporte (McyH) da toxina. O menor operon, *mcyA-C*, codifica três NRPSs (McyA-C) (TILLET et al., 2000). A descrição deste grupo de genes também foi feita para os gêneros *Anabaena* e *Planktothrix* (Figura 1) (TILLET et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003). Essa descrição permite a realização de inferências evolutivas e análise da biossíntese dessa cianotoxina e tem sido útil como base para métodos de detecção de cianobactérias tóxicas usando a PCR.

Figura 1 - Agrupamento de genes responsáveis pela síntese de MCYST e nodularina. (a) *Nodularia spumigena*, (b) *Microcystis aeruginosa*, (c) *Plankthotrix agardhii* e (d) *Anabaena* sp. Vermelho: PKS; Amarelo: PS; Verde: Enzimas de acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) e Azul: transportadores ABC (PEARSON; NEILAN, 2008, modificado por SILVA, 2010)

Existem mais de 90 variantes de MCYST (KAASALAINEN et al., 2009), todas com estrutura cíclica D-alanina-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamato-Mdha, onde Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-deióico, D-MeAsp é o D-eritro- β -metil-ácido aspártico e Mdha é N-metilhidroalanina são aminoácidos não-proteinogênicos (BOTES et al., 1985; RAO et al., 2002). Análises de bioinformática e a similaridade com enzimas análogas indicaram que a formação do Adda supostamente envolve enzimas codificadas por *mcyD-mcyG* e *mcyJ*. A enzima híbrida NRPS/PKS, McyG, constitui o primeiro passo na biossíntese do Adda.

A hipótese inicial era de que o módulo NRPS da McyG ativava o fenilacetato. No entanto, posteriormente, a caracterização bioquímica do domínio A-PCP (Adenilação – proteína carreadora de peptídica), localizado no N-terminal da McyG, revelou que fenilpropanóides variados são preferencialmente ativados e ligados na PCP (HICKS, et al. 2006). Após a ativação, a unidade iniciadora fenilpropanóide é estendida por várias etapas de alongamento do malonil-CoA e, subsequentemente, modificada pela C-metilação, sofrendo redução e desidratação, tudo catalisado pelos módulos PKS das enzimas McyD, McyE e McyG. O domínio da aminotransferase da McyE, então, converte o policetídeo em um β -aminoácido na etapa final da

biossíntese do Adda. O módulo NRPS da segunda enzima híbrida PKS/NRPS, McyE, supõe-se estar envolvido na ativação e condensação da D-Glu com o Adda. Modificações estruturais na região Adda ou acilação do glutamato representam um importante papel na toxicidade (GOMES; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2009; SILVA-STENICO et al., 2009).

Na molécula da MCYST os aminoácidos X e Z são altamente variáveis e determinam o sufixo na nomenclatura de MCYST (Figura 2). A variante mais comum de MCYST é a MCYST-LR, que é caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R), L-aminoácidos nas posições 2 e 4 (X = L: Ala, Z = R: Arg) (GULLEDGE et al., 2002) que podem induzir o estresse oxidativo, resultando em danos indiretos ao DNA (LANKOFF et al., 2004). Foi observado que os efeitos tóxicos de MCYST são em grande parte dependentes da quantidade de toxina ingerida. Primeiramente, elas afetam hepatócitos onde a toxina se acumula (WANG et al., 2005; LI et al., 2007). Com base na toxicidade aguda a MCYST-LR, esta é considerada uma das mais potentes hepatotoxinas entre as diferentes variantes (FUNARI; TESTAI, 2008).

Figura 2 – Estrutura química geral da MCYST (SILVA-STENICO et al., 2009)

Casos de intoxicação humana por cianotoxinas por utilização de água contaminada de reservatórios de abastecimento de água já foram relatados, levando inclusive a fatalidades (CARMICHAEL et al., 2001). O caso mais grave de contaminação humana envolvendo as cianotoxinas ocorreu em 1996, quando 130 pacientes de uma clínica de hemodiálise em Caruaru (PE) foram intoxicados por hepatotoxinas durante sessões de hemodiálise, provavelmente devido

à utilização de água contaminada de uma represa nas proximidades (AZEVEDO et al., 2002; EDWARDS et al., 2008). Destes pacientes, 76 vieram a falecer devido a complicações hepáticas. As análises confirmaram a presença de MCYST e cilindrospermopsina no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica e de MCYST em amostras de sangue e fígado dos pacientes.

Como medidas efetivas, o Ministério da Saúde aprovou em 2000 a Portaria nº 1469 que, dentre outras normatizações, estabeleceu um limite máximo de 1 g.L^{-1} de MCYST na água de consumo humano, sendo dado um período de 3 anos para que os sistemas de abastecimento se adaptem a essa nova situação. No entanto, em 2004, o Ministério da Saúde homologou a nova Portaria nº 518/04, substituindo a Portaria 1469/00, que prorrogou por mais um ano o prazo para adequação das ETAs às condições exigidas, ou seja, março de 2005.

2.1.3 Técnicas de remoção de MCYST da água

O potencial de toxicidade crônica de MCYST levou a OMS a estabelecer um padrão máximo de 1 µg.L^{-1} de concentração de MCYST-LR em água potável. Em 1996 a MCYST-LR foi classificada como um possível agente de câncer humano (EDWARDS et al., 2008). De acordo com a OMS (1999) a maior rota de exposição do homem às cianotoxinas é a ingestão de água. O tratamento de águas com elevadas concentrações de cianobactérias, quando realizado de forma inadequada, pode não ser eficiente na remoção dessas toxinas ou mesmo favorecer sua liberação para a massa de água. A exposição às cianotoxinas também pode ser por meio do consumo de pescados contaminados ou de alimentos à base de microalgas.

Estas toxinas têm representado muitos desafios nas instalações de tratamento de água, onde processos convencionais têm limitado efeito na remoção de MCYST. Contudo, avanços significativos nas tecnologias de tratamento de água nas últimas duas décadas têm apresentado soluções eficientes para a remoção destas toxinas. Entretanto, a implementação destas instalações é de valores elevados e a sua eficiência pode ser reduzida sob condições eutróficas (EDWARDS et al., 2008).

As cianotoxinas encontram-se predominantemente no interior das células viáveis das cianobactérias tóxicas. Sob condições normais, apenas uma pequena proporção dessas toxinas é liberada pelas células viáveis para a água. Contudo, quando ocorre a lise da célula, seja pelo

decaimento natural ou pela ação de ruptura das células exercidas por agentes químicos como o sulfato de cobre e oxidantes, a toxina intracelular é liberada para a coluna d'água (YOO et al., 1995). Assim, os processos e seqüências de tratamento de água para abastecimento público devem ser analisados em função da sua capacidade de remover as células viáveis e de não promover a lise dessas células, assim como pela capacidade de remover a fração dissolvida das cianotoxinas.

Os processos que envolvem coagulação, quando otimizados e associados a processos de separação sólido-líquido e/ou à pré-oxidação, podem remover de forma eficaz as células de cianobactérias. Entretanto, de acordo com Hart, Fawell e Croll (1998) vários estudos têm mostrado que os processos convencionais de tratamento (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) não são efetivos na remoção da fração dissolvida das cianotoxinas. Falconer et al. (1989), por meio de bioensaios em camundongos, encontraram redução de toxicidade de apenas 20% ao coagular, com sulfato de alumínio, uma água rica em neurotoxinas oriundas de uma floração de *Anabaena circinalis*, mesmo utilizando doses elevadas do coagulante (120 mg. L^{-1}).

Keijola et al. (1988) também relatou baixa redução na concentração de anatoxina-a em experimentos envolvendo a coagulação seguida de filtração e cloração. Para altas concentrações de toxinas ($\sim 200 \text{ g. L}^{-1}$) o uso do cloreto férrico como coagulante se mostrou mais eficaz que o sulfato de alumínio, porém para uma concentração de toxinas cerca de dez vezes menor, os dois coagulantes praticamente não apresentaram remoção.

Himberg et al. (1989), baseados em resultados de experimentos em escala de laboratório, relatam que o tratamento envolvendo a coagulação/floculação, filtração rápida e cloração também não foi capaz de promover a remoção significativa de hepatotoxinas oriundas de espécies tóxicas de *Microcystis* e *Oscillatoria*. Os autores destacam, ainda, que em alguns experimentos a seqüência de tratamento apresentou remoção de toxina igual à zero ou negativa, sugerindo que toxinas podem ser liberadas durante a coagulação/floculação. Confirmando as observações anteriores, Hart et al. (1998) relatam que, em experimentos conduzidos no Water Research Centre, Inglaterra, a coagulação com sulfato de alumínio reduziu significativamente a concentração total de MCYST-LR (hepatotoxina). Entretanto, a remoção se deu em função da remoção de células e não como resultado da remoção da MCYST extracelular.

A baixa eficiência observada nos processos convencionais de tratamento (coagulação/floculação, sedimentação e filtração) pode ser extrapolada para a flotação por ar

dissolvido. É pouco provável que o uso da flotação por ar dissolvido, após a coagulação/floculação, seja mais eficiente que a sedimentação na remoção de toxinas extracelulares; entretanto, como a espuma formada é mais rapidamente removida que o lodo sedimentado, isso pode ter implicações positivas em relação à possibilidade de danos nas células de cianobactérias presentes no lodo e a liberação das toxinas para a água (ACERO et al., 2005).

Os trabalhos de Falconer et al. (1989) e de Himberg et al. (1989) citados anteriormente avaliam também a remoção de toxinas por carvão ativado, em pó e granular. Os resultados obtidos sugerem que o carvão ativado é capaz de remover cianotoxinas sozinho ou de forma combinada com o tratamento convencional. Keijola et al. (1988), por sua vez, apresentam o carvão ativado granular como um processo de tratamento efetivo na remoção de hepatotoxinas e neurotoxinas (anatoxina-a), porém não relatam bons resultados com o carvão ativado em pó. A baixa eficiência do carvão ativado em pó verificada nesse estudo pode estar associada à baixa concentração utilizada nos experimentos (5 mg. L^{-1}).

Hart et al. (1998) ressaltam que a efetividade do carvão ativado em pó é altamente dependente do tipo e da dosagem aplicada. Em experimentos realizados em trabalhos anteriores, os autores, para o tipo de carvão mais efetivo, encontraram que dosagens superiores a 20 mg.L^{-1} são necessárias para atingir remoções maiores que 85%. Ainda segundo esses autores, nas dosagens usualmente adotadas no tratamento de água ($5 \text{ a } 20 \text{ mg.L}^{-1}$), o carvão ativado em pó provavelmente contribuirá para a remoção de toxinas, mas dificilmente promoverá a remoção completa desses compostos.

Experimentos realizados com água filtrada do rio Sena, Paris, contaminada artificialmente com MCYST-LR, demonstraram que, além do tipo de carvão, a presença de matéria orgânica dissolvida na água interfere negativamente na capacidade de adsorção das cianotoxinas pelo carvão ativado em pó (BRUCHET et al., 1998). A competição da matéria orgânica com as cianotoxinas também reflete na eficiência de adsorção quando o carvão ativado granular é usado na sequência de tratamento.

Bruchet et al. (1998) relatam que em testes conduzidos com duas amostras de águas naturais, contaminadas artificialmente com MCYST e que continham entre $5 \text{ e } 6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carbono orgânico dissolvido, a eficiência de remoção das toxinas foi de 90%. Acima desses valores, a eficiência de remoção da toxina caiu para 49%. A diminuição na eficiência foi

atribuída à saturação do carvão pela matéria orgânica dissolvida presente nas águas testadas. Segundo os autores, embora a elevada remoção de toxinas apresentada pelo carvão ativado granular, a competição com a matéria orgânica dissolvida pode resultar em problemas na prática do tratamento. Se a presença de altas concentrações de cianotoxinas na água ocorrer quando o carvão ativado já estiver parcialmente saturado por outras substâncias orgânicas, a passagem de concentrações significativas de toxinas poderá ocorrer.

A oxidação química vem sendo apresentada na literatura como uma técnica tão efetiva quanto o carvão ativado na remoção de cianotoxinas. Entretanto, permanece a preocupação com relação à aplicação direta de oxidantes em água bruta, ou seja, águas em que a remoção das células viáveis de cianobactérias ainda não foi realizada. Por essa razão é comum analisar-se a ação dos oxidantes sobre as cianotoxinas considerando dois estágios de tratamento, a pós-oxidação (normalmente associada à desinfecção) e a pré-oxidação (BRUCHET et al., 1998).

O cloro é o desinfetante mais utilizado em todo o mundo, por essa razão vários autores dedicaram-se a avaliar a capacidade do cloro, sob diferentes formas, de oxidar as cianotoxinas. Keijola et al. (1988) e Himberg et al. (1989), analisando a cloração dentro dos processos usuais de tratamento (convencional e filtração direta) sugerem que essa etapa não foi eficaz na remoção de cianotoxinas. Nicholson, Rositano e Burch. (1994), por sua vez, reportou que MCYST e nodularinas foram rapidamente degradadas pelo cloro, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, sendo que esse último exigiu dosagem superior à dos dois primeiros. O cloro e o hipoclorito de cálcio removeram 95% das toxinas com doses de 1 mg.L^{-1} (cloro ativo) após um tempo de contato de 30 minutos, ao passo que 5 mg.L^{-1} de hipoclorito de sódio foram necessários para cerca de 80% de remoção no mesmo tempo de contato.

O fato importante observado pelos autores foi a significativa influência do pH na efetividade das espécies de cloro testadas. A remoção de toxinas foi bastante comprometida quando os valores de pH excediam a 8. Para uma concentração de cloro ativo de 15 mg.L^{-1} , a remoção de toxinas cai de 95% para valores inferiores a 80%, quando o valor do pH é superior a 8, sendo que, para o hipoclorito, a remoção chegou a atingir apenas 40%, com pH igual a 10 (NICHOLSON; ROSITANO; BURCH, 1994).

Hart et al. (1998) também relatam resultados de testes de cloração de águas contendo MCYST-LR ou anatoxina-a, em concentrações na faixa de 5 a 10 g.L^{-1} . Simulando a etapa final de desinfecção em uma sequência de tratamento, foi utilizada uma dosagem de cloro de $1,7 \text{ mg.L}^{-1}$

¹, que resultou em 0,7 mg.L⁻¹ de cloro residual livre depois de 30 minutos. Como nos experimentos de Nicholson, Rositano e Burch (1994), a eficiência do cloro na redução da concentração de MCYST-LR mostrou-se muito dependente do pH e do tempo de contato. Com valores de pH igual a 5, a remoção foi superior a 93% em 30 minutos de tempo de contato. Com o valor de pH igual a 7, a remoção atingiu 88% depois de 22 horas de contato. Quando o valor de pH adotado foi de 9, a remoção da toxina foi inferior a 40%, mesmo após 22 horas. Nenhuma remoção de anatoxina-a foi obtida com o uso do cloro.

A cloração com valores de pH suficientemente baixos para garantir máxima eficiência de remoção de toxinas pode não ser viável na prática. Entretanto, mesmo com os valores de pH usualmente adotados na prática, é provável que a MCYST seja degradada, se maiores tempos de contato forem adotados e concentrações apropriadas de cloro residual livre sejam garantidas. Alguns estudos australianos mostraram que remoção de cilindrospermopsina pode ser obtida com dosagens de cloro de 1 a 2 mg.L⁻¹ em valores de pH entre 6 e 7,5 e cloro residual livre de 0,5 mg.L⁻¹. O uso de cloroaminas e de dióxido de cloro não se mostraram eficazes na remoção de cianotoxinas (NICHOLSON; ROSITANO; BURCH, 1994; Hart et al., 1998).

A pré-cloração também tem sido utilizada na destruição de MCYST. Hart et al. (1998) reportam que efetiva remoção de MCYST foi possível com dosagens de cloro superiores a 2 mg.L⁻¹. Entretanto, os próprios autores ressaltam que em seus experimentos a concentração total de toxinas na água era baixa, cerca de 2 g.L⁻¹. Por outro lado, Lam, Fedorak e Prepas (1995) relatam que a cloração de água contendo elevada concentração de células viáveis de *Microcystis aeruginosa* provocou a imediata liberação da MCYST intracelular para o meio líquido. A MCYST-LR liberada só foi totalmente oxidada após quatro dias de tempo de contato, apesar de uma elevada dosagem de hipoclorito de sódio (44 mg.L⁻¹) ter sido utilizada no experimento. O processo de ozonização tem sido considerado eficaz na destruição de cianotoxinas. Esse processo pode levar rapidamente à completa destruição da MCYST, da nodularina e da anatoxina-a. Trabalhando com água tratada contaminada com toxinas dissolvidas, Hart et al. (1998) relataram que tanto a MCYST-LR quanto a anatoxina-a não foram detectadas após a ozonização com dosagem de 2 mg.L⁻¹.

Os resultados apresentados por Hart et al. (1998), em relação à aplicação da ozonização em águas brutas (pré-ozonização) ricas em cianobactérias, ao mesmo tempo em que ressaltam a

grande efetividade do ozônio na remoção de toxinas, destacam a importância do controle da dosagem desse oxidante. Com dosagens baixas, até $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$, o ozônio teve pequeno efeito sobre a degradação da MCYST. Provavelmente, nesse intervalo, o ozônio degradou outras substâncias orgânicas presentes na água. Somente depois que a demanda exercida por outros orgânicos foi satisfeita, o ozônio mostrou efeito sobre a MCYST-LR. Entretanto, no intervalo entre $0,6$ e $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, esse efeito foi negativo e consistiu quase que inteiramente na lise das células, fazendo com que a concentração de MCYST na água aumentasse significativamente. Somente com a adição de 2 mg.L^{-1} de ozônio a toxina foi oxidada. Esses resultados revelam a importância crucial da utilização de dosagens de ozônio suficientemente altas, bem como a necessidade do monitoramento cuidadoso do desempenho da pré-ozonização, particularmente com concentrações variáveis de matéria orgânica na água bruta como ocorre durante as florações de cianobactérias. Nicholson, Rositano e Burch (1994), relatam que dosagens de ozônio superiores a 1 mg.L^{-1} foram necessárias para promover a completa oxidação de MCYST-LR em água contendo $8,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carbono orgânico dissolvido (YOO et al., 1995).

As dosagens necessárias de ozônio podem também ser influenciadas pelo tipo de toxina presente na água. Alguns estudos mostraram que a dosagem de ozônio necessária para se conseguir a remoção de um grupo de saxitoxinas, com concentrações na faixa de 10 a 100 g.L^{-1} , era inferior à quantidade de ozônio demandada pela água. Outros estudos, também realizados na Austrália, mostraram que o ozônio é eficaz na remoção de cilindrospermopsina (BROOKE et al., 2006). A radiação ultravioleta e o peróxido de hidrogênio não são efetivos na remoção de cianotoxinas, segundo Hart et al. (1998), ao passo que o permanganato de potássio apresenta grande potencial na remoção de toxinas dissolvidas. Em relação aos oxidantes de forma geral, é importante destacar que a seleção do ponto de aplicação (pré ou pós-oxidação) tem impactos sobre a efetividade de remoção de toxinas. A pré-oxidação pode causar a lise celular, liberando as toxinas para água. O uso de oxidantes antes da remoção das células sadias deve ser analisado com muita precaução.

2.1.4 Degradação de MCYST

Uma técnica de remoção de MCYST bastante promissora é a biodegradação. A proposta de uma série de estudos é estabelecer um método biológico para remoção de cianobactérias e seus

produtos tóxicos usando microrganismos que conseguem lisar as células de cianobactérias e decompor MCYST (TSUJI et al., 2006).

São propostos vários tratamentos para remoção de cianotoxinas da água, como citado acima, porém é possível que esses tratamentos gerem substâncias carcinogênicas e até substâncias mutagênicas (ACERO et al., 2005). A biodegradação é um dos tratamentos mais seguros para a remoção de cianotoxinas na água (ISHII; NISHIJIMA; ABE, 2004).

Embora as MCYSTs sejam resistentes a muitas peptidases de bactérias, elas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas naturalmente em rios e reservatórios. Bactérias capazes de degradar MCYST já foram isoladas de vários ecossistemas aquáticos e também de efluentes de esgotos (CHORUS; BARTRAM, 1999). Este processo pode levar à degradação de 90% do total de MCYST entre 2 a 10 dias, dependendo principalmente da concentração inicial dessas toxinas e da temperatura da água.

As MCYSTs são uma possível fonte de carbono e nitrogênio, e também pode ter um alto valor nutricional, tanto como fonte de aminoácidos como fonte de energia para os microrganismos (AMÉ et al., 2006). A degradação de MCYSTs dissolvidas em corpos d'água tem sido muito estudada. Lam, Fedorak e Prepas (1995) demonstraram a degradação de MCYST-LR usando microrganismos de efluente de esgoto. Cousins et al. (1996) relataram a biodegradação de MCYST-LR em reservatórios de água.

Rapala et al. (1994) monitoraram a concentração de MCYST-LR, após expor um inóculo da população natural de bactérias heterotróficas a partir de amostras de água e sedimentos de vários lagos. A MCYST-LR foi degradada em um período de 30 dias e até mais rápido quando o inóculo utilizado era proveniente de lagos com histórico de florações de cianobactérias. Após a ruptura das células cianobacterianas quando as toxinas são liberadas para a fase aquosa, ocorre um estímulo de crescimento das bactérias capazes de degradar as cianotoxinas (CHRISTOFFERSEN; LYCK; WINDING, 2002).

As MCYSTs são moléculas complexas e o processo de degradação é mais resistente que o das neurotoxinas. O tempo de degradação dessas toxinas no ambiente aquático é bastante variável, podendo levar de várias semanas a meses. Sua degradação depende de sua concentração inicial, dos microrganismos presentes, da temperatura da água, pH e das disponibilidades de

outras fontes de carbono (KIVIRANTA et al., 1991; ROBERTSON et al., 1999; PARK et al., 2001).

Como as MCYSTs são moléculas quimicamente estáveis, Harada e Tsuji (1998) demonstraram a estabilidade da toxina em três semanas em solução com pH 1,0 a 40°C. Para degradá-la completamente foi necessário condições ácidas muito fortes, com 6 M de ácido clorídrico e trifluoroacético. Também demonstraram que as MCYST são resistentes a hidrólises enzimáticas, utilizando enzimas usuais, como a tripsina.

As MCYSTs são estáveis diante de fatores físico-químicos, sendo a degradação a principal forma de redução da MCYST em águas naturais. As MCYSTs são dificilmente degradadas por enzimas comuns tais como tripsina, colagenase e pepsina, como já citados acima isto porque sua estrutura peptídica cíclica possui baixa flexibilidade, sugerindo que o mecanismo de degradação da MCYST é mediado por enzimas específicas produzidas por bactérias altamente adaptadas (SAITOU et al., 2003).

É conhecido que espécies de *Sphingomonas* sp. têm a habilidade de degradar várias substâncias químicas de difícil degradação, e podem produzir várias enzimas específicas para isso. Estudos demonstraram que a MCYST é reconhecida pelas espécies de *Sphingomonas* sp. como um oligopeptídeo similar aos encontrados na peptona, a qual é uma mistura complexa de oligopeptídeos cíclicos (BOURNE et al., 1996).

Em 1994, Jones et al. (1994) isolaram a primeira bactéria capaz de degradar MCYST, a linhagem MJ-PV, isolada em águas australianas, a qual foi identificada como pertencente ao gênero *Sphingomonas* baseado na sequência do 16S rRNA. Esta espécie bacteriana utiliza MCYST-LR como única fonte de carbono e nitrogênio. Tsuji et al (2006) isolaram 11 bactérias de amostras de água dos lagos Tsukui e Sagami, no Japão. Estas três espécies nomeadas B9, B10 e B11 exibiram atividade degradativa, sendo que a linhagem B9 demonstrou uma maior capacidade de degradação e foi identificada através do sequenciamento parcial da região 16S rRNA, como pertencente ao gênero *Sphingomonas* sp. Y2. MCYST-RR e -LR foram completamente degradadas por esta linhagem no período de 24 horas.

Bourne et al. (2001) identificaram os genes responsáveis pela degradação da MCYST em *Sphingomonas* sp (ACM3962): *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*. A enzima codificada pelo gene *mlrA* pode clivar o peptídeo Adda-Arg da MCYST-LR, abrindo a estrutura cíclica. A MCYST-LR

linearizada é degradada pelas peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC*, e o *mlrD* codifica a proteína transportadora que carrega a MCYST para dentro da célula microbiana.

A enzima *mlrA* ou nomeada como “microcistinase” é a enzima mais importante do mecanismo do metabolismo da MCYST devido à sua ação que promove um desarranjo na estrutura cíclica da MCYST, já que esta é a responsável pela estabilidade e resistência da MCYST contra a ação de proteases. Por este motivo, quando esta enzima está presente, a degradação da MCYST é facilitada (SAITO et al., 2003).

Estudos sobre mecanismos de degradação de MCYSTs são limitados, isto porque as MCYSTs são peptídeos cíclicos altamente estáveis contra a ação de proteases comuns e também a maioria dos estudos se concentra em isolar microrganismos capazes de biodegradar a MCYST de ambientes com histórico de florações de cianobactérias tóxicas limitando a identificação de espécies e de mecanismos que auxiliam na degradação desta toxina (CHEN, 2010).

Manage et al. (2009) testaram a capacidade de 11 isolados, membros do filo Actinobacteria, em degradar MCYST-LR, onde 10 destes isolados degradaram efetivamente a variante -LR. Entretanto, nenhum destes isolados apresentou os genes *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*. Este estudo demonstrou claramente que uma grande diversidade de gêneros de bactérias possui a capacidade de degradar MCYST, já que nenhum dos isolados apresentou similariedade com as bactérias atualmente classificadas como degradadoras de MCYSTs depositadas nos bancos de dados. A identificação de bactérias que têm a capacidade de degradar MCYSTs, isoladas de ambientes sem histórico de florações de cianobactérias tóxicas e que não possuem o grupo de genes *mlr* envolvidos na degradação, é de suma importância para trabalhos futuros, como identificar novos genes, novas enzimas envolvidas na via biossintética e assim ter uma visão ampla da diversidade de microrganismos capazes de degradar MCYSTs (MANAGE et al., 2009).

A degradação de MCYST é considerada uma forma efetiva de remoção destas toxinas na água, contudo existe a necessidade de averiguar a geração de algum produto tóxico durante a via degradativa. Poucos estudos têm identificado os produtos formados durante a degradação da toxina. Bourne et al. (1996) e Harada et al. (2004) identificaram dois produtos intermediários a partir da degradação bacteriana da MCYST-LR pelas espécies *Sphingomonas* sp. ACM-3962 e *Sphingomonas* sp. B9. Ambos os estudos identificaram MCYST-LR linearizadas (NH₂-Adda-

Glu-MDha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-OH) e um tetrapeptídeo (NH₂-Adda-Glu-Mdha-Arg-OH) como produtos intermediários da via.

Estes produtos intermediários são menos ativos que a MCYST-LR usada em bioensaios com ratos e também não apresentaram atividade citotóxica, demonstrando a viabilidade da degradação bacteriana de MCYST (HO et al., 2007).

Estudos utilizando o cladóceros *Daphnia* para avaliar a toxicidade das cianotoxinas estão sendo bastante utilizados. As cianobactérias interferem negativamente com as comunidades de cladóceros, à interferência com a alimentação e à sua toxicidade. Nas cadeias tróficas dos ecossistemas de água doce, os cladóceros são um elo importante entre os produtores e os consumidores secundários, o que os torna organismos privilegiados no estudo da toxicidade das cianobactérias (FERRÃO FILHO, 2009).

Segundo Ferrão Filho (2009), o mecanismo de intoxicação por MCYST em *Daphnia* se dá através da absorção intestinal, após a ingestão das toxinas. Estas são acumuladas na cavidade média do intestino e são transportadas diretamente para o sangue através do epitélio intestinal, causando a perda de contato célula-célula no epitélio digestivo. A MCYST inibe proteínas fosfatases 1 e 2A e também as atividades bioquímicas de outras enzimas importantes, tais como enzimas proteases-tripsina e quimotripsina, acetilcolinesterase, entre outras, causando o rompimento do epitélio digestivo e levando o organismo à morte. Estudos realizados por Chen et al. (2005), Lüring (2003), Kaebernick et al. (2001) e Rohrlack et al. (2005) mostram que a MCYST pode ser considerada um metabólito tóxico para espécies de *Daphnia*. Ensaios para avaliar a toxicidade de produtos intermediários à degradação são bastante promissores utilizando este cladóceros.

2.2 Objetivos e Hipóteses

Devido à estrutura estável das MCYSTs, cianotoxinas encontradas com maior frequência em corpos d'água, os processos de tratamento da água ficam comprometidos por não serem efetivos para a total remoção destas toxinas, colocando em risco a saúde humana e animal. Estudos demonstram que uma das formas mais seguras para se eliminar cianotoxinas da água é a degradação, sendo assim a identificação de novas bactérias que exibem a capacidade de degradação da MCYST seria de grande valia para a eliminação desta toxina em reservatórios de água.

Os objetivos deste trabalho foram obter um padrão de MCYST-XR produzido pela linhagem *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 para avaliar a capacidade de degradação da MCYST-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água tratada; identificar os isolados com capacidade de degradação da MCYST por meio do sequenciamento do gene de RNAr 16S e detectar a presença do gene específico da via de degradação da MCYST, utilizando oligonucleotídeos iniciadores já descrito em literatura e finalmente, avaliar a presença de compostos potencialmente tóxicos gerados durante a via da degradação da MCYST, sendo que os seguintes questionamentos foram levantados:

- 1) Bactérias capazes de degradar MCYST são provenientes somente de ambientes com histórico de florações de cianobactérias tóxicas?
- 2) O ambiente de um sistema de abastecimento de água tratada pode abrigar bactérias com capacidade de degradação de MCYST?
- 3) Todas as bactérias com capacidade de degradação de MCYST possuem genes e enzimas em comum para mediar a degradação?
- 4) A via de degradação da MCYST pode gerar compostos tóxicos?

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Cianobactéria e condições de cultivo

A linhagem utilizada foi a *M. aeruginosa* NPLJ-4 isolada da lagoa de Jacarepaguá-RJ pelo gupo da Profª. Sandra M. F. O. Azevedo do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essa linhagem é mantida no laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP em meio de cultura líquido ASM-1 (GORHAM; McLACHLAN; HAMMER; KIM, 1964), em temperatura de 25°C e intensidade luminosa de 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em fotoperíodo de 14 h claro:10 h escuro.

O cultivo foi realizado em tanque de 8 L (Figura 3) em 2 meios de culturas diferentes: ASM-1 (GORHAM; McLACHLAN; HAMMER; KIM, 1964) e BG-11 (ALLEN, 1968), ambos a 23°C sob iluminação constante por 30 dias. Ao final do cultivo, as culturas foram centrifugadas e as células liofilizadas.

Tabela 2 - Composição do meio ASM-1 (GORHAM; McLACHLAN; HAMMER; KIM, 1964)

Composição	Concentração (g.100mL ⁻¹)	Composição	Concentração (g.100mL ⁻¹)
Solução A		Solução C	
NaNO ₃	0,850	H ₃ BO ₃	2,480
MgCl ₂	0,205	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,390
MgSO ₄	0,245	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,080
CaCl ₂	0,145	ZnCl ₂	0,335
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019
		CuCl ₂	0,0014
Composição	Concentração (g.100mL ⁻¹)	Composição	Concentração (g.100mL ⁻¹)
Solução B		Solução D	
K ₂ HPO ₄	0,870	EdtaNa ₂	1,860
Na ₂ HPO ₄	1,330		

Para cada litro de meio ASM-1 foram adicionados os seguintes volumes: Solução A: 40 mL; Solução B: 2,0 mL; Solução C: 0,1mL; Solução D: 0,4 mL.

Tabela 3 – Composição do meio BG-11 (ALLEN, 1968)

Composição	g.L ⁻¹	Volume adicionado por litro (mL)
NaNO ₃	150	10
K ₂ HPO ₄	40	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1
Ácido cítrico	6	1
Citrato férrico amoniacal	6	1
Edta Na ₂	1	1
Na ₂ CO ₃	20	1
Solução Micronutrientes*	-	1

*Composição solução de micronutrientes (g.L⁻¹): 2,86 g, H₃BO₃; 1,81 g, MnCl₂.4H₂O; 0,222 ZnSO₄.7H₂O; 0,39 g, Na₂MoO₄.2H₂O; 0,079 g, CuSO₄.5H₂O; 0,049 g, Co(NO₃)₂.6H₂O.

Figura 3 – Tanque de cultivo da *M. aeruginosa* NPLJ-4

2.3.2 Extração e purificação da MCYST

As células liofilizadas (50 mg) de *M. aeruginosa* NPLJ-4 foram ressuspensas em 5 mL de água ultra-pura e aproximadamente 30 g de pérolas de vidro (ϕ 3 mm) foram adicionadas e agitadas em vórtex por 1 minuto. Centrifugou-se a $7.000 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado e reservado. Foram adicionados 5 ml de água ultra-pura ao pélete e novamente agitados, centrifugados e o sobrenadante retirado e reservado. Este procedimento foi repetido 5 vezes.

O sobrenadante obtido no procedimento acima foi eluído em cartucho SPE C₁₈, (Phenomenex) usando-se gradiente de metanol variando de 20 a 100%. As MCYSTs foram eluídas na fração de metanol 80%. A fração foi evaporada em estufa a 55°C e analisada em HPLC e espectrometria de massas.

2.3.3 Bactérias e condições de cultivo

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas no sistema de abastecimento de água da cidade de Piracicaba – SP (ALVES, 2007). Estes isolados foram escolhidos por terem resistido aos processos de tratamento e purificação de água do município e também por possuírem

histórico na literatura, como potenciais degradadoras de cianotoxinas (ACERO et al., 2005; BOURNE et al., 2001; JONES et al., 1994; RAPALA et al., 1994). Foram selecionados 80 isolados para a avaliação da capacidade de degradação de MCYST.

Os isolados foram cultivados em meio líquido PGY (5,0 g peptona, 2,5 g extrato de levedura, 1,0 g glicose por litro), a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação as células foram centrifugadas, lavadas e em seguida foi feita uma suspensão das células bacterianas em solução salina 0,85% contendo aproximadamente 10^8 UFC . mL⁻¹ de acordo com comparação à escala de McFarland (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

2.3.4 Avaliação da capacidade de crescimento das bactérias na presença de MCYST

Foi realizado um ensaio preliminar com os isolados. Este ensaio consistiu na avaliação da capacidade de crescimento destes na presença de MCYST. O objetivo foi avaliar se a MCYST apresentaria toxicidade para as bactérias.

Inoculou-se 100 µL da suspensão das células bacterianas, já padronizado anteriormente, em 3 mL de meio líquido R2A (REASONER; GELDREICH, 1985), (0,5 g extrato de levedura; 0,25 g triptose; 0,75 g peptona; 0,5 g glicose; 0,5 g amido; 0,3 g hidróxido de potássio bibásico; 0,024 g sulfato de magnésio; 0,3 g piruvato de sódio; água deionizada para um litro), acrescido de extrato de MCYST purificada (60 µg.mL⁻¹). As bactérias foram incubadas a 37°C por 6 dias.

Avaliou-se o crescimento dos isolados dentro do período de incubação, através da observação da turbidez do meio de cultura. Os isolados que apresentaram crescimento até 72 horas foram selecionados para o ensaio de degradação de MCYST.

2.3.5 Avaliação da capacidade de degradação de MCYST

As bactérias selecionadas para a degradação de MCYST foram inoculadas em meio PGY, incubadas a 37°C por 24 horas e a suspensão de células foi padronizada conforme o procedimento já citado no item 2.3.3.

Inoculou-se 100 µL da suspensão de bactérias em 3 mL de meio líquido MMS (Meio Mínimo de Sais) ($18,24 \text{ g.L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$; $6,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0,2 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$; $4,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ e como única fonte de carbono foram adicionados 60 µg.mL^{-1} de extrato purificado de MCYST. Os tubos foram incubados no escuro a 37°C por 6 dias. Um controle positivo (MMS + MCYST) e um controle negativo (MMS sem inóculo) foram incubados junto ao ensaio.

Após o período de incubação os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes foram eluídos em coluna SPE C₁₈, usando-se gradiente de metanol variando de 20 a 100%. As frações de 40-60, 80 e 100% do gradiente de metanol de cada tubo do ensaio de degradação foram evaporadas e analisadas em HPLC e espectrometria de massas.

2.3.6 Cromatografia Líquida de Alta Performance

As amostras do ensaio de degradação foram centrifugadas a $9.000 \times g$ durante 5 min. e o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,22 μ) e injetado no HPLC. As condições do HPLC foram: fluxo de 1,0 ml min⁻¹; coluna: Zorbax (Agilent) C₁₈ 5 μ m, 4,6 $\times$ 250 mm; Solvente: A: água; solvente B: metanol; gradiente: 80% B por 10 min; 100% B por 8 min; Detector: 238 nm. A concentração da toxina em cada amostra foi determinada de acordo com a curva padrão (8,35 a 41,75 μ g mL⁻¹) usando o padrão de MCYST-XR obtida do extrato da *M. aeruginosa* NPLJ-4. A toxina foi identificada pela comparação do tempo de retenção dos picos obtidos nos extratos com o tempo de retenção do pico do padrão. O coeficiente de correlação de linearidade da curva (r) foi de 0,998 obtido pela área do pico e concentração da toxina.

2.3.7 Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS)

O extrato de MCYSTs e os extratos do ensaio de degradação foram analisados em LC-MS (Agilent 6410 MS controlado pelo programa Agilent MassHunter) utilizando infusão direta em modo MRM (Monitoramento Múltiplo de Reação, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) permitindo a identificação das variantes. A aquisição dos dados e as análises foram feitas usando o programa Agilent MassHunterWorkstation. A fase móvel A consistiu de água ultra-pura (Milli-Q) e a fase móvel B de metanol, ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. O fluxo foi de 0,3 mL.min⁻¹. Os parâmetros de detecção de MS foram otimizados para sensibilidade máxima para MCYSTs, descrito a seguir: gás de dessolvatação nitrogênio foi aquecido a 300°C, fluxo de 7 L. min⁻¹ e a voltagem capilar de 3.000 V. Os íons moleculares foram analisados numa faixa de 100 a 1.500 Da. A confirmação dos fragmentos foi feita em comparação com padrões de fragmentos de MCYSTs já descritos na literatura (SILVA-STENICO et al., 2009).

2.3.8 Cinética da degradação da MCYST-XR

Para a realização da cinética da degradação da MCYST-XR foram coletadas amostras do ensaio de degradação a cada 24 horas de incubação a partir do tempo zero, início do ensaio, até 144 horas, tempo final do ensaio. As amostras foram preparadas e analisadas conforme descrito nos itens 2.3.5 e 2.3.6. A avaliação da redução na concentração da MCYST foi obtida por meio de medição da área dos picos apresentados na análise de HPLC.

2.3.9 Identificação molecular das bactérias degradadoras de MCYST

2.3.9.1 Extração de DNA das bactérias

As bactérias foram enriquecidas em meio LB incubadas a 37°C por 48 horas. Transferiu-se 1 mL da suspensão de células para tubos eppendorf com capacidade de 1,5 mL, os quais foram centrifugados por 10 min a $10.000 \times g$, para concentração das células. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi ressuscitado com 100 μ L da Solução I (Tris 25 mM; EDTA 10 mM). Incubou-se no gelo por 5 min, adicionou-se 200 μ L da Solução II (SDS 10%; NaOH 4 N), incubou-se novamente no gelo para que ocorresse a lise celular. A desproteinização foi realizada com 2 volumes de CIA (Álcool Isoamílico, 1 mL; Clorofórmio, 24 mL) e centrifugação por 10 min a $10.000 \times g$. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma micropipeta e transferido para um novo eppendorf. A precipitação do DNA genômico foi realizada com 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após a secagem o DNA obtido de cada isolado foi ressuscitado em água deionizada. Dois microlitros (2 μ L) do DNA genômico foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e SYBR® Green I 1 μ L.mL⁻¹ [Molecular Probes]) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1% após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 $\times$ (1 $\times$ TBE: Tris-borato 44 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). A documentação do gel foi feita através do programa “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Science Park, New Haven, CT, EUA).

2.3.9.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S

Para a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene RNAr 16S dos isolados bacterianos, foi utilizado o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (NEILAN et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR

1 × (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 µmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 95°C/3 min; 30 ciclos 94°C/10 s, 50°C/20 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. Cinco microlitros (5 µL) dos produtos de PCR foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25% xilenocianol 0,25%) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% contendo SYBR[®] Green I (Molecular Probes) após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 × (1 × TBE: Tris-borato 44 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). A documentação do gel foi feita através do programa “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5.0” (Science Park, New Haven, CT, EUA). A verificação do tamanho dos produtos de PCR foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind* III (Promega). O material foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

2.3.9.3 Clonagem

Na clonagem das seqüências do gene que codifica para o RNAr 16S produzidas na PCR foi utilizado o kit “pGEM[®]-T Easy Vector Systems” (Promega). A clonagem no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante, presentes no Manual de Instrução do “pGEM[®]-T Easy Vector Systems”.

2.3.9.4 Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 100 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio LB à temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 x g. As células competentes transformadas foram inoculadas em meio

LB sólido contendo ampicilina e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 g mL⁻¹ de meio. As placas foram incubadas por 15 horas a temperatura de 37°C.

2.3.9.5 PCR usando colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, uma colônia de cor branca foi utilizada para nova reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 L de reação de PCR utilizando-se os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3'); M13R (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1 × (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador “Techne TC-412” (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). As condições de amplificação foram: 94°C/5 min; 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos produtos de PCR gerados foi feita em gel de agarose 1% - 0,5 × TBE conforme descrito no item 2.3.8.1.

2.3.9.6 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5α que continham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferidas para 6 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 x g. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzidas e, em seguida, estas foram centrifugadas a 10.000 × g por 20 segundos. O pélete formado foi ressuspensionado em 100 L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glicose 50 mM). Em seguida, 200 L de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados e misturados gentilmente através da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados aos microtubos 150 L de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos, centrifugados a 13.000 x g durante 7

minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 μ L de isopropanol à temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 x g por 2 minutos. Após secagem, a amostra foi ressuspendida em 30 μ L de água ultrapura esterilizada e 1 μ L de RNase na concentração de 10 mg.mL⁻¹. Incubou-se essa mistura a 37°C por 30 minutos.

2.3.9.7 Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para a reação utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 μ mol de iniciador: M13F(5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA- 3'), M13R (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), 357F (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3'), 357R (5'- CTGCTGCCTCCCGTAGG -3'), 704F (5'- GTAGSGGTGAAATSCGTAGA -3'), 704R (5'- TCTACGSATTTACCCSCTAC -3'), 1114F (5'- GCAACGAGCGMRACCC -3'), 1114R (5'- GGGTYKCGCTCGTTGC -3'), 1 μ L de “DYEnamic”, 2 μ L de tampão 2,5 $\times$ “Save Money” (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 μ L. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems). As seqüências geradas foram processadas para a remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade <20) e utilizadas para a obtenção de seqüências-consenso do gene de RNAr16S para cada isolado através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING; HILLIER; WENCL, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux.

2.3.9.8 Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e para a obtenção de seqüências-consenso através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING; HILLIER; WENCL, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux. As seqüências obtidas foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção da árvore filogenética, as seqüências de RNAr 16S obtidas neste estudo e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas, editadas e o método de distância evolutiva (“Neighbor-Joining”) foi aplicado usando o pacote de programas MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O suporte para os nós internos da árvore de distância evolutiva foi estimado usando reamostragem (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 replicações.

2.3.10 Detecção da presença do gene da microcistinase e *mlrA*

2.3.10.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos isolados degradadores de MCYST foi feita conforme já descrito no item 2.3.8.1.

2.3.10.2 Amplificação do gene da microcistinase *mlrA*

Para a amplificação por PCR do gene da microcistinase *mlrA* (BOURNE et al., 2001) dos isolados que apresentaram capacidade de degradação da MCYST, foi utilizado o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: MF (5'-GACCCGATGTTCAAGATACT-3') e MR (5'-CTCCTCCCACAAATCAGGAC-3') (SAITO et al., 2003). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 × (Tris HCl 20 mM pH 8,4; NH₄SO₄ 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM de MgCl₂; 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL.

A reação foi realizada em um termociclador “Techne TC-412” (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK), nas seguintes condições: 95°C/5 min; 40 ciclos 94°C/30 s, 56°C/30 s, 72°C/1

min; extensão final a 72°C/7min. Cinco microlitros (5 μ L) dos produtos de PCR foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e SYBR® Green I 1 μ L.mL⁻¹ [Molecular Probes]) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 $\times$ (1 $\times$ TBE: Tris-borato 44 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). A documentação do gel foi feita através do programa “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Science Park, New Haven, CT, EUA). A verificação do tamanho dos produtos de PCR de aproximadamente 800 pb, foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Low Mass (Promega). Os produtos de PCR foram clonados e sequenciados para confirmação do gene.

2.3.10.3 Sequenciamento do gene *mlrA*

Após a amplificação via PCR das seqüências de DNA do gene *mlrA*, foi realizada a clonagem, transformação e sequenciamento dos produtos de PCR conforme os itens 2.3.9.3, 2.3.9.4, 2.3.9.5, 2.3.9.6 e 2.3.9.7, respectivamente. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os seguintes: M13F (5'- GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA- 3') e M13R (5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), os quais flanqueiam seqüências de nucleotídeos do vetor de clonagem.

2.3.11 Bioensaios de toxicidade dos produtos da degradação da MCYST

O bioensaio de toxicidade foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP. Os organismos utilizados nos testes de toxicidade foram *Daphnia similis* e *Hydra attenuata* por serem organismos sensíveis para avaliação do grau de toxicidade de compostos tóxicos.

A manutenção das culturas dos organismos, como também a separação dos filhotes foi realizada por técnicos e procedimentos padronizados do Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP.

2.3.11.1 Procedimento dos bioensaios

2.3.11.1.1 *Daphnia similis*

O método utilizado foi realizado de acordo com Dutka (1997). Grupos de 5 neonatos com até 24 horas de crescimento de *D. similis*, foram colocados em frascos de polietileno contendo 10 mL de meio de manutenção (meio de cultivo com dureza entre 25-250 mg.L⁻¹ de CaCO₃) e extrato seco da extração do ensaio de degradação de MCYST foi ressuspensionado em 12 mL do mesmo meio de manutenção, diluído nas concentrações 100, 75, 50, 25, 10, 5 e 1%. No controle negativo foi utilizado somente o meio de manutenção. O teste foi conduzido em triplicatas e teve a duração de 48 horas, mantido em incubadora a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e no escuro (OECD, 1998). A contagem de organismos imóveis ou mortos foi realizada com 24 e 48 horas de exposição. As análises estatísticas foram realizadas com o programa JSPEAR, conforme procedimento do Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP, para a determinação da CL₅₀. Nos testes de toxicidade foram incluídos controles negativo e positivo com NaCl como substância de referência.

2.3.11.1.2 *Hydra attenuata*

O método utilizado foi segundo Trottier et al. (1997). Foram adicionados 4 mL de meio de manutenção para *H. attenuata* (CaCl₂, N-tris metil 1-2 aminoetanossulfônico – Tampão TES), (MESSIAS, 2008) e extrato seco da extração do ensaio de degradação de MCYST foi ressuspensionado com 10 mL do mesmo meio de manutenção, diluído nas concentrações 100, 75, 50 e 25%. Três *H. attenuata* saudáveis e sem broto foram adicionadas nas placas de poliestireno contendo 12 cavidades (3 repetições $\times$ 4 concentrações). No controle negativo foi utilizado somente o meio de manutenção. A duração do teste foi de 96 horas, com observações realizadas com o auxílio de uma lupa (Leica, modelo zoom 2000), a cada 24 horas de exposição. Os efeitos avaliados foram mortalidade e efeitos sub-letais (danos morfológicos), Figura 4. As análises estatísticas foram realizadas com o programa JSPEAR, conforme procedimento do Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP, para a determinação da CL₅₀.

Figura 4 – Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de *H. attenuata*

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Produção e Purificação do padrão da MCYST-XR

A linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 é conhecidamente tóxica e produtora de quatro variantes de MCYST, -HtyR, -LR, -RR e -XR (GOMES; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2009). A variante -XR (m/z 1037) é produzida em maior abundância quando comparada em quantidade com as outras variantes -LR e -RR, de acordo com a intensidade do pico obtido por LC-MS. Por este motivo, esta variante foi escolhida para a produção de padrão que foi utilizado no ensaio de degradação.

A variante de m/z 1037 produzida em maior abundância por esta linhagem é classificada por alguns autores como sendo MCYST-LR (NAMIKOSHI et al., 1990; PARK et al., 2001; FERREIRA et al., 2010), contudo segundo Zweigenbaum et al. (2000); Oksanen et al. (2004); Silva-Stenico et al. (2009), na fragmentação da molécula atribuições estruturais confirmam a presença de aminoácidos característico dela, Adda, Glu, Mdha, MeASP e Arg, e m/z 965 que é um derivado da perda da alanina na molécula. Entretanto, um resíduo m/z 155 é encontrado e devido a isso não é possível confirmar a estrutura desta MCYST, sendo então designada como MCYST-XR, Tabela 4.

Tabela 4 – Fragmentação da variante de MCYST m/z 1037 por diferentes autores

(continua)

Fragmento	Zweigenbaum et al., 2000	Oksanen et al. 2004	SILVA-STENICO et al., 2009	Ferreira et al. 2010	Park et al. 2001	Kaasalainen et al. 2009	Este estudo
	MCYST -XR	MCYST -XR	MCYST -XR	MCYST-[D-Leu ¹]-LR	MCYST-[D-Leu ¹]-LR	MCYST-[ADMAdda ⁵]-HILR	MCYST -XR
[M + H] ⁺	1037	1037	1037	1037	1037	1037	1037
[M + H] ⁺ - 17	1020	1020	1020				1020
Ala-X-(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha – NH ₃ + H						1020	
[M + H] ⁺ – H ₂ O		1019	1019			1019	
[M + H] ⁺ - CO	1009		1009				1009
Ala-X-(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha – CO + H		1009				1009	
[M + H] ⁺ - COOH		992	992			992	992
[M + H] ⁺ - AcOH		977	977				
[M + H] ⁺ - Ala							965
Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha + H					924		
MeAsp-Arg-Adda-Glu-Mdha-Leu + H					924		
Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha-Ala-X + NH ₂ + 2H		925				925	
Mdha-Ala-X-(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda + NH ₂ + 2H						925	
[M + H] ⁺ - MeAsp	908	908	908				908
Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha-Ala-X + H						908	
Adda-Glu-Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg + H						908	
Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha-Ala-X – CO + H		881			881		
Mdha-Ala-X-(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda – CO + H		880				880	
[M + H] ⁺ - 163							
Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu + H					841		
(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda-Glu + H		756				756	
Glu-Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg-NH ₂ + 2H					741		
(Me)Asp-Arg-(A)DMAdda-Glu – NH ₃ + H						739	
MeAsp + Arg + Adda + Glu	728		728		728		728
Leu-MeAsp-Arg-Adda + H					712		
m/z 728 - 17 Da	711		711				
Arg-(A)DMAdda-Glu-Mdha + H						710	
Arg-Adda-Glu-Mdha + H					682		
Arg-(A)DMAdda-Glu + H		627				627	
Mdha + Ala + (155) + MeAsp + Arg + OH	612		612				612
Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg-NH ₂ + 2H					612		
Arg-(A)DMAdda-Glu – NH ₃ + H		610				610	

Tabela 4 – Fragmentação da variante de MCYST m/z 1037 por diferentes autores (conclusão)

163-Glu-Mdha-Leu-Leu					601		
Arg + Adda + Glu	599	599	599		599		599
MeAsp-Arg-Adda + H					599		
Arg-(A)DMAAdda-Glu – CO + H						599	
Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg	595		595	595	595		595
Mdha-Ala-X-(Me)Asp-Arg + NH ₂ + 2H		584				584	
m/z 599 – CO	571		571				571
Arg-Adda-CO + H					571		
163-Glu-Mdha-Leu	512		512				512
Mdha-Ala-X-(Me)Asp-Arg + H	567					567	
Mdha-Ala-X-(Me)Asp-Arg – CO + H		539				539	
Leu-Leu-MeAsp-Arg + H					512		
Arg-(A)DMAAdda + H		498				498	
Ala + (155) + MeAsp + Arg				488	488		
Ala-X-(Me)Asp-Arg + H		481				481	
Arg + Adda	469		469		470		469
Mdha-Leu-Leu-MeAsp+1 H				439			
Leu-MeAsp-Arg-NH ₂ + 2H				439			
Leu-MeAsp-Arg + H					416		
Mdha-Leu-Leu-MeAsp					399		
X-(Me)Asp-Arg – NH ₃ + H		396				396	
Adda-fragment + Glu + Mdha	375		375	375	375		
C ₁₁ H ₁₄ O_Glu_Mdha							375
Mdha-Leu-Leu + H					310		
CO-Glu-Mdha-Ala-2H							
MeAsp-Arg-NH ₂ + 2H					303		
Har-MeAsp+H							
MeAsp-Arg			286	286	286		
Glu-Mdha-Ala-H							
MeAsp-Arg-CO + H					258		
Leu-Leu-NH ₂ + 2H					244		
Leu-MeAsp + H					243		
CO-Glu-Mdha-H							
Leu-Leu + H					227		
Glu-Mdha+H			213		213		213
Mdha-Leu				197	197		197
Mdha-Leu-CO + H					169		
CH(Me)-CH=C(Me)-CH=CH-CH ₂ -CH(Me)-CO				163	163		
Mdha-Ala-H	155						155
Adda-fragment (Ph-CH ₂ -CH-OCH ₃)			135	135			135
Leu-imônio			86	86			86

Para a produção de MCYST-XR (m/z 1037), utilizada como padrão, esta linhagem foi cultivada em dois meios diferentes: meio líquido ASM-1 e BG-11 para avaliar a produção e abundância de outras variantes. A Figura 5 apresenta o cromatograma em LC-MS e identificação dos picos das variantes -LR (m/z 1023) e -XR (m/z 1037).

Figura 5 – Cromatograma em LC-MS do extrato bruto de *M. aeruginosa* NPLJ-4 (A); Espectro da MCYST-LR (m/z 1023) com tempo de retenção de 17,72 min. (B); Espectro da MCYST-XR (m/z 1037) com tempo de retenção de 17,03 min. (C)

A *M. aeruginosa* NPLJ-4 produziu biomassa de 0,10 g.L⁻¹ e 0,13 g.L⁻¹ de células liofilizadas nos meios de cultura ASM-1 e BG-11, respectivamente. Quanto à produção de MCYSTs, no meio ASM-1 a linhagem produziu duas variantes: a -LR (*m/z* 1023) e a -XR (*m/z* 1037), Figura 7. No meio de cultivo BG-11 a linhagem produziu quatro variantes, as duas já citadas acima mais a variante -HtyR (*m/z* 1071), conforme já descrito por Albuquerque; Melo e Franco (2006) e uma nova variante (*m/z* 1055) Figura 7, identificada como uma MCYST, pela fragmentação da molécula em LC-MS/MS, onde o íon molecular *m/z* 135 correspondente ao aminoácido não proteinogênico Adda (Figura 9) foi observado. A Tabela 3 apresenta os fragmentos encontrados em todas as variantes pela análise em LC-MS/MS.

A estrutura geral da MCYST é D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, onde D-MeAsp é o ácido D-eritrometilaspártico, Mdha é N-metildehidroalanina e Adda é o ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6 dienóico. O Adda é a parte essencial para a toxicidade da MCYST e Mdha é responsável pela ligação da toxina com as proteínas fosfatases (ZWEIGENBAUM et al., 2000; MACKINTOSH, 1995). A variante *m/z* 1055 foi produzida no meio de cultura BG-11, o qual é um meio que contém mais minerais e possui uma maior concentração de nitrogênio em comparação com o meio ASM-1.

No caso do meio de cultivo ASM-1, observou-se que a linhagem produziu somente duas variantes, que para estudos de obtenção de um padrão para fins de degradação, foi escolhido esse meio de cultivo. A curva de crescimento da linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4, em meio ASM-1, pode ser observada na Figura 6, onde a fase exponencial de crescimento aconteceu por volta de 26 dias de cultivo.

Figura 6 - Curva de crescimento da linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4, em meio ASM-1

A fragmentação da variante -XR pode ser observada na Figura 8 e a indicação das massas dos fragmentos das quatro variantes produzidas pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 na Tabela 5.

Figura 7 - Espectro de massas obtido em LC-MS de MCYST produzidas pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 em meio ASM-1 (A) e BG-11 (B)

Para confirmação da variante estrutural -XR, foi realizada a fragmentação da molécula. O íon molecular m/z 135 (Figura 7) é a característica mais marcante em MCYSTs, caracterizando a toxicidade da molécula.

Figura 8 - Espectro de massas obtido em LC-MS/MS após a fragmentação da variante -XR (m/z 1037) produzida pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 no meio BG-11

A nova variante de íon molecular m/z 1055 (Figura 9) apresenta os íons característicos de MCYST (m/z 135 e 213), porém ainda precisa ser melhor investigada para a identificação dos aminoácidos presentes na molécula, já que ela é produzida em quantidade mínima.

Figura 9 – Espectro de massas obtido em LC-MS/MS após fragmentação da variante de MCYST produzida pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 (m/z 1055) no meio BG-11

As variantes MCYST-LR e -XR foram fragmentadas e os íons característicos podem ser observados na Tabela 3. Esses dados corroboram os de Silva-Stenico et al. (2009). A variante m/z

1071 foi estudada por Albuquerque, Melo e Franco (2006), porém os dados de fragmentação não foram descritos, sendo este estudo o primeiro a apresentar a fragmentação desta molécula.

Tabela 5- Identificação das massas a partir da fragmentação em LC-MS/MS das variantes de MCYSTs produzidas pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4 neste estudo

Fragmento do íon $[M+H]^+$	MCYST-LR m/z 1023	MCYST-XR m/z 1037	MCYST- HtyR m/z 1071	MCYST-XZ m/z 1055
M+H-NH ₃	1006			
$[M+H]^+ - 17$		1020		
$[M+H]^+ - CO$		1009		
$[M+H]^+ - COOH$		992		
M+H-CO	995			
$[M+H]^+ - Ala$		965		
Leu/X-(Me)Asp-Arg+H-NH ₃	382			
$[M+H]^+ - MeAsp$		908		
MeAsp+Arg+Adda+Glu		728		
Arg-(A)DMAdda-Glu-H			627	
Mdha+Ala+(155)+Measp+Arg+OH		612		612
Arg+Adda+Glu	599	599		
Mdha+Ala+(155)+MeAsp+Arg		595		
m/z 599-CO		571		
Arg-(A)DMAdda-Glu-H-NH ₃				568
163-Glu-Mdha-Leu		512		
Arg-(A)DMAdda-H			498	
Arg+Adda		469		
Leu/X-(Me)Asp-Arg+H	399			399
C ₁₁ H ₁₄ O_Glu_Mdha		375		
(Me)Asp-Arg-NH ₃ +2H	303			
(Me)Asp-Arg+H	286			
Mdha-Ala-Leu-NH ₃ +H				
Glu-Mdha+H	213	213	213	213
Mdha-Leu		197		
Arg+H	157			
Adda	135	135	135	135
Leu-imônio		86		

2.4.2 Avaliação da capacidade de degradação da MCYST

As bactérias selecionadas para avaliação quanto à capacidade de degradação da MCYST foram as que apresentaram crescimento máximo de até 72 horas em meio R2A na presença de MCYST. O objetivo deste teste inicial em meio R2A foi para avaliar se a MCYST apresentaria toxicidade para as bactérias testadas. Considerando o período de incubação de 72 horas utilizando o meio de cultura onde as bactérias não apresentam dificuldade de crescimento concluiu-se que a MCYST não foi tóxica para estas bactérias, já para os isolados que não apresentaram crescimento em até 72 horas de incubação, considerou-se que a MCYST foi tóxica, portanto foram excluídos dos ensaios de degradação da MCYST.

Trinta e cinco isolados bacterianos apresentaram crescimento no meio R2A + MCYST em até 72 horas de incubação, sendo então considerados aptos ao ensaio de degradação de MCYST. Dos 35 isolados testados quanto à capacidade de degradação, seis foram capazes de utilizar a MCYST como única fonte de carbono presente no meio de cultura, removendo completamente a MCYST presente em 144 horas de incubação. Essa remoção foi constatada primeiramente utilizando análises de espectrometria de massas, onde o pico indicando a massa da MCYST-XR (m/z 1037) não foi detectado, sendo este detectado somente no controle positivo do ensaio, como pode ser observado na Figura 10.

A

B

C

D

E

F

Figura 10 - Espectro de massas obtido em LC-MS dos testes de degradação de MCYST produzida pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4. A) Controle positivo do ensaio de degradação (meio de cultura MS + MCYST) com presença do íon m/z 1037; B) Isolado 30; C) Isolado 44; D) Isolado 59; E) Isolado 65; F) Isolado 69 e G) Isolado 04, os quais removeram completamente a MCYST presente no meio de cultura (m/z 1037)

2.4.3 Cinética de degradação da MCYST

Após a constatação da degradação da MCYST em espectrometria de massas pelos seis isolados, uma cinética de degradação foi realizada, onde amostras foram coletadas a cada 24 horas de incubação, a partir do tempo zero, momento da inoculação, até 144 horas, tempo final do ensaio. A cinética de degradação de cada um dos seis isolados que apresentaram a capacidade de degradação da MCYST pode ser observado na Figura 11. O frasco controle contendo somente meio de cultura e toxina manteve-se com uma concentração constante de MCYST. A análise da cinética de degradação foi feita em HPLC, e esta permitiu visualizar a redução da concentração de MCYST durante o período de incubação.

Figura 11 – Cinética de degradação da MCYST-XR

Todos os seis isolados bacterianos foram efetivos na remoção de MCYST. A velocidade de redução de cada um dos isolados foi bastante variável, uns reduzindo cerca de 80% da concentração de MCYST, em 48 horas de ensaio, como é o caso dos isolados 65 e 69, e o isolado 59 que removeu 100% da MCYST em 72 horas de incubação, enquanto que os outros isolados chegaram a este valor somente no final do ensaio, 144 horas de incubação. A Figura 12 mostra esta comparação entre os isolados.

Figura 12 - Comparação da % de degradação da MCYST-XR entre os isolados bacterianos

É essencial remover toxinas de cianobactérias de corpos d'água utilizando tratamentos eficazes como a degradação, a fim de evitar graves danos à saúde de animais e humanos causados pelas cianotoxinas. Vários estudos para identificar bactérias capazes de degradar completamente MCYSTs estão sendo propostos. Num estudo realizado por Imanishi (2005) e colaboradores foram identificados 11 isolados bacterianos em lagos com florações de cianobactérias no Japão e todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Sphingomonas*. Rapala et al. (1994) monitoraram a concentração de MCYST-LR após expor um inóculo da população natural de bactérias heterotróficas a partir de amostras de água e sedimentos de vários lagos. A MCYST foi degradada em 30 dias e em algumas amostras até mais rápido quando o inóculo utilizado era proveniente de lagos com histórico de florações de cianobactérias.

Edwards et al. (2008) mostraram significativa diferença nas taxas de degradação de MCYST-LR em água coletada em cinco diferentes corpos d'água no Reino Unido. Eles demonstraram que a taxa de degradação da MCYST variou de acordo com o histórico de florações de cianobactérias em cada manancial.

Embora as MCYST sejam resistentes a muitas peptidases de bactérias, elas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas naturalmente em rios e reservatórios. Bactérias capazes de degradar MCYST já foram isoladas de vários ecossistemas aquáticos e também efluentes de esgotos (CHORUS; BARTRAM, 1999). Este processo pode levar à degradação de 90% do total de MCYST entre 2 a 10 dias.

As MCYSTs são potenciais fontes de carbono e nitrogênio. Estudos demonstram que a MCYST é reconhecida por espécies de *Sphingomonas* sp. capazes de degradá-la, como oligopeptídeos similares aos encontrados na peptona, a qual é uma mistura complexa de oligopeptídeos cíclicos (BOURNE et al., 1996). Chen et al. (2010) isolaram uma bactéria identificada como *Stenotrophomonas* sp. capaz de degradar MCYST –LR e –RR em 24 horas nas concentrações 0,7 e 1,7 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente. Ishii, Nishijima e Abe (2004), isolaram uma bactéria do gênero *Sphingomonas* sp. que foi capaz de degradar 6,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ MCYST –LR em 4 dias.

Saitou et al. (2003) identificaram espécies de *Sphingomonas* e *Pseudomonas* capazes de degradar MCYST –RR e –YR, utilizando MCYST–LR para o enriquecimento e indução da atividade de degradação das culturas. Jones et al. (1994) demonstraram que *Sphingomonas* sp. isolada de águas naturais na Austrália degrada tanto MCYST–RR quanto –LR, contudo a taxa e a

velocidade de degradação da variante –LR é maior que a –RR. Estes resultados demonstram que as taxas de redução e a velocidade de degradação da MCYST variam de acordo com a espécie bacteriana e também do ambiente de sobrevivência desta espécie.

A maioria dos estudos de degradação de MCYST tem focado em bactérias isoladas em ambientes com florações contendo MCYST, e talvez seja por este motivo que ainda é baixo o número de microrganismos identificados até hoje capazes de degradar essas toxinas (EDWARD et al., 2008). Ainda não foram relatados estudos onde se avalie a capacidade de degradação por bactérias isoladas de ambientes como sistema de abastecimento público de água tratada, sendo este um estudo pioneiro.

O descobrimento de várias bactérias degradadoras de MCYST e o reconhecimento da diversidade destas bactérias podem levar ao entendimento da dinâmica da MCYST em águas naturais (SAITOU et al., 2003).

2.4.3 Identificação dos isolados degradadores de MCYST

Os isolados bacterianos que apresentaram a capacidade de degradação da MCYST foram identificados utilizando o sequenciamento do RNAr 16S. As análises genéticas das sequências do gene RNAr 16S revelaram que os seis isolados pertencem aos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Agromyces* sp., *Bacillus* sp. e *Acinetobacter* sp. Uma das vantagens de se utilizar sequências do gene de RNAr 16S é que estudos demonstram que dentro do domínio Bacteria, dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentarem reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAYNE et al., 1987) e que linhagens com sequências do gene de RNAr 16S que apresentam valores de identidades inferiores a 97,5% são improváveis de possuírem reassociação de DNA-DNA maior que 60-70% e, portanto, improváveis de pertencerem à mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Disso resulta que, em análise BLAST utilizando o gene de RNAr 16S, dois organismos são considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998) e de mesma espécie se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de similaridade e cobertura das sequências de RNAr 16S dos isolados degradadores de MCYST obtidas por meio da análise BLAST.

Tabela 6 - Resultado da análise BLAST das sequências de genes de RNAr 16S dos isolados utilizados neste trabalho

Isolado	Tamanho fragmento RNAr 16S (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Ordem	Sequências do Genbank com maior similaridade (nº de Acesso)
04	1460	100	99	Pseudomonadales	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ609597.1)
30	1477	99	99	Bacillales	<i>Bacillus sporotheodurans</i> (BSU49079)
44	1447	100	99	Actinomycetales	<i>Microbacterium</i> sp. (HM222652.1)
59	1461	99	99	Pseudomonadales	<i>Acinetobacter</i> sp. (AM412158.1)
65	1413	100	99	Sphingomonadales	<i>Sphingomonas</i> sp. (AY162145.1)
69	1451	100	99	Actinomycetales	<i>Agromyces</i> sp. (DQ448705.1)

A árvore filogenética do gene de RNAr 16S construída usando o método de distância Neighbor-joining mostra as relações evolutivas entre as sequências das bactérias degradadoras de MCYST e outras sequências escolhidas do GenBank (Figura 13). A árvore filogenética foi enraizada usando como grupo externo uma sequência de nucleotídeos retirada do GenBank, referente ao RNAr 16S existente na cianobactéria *Microcystis* sp. (AY439281).

Em 1994, Jones e colaboradores isolaram a primeira bactéria capaz de degradar MCYST, isolada em águas australianas, a qual foi identificada pertencente ao gênero *Sphingomonas* baseado na sequência de gene RNAr 16S. Esta espécie bacteriana utiliza MCYST-LR como única fonte de carbono e nitrogênio. Tsuji et al (2006) isolaram 11 bactérias de amostras de água dos lagos Tsukui e Sagami, no Japão. Dentre elas, três espécies nomeadas B9, B10 e B11 exibiram atividade degradativa, sendo que a linhagem B9 mostrou uma maior capacidade de degradação e foi identificada através do sequenciamento parcial da região RNAr 16S, pertencente ao gênero *Sphingomonas* sp. Y2. MCYST-RR e -LR foram completamente degradadas por esta linhagem no período de 24 horas.

No presente trabalho um dos isolados degradadores de MCYST foi identificado como *Sphingomonas* sp. e assim como os trabalhos já citados acima que também identificaram esta espécie como eficiente degradadora os resultados apresentados corroboram com os resultados já obtidos por diferentes autores, já que a redução da concentração de MCYST foi de 95% em 72 horas de exposição.

A degradação da MCYST era demonstrada somente por membros do gênero *Sphingomonas*, contudo estudos recentes têm identificado espécies com esta capacidade, incluindo os gêneros *Pseudomonas* (TAKENAKA; WATANABE, 1997), *Paucilobacter* (RAPALA et al., 2005), *Methylobacillus* (HU et al., 2009), *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (NYBOM; SALMINEN; MERILUOTO, 2007), *Burkholderia* (LEMES et al., 2008), *Sphingosinicella* (MARUYAMA et al., 2006), *Arthrobacter*, *Brevibacterium* e *Rhodococcus* (MANAGE et al, 2009) e *Bacillus* (ALMRI,2010).

Takenaka e Watanabe (1997) isolaram 5 espécies de bactérias *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* de um lago com constantes florações de cianobactérias, mas somente a espécie *Pseudomonas* sp. foi capaz de degradar $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de MCYST-LR em três dias. Quando comparada com a *Pseudomonas* sp., isolado deste trabalho (Isolado 4). Esta foi mais efetiva, pois reduziu 80% da MCYST-XR no mesmo período, esta diferença na eficiência de degradação pode ser atribuída à condição ambiental de isolamento destas bactérias, já que um ambiente eutrofizado com constantes florações de cianobactérias oferece maiores condições de desenvolvimento bacteriano e por outro lado um ambiente como a água tratada exige uma maior versatilidade nutricional para a bactéria visto que fontes de carbono estão mais restritas na água tratada.

O isolado 59, identificado como *Acinetobacter*, também foi bastante efetivo na remoção da MCYST no ensaio de degradação, removendo 100% da MCYST em 72 horas de incubação. Berg et al. (2009) identificaram bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Flavobacterium* que estavam presentes em culturas de cianobactérias e relataram que essas bactérias exercem um efeito benéfico ao desenvolvimento da cianobactéria. O gênero *Acinetobacter* ainda não foi identificado como degradador de MCYST, sendo este trabalho o primeiro relato. Gêneros de bactérias pertencentes à classe Gammaproteobacteria, da ordem Pseudomonales são bastante versáteis e conhecidos por degradarem compostos aromáticos e são amplamente utilizados em processos de biorremediação.

Alamri (2010) demonstrou a capacidade de degradação de MCYST-RR por uma espécie de *Bacillus* sp. obtido em um lago eutrofizado com constante floração de cianobactérias. Este foi o primeiro estudo a investigar a habilidade de degradação de MCYST por *Bacillus*, o qual foi capaz de reduzir 10 mg.L⁻¹ de MCYST-RR em 48 horas. O isolado também identificado como *Bacillus* sp., no presente trabalho, reduziu 80% da MCYST presente no meio em 96 horas de ensaio de degradação. Algumas espécies de *Bacillus* são bem conhecidas por sua capacidade de degradar compostos aromáticos de difícil degradação. Outro fator que deve ser considerado é o ambiente de isolamento destas espécies, que provém de habitats diferentes.

Manage et al. (2009) identificaram bactérias dos gêneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium* e *Rhodococcus* capazes de degradar MCYST-LR. Estas bactérias pertencem ao grupo Actinobacteria, cujos membros são conhecidos por sua diversidade metabólica e habilidade em degradar um grande número de compostos. No presente trabalho dois isolados foram identificados também como pertencentes ao grupo Actinobacteria, sendo os gêneros *Agromyces* e *Microbacterium* que foram bastante efetivos na eliminação da MCYST presente no meio, reduzindo sua concentração de 96 e 79% em 72 horas, respectivamente.

Os membros da ordem Actinomicetales são conhecidos por sua diversidade e habilidade de degradar grande variedade de substâncias recalcitrantes, e isto tem sido demonstrado nos mais diversos ambientes, como água doce, água salgada e solo. Um estudo realizado por Kang et al. (2005) isolou *Microbacterium* sp. e *Rhodococcus* sp. capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos no solo. Kato et al. (2007) relataram que a degradação da MCYST e de outros peptídeos cíclicos de difícil degradação não são induzidos por substratos, mas inerente, pois a

degradação dos compostos tanto MCYST como outros peptídeos era iniciada sem intervalo para crescimento sugerindo uma ampla especificidade de substrato de enzimas hidrolíticas, corroborando os resultados do presente trabalho onde os isolados capazes de degradar MCYST pertencem a classes e gêneros que também são capazes de degradar outros compostos, como hidrocarbonetos.

2.4.4 Detecção da presença do gene da microcistinase *mlrA*

Bourne et al. (2001) identificaram os genes responsáveis pela degradação da MCYST em *Sphingomonas* sp (ACM3962): *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*. A enzima codificada pelo gene *mlrA* pode clivar o peptídeo Adda-Arg da MCYST-LR, abrindo a estrutura cíclica. A MCYST-LR linearizada é degradada pelas peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC*, e o *mlrD* codifica a proteína transportadora que carrega a MCYST para dentro da célula microbiana.

A enzima MlrA, nomeada “microcistinase”, é a enzima mais importante do mecanismo do metabolismo da MCYST, pois é a responsável por abrir a estrutura cíclica da MCYST, já que é esta estrutura que promove a estabilidade e resistência contra a ação de proteases. Por este motivo quando esta enzima está presente, a degradação da MCYST é facilitada (SAITO et al., 2003). Estes genes que codificam enzimas envolvidas na via de degradação da MCYST demonstram similaridade com todas as espécies bacterianas depositadas no GenBank como degradadoras de MCYST. Assim, neste trabalho foi avaliada a presença de um gene específico, *mlrA*, nas bactérias que apresentaram capacidade de degradação da MCYST-XR.

Dentre os seis isolados que apresentaram a capacidade de degradação da MCYST e que foram testados utilizando iniciadores específicos para o gene *mlrA* (SAITO et al., 2003), dois isolados apresentaram fragmento de aproximadamente 800 pb, correspondente ao gene *mlrA*, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Detecção do fragmento de 800 pb

Os produtos da amplificação utilizando os iniciadores específicos para o gene *mlrA* (SAITO et al., 2003), que apresentaram o fragmento esperado foram clonados e sequenciados, a análise BLASTp pod ser observada Tabela 7. A árvore filogenética da sequência de aminoácidos obtidas dos isolados pode ser observada na Figura 15.

Tabela 7 - Resultado da análise BLASTp da sequência de aminoácidos obtidas dos isolados que apresentaram fragmento de 800pb

Isolado	Identidade (%)	Sequências do Genbank com maior similaridade (nº de Acesso)
30	90	hydrolase de <i>Bacillus cereus</i> HB3081.97 (YP_003790703)
44	88	hydrolase de <i>Streptomyces scabei</i> CB67289 (ZP_003485869)

Devido às sequências de proteínas relacionadas ao gene *mlrA* não terem sido encontradas na análise BLASTp, foi feita uma comparação direta entre as sequências obtidas para os dois isolados e a sequência MlrA de *Sphingomonas* sp. ACM-3962 (AF 411068), utilizada no desenho dos iniciadores por Saito et al. (2003). Esta comparação resultou em um percentual de 11% de cobertura e 26% de identidade entre o isolado 30 e a linhagem ACM-3962, e 41% de cobertura e 20% de identidade quando a comparação foi realizada entre o isolado 44 e a linhagem

ACM-3962. O isolado 44 possui uma sequência menor (131 aa) em relação à sequência do isolado 30 (164aa), enquanto a sequência de aminoácidos da linhagem ACM-3962 é de um tamanho consideravelmente maior (336 aa) que ambas, o que explica a baixa cobertura das sequências analisadas. Além disso, a sequência do isolado 44 em comparação com a do isolado 30 apresenta uma cobertura relativamente alta (70%), mas uma baixa identidade (32%). Estes valores são baixos para se afirmar que estas sequências estão proximamente relacionadas, o que é confirmado na análise filogenética, ilustrada na Figura 15.

Figura 15 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos obtidas dos isolados que apresentaram fragmento para o gene *mlrA*. As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

Estudos sobre mecanismos de degradação de MCYSTs são limitados, isto porque as MCYSTs são peptídeos cíclicos altamente estáveis contra a ação de proteases (CHEN, 2010). As MCYSTs são dificilmente degradadas por enzimas comuns tais como tripsina, collagenase e pepsina, isto porque sua estrutura peptídica cíclica possui baixa flexibilidade (SAITOU et al., 2003). Isto sugere que o mecanismo de degradação da MCYST é mediado por enzimas específicas produzidas por bactérias altamente adaptadas.

A enzima microcistinase é classificada como peptidase, pertencente à família das hidrolases. Hidrolases são enzimas que promovem a quebra de um material orgânico através da utilização de água. São divididas em várias classes, incluindo glicosídeos e peptidases.

Peptidases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que quebram ligações peptídicas (ALBERTS et al., 1997).

Esta enzima promove a hidrólise da ligação Adda-Arg na MCYST-LR, tendo como única função clivar a estrutura cíclica da MCYST, apesar desta enzima ser expressa por um gene identificado primeiramente em *Sphingomonas*, o qual não é específico para esta espécie, mas sim específico para bactérias que exibem a capacidade em degradar MCYST (SAITO et al., 2003; BOURNE et al., 2001).

No presente estudo, dos seis isolados bacterianos que apresentaram a capacidade de degradação da MCYST, somente dois apresentaram o fragmento de 800 pb, utilizando os iniciadores específico do gene *mlrA*, segundo Saito et al. (2003), e por meio da análise BLASTp apresentaram similaridade com hidrolases, mas não apresentaram similaridade com peptidases ou com a microcistinase. Este isolados, identificados como *Bacillus* sp. e *Microbacterium* sp., foram bastante efetivos na remoção da MCYST e o fato de terem apresentado similaridade com hidrolases pode ser um indício que esta não é uma simples hidrolase, mas sim uma enzima que age especificamente nas ligações peptídicas da MCYST, já que a microcistinase também é uma hidrolase (SAITO et al., 2003; BOURNE et al, 2001).

Os quatro isolados que degradaram MCYST e não apresentaram bandas correspondentes ao gene da microcistinase podem possuir outros genes que codificam enzimas diferentes e que talvez possuam a mesma função da microcistinase. Manage et al. (2009) testaram a capacidade de 11 isolados, membros do gênero *Actinobacteria*, em degradar MCYST-LR, onde 10 destes isolados degradaram efetivamente a variante -LR, entretanto, nenhum destes isolados apresentou os genes *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*. Este estudo demonstrou claramente que uma grande diversidade de gêneros de bactérias possui a capacidade de degradar MCYST, já que nenhum dos isolados apresentou homologia com as bactérias atualmente classificadas como degradadoras de MCYSTs depositadas no banco de dados. Pelo fato dos isolados deste trabalho também não apresentarem o gene *mlrA*, provavelmente seus mecanismos de degradação são diferentes das já identificadas como degradadores de MCYSTs.

Como o gene da microcistinase é um gene que possui poucas sequências nos bancos de dados e estas estão relacionadas a poucos táxons, isolados de ambientes semelhantes, o gene pode ser pouco conservado e apresentar alta variação em gêneros diferentes, desconhecida até o

momento, o que geraria a baixa similariedade e a aparente proximidade a outras enzimas não relacionadas ao metabolismo da microcistina. É possível ainda que os iniciadores tenham baixa especificidade ao gene *mlrA* e amplifiquem regiões do genoma não necessariamente relacionados a ele. Esta última hipótese é corroborada pela baixa identidade apresentada entre as sequências dos isolados 30 e 44 e *Sphingomonas* sp. ACM-3962.

A identificação de bactérias que tem a capacidade de degradar MCYSTs, isoladas de ambientes sem histórico de florações de cianobactérias tóxicas e que não possuem o grupo de genes *mlr* envolvidos na degradação, é de suma importância para trabalhos futuros, como identificar novos genes, novas enzimas envolvidas na via biossintética e assim ter uma visão ampla da diversidade de microrganismos capazes de degradar MCYSTs.

2.4.5 Toxicidade do subproduto da degradação da MCYST

Para avaliar se a via de degradação da MCYST-XR realizada neste trabalho gerou subprodutos tóxicos, foram feitos bioensaios de toxicidade aguda, utilizando o cladócero *D. similis* e *H. attenuata*, organismos padrão conhecidamente sensíveis para avaliação do grau de toxicidade de compostos em água. Antes de avaliar o produto da degradação a Dose Letal, CL₅₀, foi estabelecida com o padrão de MCYST-XR.

A diluição do padrão -XR e as doses utilizadas para o estabelecimento da CL₅₀, para ambos os organismos, pode ser observado nas Tabelas 8 e 9. Um controle positivo, contendo somente o meio de cultura do organismo teste e um controle negativo, contendo somente metanol 100% seco foi realizado juntamente com o ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 8 – Concentrações utilizadas do padrão -XR para estabelecimento da CL₅₀ para *D. similis*

Concentração padrão -XR (%)	Meio de cultivo (mL)	Solução padrão -XR toxina (mL)	Concentração final da MCYST-XR (µg.mL ⁻¹)
100	7,500	1,500	620
75	8,750	1,125	460
50	9,250	0,750	310
25	9,625	0,375	156
10	9,850	0,150	62
5	9,925	0,075	31
1	9,985	0,015	6,2
0	10,00	0,00	0

Tabela 9 – Doses utilizadas do padrão -XR para estabelecimento da CL₅₀ para *H. attenuata*

Concentração padrão -XR (%)	Meio de cultivo (mL)	Solução padrão -XR toxina (mL)	Concentração final da MCYST-XR (µg.mL⁻¹)
100	3,0	1	410
75	3,25	0,75	307
50	3,50	0,50	205
25	3,75	0,25	150
0	4,00	0,00	0

O tempo de duração do ensaio com a *D. similis* é de 48 horas, mas leituras em 24 horas são recomendadas para avaliar o grau de toxicidade do composto. Os resultados obtidos nas leituras efetuadas pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 – Número de organismos imóveis durante o ensaio de toxicidade com a *D. similis* utilizando o padrão MCYST-XR

Concentrações (%)	Número de organismos utilizados no teste	Número de organismos imóveis após 48 horas de exposição
100	15	15
75	15	15
50	15	15
25	15	15
10	15	12
5	15	8
1	15	0
0	15	0

No resultado apresentado na Tabela acima pode-se observar que na concentração de 10% da toxina, após 48 horas, a *D. similis* começou a diminuir o número de organismos imóveis, passando de 15 para 4 imóveis e a partir daí conforme a concentração da toxina diminuiu, a média de organismos mortos também diminuiu. Este resultado mostra que a sensibilidade dos organismos está entre as concentrações 10 e 1% da toxina, sendo 10% considerada ainda dose letal. Utilizando o programa JSPEAR, conforme procedimento do Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP calculou-se a CL₅₀ que está entre 5 e 1% da concentração da toxina.

O tempo de duração do ensaio com *H.attenuata* é de 96 horas, contudo leituras a cada 24 horas são recomendadas para uma melhor avaliação da toxicidade do composto. OS resultados

obtidos do ensaio para avaliar a sensibilidade da *H. attenuata* ao padrão de MCYST-XR podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 - Alterações morfológicas apresentadas pela *H. attenuata* após exposição ao padrão MCYST-XR

Concentrações (%)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
100	C	C	C	C
75	B	B	B	B
50	B	B	B	B
25	A	A	A	A
0	A	A	A	A

A) Organismo normal;

B) Bulbo; C) Tentáculos encurtados; - Efeitos Sub-letais

C) Tulipa; D) Desintegrado; - Efeitos Letais

A Tabela 9 mostra que as alterações morfológicas causadas na *H. attenuata* pela MCYST-XR foram apenas efeitos sub-letais, como a formação de bulbos e encurtamento dos tentáculos (Figura 16). Como não ocorreu morte do organismo durante o ensaio não foi possível calcular a CL₅₀ e concluiu-se então que a MCYST-XR não é tóxica para o organismo *H. attenuata*. Sendo assim para avaliação da toxicidade do produto da degradação da MCYST-XR optou-se pela utilização somente do organismo *D. similis*.

Após a confirmação da toxicidade da MCYST-XR em *D. similis* e estabelecimento da CL₅₀ foram iniciados os ensaios para avaliar se a via de degradação da MCYST realizado pelos isolados gerou produtos tóxicos. O ensaio de toxicidade foi realizado da mesma forma como já citado acima, sendo que as concentrações do ensaio foram substituídas pelos dias do ensaio de degradação, ou seja, a concentração de 100% é o tempo 0 (60 µg.mL⁻¹) do ensaio de degradação, a concentração 75% é o tempo 48 horas, 50% é o tempo 72 horas e 25% é o tempo 120 horas dos ensaios de degradação, para assim dar uma melhor visão se ocorreu diminuição da toxicidade da MCYST frente ao organismo, ou se a toxicidade continuava devido à presença de produtos de degradação da MCYST.

As amostras coletadas que foram utilizadas nos ensaios de toxicidade foram às mesmas utilizadas para avaliação da capacidade de degradação da MCYST em LC-MS, já que o ensaio foi

realizado em repetições com o intuito de utilizar amostras com as mesmas condições. Um controle positivo, somente o meio de cultivo da *D. similis*, foi incluído junto ao ensaio, assim como um controle positivo do ensaio de degradação, MCYST + MS e o controle negativo (meio MS).

Na Figura 17 é possível observar o aumento da sobrevivência de organismos *D. similis* relacionado com a redução da concentração da MCYST presente do ensaio de degradação. O controle positivo do ensaio manteve a toxicidade, causando a morte dos organismos durante todo o ensaio de degradação.

Figura 16 – Gráficos de redução da concentração da MCYST-XR de cada isolado bacteriano e do aumento no número de organismos móveis de *D. similis*

A ocorrência de florações de cianobactérias é um fenômeno típico em ambientes eutrofizados afetando as comunidades zooplancônicas e interferindo na transferência de energia nos níveis tróficos (OKUMURA et al., 2006). A evidência dos efeitos deletérios causados pelas cianobactérias em zooplânctons é conhecida, contudo esses efeitos podem ser variáveis entre gêneros e espécies de zooplânctons (SIVONEN; JONES, 1999). *Daphnias* são excelentes representantes dos cladóceros, um grupo de organismos de água doce capazes de demonstrar os efeitos dos distúrbios no ambiente aquático, esses organismos são comumente utilizados em testes de toxicidade em todo o mundo (OKUMURA et al., 2006).

Okumura et al. (2006) investigaram os efeitos de toxicidade aguda de extratos de florações de cianobactérias de ambientes naturais e também da espécie de laboratório conhecidamente tóxica *M. aeruginosa* NPLJ-4, avaliando a sobrevivência de 3 espécies de cladóceros, *Ceriodaphnia silvestrii*, *C. dubia* e *D. similis*. Os resultados demonstraram que tantos os extratos de florações naturais como a linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4, interferiram negativamente na sobrevivência dos organismos, contudo o organismo que apresentou maior sensibilidade aos extratos foi *D. similis*, demonstrando ser um excelente indicador de toxicidade de extratos de MCYST.

A degradação da MCYST é considerada uma das formas mais efetivas para eliminação desta toxina em água. Contudo, antes da degradação de MCYST ser considerada uma forma efetiva de remoção, existe a necessidade de averiguar a geração de algum produto tóxico durante a via degradativa. Os resultados obtidos no presente trabalho foram bastante satisfatórios e promissores.

A redução da concentração da MCYST no ensaio de degradação pelos isolados 4, 65 e 59 nas primeiras 48 horas de ensaio levou à sobrevivência de 40% dos organismos indicadores, sendo a taxa de organismos imóveis de 100% no tempo 0 do ensaio de degradação. Todos os isolados bacterianos degradadores reduziram a concentração da MCYST no ensaio de degradação e não produziram compostos tóxicos na via biodegradativa, pois como foi demonstrado na Figura 17, a sobrevivência da *D. similis* ao final do ensaio de degradação foi de 100%, sendo que o controle positivo do ensaio (MCYST-XR + Meio de manutenção) manteve a taxa de morte em 100%. A morte dos organismos era observada e detectada pelo rompimento do epitélio digestivo (FIGURA 18). No decorrer dos dias do ensaio de degradação e consequente redução na

concentração da MCYST o número de organismos imóveis também diminuía até a completa remoção da MCYST no meio.

Poucos estudos têm identificado os produtos formados durante a degradação da toxina. Bourne et al. (1996) e Harada et al. (2004) identificaram dois produtos intermediários a partir da degradação bacteriana da MCYST-LR pelas espécies *Sphingomonas* sp. ACM-3962 e *Sphingomonas* sp. B9. Ambos os estudos identificaram MCYST-LR linearizadas (NH₂-Adda-glu-Mdha-Ala-Leu-Measp-Arg-OH) e um tetrapeptídeo (NH₂-Adda-Glu-Mdha-Arg-OH) como produtos intermediários da via. Harada et al. (2004) também isolaram o grupo Adda como um produto final da degradação da MCYST. Esses autores determinaram que ambos os produtos intermediários gerados durante a via degradativa são menos ativos na inibição de proteína fosfatase do que a MCYST-LR em bioensaios com ratos. Ho et al. (2007) avaliaram a geração de produtos citotóxicos gerados durante a degradação da MCYST-LR e -LA. Os resultados obtidos não detectaram produtos citotóxicos na degradação destas duas variantes de MCYST, demonstrando a viabilidade da degradação da toxina.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com esses autores mostrando que a degradação da MCYST-XR elimina sua toxicidade e não apresenta compostos de toxicidade aguda para organismos *D. similis*, podendo ser considerada uma forma efetiva de remoção de MCYST na água.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As MCYST representam um grande desafio nas estações de tratamento de água, já que são de difícil remoção devido à sua estrutura estável e resistente a ações de várias enzimas. A biodegradação tem-se mostrado uma das formas mais seguras para a remoção destas toxinas na água destinada ao consumo humano. No intuito de obter mais informações, este trabalho tentou responder as questões relacionadas à este tema e os resultados mostraram que:

- Foi possível obter um padrão da MCYST–XR, produzida pela linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4, para avaliar a capacidade de degradação desta toxina por bactérias;
- No meio de cultura BG-11 a linhagem de cianobactéria *M. aeruginosa* NPLJ-4 produz diferentes variantes de MCYSTs, quando comparado ao meio de cultura ASM-1;
- Foi produzida pela *M. aeruginosa* NPLJ-4 uma nova variante de MCYST ainda não descrita na literatura, com massa molecular de 1055 Da;
- Bactérias provenientes de ambientes sem histórico de florações de cianobactérias são capazes de degradar MCYST;
- O sistema de abastecimento de água tratada contém bactérias com capacidade de degradação de MCYST;
- Nem todas as bactérias degradadoras de MCYSTs possuem genes já descritos envolvidos na degradação dessa toxina;
- O gênero *Acinetobacter*, ainda não descrito como degradador de MCYST, foi efetivo na degradação desta cianotoxina;
- Não foram encontrados compostos da via de biodegradação da MCYST-XR, pelas bactérias deste estudo, que apresentassem toxicidade aguda frente aos organismos *D. similis*.

REFERÊNCIAS

ACERO, J.L.; RODRIGUEZ, E.; MARILUOTO, J. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. **Water Research**, Oxford, v. 39, p. 1628-1638, 2005.

AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterium species from the genus *Brasilonema* causing damage to Eucalyptus leaves. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, p. 1322-1334, 2008.

ALAMRI, S.A. Degradation of microcystin by a new *Bacillus* sp. isolated from a Saudi freshwater lake. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, p. 6552-6559, 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1997. 1462 p.

ALBUQUERQUE, E.C.; MELO, L.F.C.; FRANCO, T.T. Use of solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and MALDI-TOF identification for [D-Leu1]MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, Oxford, v. 1, p. 1-10, 2006.

ALLEN, M.B., Simple conditions for growth of unicellular blue- green algae on plates. **Journal of Phycology**, Malden, v. 4, p. 1-4, 1968.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p.403-410, 1990.

ALVES, M.G. **Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba**. 2007. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

AMÉ, M.V.; ECHENIQUE, J.R.; PFLUGMACHER, S.; WUNDERLIN, D.A. Degradation of microcystin –RR by sphingomonas sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba – Argentina). **Biodegradation**, New York, v. 17, p. 447-455, 2006.

AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v. 32, p. 1495-1507, 1994.

AZEVEDO, S. M. F.O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, R. S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Malden, v. 181, p. 441-446, 2002.

- BERG, K.A.; LYRA, C.; SIVONEN, K.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; TUOMI, P.; RAPALA, J. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. **International Society for Microbial Ecology**, New York, v. 3, p. 314-325, 2009.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BOTES, D.P.; WESSELS, P.L.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.T.C.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; BARNA, J.C.J.; WILLIAMS, D.H. Structural studies on cyanoginosins-LR, YR, YA, and YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 1, p. 2747-2748, 1985.
- BOURNE, D.G.; JONES, G.J.; BLAKELEY, R.L.; JONES, A.; NEGRI, A.P.; RIDCLES, P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4086-4094, 1996.
- BOURNE, D.G.; RIDCLES, P.; JONES, G.J.; SMITH, W.; BLAKELEY, R.L. Characterization of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Environment Toxicology**, Malden, v. 16, p. 523-534, 2001.
- BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from the Atlantic rainforest region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 30, p. 135- 152, 2009.
- BROOKE, S.; NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B.; KLASS, G. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicon**, New York, v. 48, p. 1054-1059, 2006.
- BRUCHET, A.; BERNAZEAU, F.; BAUDIN, I.; PIERONNE, P. Algal toxins in surface waters: analysis and treatment. **Water Supply**, Oxford, v. 16, p. 619-623, 1998.
- CARMICHAEL, W.W. The toxins if Cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, p. 78-86, 1994.
- CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; NA, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.I.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, Triangle, v.109, p. 663-668, 2001.
- CHEN, J.; HU, L.B.; ZHOU, W.; YAN, S.H.; YANG, J.D.; XUE, Y.F.; SHI, Q.Z. Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from Lake Taihu, China. **Internation Journal of Molecular Science**, Basel, v. 11, p. 896-911, 2010.

CHEN, W.; SONG, L.; OU, D.; GAN, N. Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. **Environmental Toxicology**, Malden, v. 20, p. 323-330, 2005.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.185, p.564-572, 2003.

CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. **Aquatic Microbial Ecology**, New York, v. 27, p. 125-136, 2002.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 264-272, 2005.

COUSINS, I.T.; BEALING, D.J.; JAMES, H.A.; SUTTON, A. Degradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. **Water Research**, Oxford, v. 30, p. 481-485, 1996.

DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 197-206, 1996.

DUTKA, B.J. **Methods for microbiological and toxicological analysis of water, wastewaters and sediments**. Ohwa: National Water Research Institute (NWRI), 1997. 317 p.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algal) toxins in water. **Review of Environmental Contamination**, New York, v. 163, p. 115-136, 2000.

EDWARDS, C.; GRAHAM, D.; FOWLER, N.; LAWTON, L.A. Degradation of microcystins and nodularin in freshwater. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, p. 1315-1321, 2008.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENCL, M.C. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALCONER, I.R.; RUNNERGAR, M.T.C.; BUCKLEY, T.; HUYN, V.L.; BRADSHAW, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing Cyanobacterial blooms. **Journal of the American Water Works Association**, New York, v. 81, p. 102-105, 1989.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783–791, 1985.

FERRÃO FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecol Bras**, New York, v. 13, p. 272-312, 2009.

FERREIRA, M.F.N.; OLIVEIRA, V.M.; CUNHA, P.V.; GRISOLIA, C.K.; PIRES, O.R.P.; FIORE, M.F. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium the genus *Fischerella*. **Toxicon**, New York, v. 53, p. 754-761, 2009.

FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microorganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 69-96.

FIORE, M.F.; GENUÁRIO, D.B.; PAMPLONA, C.S.S.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; CANTANÚSIO, R.N.; SILVA-STENICO, M.E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**, New York, v. 53, p. 754-761, 2009.

FUNARI, E.; TESTAI, E. **Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. critical reviews in toxicology**. Disponível em: <www.informaworld.com/smpp/title~content=t713401167>. Acesso em: 11 jan. 2011.

GOMES, A.M.A.; OLIVEIRA, A.C.P.; AZEVEDO, S.M.F.O. Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de MCYSTs (Cianotoxina). **Oecology**, New York, v. 13, p. 402-412, 2009.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORHAM, P.R.; McLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K., Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **VerhanCLungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, Basel, v. 15, p. 796-804, 1964.

GULLEDGE, B.M.; AGGEN, J.B.; HUANG, H.B.; NAIRN, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 9, p. 1991 2003, 2002.

HARADA, K.J.; TSUJI, K. Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. **Journal of Toxicology. Toxin Reviews**, New York, v. 61, p. 385-403, 1998.

HARADA, K.I.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MASAYOSHI, M.; ITO, E.;TUSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicon**, New York, v. 44, p. 107–109, 2004.

HART, J.; FAWELL, J. K.; CROLL, B. The fate of both intra- and extracellular toxins during drinking water treatment. **Water Supply**, Oxford, v. 16, p. 611-616, 1998.

HICKS, L.M.; MOFFITT, M.C.; BEER, L.L.; MOORE, B.S.; KELLEHER, N.L. Structural characterization of in vitro and in vivo intermediates on the loading module of microcystin synthetase. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 1, p. 93-102, 2006.

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A. M.; PYYSALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. **Water Research**, Oxford, v. 23, p. 979-984, 1989.

HISTOPATHOLOGICAL effects of [D-Leu1]Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844). **Toxicon**, New York, v. 55, p. 1255-1262, 2010.

HO, L.; GAUDIEUS, A.L.; FANOK, S.; NEWCOMBE, G.; HUMPAGE, A.R. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, New York v. 50, p. 438-441, 2007.

HU, L.B.; YANG, J.D.; ZHOU, W.; YIN, Y.F.; CHEN, J.; SHI, Z.Q. Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p. 205-211, 2009.

IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; TSUJI, K.; HARADA, K. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. **Chemical Research of Toxicology**, Washington, v. 18, p. 591-598, 2005.

ISHII, H.; NISHIJIMA, M; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Research**, Oxford, v. 38, p. 2667-2676, 2004.

JONES, G.J.; BOURNE, D.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacterial. **Natural Toxins**, Washington, v. 2, p. 228-235, 1994.

KAASALAINEN, U.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Microcystin Production in the Tripartite Cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, New York, v. 22, n. 6, p. 695-702, 2009.

KAEBERNICK, M.; ROHRLACK, T.; CHISTOFFERSEN, K.; NEILAN, B.A. Aspontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 3, p. 669-679, 2001.

KANG, S.M.; OH, K.H.; KAHNG, H.Y. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of sunchon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 33, p. 169-177, 2005.

- KATO, H.; IMANISHI, S.Y.; TSUJI, K.; HARADA, K.I. Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. **Water Research**, Oxford, v. 41, p. 1754-1762, 2007.
- KEIJOLA, A.M.; HIMBERG, K.; ESALA, A.L.; SIVONEN, K.; HIISVIRTA, L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot scale experiments. **Toxicity Assessment International Journal**, Oxford, v. 3, p. 643-656, 1988.
- KIVIRANTA, J.K.; SIVONEN, K. LAHTI, K.; LUUKKAINEN, R.; NIEMELA, S.I. Production and degradation of cyanobacterial toxins: a laboratory study. **Archives für Hydrobiology**, New York, v. 121, p. 281-294, 1991.
- KURMAYER, R.; DITTMAN, E.; FASTNER, J.; CHORUS, I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microbial Ecology**, New York, v. 43, p. 107-118, 2002.
- LAM, A.K.L.; FEDORAK, P.M.; PREPAS, E.E. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin- LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. **Environmental Technology**, Washington, v. 29, p. 242-246, 1995.
- LAMBERT, T.W.; BOLAND, M.P.; HOLMES, C.F.B.; HRUDEY, S.E. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate biomass. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 28, p. 753-755, 1994.
- LANKOFF, A.; KRZOWSKI, L.; GLAB, J.; BANASIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 559, p. 131-142, 2004.
- LEMES, G.A.; KERSANACH, R.; PINTO, L.; DELLAGOSTIN, O.; YUNES, J.; MATTHIENSEN, A. Degradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicology Environmental Safety**, Dordrecht, v. 69, p. 358-365, 2008.
- LI, X.Y.; WANG, J.; LIANG, J.B.; LIU, Y.D. Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common Carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Dordrecht, v. 67, p. 447-451, 2007.
- LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 554-568, 1998.
- LÜRLING, M. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Limnology and Oceanography**, Tokyo, v. 48, p. 2214-2220, 2003.
- MACKINTOSH, R.W. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 371, p. 236-240, 1995.

MANAGE, P.M.; EDWARDS, C.; SINGH, B.K.; LAWTON, L.A. Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2964-2968, 2009.

MARUYAMA, T.; PARK, H.D.; OZAWA, K.; TANAKA, Y.; SUMINO, T.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A.; KATO, K. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a microcystin-degrading bacterium. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 85–89, 2006.

MESSIAS, T.G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Characterization of the Nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 6353-6362, 2004.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.; SAKAI, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Nostoc* sp. strain 1521. **Journal Organic Chemical**, Ontario, v. 55, p. 6135-6139, 1990.

NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated pepetide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, Tokyo, v. 7, p. 753-764, 1997.

NICHOLSON, B.C.; ROSITANO, J.; BURCH, M.D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, Oxford, v. 28, p. 1297-1303, 1994.

NICHOLSON, W.C.; STEFFENSEN, D.A. Praralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, Victoria, v. 45, p. 230-238, 2006.

NYBOM, S.; SALMINEN, S.J.; MERILUOTO, J. Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 270, p. 27-33, 2007.

OKSANEN, I.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. Discovery rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5756, 2004.

OKUMURA, D.T.; SOTERO-SANTOS, R.B.; TAKENAKA, R.A.; ROCHA, O. Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 16, p. 263-270, 2006.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT **Guidelines for testing of chemicals *Daphnia magna*, n° 211**. Paris, 1998. 135 p.

PARK, H.D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. **Environmental Toxicology**, Dordrecht, v. 16, p. 337-343, 2001.

PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, p. 281-288, 2008.

RAO, P.V.; GUPTA, N.; BHASKAR, A.S.; JAYARAJ, R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. **Journal of Environmental Biology**, Muzaffarnagar, v. 23, p. 215-224, 2002.

RAPALA, J.; LAHTI, K.; SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I. Biodegradability and absorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. **Letters Applied Microbiology**, Malden, v. 19, p.423-426, 1994.

RAPALA, J.; BERG, K.; LYRA, C.; NIEMI, R.M.; MANZ, W.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LAHTI, K. *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 1563–1568, 2005.

REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. A New medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1-7, 1985.

ROBERTSON, P.K.J.; LAWTON, L.A.; CORNISH, B.J.P.A. The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, Hackensack, v. 3, p. 544-551, 1999.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; DITTMANN, E.; NOGUEIRA, I.; VACONCELOS, V.; BÖRNER, T. Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. **Limnology and Oceanography**, Tokyo, v. 50, p. 440-448, 2005.

SAITO, T.; OKANO, K.; PARK, H.D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B.A.; BURNS, B.P.; SUGIURA. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 229, p. 271-276, 2003.

SAITOU, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M. Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. **Journal of Water Supply Research and Technology – AQUA**, Malden, v. 52.1, p. 13-18, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.

SANT'ANA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Zeitschrift Für Kryptogamenkunde**, Nova Hedwigia, v. 71, p. 359-385, 2000.

SCHOPF, W. Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 6735-6742, 1994.

SILVA, C.P. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. 2010. 199 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. **Microbiologia de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1997. 295 p.

SILVA-STENICO, M.E.; CANTÚSIO, R. N.; ALVES, I.R.; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction Optimization. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, p. 535-542, 2009.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 41-91.

SKULBERG, O.M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.). **Hydrogen energy system: production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 95-110.

SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science**, Washington, v. 221, p. 669-671, 1983.

STACKEBRANDT, P.H.A.; GOEBEL, B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S RNAr sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

STAL, L.J. Physiological ecology of Cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytologist**, Malden, v. 131, n. 1, p. 1-32, 1995.

STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 21, p. 179-211, 1997.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.

TAKENAKA, S.; WATANABE, M.F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **Chemosphere**, Oxford, v. 34, p. 749–757, 1997.

TAMURA, K.; DUCLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THIEL, T.; WOLK, C.P. Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, p. 369-374, 1983.

TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, TROTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Waters Quality**, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 117-124, 2006.

WANG, P.J.; CHIEN, M.S.; WU, F.J.; CHOU, H.N.; LEE, S.J. Inhibition of embryonic development by microcystin- LR in zebrafish, *Danio rerio*. **Toxicology Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v. 45, p. 303-308, 2005.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANCLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRUPER, H.G. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464, 1987.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides-Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiological Review**, Malden, v. 30, p. 530–563, 2006.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669 p.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 203, p. 201-218, 2005.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide**. New York: Research Foundation and American Water Works Association, 1995. 200 p.

ZWEIGENBAUM, J.A.; HENION, J.D.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A; POON, G.K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 23, p. 723–733, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Sequências do gene de RNAr 16S

>*Pseudomonas* sp. - ISOLADO 4

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTG
CTCCTGGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
GGATAACGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGG
GGATCTTCGGACCTCACGCTACCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGG
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CGATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTG
TAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGT
TACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGT
TGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTACTGAGCTAGA
GTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
GACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCAAGACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGC
GCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG
CTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAA
CCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAA

>*Bacillus* sp. – ISOLADO 30

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTTGATGGGAGCT
TGCTCCCTGATAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAA
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACTTTTTTCTTCGCATG
AAGGGGAATTGAAAGATGGCTCCGGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACTTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACCCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGTTCGAATAG
GGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGCGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTCTTTGGTCTGTAAGT
ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC

GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTTGACCTCCCTAGAGATAGGGATTTCCTTCGG
 GGACAAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCAC
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
 ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTTGCT
 AGACCGCGAGGTTACGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC
 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCTGCGGTGA
 GTACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCC
 GAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGG
 GGTGAA

>*Microbacterium* sp. – ISOLADO 44

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCCCAGCTTG
 CTGGGTGGATCAGTGCGCAACGGGTGAGTAACATGTGAGCAATCTGCCCTGACTCT
 GGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATGAACCGTGGAGGCATCTTC
 AACGGTTGGAAAGATTTTTTGGTCAGGGATGAGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGT
 GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAG
 CGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCG
 GAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCTCGCTCTGCTGTGAAATCCCG
 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGA
 TTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGC
 GAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAA
 CAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTC
 CATTCCACGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACG
 GCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCAT
 GCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAA
 CGCTGCAGAAATGTAGAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
 TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCT
 ATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCATGGGATACTGCCGGGGTCAACTCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGC
 TACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG
 CCGGTCCCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAG
 TAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCC
 CGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGG
 GAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGTAATTAGGACTAA

>*Acinetobacter* sp. – ISOLADO 59

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG
CACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCATTTAGTGGG
GGACAACGTTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG
GGATCTTCGGACCTTGCGCTAAATGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGA
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA
CAATGGGCGGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTG
TAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTAGTACTAATACTACTGGATAGTGGAC
GTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG
GGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAG
TCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCGATACTGGGAAGCTAG
AGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG
GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGA
AAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGT
CTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGAC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
GACATACTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTTTTTCCTTACTTGCCAGCATTTCGGATGGGAACCTTAAAGGATACTGCCAG
TGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
TGCTACACTCGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGC
TAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGGTAGTCTAA
CCGCAAGGAGGACGCTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAA

>*Sphingomonas* sp. – ISOLADO 65

AACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTA
GTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCGGAATAACAGTGA
GAAATTACTGCTAATACCGGATGATGACTTCGGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGAT
GAGCCCGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTT
TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATG
CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAATG
ACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACG
GAGGGAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCCATTC
AAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGAACTAGATGG
CTTGAATCTTGGAGAGGCGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATAT
TCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCGCTGGACAAGTATTGACGCTGAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGATAACTAGCTGTCCGGGTTCATGGAACCTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTT
ATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCT
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGT

GTTTGACATGTCTAGTATGTTTCCCAGAGATGGGTTACTTCAGTTCGGCTGGCTAGAA
CACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTCGTCTTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGAAA
CCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTA
CACGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGAGCAGCTAGATCGCGA
GATCATGCTAATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAG
CATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
AGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGATTACCCGAAGGCGCTG
CGCTAACCCGCAAGGGAGGCAGGCGACCACGGTGGGTTTCAGCGACTGGGGTGAA

>*Agromyces* sp. – ISOLADO 69

GACGAACGTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGGTGCTT
GCACCTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGGAC
TCTGGGATAAACCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGGACCTTTCCTCGCATGA
GGTTTGGTGGAAGTTTTTCGGTCTGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGG
TTGTAAACCGCTTTTAGTAGGGAAGAAGGGCTTCGGCTTGACGGTACCTGCAGAAAA
AGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAACT
AGAGGCTCAACCTCTAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTGGTGTAGGGGA
GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATG
GCGAAGGCAGGTCTCTGGGCACTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGGGCGCTAGATGTGGGG
ACCTTTCCACGGTTTCCGTGTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGC
ATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAG
AACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTC
GCATGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTCATGTGAGACTGCCGGGGTCAACTCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCAT
GCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGTCGTAAGGCGGAGCGAATCCCAAAA
AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCT
AGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAG
GGAGCCGTTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAA

ANEXO B – Sequência de aminoácidos

>Isolado 30 – hidrolase de *Bacillus cereus* HB3081.97

MKNRVNPALLPGLMYPDQCLRPECLPVMREEASKVFPPTIVDETLSVTNEVIEGPDANP
LRLKIYRPKSNNESELPALLWIHGGGYILGSINDNDCLAVKIAKEANCMVISVDYRLAPEH
PYPAPIEDCYAALKWIADNAETLNIDSNRIGVAGVSAGGGLTAA

>Isolado 44 – hidrolase de *Streptomyces scabei* CB67289

MTLTPPPFDPPELAAALEMIKDTLLTQLTMDEIEATRNGPGIEMWADMCLTLGGAFEVED
RVVPGPENAPDISLLICRPVDPATDGPLPVIYHVHGGGMVLGNNRVGVDAPLRWANELG
AVVVSVEYRLAPE