**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

JANAÍNA FAGUNDES MALTA

**DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE MICROCISTINA EM LABORATÓRIO:
SUBSÍDIOS PARA O TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE
ABASTECIMENTO**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2018

JANAÍNA FAGUNDES MALTA

**DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE MICROCISTINA EM LABORATÓRIO:
SUBSÍDIOS PARA O TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE
ABASTECIMENTO**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FIM DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

F261d Fagundes Malta, Janaína
Degradação Biológica de Microcistina em
Laboratório: Subsídios para o Tratamento Avançado de
Águas de Abastecimento / Janaína Fagundes Malta;
orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha . São Carlos,
2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2018.

1. Cianotoxinas. 2. Biodegradação. 3. Microcistina.
4. 16S rRNA. 5. Comamonadaceae. 6. Tratamento Avançado
de águas de abastecimento. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **JANAÍNA FAGUNDES MALTA**.

Título da dissertação: "Degradação biológica de microcistina em laboratório: subsídios para o tratamento avançado de águas de abastecimento".

Data da defesa: 05/06/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Davi Gasparini Fernandes Cunha**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADA

Profa. Dra. **Mirna Helena Regali Seleguin**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

Prof. Dr. **Cesar Rossas Mota Filho**
(Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Dedico este trabalho à minha família e amigos. Sem vocês não seria possível alcançar meus sonhos e objetivos. Ana Gabriela, Tó, Soninha e Biel obrigada pelos exemplos maravilhosos de dedicação, amor, cumplicidade e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas escolhas que me inspiram a ser uma pessoa iluminada, única e que me faz cruzar com pessoas de bom coração durante essa longa jornada que é a vida.

Aos meus exemplos de vida: Ana Gabriela Fagundes, exemplo de mãe, mulher e guerreira; e Antônio Wilson, pai, amigo e que jamais me deixou desistir dos meus sonhos. Vocês são pais amados e meu maior orgulho. Meus irmãos, Sônia Fagundes Malta e Gabriel Nogueira Malta, pelo carinho e, acima de tudo, exemplos de caráter e cumplicidade. À família Fagundes e Malta, obrigada a cada um de vocês por fazerem parte das minhas histórias e de quem eu sou; e à família Nogueira, em especial à Jaqueline, exemplos de união e amor incondicional.

Ao meu orientador, Davi Gasparini Fernandes Cunha, por acreditar no meu potencial e abrir novas portas e oportunidades na minha vida. Obrigada pela dedicação, pelo conhecimento profissional compartilhado e, acima de tudo, pela amizade e zelo criado ao longo desses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus bons e velhos amigos, Juninho, Fernanda, Camila, Ana Elisa e Bárbara pelos anos de amizade verdadeira e histórias memoráveis. Nayara, Iara e Maurício, amigos que se tornaram a minha segunda família em São Paulo. Obrigada por me acolherem e serem tão especiais para mim. Amo cada um de vocês!

Aos amigos e companheiros do Biotace, que me acompanharam ao longo dos dias de luta e glória, Andréia Ortolan, Larissa Sene Araújo, Wesley Saltarelli, Flávia Bottino, Munique Moraes, Murilo Ferreira, Nicolas Finkler, Raphaella Guimarães, o meu muito obrigada pelos momentos descontraídos no *coffe time*, ou nos momentos de desespero, entre um experimento e outro. Henrique Sonobe, pela paciência e compreensão no nosso dia a dia e quem eu considero como um “irmão” que a vida me deu, obrigada de coração! Em especial, agradeço à técnica do nosso laboratório, Adriana Miwa, pela ajuda e conhecimento compartilhado; e à professora Maria do Carmo Calijuri, por nos disponibilizar um local de pesquisa com uma infraestrutura de qualidade para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento e toda equipe, Maria Auxiliadora C. Altieri Pin (Sá), Priscila Carla Toselli de Almeida (Pri), Rosemeire A. de Jesus e André Canale Garcia, obrigada pela atenção e zelo durante toda essa caminhada.

Aos professores presentes na minha banca de qualificação, Cali Laguna Achon e Eloisa Pozzi pelas sugestões que foram importantes e que contribuíram para que buscássemos desenvolver uma pesquisa de qualidade. Em especial, gostaria de agradecer à Eloiza, pela paciência comigo e com “minhas meninas”, pelo conhecimento dividido e por jamais me deixar desanimar em momentos difíceis enfrentados nesta jornada.

A equipe do SAAE – São Carlos, em especial a Eng. Leila Patrizzi, por gentilmente nos fornecerem amostras de água da unidade de filtração da estação.

Aos membros da banca de defesa, pela presença e contribuições a esta pesquisa. Agradeço por participarem do início desta nova jornada da minha carreira profissional.

A cada um que contribuiu, direta ou indiretamente, na realização de mais um sonho; a todos os exemplos de determinação, persistência e que jamais me deixaram desistir dos meus objetivos, a minha eterna gratidão e o meu muito obrigada!

“Acho que a vida é um processo... É como subir uma montanha. Mesmo que no fim não se esteja tão forte fisicamente, a paisagem visualizada é melhor.”

(Lya Luft)

RESUMO

MALTA, J. F. **Degradação biológica de microcistina em laboratório: subsídios para o tratamento avançado de águas de abastecimento.** 2018. 89 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Frequentemente encontrada nas florações de cianobactérias tóxicas em mananciais e reservatórios de água eutrofizados, a microcistina-LR (MIC-LR) é uma hepatotoxina persistente e de difícil remoção em Estações de Tratamento de Água (ETAs). O tratamento biológico combinado com o processo convencional de tratamento tem demonstrado resultados satisfatórios na remoção de MIC-LR, por meio da utilização de microrganismos na biodegradação da cianotoxina. Esta pesquisa avaliou, em diversos experimentos laboratoriais com duração de 10 dias, a biodegradação de MIC-LR por diferentes inóculos, como culturas purificadas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp., comunidade bacteriana autóctone isolada de um sistema de abastecimento de água e do próprio extrato da toxina. Foram testadas diferentes condições de concentração inicial (C_0) de MIC-LR, temperatura (T) e diferentes volumes de microrganismos inoculados (v/v). As análises das concentrações residuais da toxina foram realizadas pelo método Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a análise filogenética dos microrganismos, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos para C_0 , T e inóculos avaliados, nos quais influenciaram na redução substancial da toxina. Em $C_0 = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$, as menores concentrações residuais foram observadas pela comunidade bacteriana autóctone presente na ETA, que juntas degradaram mais de 90% da toxina, quando comparado as culturas purificadas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp., que reduziram em até 60% a C_0 . Quando expostos a $C_0 = 20 \mu\text{g.L}^{-1}$, os resultados demonstraram redução de 96% da concentração da toxina pela (SF); 90% na entrada e saída do filtro rápido (EF e SF) e 80%, pelos inóculos de culturas purificadas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. na concentração de 10% (v/v), nas $T = 22^\circ\text{C}$. Este é, possivelmente, o primeiro relato no Brasil da capacidade de cepas bacterianas *Brevundimonas* sp. em degradar MIC-LR. O acréscimo de T foi acompanhado pelos melhores resultados obtidos nesta pesquisa, com a biodegradação de 99% e 97% da toxina ($C_0 = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) pelos inóculos da SF e comunidade bacteriana autóctone do extrato de MIC-LR. Um total de 464 OTU (*Operational Taxonomic Unit*) foi obtido da comunidade bacteriana autóctone presente no extrato da toxina, EF e SF, com predominância de quatro filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (abundâncias relativas de 51,7, 13,4, 6,5 e 2,8%, respectivamente). Além disso, foi verificada a presença da família Comamonadaceae em todas as amostras analisadas, sugerindo-se a participação de cepas dessa família na biodegradação da toxina. Esta pesquisa demonstrou, por meio da utilização de microrganismos e diferentes fatores bióticos e abióticos, resultados promissores ao desenvolvimento dos processos biológicos como etapa adicional ao tratamento avançado de águas contaminadas por MIC-LR.

Palavras-chave: Cianotoxinas; Biodegradação; Microcistina; 16S rRNA; Comamonadaceae; Tratamento Avançado de águas de abastecimento.

ABSTRACT

MALTA, J. F. **Biological degradation of microcystin in laboratory conditions: contributions to drinking water advanced treatment.** 2018. 89 f. Dissertation (Master's Degree) – School of Engineering in São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018.

Often found in toxic cyanobacterial blooms in eutrophic water sources and reservoirs, microcystin-LR (MIC-LR) is a persistent hepatotoxin that is difficult to be removed in drinking water treatment plants (DWTPs). Biological treatment combined with conventional treatment process has shown satisfactory results in the removal of MIC-LR, through the use of microorganisms to biodegrade cyanotoxin. This study evaluated the biodegradation of MIC-LR by different inocula, such as purified cultures of *Sphingomonas* sp. and *Brevundimonas* sp., bacterial community isolated from a water supply system and the toxin extract itself. Several laboratory experiments were conducted with a duration of 10 days each. The biodegradation tests were carried out considering different initial concentrations (C_0) of MIC-LR, temperature (T) and different volumes of inoculated microorganisms (v/v). Residual toxin concentrations analyses were performed by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and for phylogenetic analysis of bacterial communities 16S rRNA gene sequencing was applied. The results were statistically significant for C_0 , T and the evaluated inocula, these factors influenced the substantial toxin reduction. With $C_0 = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$, the lowest residual concentrations were observed by the bacterial community present in the DWTP, which degraded more than 90% of the toxin when compared to the purified cultures of *Sphingomonas* sp. and *Brevundimonas* sp., which reduced C_0 up to 60%. When exposed to $C_0 = 20 \mu\text{g.L}^{-1}$, the results demonstrated a 96% reduction in toxin concentration by the bacterial community posfiltration of the rapid sand filter (PF); 90% at the prefiltration and posfiltration of the rapid sand filter (PR and PF) and 80% by the purified cultures inocula of *Sphingomonas* sp. and *Brevundimonas* sp. at the concentration of 10% (v/v) at $T = 22^\circ\text{C}$. This is possibly the first report in Brazil of the capacity of *Brevundimonas* sp. bacterial strains in degrading MIC-LR. The addition of T was followed by the best results obtained in this research, with the toxin biodegradation of 99% and 97% ($C_0 = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) by PF inoculums and bacterial community from MIC-LR extract. A total of 464 OUT (Operational Taxonomic Unit) was obtained from the bacterial community present in the toxin extract, PR and PF, with four predominant phyla: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes (relative abundances of 51.7, 13.4, 6.5 and 2.8%, respectively). In addition, the presence of the Comamonadaceae family was verified in all analyzed samples, suggesting the participation of this family strains in the toxin biodegradation. This research demonstrated, by using microorganisms and different biotic and abiotic factors, promising results to the development of biological processes as an additional step to the advanced treatment of water contaminated with MIC-LR.

Keywords: Cyanotoxins; Biodegradation; Microcystin; 16S rRNA; Comamonadaceae; Drinking water advanced treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química geral de microcistina e suas principais variantes detectadas em reservatórios eutrofizados. As letras X e Z, destacadas por círculos vermelhos, representam os	30
Figura 2 – Estrutura química da molécula de MIC–LR, principal variante da toxina encontrada em mananciais eutrofizados	31
Figura 3 - Sequência de etapas da biotransformação da microcistina por cepas de <i>Sphingomonas</i> sp.	40
Figura 4 – Curva de crescimento da biomassa bacteriana ativa e curva de decaimento do substrato esperadas em um processo de biotransformação por microrganismos expostos a um contaminante.....	41
Figura 5 – Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação	47
Figura 6 – Local e materiais utilizados para a coleta das alíquotas das amostras utilizadas ao longo dos ensaios de biotransformação	48
Figura 7 - Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação	49
Figura 8 - Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação	50
Figura 9 – Gráficos da relação C/C_0 x tempo de contato (d) para as concentrações iniciais de 20 (A) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (B) de MIC-LR nas amostras coletadas durante a Etapa 1 dos ensaios de biotransformação, para as diferentes condições experimentais e Controle	54
Figura 10 - Gráficos da Relação C/C_0 x tempo de contato (d) para as concentrações iniciais de 20 (A) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (B) de MIC-LR nas amostras coletadas durante a Etapa 2 dos ensaios de biotransformação, para os diferentes inóculos analisados e Controle	59
Figura 11- Gráficos da Relação C/C_0 x tempo de contato (d) para a concentração inicial de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR incubadas na $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A) e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B), e para a concentração inicial de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR incubadas na $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (C) e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (D), nas amostras coletadas durante a Etapa 3 dos ensaios de biotransformação, para os diferentes inóculos analisados e Controle.....	61
Figura 12 – Identificação dos filos microbianos para as 464 OTU obtidas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA.....	63
Figura 13 – Abundância relativa da comunidade bacteriana em amostra de extrato bruto de MIC– LR obtida por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	64
Figura 14 - Abundância relativa da comunidade bacteriana em amostra coletada na entrada do filtro rápido da ETA obtida por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais toxinas produzidas pelos diferentes gêneros de cianobactérias conhecidas por suas toxicidades a seres humanos e animais.....	29
Tabela 2 – Principais vantagens e desvantagens dos métodos de detecção de MIC mais utilizados em amostras ambientais	32
Tabela 3 – Principais unidades utilizadas em ETAs e seus principais impactos durante o tratamento da água contaminada por cianotoxinas.....	34
Tabela 4 – Principais microrganismos descritos na literatura como ativamente envolvidos no processo de biotransformação de MIC–LR, eficiência estimada de remoção e genes cluster <i>mlr</i> detectados.....	38
Tabela 5 – Determinação das variantes de microcistina na amostra de extrato de MIC encaminhada por Araújo (2017).....	45
Tabela 6 – Caracterização do extrato de MIC-LR encaminhado por Ortolan (2016) utilizado no experimento de biotransformação conduzido ao longo da pesquisa	45
Tabela 7 – Identificação das amostras utilizadas nos ensaios de biotransformação	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϕ_{int}	Diâmetro Interno
$\approx$	Aproximadamente
% v/v	Percentual volume/volume
10% (v/v)	10mL de inóculos em 100mL de amostras
50% (v/v)	50mL de inóculos em 100mL de amostras
ANOVA	Análise de Variância
BIOTACE	Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes
bp	<i>Base pair</i>
C/C ₀	Concentração residual de microcistina-LR/ Concentração inicial de microcistina-LR
C ₀	Concentração inicial de microcistina-LR
CA	<i>California</i>
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
CT	Cianobactéria tóxica
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EETA	Amostra coletada na entrada da estação, antes da etapa de mistura rápida
EF	Entrada do filtro rápido da ETA
ELISA	<i>Enzyme Linked Sorbent Assay</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Eletrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MA	Massachusetts
MD	Microcistina dissolvida

MIC	Microcistina
MIC-LR	Microcistina-LR
MS	Ministério da Saúde
ND	Não detectado
NGS	<i>Next Generation DNA Sequencing</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SF	Saída do filtro rápido da ETA
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SP	São Paulo
SP + BR	<i>Sphingomonas</i> sp. e <i>Brevundimonas</i> sp.
T	Temperatura
TDH	Tempo de detenção hidráulica
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
WI	<i>Wisconsin</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
3 REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS	28
3.2 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM CIANOTOXINAS	33
3.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO CONTAMINADAS POR MICROCISTINA-LR	36
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MICROCISTINA-LR	44
4.2 OBTENÇÃO DA COMUNIDADE POTENCIALMENTE DEGRADADORA DE MICROCISTINA – LR	45
4.3 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM MICROCISTINA-LR EM ESCALA DE BANCADA	46
4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS INÓCULOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE MICROCISTINA-LR	50
4.4.1 Extração e purificação do DNA dos inóculos	50
4.4.2 Sequenciamento e análise das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA	51
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A – Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone do extrato bruto de MIC-LR.....	78
ANEXO B –Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone da entrada do filtro rápido da ETA.....	80
ANEXO C – Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone da saída do filtro rápido da ETA	85

1 INTRODUÇÃO

A água é um bem de domínio público e sua gestão deve sempre proporcionar os usos múltiplos, dentre eles um de extrema importância, o abastecimento para consumo humano (Política Nacional de Recursos Hídricos, 1997). Um dos objetivos desta lei federal engloba a necessidade de assegurar às gerações atuais e futuras a disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos seus respectivos usos. Assim, fica evidente a necessidade de ações públicas voltadas para a melhor gestão deste bem natural, dotado de valor econômico, garantindo a toda população água potável de boa qualidade. No entanto, devido ao crescimento acelerado da população e a intensificação das atividades industriais e agrícolas, maiores têm sido a demanda por água e o comprometimento de seus aspectos qualitativos (e.g. por meio de resíduos sólidos, águas residuárias, microrganismos emergentes e micropoluentes orgânicos).

Em face da intensa atividade antropogênica, os impactos do lançamento dos poluentes nos corpos hídricos têm agravado o processo de eutrofização artificial, principalmente em mananciais de abastecimento público. O aumento do aporte de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, causa o desenvolvimento excessivo dos produtores primários nos ecossistemas aquáticos, o que gera, entre outros inconvenientes, episódios conhecidos como florações (*blooms*) fitoplantônicas. Tais florações podem afetar o sistema de abastecimento, principalmente quando há presença de cianobactérias, que geram agravos à saúde pública devido a dois fatores: por constituírem matéria orgânica precursora de subprodutos indesejados na etapa de cloração nas Estações de Tratamento de Água (ETAs), como os trihalometanos, e pelo fato de alguns gêneros e espécies de cianobactérias produzirem cianotoxinas, tais como as microcistinas, saxitoxinas, nodularinas, cilindrospermopsinas e anatoxinas, que podem causar prejuízos significativos aos organismos presentes no meio aquático e à população (HITZFELD; HOGER; DIETRICH, 2000).

A interação entre fatores ambientais (bióticos e abióticos) influencia na produção das cianotoxinas, tais como: o enriquecimento de nutrientes no meio aquático (DOWNING; WATSON; MCCAULEY, 2001; HEISLER et al., 2008), a hidrodinâmica do sistema hídrico (HOTTO; SATCHWELL; BOYER, 2007; MAGHSOUDI et al., 2015), disponibilidade de luz e temperatura (WO et al., 2011), além de fatores bióticos, como a competição entre os microrganismos (GOBLER et al., 2007). Dentre elas, a microcistina, objeto de intensa pesquisa na área de saneamento, é um poluente alvo que merece especial atenção por já ter sido protagonista de episódios de intoxicação em seres humanos e animais (como o episódio

ocorrido em 1996 na cidade de Caruaru, Pernambuco, Brasil, que levou mais de 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise a óbito em função da exposição à água contaminada).

O conjunto de operações unitárias de tratamento de água denominado “ciclo completo”, que consiste das etapas de coagulação, floculação, decantação ou flotação, filtração e desinfecção, é desenvolvido na maioria das ETAs dos municípios brasileiros. No entanto, este ciclo possui limitações na remoção de cianotoxinas, como as microcistinas, que são endotoxinas produzidas pela espécie *Microcystis aeruginosa* e também por gêneros como *Anaebaena*, *Nodularina*, *Nostoc*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) e *Cylindrospermopsis* (RODRÍGUEZ et al., 2007; SPOOF; KARLSSON; MERILUOTO, 2001). Estas limitações se devem, principalmente, à lise celular de cianobactérias ao longo do tratamento, aumentando suas concentrações na água e não atendendo aos padrões de potabilidade da Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2017), que estabelece a concentração máxima de 1 µg.L⁻¹ de microcistina na água tratada.

Diante disto, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar processos adicionais de tratamento (conhecidos como “tecnologias avançadas”), capazes de promover uma eficiente remoção de microcistinas, como é o caso do processo de adsorção pelo carvão ativado ou de separação por membranas. A utilização de um componente biológico como etapa final do tratamento de água, antecedente à desinfecção/fluoreação, tem sido alvo de estudos que utilizam microrganismos como forma de remediação, especialmente via degradação/transformação de poluentes. O objetivo da biodegradação é converter a toxina dissolvida a subprodutos não tóxicos, tornando mais segura, do ponto de vista sanitário, a água a ser distribuída para a população (KORMAS; LYMPEROPOULOU, 2013).

Assim como qualquer tecnologia de tratamento de água, a biotransformação de microcistina deve ser estudada no intuito de compreender os mecanismos envolvidos ao longo das etapas de sua conversão, bem como as melhores condições e fatores operacionais para se obter a melhor eficiência na remoção do contaminante. Considerando a necessidade de maior entendimento para a sua aplicabilidade em escala real, é necessário investir em pesquisas nesta área, uma vez que os mananciais para abastecimento público se encontram cada vez mais poluídos e eutrofizados, com reflexos negativos à saúde humana. Diante deste cenário, torna-se necessária a compreensão da aplicação dos processos biológicos, como alternativa ao tratamento avançado de águas de abastecimento público contaminadas por microcistina, por meio da investigação sobre o mecanismo de biodegradação e os fatores que o influenciam (e.g. concentração da toxina e microrganismos, temperatura, entre outros) e, principalmente, da caracterização da comunidade microbiológica apta a degradar a cianotoxina.

2 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi analisar a eficiência de biotransformação da microcistina e os fatores bióticos e abióticos intervenientes, em escala laboratorial, na presença de diferentes inóculos bacterianos. Para isso, três objetivos específicos foram estabelecidos:

- i. Avaliar a remoção de microcistina–LR obtida pela biotransformação da cianotoxina quando submetida à presença de inóculos de culturas purificadas, obtidas em laboratório, de comunidade bacteriana autóctone presente em sistema de abastecimento público e em extrato bruto da toxina;
- ii. Avaliar a influência de alguns fatores abióticos e bióticos na eficiência de biotransformação (e.g. temperatura, concentração inicial da cianotoxina no meio, volume de microrganismos inoculados);
- iii. Isolar e identificar filogeneticamente as cepas bacterianas envolvidas na biotransformação de microcistina–LR e comparar com os microrganismos já relatados na literatura;

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS) e seus países membros, *“todas as pessoas, em quaisquer estágios de desenvolvimento e condições sócio-econômicas, têm o direito de ter acesso a um suprimento adequado de água potável e segura”*. Nessa mesma linha, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2017), toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água, deve ser objeto de controle e vigilância da qualidade da água, garantindo-se assim, uma água potável e sem riscos à saúde de humanos e animais.

A intensificação das atividades agrícolas e industriais, aliada ao crescimento demográfico, tem contribuído para a incidência do fenômeno de eutrofização artificial em corpos hídricos, o que causa preocupação especialmente naqueles destinados à captação de água bruta para abastecimento público. Em virtude do despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento prévio e do uso indiscriminado de fertilizantes, constituindo vias de aporte de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, tem-se a proliferação exacerbada de algas, cianobactérias e macrófitas aquáticas que podem contribuir para redução da transparência da água e das concentrações de oxigênio dissolvido, produção de odores desagradáveis, mortandade de espécies aquáticas, além da síntese de cianotoxinas, que são toxinas produzidas por algumas cianobactérias (PANTELIC et al., 2013).

3.1 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

O comprometimento da qualidade dos mananciais gera uma série de inconvenientes ao tratamento da água e ocasiona efeitos deletérios à saúde de humanos e animais. Em especial, a ocorrência de cianobactérias nestes locais torna-se um fator preocupante, pois estes organismos podem produzir metabólitos secundários (conhecidos como cianotoxinas) de elevada persistência na água, tolerantes a elevadas temperaturas e recalcitrantes, além de tóxicos a muitos organismos (EDWARDS; LAWTON, 2009; SAITO et al., 2003).

As cianobactérias compreendem o grupo de microrganismos procarióticos fototróficos e são importantes produtores primários do sistema aquático, principalmente lagos e reservatórios. Por estarem associados à produção de toxinas, estes microrganismos têm sido alvo de estudos na área de saneamento, que buscam alternativas para mitigar o impacto deste contaminante na água. Para que seja eficiente a remoção das cianotoxinas ao longo do processo de tratamento, é importante compreender as suas propriedades físicas e químicas, a

sua natureza, ou seja, se a toxina é intra ou extracelular e o impacto sobre as diferentes tecnologias de tratamento de água (WESTRICK et al., 2010).

As cianotoxinas se diferenciam quanto as suas estruturas químicas e toxicidade, sendo classificadas como dermatotoxinas, neurotoxinas (e.g., saxitoxinas, anatoxina-a) e hepatotoxinas (e.g. microcistina, nodularina), além de serem produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias presentes no meio aquático (Tabela 1). São encontradas no interior das cianobactérias (toxinas intracelulares), mas também podem ser liberadas no meio (toxinas extracelulares) por meio da senescência ou lise celular (decorrente da exposição a produtos químicos, como algicidas aplicados no manancial) ou durante as etapas de tratamento da água (e.g. pré-cloração) (DE FIGUEIREDO et al., 2004; JONES; ORR, 1994; ROSS; SANTIAGO-V; PAUL, 2006).

Tabela 1 – Principais toxinas produzidas pelos diferentes gêneros de cianobactérias conhecidas por suas toxicidades a seres humanos e animais

Toxina	Gênero da cianobactéria	Tipo de ação da toxina
Anatoxina – a	<i>Anabaena (Dolichospermum), Cylindrospermum, Microcystis, Planktothrix, Raphidiopsis</i>	Neurotoxina, dermatotoxina
Cilindrospermopsina	<i>Anabaena (Dolichospermum), Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Oscillatoria (Planktothrix), Raphidiopsis</i>	Hepatotoxina
Microcistina	<i>Anabaena (Dolichospermum), Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria (Planktothrix), Rivularia</i>	Hepatotoxina
Nodularina	<i>Nodularia</i>	Hepatotoxina
Saxitoxina	<i>Anabaena (Dolichospermum), Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya, Planktothrix</i>	Neurotoxina, dermatotoxina

Fonte: Adaptado de Rastogi; Madamwar; Incharoensakdi (2015).

As microcistinas, hepatotoxinas de estrutura cíclica, são as mais comumente encontradas em episódios de florações e produzidas por diferentes cepas de cianobactérias, principalmente àquelas pertencentes ao gênero *Microcystis* sp.. Já são conhecidas aproximadamente 85 de suas variantes, sendo a principal característica que as diferenciam a

substituição dos aminoácidos X e Z em suas estruturas químicas, como mostra a Figura 1. Além disso, a sua toxicidade é atribuída à presença do aminoácido Adda e a sua variante LR [microcistina-LR (MIC-LR)] (Figura 2) é a forma mais potente encontrada em corpos hídricos eutrofizados. A presença de MIC-LR está associada a casos de intoxicações em humanos e animais, devido à sua hepatotoxicidade e seu potencial carcinogênico (DAWSON, 1998; MINILLO et al., 2013; RASTOGI; SINHA, 2014; SVIR et al., 2010; WESTRICK et al., 2010; ZHU et al., 2016).

Figura 1 – Estrutura química geral de microcistina e suas principais variantes detectadas em reservatórios eutrofizados. As letras X e Z, destacadas por círculos vermelhos, representam os L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das variantes da cianotoxina

Fonte: Adaptado de Rastogi; Madamwar; Incharoensakdi (2015).

Figura 2 – Estrutura química da molécula de MIC-LR, principal variante da toxina encontrada em mananciais eutrofizados

Fonte: Adaptado de Rastogi; Madamwar; Incharoensakdi (2015).

Segundo Merel et al. (2013), Saito et al. (2003) e Zhu et al. (2016), as possíveis rotas de contaminação humana por MIC-LR se dão por meio da ingestão de alimentos que contêm a toxina bioacumulada; ingestão de água proveniente de um reservatório contaminado; ou pela ingestão acidental, inalação ou contato com a pele durante atividades recreacionais em ambientes eutrofizados. A estrutura cíclica da MIC-LR confere algumas características como estabilidade química e resistência a elevadas temperaturas, além de grande solubidade em água, recalcitrância e toxicidade a seres humanos e animais (RASTOGI; SINHA; INCHAROENSAKDI, 2014). Tais características podem acarretar uma série de inconvenientes ao tratamento da água e comprometer a qualidade da água potável. Isto se explica pelo fato de a maioria das tecnologias convencionalmente empregadas em ETAs apresentar eficiência não satisfatória na remoção de MIC-LR, cuja concentração máxima estabelecida pelo padrão de potabilidade, segundo a Portaria de Consolidação nº5 e a Organização Mundial da Saúde (OMS), é de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

O monitoramento de microcistina, principalmente a sua variante LR, é uma das medidas a serem aplicadas pelos gestores de saneamento, associado ao controle de florações fitoplanctônicas em mananciais de abastecimento. Os métodos mais utilizados para detecção e quantificação da toxina em amostras ambientais estão descritos na Tabela 2, juntamente com as principais vantagens e limitações de cada técnica. A escolha de um ou mais métodos depende da quantidade de informações a ser obtida para a toxina (e.g. concentração, variantes), além da disponibilidade técnica e financeira para a análise das amostras.

Tabela 2 – Principais vantagens e desvantagens dos métodos de detecção de MIC mais utilizados em amostras ambientais

Método de detecção de MIC	Vantagens	Desvantagens	Referências
ELISA <i>(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)</i>	Método semiquantitativo de detecção de microcistina, com melhor custo benefício e utilização de equipamentos de fácil manuseio;	Limitado à detecção da variante LR, não fornecendo as concentrações das outras variantes da cianotoxina	KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013; LAWTON et al., 2010; MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006; RAPALA et al., 2002; TRANTIS et al., 2010
LC-MS <i>(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)</i>	Método quantitativo de detecção de todas as variantes de microcistina, presentes nas amostras analisadas	Método que exige maiores conhecimentos técnicos, utilização de aparelhos específicos e mais onerosos, quando comparado ao ELISA	NEFFLING; SPOOF; MERILUOTO, 2009; WANG et al., 2007b; ZHANG; PING; YANG, 2004
HPLC <i>(High Performance Liquid Chromatography)</i>	Método quantitativo de detecção de microcistina; permite diferenciar todas as variantes da toxina nas amostras, permitindo a separação entre elas	Método que exige maiores conhecimentos técnicos, utilização de aparelhos específicos e com maior custo benefício (comparado ao ELISA) Requer maiores volumes de amostras para detecção de baixas concentrações da cianotoxina	GURBUZ et al., 2009; MATHYS; SURHOLT, 2004; MCELHINEY; LAWTON, 2005

Fonte: da própria autora (2018).

3.2 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTAMINADAS COM CIANOTOXINAS

O aumento da incidência dos episódios de florações fitoplanctônicas em mananciais de abastecimento público pode gerar uma série de agravos ao tratamento de água, principalmente quando detectada a presença de cianobactérias. O crescimento exagerado destes microrganismos e suas toxinas podem impactar as unidades de tratamento ao aumentar a demanda por coagulantes, diminuir as carreiras de filtração e favorecer a produção dos trihalometanos (WESTRICK et al., 2010). Além disso, as algas e cianobactérias podem interferir nas propriedades organolépticas da água, conferindo sabor e odor à mesma e consequente rejeição da água potável pelo usuário final.

Segundo Chorus, Ingrid e Bartram (1999), aproximadamente 95% das anatoxinas-a, variantes de saxitoxinas e microcistinas se encontram no interior do citoplasma das cianobactérias, na forma de endotoxinas. Em ETAs de ciclo completo, as endotoxinas são removidas durante as etapas coagulação, floculação, sedimentação e filtração desde que as células das cianobactérias permaneçam intactas. Porém, durante o processo de tratamento, pode ocorrer a lise celular decorrente da aplicação de produtos químicos ou ruptura mecânica, causando consequente aumento da toxina dissolvida no meio, não atendendo aos padrões de potabilidade (MEREL et al., 2013). A eficiência não satisfatória na remoção de cianotoxinas extracelulares, principalmente a MIC-LR, implica no acréscimo de outras etapas e processos ao tratamento para potabilização da água.

Quando há microcistina dissolvida, outros métodos físicos e químicos podem ser adicionados ao tratamento, como a adsorção por carvão ativado, ozonização, processos oxidativos avançados e filtração por membranas (CAMPINAS, 2009; DE FIGUEIREDO et al., 2004; GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE et al., 2006; HE et al., 2016; LEE; WALKER, 2008; PANTELIC' et al., 2013). No entanto, estas são tecnologias que requerem maiores recursos técnicos e possuem custos operacionais mais elevados, quando comparados aos processos convencionais. Entre as tecnologias mais utilizadas, o carvão ativado tem sido o mais amplamente empregado na remoção de cianotoxinas da água, como sugerem os estudos de Jones et al. (1994), Rositano et al. (2001), Newcombe e Nicholson (2004) e Ho (2004). A Tabela 3 descreve os principais impactos da presença de cianobactérias e microcistina ao longo de alguns dos processos de tratamento de água.

Tabela 3 – Principais unidades utilizadas em ETAs e seus principais impactos durante o tratamento da água contaminada por cianotoxinas

Unidade de tratamento	Impactos durante o tratamento	Remoção esperada de microcistina*		Referências
		CT	MD	
Pré- cloração	Etapa que antecede as unidades de mistura rápida e floculação/sedimentação, e auxilia na eficiência de remoção celular de cianotoxinas nestas unidades. Entretanto, deve ser evitada, principalmente em episódios de florações, pois a aplicação de agentes oxidantes pode resultar na formação de trihalometanos, comprometendo as características organolépticas da água potável; Pode provocar a lise celular de cianobactérias e alterar o potencial tóxico da microcistina dissolvida	Processo auxiliar de tratamento	–	KEIJOLA et al., 1988; MA et al., 2012; NICHOLSON; ROSITANO; BURCH, 1994
Coagulação (mistura rápida), floculação e sedimentação	Eliminam grande parte das células de cianobactérias presentes na água captada, desde que não ocorra a lise celular, que pode ocorrer com altas dosagens do coagulante e o pH da coagulação;	> 90%	< 10%	HO et al., 2012; SUN et al., 2012

*quando em condições ótimas de operação da unidade (e.g. dose do coagulante, gradiente de mistura rápida, pH); CT: cianobactéria tóxica (microcistina intracelular); MD: microcistina dissolvida. C_0 = concentração inicial de microcistina. Fonte: adaptado de Chorus, Ingrid; Bartram. (1999); Merel et al. (2013); Pantelic et al. (2013).

Continuação da Tabela 3

Filtração	Para se evitar a colmatção do meio filtrante, são necessárias lavagens regulares dos filtros. Se o processo for realizado de maneira inadequada, ocorre a lise celular das cianobactérias, liberando microcistina dissolvida no meio, comprometendo a qualidade final da água.	> 60%	<10%	CHORUS, INGRID; BARTRAM, 1999
Filtração por membranas (Microfiltração, Ultrafiltração, Nanofiltração e Osmose reversa)	Processos eficientes na remoção de microcontaminantes na água, principalmente a microfiltração e ultrafiltração; a nanofiltração e osmose reversa possuem eficiência na retenção de micropartículas, consequentemente, necessitam de um pós-tratamento para remineralização da água tratada (aumentando os custos operacionais da ETA).	>96% (C ₀ = 130 µg.L ⁻¹)	-	NEUMANN; WECKESSER, 1998; CAMPINAS; JOÃO, 2010; DIXON et al., 2011; WESTRICK et al., 2010
Adsorção por carvão ativado	Não ocorre lise celular de cianobactérias, sendo utilizado, com sucesso, na remoção de toxinas extracelulares, principalmente microcistinas; a qualidade da água a ser tratada influencia em sua eficiência, uma vez que, a matéria orgânica presente pode competir com as cianotoxinas dissolvidas, limitando o processo de adsorção. É uma tecnologia que deve ser considerada como etapa adicional ao tratamento de ciclo completo, promovendo melhoria adicional da qualidade da água.	**	>85% (C ₀ = 250 µg.L ⁻¹)	HUANG; CHENG; CHENG, 2007; PARK et al., 2018
Processos oxidativos avançados	Estudos demonstram a inativação de MIC-LR, no entanto, são tecnologias com melhor eficiência em pH 3, tornando-se uma alternativa inviável no tratamento de águas para abastecimento.	98- 100%	-	PINHO et al., 2015; SUI et al., 2014

** informação não disponível.
Fonte: da própria autora (2018).

Embora menos empregada em comparação aos processos físicos e químicos de tratamento citados, a biodegradação tem sido estudada como uma possível forma de remover microcistina, em conjunto com outras formas de tratamento da água, já que ocorre naturalmente no sistema aquático. Várias cepas bacterianas têm sido isoladas e analisadas quanto ao seu potencial em biodegradar a toxina. Através da síntese de enzimas específicas, reguladas por fatores bióticos e abióticos, o mecanismo de biotransformação tem demonstrado ser eficiente na redução da concentração de MIC-LR (LI; LI; LI, 2017). Segundo Chorus, Ingrid e Bartram (1999) após iniciado o processo, 90% da toxina é degradada em um período entre 2 a 10 dias, dependendo das condições ambientais (e.g. grau de eutrofização do reservatório, concentração da toxina no meio, temperatura da água, entre outros) e dos microrganismos que participam do processo biológico.

3.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO CONTAMINADAS POR MICROCISTINA-LR

O avanço das pesquisas acerca da capacidade de microrganismos potencialmente biodegradadores da cianotoxina, principalmente procariontes, tem levantado hipóteses sobre a aplicação e eficiência dos processos biológicos no tratamento da água para o abastecimento humano. Muitas têm demonstrado a biotransformação da microcistina por diferentes microrganismos presentes no meio natural, contudo, poucas foram capazes de descrever o processo de biodegradação, já que ainda são limitadas as informações sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na conversão da molécula tóxica a formas menos prejudiciais à saúde de humanos e animais (COUSINS et al., 1996; DZIGA et al., 2016).

Jones e Olut (1994) foram os pioneiros na identificação das primeiras cepas bacterianas capazes de metabolizar a microcistina, utilizando-a como fonte de carbono e nitrogênio para o seu crescimento. Mais tarde, nos experimentos conduzidos por Bourne et al. (1996) e Jones et al. (1994), tais cepas foram isoladas e identificadas como *Sphingomonas* sp. ACM-3962, que demonstraram a capacidade de degradar 95% da concentração inicial (1000 µg.L⁻¹ de MIC-LR), sob condições aeróbias, em um período de dois a oito dias após atingida a fase de adaptação (conhecida como fase de adaptação).

Após estas descobertas, novas cepas bacterianas foram identificadas e isoladas de amostras ambientais, como mostra a Tabela 4, sendo a grande maioria pertencente a α - Proteobacteria (principalmente dos gêneros *Sphingomonas* e *Sphingopyxis*) e β - Proteobacteria (e.g. *Burkholderia*), para as quais a capacidade em biodegradar microcistina

foi atribuída a síntese à de três peptidases intracelulares conhecidas como *mlrA* (microcistinase), *mlrB*, *mlrC* e um gene transportador (*mlrD*), que participam do processo bioquímico de conversão da toxina a formas menos tóxicas na água e que já foram confirmadas por várias pesquisas (BOURNE et al., 1996; DZIGA et al., 2016; EDWARDS; LAWTON, 2009; HARADA et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2009; IMANISHI et al., 2005; ZHU et al., 2016). Em alguns microrganismos, já foi detectada a presença do gene *cluster* que têm caracterizado microrganismos biodegradadores da toxina, além de fases de adaptações que variam conforme a cepa bacteriana e as condições experimentais (MORÓN-LÓPEZ; NIETO-REYES; EL-SHEHAWY, 2017).

Dentre as peptidases, a microcistinase (*mlrA*) é citada como a mais importante no processo de biotransformação. Saito et al. (2003) concluíram, por meio da descoberta de novas cepas bacterianas (MD- 1 e Y2) que o gene é característico de microrganismos degradadores de microcistina, mas não exclusivamente encontrado nas cepas do gênero *Sphingomonas* sp. Desde então, diversas outras cepas têm sido isoladas e caracterizadas como degradadoras, como as *Sphingopyxis* sp., *Novosphingobium* sp., *Strenotrophomonas* sp. e *Bacillus* sp., sendo a grande maioria pertencente à classe α – Proteobacteria (Tabela 4).

No processo de biotransformação de microcistina, os microrganismos utilizam a toxina como fonte de carbono (alimento) e elétrons (energia) para seu crescimento, metabolismo e reprodução. As enzimas, que são sintetizadas naturalmente, exercem o importante papel de acelerar o processo de quebra entre as ligações químicas da molécula da toxina, transferindo os elétrons do contaminante para um aceptor de elétrons (e.g. oxigênio para respiração aeróbia) (VALLERO, 2010). Neste contexto, a mais importante é aquela sintetizada pelo gene *mlrA* (microcistinase), que quebra a estrutura cíclica (que confere estabilidade contra outras proteases e outros fatores químicos) a uma forma linear e menos tóxica da molécula de microcistina (BOURNE et al., 1996, 2001). São relativamente recentes os estudos que descreveram detalhadamente os mecanismos envolvidos, sendo o primeiro realizado por Bourne et al. (1996), em bactérias *Sphingomonas* sp. (Figura 3).

Tabela 4 – Principais microrganismos descritos na literatura como ativamente envolvidos no processo de biotransformação de MIC-LR, eficiência estimada de remoção e genes cluster *mlr* detectados

Classe taxonômica	Cepa bacteriana	<i>Mlr cluster</i> *	Resultados representativos**	Referências
α – Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp. ACM - 3962	mlrA - mlrD	Atingida a fase de rápida degradação (entre dois a quatro dias), os inóculos biodegradaram 80% da MIC inicial após seis dias dos ensaios.	BOURNE et al., 1996; JONES et al., 1994; JONES; OLUT, 1994
	<i>Sphingomonas</i> sp. Y2	mlrA	C ₀ = 20.000 µg.L ⁻¹ de MIC-LR totalmente degradada pelos inóculos após seis dias de exposição à toxina.	MARUYAMA et al., 2006; PARK et al., 2001
	<i>Sphingomonas</i> sp. MD-1	mlrA - mlrD	***	SAITO et al., 2003
	<i>Sphingopyxis</i> sp. LH21	mlrA - mlrD	Fase de adaptação não observada para C ₀ = 3 µg.L ⁻¹ e MIC-LR não detectada após o segundo dia do experimento. Já para C ₀ = 10 µg.L ⁻¹ e C ₀ = 25 µg.L ⁻¹ de MIC-LR, foi observado uma fase de adaptação de dois dias e não detectada toxina residual após quatro e 12 dias, respectivamente.	HO et al., 2007a
	<i>Sphingopyxis</i> sp. C-1	mlrA - mlrD	*****	OKANO et al., 2009
	<i>Novosphingobium</i> sp. THN1	mlrA - mlrD	Degradação de 91% da toxina (C ₀ = 1.400 µg.L ⁻¹ de MIC-LR), após 12hrs do início do experimento. Após o dia três, não havia mais toxina residual na amostra.	JIANG et al., 2011

*genes detectados por meio de métodos como HPLC, ELISA e outros já citados; **Melhores resultados obtidos entre as diferentes referências; ***em sua pesquisa, o autor detectou a capacidade da cepa bacteriana em sintetizar a microcistinase; MIC-LR: microcistina-LR; C₀: Concentração inicial. Fonte: adaptado de Dziga et al. (2013) e Li; Li; Li (2017).

Continuação da Tabela 4

β – Proteobacteria	<i>Ralstonia solanacearum</i>	mlrA	Degradação total de MIC-LR ($29.500 \mu\text{g.L}^{-1}$) após um dia.	YAN et al., 2004; ZHANG; YAN; PAN, 2011
	<i>Burkholderia</i> sp.	Desconhecido	Para $C_0 = 30 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR, foi observada uma fase de adaptação de um dia, com degradação total após 15 dias do experimento.	LEMES et al., 2008
	<i>Acinetobacter</i> sp.	Desconhecido	Para os inóculos utilizados com concentração inicial de $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR, não foi constatado a fase de adaptação. Contudo, após o quinto dia do experimento, já não era mais detectado toxina residual.	LI et al., 2016; LI; PAN, 2014
	<i>Methylobacillus</i> sp. J10	Desconhecido	$C_0 = 3.500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR degradado totalmente após 17hrs.	HU et al., 2009
γ – Proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Desconhecido	$C_0 = 50.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR totalmente degradada após três semanas do experimento. Observado uma fase de adaptação de três dias.	TAKENAKA; WATANABE, 1997
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.	Não detectado	$C_0 = 5.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR totalmente degradada em 3 dias	LAWTON et al., 2011; MANAGE et al., 2009
	<i>Microbacterium</i> sp.	Desconhecido	74% de MIC-LR ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) degradada em 20 dias de ensaios experimentais.	RAMANI, A.; REIN, K., SHETTY, K.G.; JAYACHANDRAN, 2012
Bacilli	<i>Bacillus</i> sp. EMB	Desconhecido	Degradação total de MIC-LR ($C_0 = 2.150 \mu\text{g.L}^{-1}$). A fase de adaptação não foi observada nos ensaios realizados pelos autores.	HU et al., 2011

Fonte: da própria autora (2018).

Figura 3 - Sequência de etapas da biotransformação da microcistina por cepas de *Sphingomonas* sp.

Fonte: Adaptado de Bourne et al. (1996); Dziga et al. (2013); Kormas e Lympelopoulou (2013).

Na Figura 3, é mostrada a biotransformação da MIC-LR, que envolve uma sequência de etapas da ação de três enzimas e que já foram confirmadas por várias pesquisas (BOURNE et al., 1996; EDWARDS; LAWTON, 2009; HARADA et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2009; IMANISHI et al., 2005; ZHU et al., 2016). A primeira enzima de atuação, a microcistinase *mlrA*, catalisa a conversão da toxina cíclica a uma forma linear e menos tóxica de MIC-LR, que é sequencialmente hidrolisada pelas enzimas *mlrB* e *mlrC* a formas não tóxicas. Ainda são desconhecidos os produtos resultantes desse metabolismo, o perfil genético e o processo enzimático envolvidos no mecanismo de degradação da hepatotoxina (DZIGA et al., 2013). No entanto, a presença das três proteinases (MlrA, MlrB e MlrC) se deve ao fato da codificação de genes específicos, que juntamente com um transportador (MlrD), são capazes de reduzir a toxicidade molecular da MIC-LR (BOURNE et al., 1996; DZIGA et al., 2013; EDWARDS; LAWTON, 2009).

De modo geral, para se garantir a eficiência dos processos biológicos na remoção de contaminantes, tanto em águas residuárias como no tratamento de água, é necessário disponibilizar condições para o crescimento e sobrevivência dos microrganismos quando expostos à toxina. Estudos como os de Ho et al. (2007b), Klitzke e Fastner (2011), Li et al. (2012), Minillo et al. (2013), Park et al. (2001), Somdee et al. (2013) e Wang et al. (2007a) demonstraram que fatores bióticos e abióticos, como a temperatura da água, a concentração da

toxina e de cepas de bactérias ativas no meio, além dos seus requerimentos nutricionais, podem influenciar o processo de biotransformação da toxina.

A aplicação da biotecnologia, principalmente a biorremediação por microrganismos, foi abordado por Vallero (2010). Segundo o autor, quando cepas bacterianas obtidas e isoladas de fontes ambientais (e.g. solo, água) são expostas a vários tipos de contaminantes recalcitrantes, inicia-se o processo de biotransformação. Neste, por meio da síntese de enzimas, ocorrem reações de quebra dos contaminantes tóxicos a subprodutos não tóxicos, que são utilizados pelos microrganismos como fonte de crescimento e sobrevivência, resultando no decaimento temporal do substrato (contaminante) e o aumento da biomassa bacteriana no meio. Adaptando o estudo realizado pelo pesquisador, a Figura 4 ilustra o que se é esperado observar na biotransformação da MIC-LR ao longo de um determinado tempo de contato entre os inóculos potencialmente biodegradadores e o poluente-alvo.

Figura 4 – Curva de crescimento da biomassa bacteriana ativa e curva de decaimento do substrato esperadas em um processo de biotransformação por microrganismos expostos a um contaminante (MIC-LR)

Fonte: Adaptado de Vallero (2010).

Na Figura 4, são observados dois gráficos espelhados, um com a curva de crescimento da biomassa bacteriana e outro com a curva de decaimento do substrato (no caso, da MIC-LR) ao longo do tempo. Tais gráficos foram subdivididos nas seguintes fases:

1) Fase de adaptação: é o período de aclimação dos microrganismos, quando inicialmente expostos ao contaminante. Nesta fase, há a maior concentração da toxina e um menor número de microrganismos no meio;

2) Fase de crescimento acelerado (fase de rápida biodegradação): após a fase de adaptação, há crescimento e reprodução da comunidade bacteriana, por meio da assimilação de carbono e energia, proveniente dos seguintes processos:

- a. síntese de enzimas específicas que atuam na quebra da estrutura química do poluente-alvo; consequentemente, a toxina é a fonte de carbono e energia para o crescimento da biomassa bacteriana;
- b. Após a quebra da molécula do contaminante, pode-se iniciar o processo conhecido como “cometabolismo”, no qual outros microrganismos presentes são capazes de sintetizar os subprodutos da etapa anterior. No caso da MIC-LR, os microrganismos que possuem a microcistinase quebram a estrutura cíclica da molécula e, após esta etapa, outros microrganismos continuam o processo de biotransformação da toxina, até que sejam atingidas formas menos tóxicas e assimiláveis por outros organismos.

3) Fase de decrescimento bacteriano: esgotada a fonte de alimento e energia (a toxina presente no meio), a densidade da biomassa bacteriana diminui e o processo de biotransformação se finaliza.

Basicamente, as fases mais importantes são aquelas em que a microbiota é exposta ao contaminante, conhecida como fase de adaptação (adaptação ou latência) e a fase em que há o maior metabolismo microbiano, com consequente diminuição do substrato no meio (fase de rápida degradação). Tais fases foram comprovadas por muitos estudos referenciados na Tabela 4, sendo que a fase de adaptação compreende, aproximadamente, um período de dois a quatro dias, dependendo dos inóculos e das condições experimentais.

Os microrganismos encontrados em ETAs são provenientes da captação da água bruta nos mananciais de abastecimento. O desenvolvimento da comunidade bacteriana se dá principalmente na forma de biofilmes em unidades de tratamento (e.g. meio filtrante dos filtros rápidos, tubulações que interconectam as instalações da estação), sendo a etapa de desinfecção (última etapa do tratamento) que garante a qualidade microbiológica da água que é distribuída ao longo do sistema de abastecimento das cidades. Tal fato faz com que seja necessário o monitoramento destes microrganismos ao longo das unidades que compõem a estação e, para isto, a aplicação de técnicas moleculares, como o sequenciamento de DNA de nova geração (*NGS – Next Generation DNA Sequencing*), que tem auxiliado na detecção e caracterização destas cepas.

Douterelo et al. (2014) e Vierheilig et al. (2015) descreveram os principais métodos moleculares aplicados na caracterização de microrganismos ao longo dos sistemas de distribuição de água, sendo o mais utilizado o sequenciamento dos genes 16S rRNA para os domínios *Bacteria* e *Archaea*. Revetta et al. (2010) utilizaram o sequenciamento do gene 16S rRNA na identificação dos microrganismos isolados em biofilme de um sistema de ultrafiltração, encontrando os grupos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Plantomycetes em suas amostras. Estudos realizados por Bourne et al. (2006), Briand et al. (2016), Quesada e El-Shehawy (2017) e ZENG et al. (2013) também são alguns exemplos de aplicação das técnicas moleculares na identificação dos microrganismos encontrados em águas e reservatórios utilizados para o abastecimento público.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MICROCISTINA–LR

Nesta pesquisa, utilizou-se a cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (código BB0005), isolada do reservatório de Barra Bonita, São Paulo, Brasil (coordenadas geográficas: 22° 31' 15''S e 48° 31' 43''W) por Ortolan (2016). A autora cultivou esta espécie sob diferentes condições até obter extrato de toxina na concentração de aproximadamente 360 µg.L⁻¹.

As melhores condições observadas no cultivo da cianobactéria em fotobiorreator, foram em meio WC, sob intensidade luminosa de 60 µE.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12 h, temperatura de 24 ± 1°C, com aeração e sem condições de assepsia. O volume final de cultivo obtido foi em torno de 160 L. A fase estacionária foi alcançada aos 30 dias de crescimento, aproximadamente, quando a cultura foi transferida para garrafas PET de 2L. Com o intuito de promover a lise celular, segundo o método proposto por Törökne et al. (2004) e Yilmaz et al. (2008), foi realizada uma sequência de quatro etapas de congelamento e descongelamento das amostras (ORTOLAN, 2016) para a liberação das microcistinas intracelulares no meio (extrato de microcistina). Na sequência, este extrato foi submetido à centrifugação por 10 min, a 11.000rpm e 4°C, a fim de promover a separação do material particulado. Ao finalizar este procedimento, estas garrafas PET foram congeladas e armazenadas em freezer para sua posterior utilização em ensaios e procedimentos laboratoriais.

Com o objetivo de comparar o desempenho de carvão ativado, produzido a partir de diferentes matrizes para remoção de microcistina em águas de abastecimento, Araújo (2017) encaminhou uma alíquota da amostra deste extrato centrifugado para o Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), no qual, utilizando a Técnica de detecção LC-ESI-MS/MS, a variante da cianotoxina encontrada na amostra foi exclusivamente a MIC-LR (Tabela 5).

Para a quantificação da concentração da toxina presente no extrato bruto centrifugado obtido por Ortolan (2016), por meio do Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima – ELISA, a autora encaminhou amostra de uma das garrafas PET, cujo valor encontrado foi de, aproximadamente, 356 µg.L⁻¹ (Tabela 6), entre outras variáveis (e.g., nitrito, nitrato, fósforo total), de acordo com metodologia de APHA (2012).

Tabela 5 – Determinação das variantes de microcistina na amostra de extrato de MIC encaminhada por Araújo (2017)

VARIANTE	MIC – RR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	MIC – LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	MIC – LA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	MIC – YR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Concentração	ND*	178	ND	ND

* ND: não detectado. Fonte: da própria autora (2018).

Tabela 6 – Caracterização do extrato de MIC-LR encaminhado por Ortolan (2016) utilizado no experimento de biotransformação conduzido ao longo da pesquisa

Variável	Unidade	Valor
Microcistina-LR	$\mu\text{g.L}^{-1}$	356,1
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg.L^{-1}	28,8
Nitrito	mg.L^{-1}	1,2
Nitrato	mg.L^{-1}	2,2
Nitrogênio Total	mg.L^{-1}	32,2
Fósforo Total	$\mu\text{g.L}^{-1}$	776
Fósforo Fosfato Total Dissolvido	$\mu\text{g.L}^{-1}$	398
Ortofosfato	$\mu\text{g.L}^{-1}$	232
Sólidos Suspensos Totais	mg.L^{-1}	59
Sólidos Suspensos Voláteis	mg.L^{-1}	59

Fonte: da própria autora (2018).

As concentrações iniciais de MIC-LR adotadas nos experimentos da presente pesquisa foram de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, que são concentrações frequentemente observadas em florações menos ou mais extensas de cianobactérias em reservatórios de abastecimento de água (CHORUS, INGRID; BARTRAM, 1999).

4.2 OBTENÇÃO DA COMUNIDADE POTENCIALMENTE DEGRADADORA DE MICROCISTINA – LR

Para os ensaios de biotransformação de MIC-LR (item 4.3), a comunidade bacteriana potencialmente degradadora de microcistina utilizada foi oriunda da Estação de Tratamento de Água – ETA Vila Pureza, da cidade de São Carlos (SP), que recebe água dos mananciais Córrego do Monjolinho e Ribeirão do Feijão, com a capacidade de tratar uma vazão média de 480 L.s^{-1} de água, pelo tratamento de água convencional, envolvendo as seguintes etapas: coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção, fluoretação e correção de pH (SAAE São Carlos, 2018).

Na ETA, as amostras dos inóculos foram obtidas antes da etapa de mistura rápida (antes das etapas de coagulação e floculação) e na entrada e saída dos filtros rápidos (antes da unidade de desinfecção). Para a retirada do excesso de sólidos mais grosseiros, as amostras

foram filtradas em membrana de 0,6µm e, em seguida, centrifugadas por 10 min, com rotação de 11.000rpm, para a formação de *pellets*. Após estas etapas, a comunidade bacteriana autóctone foi mantida sob refrigeração a 4°C até o dia inicial do experimento.

A partir de amostras coletadas de água eutrofizada do reservatório de Barra Bonita (SP), cepas das bactérias *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. foram isoladas nas maiores diluições (10^{-5} e 10^{-6}) e mantidas em glicerol a -80°C no Laboratório de Processos Biológicos (LPB – SHS/EESC/USP). Os inóculos de culturas purificadas, representado por estas cepas, juntamente com a comunidade bacteriana autóctone da ETA, constituíram os microrganismos potencialmente degradadores de MIC–LR (Tabela 7) avaliados.

Tabela 7 – Identificação das amostras utilizadas nos ensaios de biotransformação

Inóculo	Procedência	Coordenadas Geográficas
<i>Sphingomonas</i> sp. e <i>Brevundimonas</i> sp	Reservatório de Barra Bonita (SP)	22° 31' 15" S
		48° 31' 43" O
Comunidade bacteriana autóctone	ETA São Carlos – entrada da estação, antes da etapa de mistura rápida	
	ETA São Carlos – entrada dos filtros rápidos	22° 00' 39" S
	ETA São Carlos – saída dos filtros rápidos (antes da etapa de desinfecção)	47° 53' 55" O

Fonte: da própria autora (2018).

4.3 ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM MICROCISTINA-LR EM ESCALA DE BANCADA

Realizados no BIOTACE - Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes (SHS/EESC/USP), os ensaios de biotransformação com MIC–LR foram divididos em três etapas distintas, com o objetivo de se obterem as menores concentrações residuais da toxina utilizando inóculos de culturas purificadas e comunidade bacteriana autóctone. Foi avaliada a influência de fatores bióticos e abióticos (e.g. concentração inicial de MIC-LR, temperatura, tempo de contato entre os inóculos e o poluente alvo e a relação v/v dos inóculos potencialmente degradadores da toxina).

Em frascos *erlenmeyers* de 250mL, um volume total de 100mL de amostra foi preenchido com inóculos das culturas purificadas e da microbiota autóctone, concentração

inicial de MIC-LR e meio mineral Zinder (ZINDER et al., 1984) acrescido de vitaminas (WIDDEL et al., 1981) e solução traço de metais (ZINDER; KOCH, 1984). Em todas as etapas, utilizou-se como controle amostra composta por água deionizada, esterilizada (121°C - 20 min), acrescida do extrato bruto da toxina, com sua microbiota associada, não esterilizado e filtrado, além do meio mineral escolhido. Os ensaios foram realizados em duplicata, em escala de bancada e o meio de cultura selecionado foi previamente esterilizado, a 121°C por 20 min, em autoclave, exceto as soluções de metais e vitaminas (esterilizadas por filtração em membrana), que foram adicionadas apenas no primeiro dia do experimento (dia 0 – zero).

Baseando-se nos estudos referenciados na Tabela 4, foi definido um período máximo de 10 dias para cada experimento, em todas as etapas. Os frascos foram mantidos em incubadoras (evitando a entrada de luz e a possibilidade de foto-oxidação da toxina) nas temperaturas de 22°C e 25°C, dependendo das condições dos ensaios, e sem agitação. Ao longo deste período, foram retiradas alíquotas de 1mL em dias pré-definidos (dia 0, 2, 3, 4, 7 e 10) e armazenadas em freezer, até o fim dos ensaios, para posterior análise da concentração residual de MIC-LR, realizada pelo método ELISA.

- **Etapa 1 dos ensaios de biotransformação**

A Etapa 1 avaliou os resultados de MIC-LR residual obtidos pelos diferentes inóculos quando submetidos aos tratamentos mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação – Etapa 1

***Controle:** extrato bruto de MIC-LR com sua microbiota associada. Fonte: da própria autora (2018).

No Dia 0, frascos *erlenmeyers* foram inoculados com 10% (v/v) dos inóculos potencialmente biodegradadores (exceto o controle), concentrações iniciais de MIC-LR de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e meio Zinder, acrescido de vitaminas e solução traço de metais previamente autoclavados, totalizando um volume de 100mL de amostras. Ao término deste procedimento, foram retiradas alíquotas de 1mL, armazenadas em frascos de vidro e congeladas em freezer onde ficaram até o término do ensaio, para posterior análise da concentração de microcistina residual pelo método ELISA.

Os frascos foram mantidos em incubadoras na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ao longo do período do ensaio, na ausência de luz e sem agitação. Nos dias 2, 3, 4, 7 e 10, foram retiradas novas alíquotas de 1mL e armazenadas em freezer. A fim de se evitarem possíveis contaminações, todos esses procedimentos foram realizados em capela e na presença de um Bico de Bunsen com ponteiros previamente esterilizados em autoclave (Figura 6).

Figura 6 – Local e materiais utilizados para a coleta das alíquotas das amostras utilizadas ao longo dos ensaios de biotransformação

Fonte: da própria autora (2018).

- **Etapas 2 dos ensaios de biotransformação**

Nesta etapa, nova hipótese e inóculo foram testados: a influência da maior concentração de inóculos, além do desempenho da comunidade bacteriana autóctone presente na entrada da ETA, antes da mistura rápida, no mecanismo de biodegradação da MIC-LR. Assim, frascos *erlenmeyers* foram inoculados nas seguintes proporções: 10 e 50% (v/v) (que

correspondem a um volume de 10 mL e 50 mL, respectivamente) de culturas purificadas e 50% (v/v) da comunidade bacteriana autóctone (exceto o controle), concentrações iniciais de microcistina de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e meio Zinder, acrescido de vitaminas e solução traço de metais previamente autoclavados, totalizando um volume total de 100mL de amostras (Figura 7). Além disso, foram mantidos em incubadoras na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz e sem agitação. Aliquotas de 1mL foram retiradas nos dias 0, 3, 4, 7 e 10, armazenadas em frascos de vidro e congeladas até a análise das concentrações residuais de MIC-LR.

Figura 7 - Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação – Etapa 2

***Controle:** extrato bruto de MIC-LR com sua microbiota associada. Fonte: da própria autora (2018).

• Etapa 3 dos ensaios de biotransformação

A última etapa dos ensaios de biotransformação avaliou a influência do fator temperatura sobre o mecanismo de biodegradação. Adicionalmente, novo inóculo foi testado: o extrato de MIC-LR foi submetido à centrifugação por 10 min, a 11.000rpm e 4°C até a formação de *pellets*. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi acrescido ao grupo controle (controle acrescido de inóculo), e a comunidade bacteriana presente na amostra foi utilizada como inóculo.

Frascos *erlenmeyers* foram inoculados com 50% (v/v) da comunidade bacteriana autóctone presente no extrato de MIC-LR (controle acrescido de inóculo) e 10% (v/v) da comunidade bacteriana autóctone (exceto o controle) da saída do filtro da ETA, concentrações

iniciais da toxina de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e meio Zinder, acrescido de vitaminas e solução traço de metais previamente autoclavados, totalizando um volume total de 100mL de amostras (Figura 8). Os frascos foram mantidos em incubadoras com temperaturas de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz, por um período de 10 dias, e sem agitação. Aliquotas de 1mL foram retiradas nos dias 0, 2, 3, 4, 7 e 10, armazenadas em frascos de vidro e congeladas até a realização do teste ELISA.

Figura 8 - Procedimentos e condições experimentais adotadas para o ensaio de biotransformação – Etapa 3

***Controle:** extrato bruto de MIC-LR com sua microbiota associada. Fonte: da própria autora (2018).

4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS INÓCULOS POTENCIALMENTE DEGRADADORES DE MICROCISTINA-LR

4.4.1 Extração e purificação do DNA dos inóculos

Amostras de água da entrada e saída do filtro rápido, antes da etapa de desinfecção, da ETA foram submetidas ao processo de extração de DNA. O material recolhido foi filtrado à vácuo utilizando membranas de nitrocelulose com $0,22\mu\text{m}$ de porosidade e 47 mm de diâmetro (Millipore® - N8645, Burlington, MA, USA), previamente autoclavadas. A biomassa retida nas membranas foi transferida para tubos coletores de 2 mL contidas no PowerWater® DNA Isolation Kit (MoBio Inc., Carlsbad, CA, USA) para posterior extração de DNA, realizado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB-EESC-USP) seguindo o protocolo do fabricante. O mesmo procedimento de extração do DNA foi realizado para os microrganismos presentes na amostra do extrato bruto de MIC-LR. O DNA da comunidade

bacteriana foi extraído e purificado, de acordo com as especificações do fabricante Qiagen® (Hilden, Alemanha), e encaminhadas para o sequenciamento do gene 16S rRNA em plataforma MiSeq Illumina 2x250bp no Laboratório BPI – Biotecnologia Pesquisa e Inovação, Botucatu – SP. A qualidade do DNA extraído, verificado por meio de eletroforese em gel de agarose, foi quantificado por fluorescência por meio do Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA).

4.4.2 Sequenciamento e análise das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA

O material genético obtido após o procedimento descrito no item 4.4.1 foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a PCR, foi utilizado o volume final de 20 µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®, Madison WI, USA), 0,3 µM de *primer forward* e 0,3µM de *primer reverse*, 30 ng de DNA, água ultrapura estéril suficiente para completar os 20µL e a sequência de oligonucleotídeo descritos na Tabela 8, para amplificação. A reação de PCR foi conduzida em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas condições: 3 min a 95°C, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram submetidos as etapas de purificação utilizando *bead* magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Tabela 8 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do DNA das amostras

Iniciador (Primer)	Sequência
16s Forward	5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3'
16s Reverse	5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA ATCC - 3'

Fonte: adaptado de EPP (2018).

Para a geração de *clusters* e sequenciamento, as amostras foram submetidas à reação de indexação, seguindo o protocolo *Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit* (Illumina, San Diego CA, USA). As bibliotecas geradas foram purificadas utilizando *bead* magnética *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea CA, USA), para remoção fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de *primers*. Em seguida, o DNA foi quantificado por *Real – Time PCR* (*qPCR – quantitative polymerase chain reaction*)

utilizando o Kapa-kk4824 *Library Quantification kit Illumina® Platforms* (Illumina, San Diego CA, USA), de acordo com protocolo do fabricante.

Ao final dos procedimentos, foi gerado um *Pool* equimolar de DNA por meio da normalização de todas as amostras a 3nM, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) (EPP, 2018).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para auxiliar na discussão da influência das diferentes condições e fatores bióticos e abióticos sobre o mecanismo de degradação da MIC-LR, foi utilizada a ANOVA Fatorial (Análise de Variância) para verificação da influência de diferentes fatores sobre a concentração residual de MIC-LR, através do *software Statistica 13.0®*, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). No teste estatístico, a variável dependente foi definida como a relação C/C_0 e, as variáveis independentes foram consideradas como tempo de contato, concentração inicial de MIC-LR, inóculos potencialmente degradadores (Etapa 1 dos ensaios de biotransformação), concentração dos inóculos (Etapa 2) e temperatura (Etapa 3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

• Etapa 1 dos ensaios de biotransformação

A Figura 9 descreve a relação C/C_0 ao longo dos 10 dias da Etapa 1 dos ensaios de biotransformação. Essa relação C/C_0 exprime o valor da concentração residual de MIC-LR, com relação à concentração inicial da toxina, sendo esta de 20 ou 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, dependendo do experimento. Assim, C/C_0 varia de 0 a 1, com valores mais próximos a zero relacionados ao maior decaimento, e presumivelmente maior biotransformação da MIC-LR

Os resultados encontrados para a relação C/C_0 (Figura 9) mostram o decaimento da toxina em todas as amostras e condições experimentais, inclusive no controle com sua microbiota associada. Na concentração inicial de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 9A), a fase de adaptação foi observada durante os três primeiros dias, exceto para a comunidade bacteriana autóctone presente na saída do filtro, cuja fase de adaptação foi de apenas dois dias. Ao término do ensaio, a toxina foi reduzida em: 90% da sua concentração inicial pela comunidade bacteriana autóctone da entrada e saída do filtro rápido da ETA; 80% pela mistura das culturas purificadas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. e em 40%, pelas culturas purificadas de *Brevundimonas* sp.

Em concentração inicial de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 9B), a fase de adaptação foi observada nos dois primeiros dias para todos os inóculos, exceto para a entrada do filtro rápido e para o controle (fase de adaptação de três dias). No décimo dia, a concentração de MIC-LR foi reduzida em até 70% de seu valor inicial pela comunidade bacteriana autóctone presente na saída do filtro da ETA, seguido pela mistura das cepas purificadas de SP + BR (50%), comunidade autóctone da entrada do filtro da ETA (50%) e pelas culturas purificadas de BR (40%). Verificou-se que a biotransformação nas amostras do controle com sua microbiota associada atingiu valores próximos a 20% e 60%, respectivamente para a menor e maior concentração inicial da toxina.

Destaca-se do ensaio a possível habilidade da cepa bacteriana de *Brevundimonas* sp. em biodegradar MIC-LR, principalmente quando associada à cepa de *Sphingomonas* sp., condição para a qual as eficiências obtidas foram ainda mais satisfatórias, com decaimento de até 90 e 40% da concentração inicial da toxina quando expostas a 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Uma hipótese é que tenha ocorrido um cometabolismo entre as cepas, aumentando a eficiência destes inóculos na remoção de MIC-LR nas amostras. Entende-se por cometabolismo o processo pelo o qual o contaminante é degradado, por meio da ação de

enzimas específicas produzidas durante o metabolismo, transformando-se em sub-produtos que são assimiláveis por outros microrganismos, possibilitando a degradação completa e redução da concentração deste no meio (HAZEN, 2010).

Figura 9 – Gráficos da relação C/C_0 x tempo de contato (d) para as concentrações iniciais de 20 (A) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (B) de MIC-LR nas amostras coletadas durante a Etapa 1 dos ensaios de biotransformação, para as diferentes condições experimentais e Controle

Controle: extrato bruto de MIC-LR com sua microbiota associada

SP + BR: *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp

BR: *Brevundimonas* sp

EF: Entrada do filtro rápido da ETA

SF: Saída do filtro rápido da ETA

Fonte: da própria autora (2018).

O gênero *Sphingomonas* abrange microrganismos reconhecidos por biodegradar a toxina, diferentemente das *Brevundimonas*, que ainda não foram relatadas na literatura (Tabela 4), sendo esta pesquisa, possivelmente, o primeiro relato do potencial destes microrganismos em biodegradar MIC-LR. Além disso, sua utilização como biorremediadoras foi descrito por pesquisas como as de Li et al. (2004) e Masoudzadeh et al. (2011). Os autores reportaram que estes microrganismos têm potencial para a biorremediação de águas

residuais com elevadas concentrações de cádmio, composto altamente recalcitrante e nocivo ao meio ambiente.

O tipo de inóculo avaliado foi um fator estatisticamente significativo entre eles ($p < 0,05$, ANOVA), exercendo influência sobre o mecanismo de biodegradação. Ressalta-se que a comunidade bacteriana autóctone presente nos filtros da ETA foi mais eficiente na remoção, quando comparado às culturas purificadas e comunidade autóctone presente no extrato bruto da toxina (Controle com sua microbiota associada). Tal fato pode estar associado à presença de uma diversidade de microrganismos que, em conjunto, foram capazes de cometabolizar a MIC-LR mais rapidamente do que apenas microrganismos isolados.

Minillo et al. (2013) observaram o cometabolismo entre microrganismos presentes em biofilme de filtros de carvão com atividade biológica (CAB), quando expostos à concentração de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ da toxina durante 84 dias. As linhagens de bactérias, identificadas em um total de quatro gêneros (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Stenotrophomonas*), contribuíram para a degradação da toxina, atingindo concentrações de toxina não detectáveis com 49 dias dos experimentos. Efeito similar entre um consórcio bacteriano foi verificado por Ramani et al. (2012) entre as cepas de *Microbacterium* sp e *Rhizobium gallicum* (AY972457), expostas a concentração inicial de $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR, durante um período de 20 dias. Ao término do ensaio, amostras que continham as cepas isoladas não demonstraram diminuições significativas da toxina. Por outro lado, quando inoculadas em conjunto, biodegradaram 74% da concentração inicial de MIC-LR.

O potencial de uma comunidade autóctone isolada de uma ETA (*Morgan Water Treatment Plant*, Austrália) foi inicialmente descrita por Ho et al. (2006), ao utilizarem microrganismos que se desenvolveram em biofilme de unidade de filtração rápida. Em laboratório, colunas de filtração foram preenchidas com a areia dos filtros rápidos da estação e alimentados por água contaminada por $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR durante 12 meses e taxa de filtração de 24 m.h^{-1} , similar ao que é encontrado em filtros rápidos em escala real. Após o terceiro dia dos ensaios, já não foi possível detectar concentração residual da toxina no efluente das colunas, efeito que foi vinculado à ação dos microrganismos identificados como *Sphingopyxis* sp. Geo 24 e *Novosphingobium* sp. GGeo25 aderidos ao biofilme.

Em ensaios de bancada conduzidos por Saitou et al. (2002), comunidades bacterianas de duas diferentes fontes (biofilme de tratamento biológico combinado com os processos de tratamento de ciclo completo de uma ETA) e de um lago foram analisadas, quanto ao seu potencial em biodegradar $1.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ da MIC-LR, produzida a partir da cepa tóxica de *Microcystis viridis*. Os microrganismos foram expostos à toxina por um período de 10 dias e

temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Após uma fase de adaptação de 2 e 8 dias, ambas as comunidades degradaram 95% da concentração inicial da toxina.

Na presente pesquisa, a concentração inicial da toxina também foi um fator estatisticamente relevante ($p < 0,05$, ANOVA), aparentemente modificando a fase de adaptação dos microrganismos. Em geral, foi observado o encurtamento da fase de adaptação para a maior concentração de MIC-LR ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) e, conseqüentemente, aumento da biotransformação da toxina. A relação entre a concentração inicial de MIC-LR e sua degradação também foi observada nos estudos de Jones et al. (1994) e Saitou et al. (2002), ao encontrarem maior degradação pelos microrganismos quando expostas à 16.000 e $820 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR, comparado àqueles expostos as concentrações de 4.000 e $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ da toxina.

Morón-Lopez, Nieto-Reyes e El-Shehawy (2017) relatam que a maior concentração da toxina disponível no meio influencia na expressão dos genes *cluster mlr*. Os autores utilizaram diferentes consórcios bacterianos expostos as concentrações iniciais de 300 e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR. Na pesquisa, os consórcios foram divididos em dois grupos (cepas com e sem a expressão gênica das enzimas) e a melhor eficiência foi observada para as cepas que continham o gene *cluster mlr* (*Sphingopyxis* sp. IM-1 e *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2) expostas à maior concentração da toxina.

Embora a cepa de *Sphingomonas* sp nos estudos de Bourne et al. (2001) não tenha sido isolada de ambiente com episódios de florações, não há um consenso se a pré-exposição dos microrganismos à toxina contribui para a diminuição da fase de adaptação. Christoffersen, Lyck e Winding (2002), Edwards et al. (2008), Jones et al. (1994), Minillo et al. (2013) e Shimizu et al. (2011) defendem a ideia de que a comunidade bacteriana autóctone de ambientes eutrofizados é mais adaptada a degradar microcistinas, quando comparado a microrganismos isolados de ambientes onde não há a proliferação de cianobactérias. A diversidade de substâncias tóxicas e recalcitrantes em sistemas aquáticos eutrofizados, estimularia o crescimento de cepas bacterianas capazes de utilizar a toxina para crescimento e reprodução, induzindo à maior ou menor síntese dos genes *cluster mlr*.

Ao se avaliar a possibilidade da aplicação da biodegradação em ETAs, é essencial a compreensão do tempo requerido pela comunidade bacteriana para degradar a toxina, similar ao tempo de detenção hidráulica (TDH) em unidades de processos físicos. Como evidenciado nesta pesquisa, o TDH é caracterizado em duas fases: a fase de adaptação e a de rápida degradação, além de ser influenciado por fatores como a duração do período de adaptação, a concentração da toxina dissolvida no meio e a capacidade das cepas bacterianas em biodegradar a MIC-LR, como foi evidenciado nos resultados obtidos da Etapa 1 (Figura 9).

• Etapa 2 dos ensaios de biotransformação

A Figura 10 descreve a relação C/C_0 encontrada para os diferentes tratamentos experimentais ao longo dos 10 dias da Etapa 2 dos ensaios de biotransformação para as concentrações iniciais de 20 (Figura 10A) ou 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 10B), respectivamente, e diferentes concentrações de inóculos, nas proporções de 10 e 50% (v.v) (para um volume total de 100 mL de amostra).

Diferentemente da Etapa 1 (fase de adaptação de três dias), para a menor concentração inicial de MIC-LR (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$), a fase de adaptação foi de quatro dias em todos os inóculos, exceto nas cepas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. na concentração de 10% (v/v), para as quais já ocorreu decaimento da toxina (10%) a partir do terceiro dia do ensaio. As melhores eficiências observadas foram nas amostras inoculadas na concentração 10% (v/v) de culturas purificadas (redução de 60% da concentração inicial da toxina), seguido pelos inóculos na concentração 50% (v/v) (biotransformação de 50% de MIC-LR), contra apenas 20% obtidos pela comunidade bacteriana autóctone.

Para a concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR, houve um aumento da fase de adaptação para três dias comparado à Etapa 1, que foi de dois dias. No entanto, a partir do terceiro dia, observou-se um pequeno decaimento da toxina nas amostras inoculadas pela mistura das culturas purificadas de *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. (20%) e *Brevundimonas* sp. (10%), ambas na concentração de 10% (v/v). Diferente do que foi observado para a concentração de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os melhores resultados foram obtidos pela comunidade autóctone presente na entrada da ETA (antes da etapa de mistura rápida), saída e entrada do filtro, nos quais houve o decaimento de 98%, 96% e 90% da concentração inicial da toxina. Para as culturas purificadas, as melhores eficiências foram observadas quando inoculadas em menores concentrações (10% comparado à 50%), degradando em até 70% e 50% a MIC-LR.

No grupo controle com sua comunidade microbiota associada foi observado o decaimento da toxina, atingindo valores próximos a 40% e 60% para a menor e maior concentração inicial da toxina no fim do ensaio. Os resultados encontrados foram similares ao da Etapa 1.

A concentração dos microrganismos ativos na biotransformação não foi um fator estatisticamente relevante ($p < 0,05$, ANOVA). Para as culturas purificadas, não houve diferença de remoção quando inoculadas em maior concentração (50% v/v). Como não foram mantidas sob constante agitação, foi observado após o segundo dia, que as amostras

apresentavam turvação e exalavam forte odor, possivelmente devido ao desenvolvimento de um ambiente anóxico (menor concentração de O_2 disponível), fato este que impacta negativamente nas propriedades organolépticas da água (odor e sabor), além do aumento nos custos do tratamento da água e possível rejeição dos usuários finais.

Os valores residuais de MIC-LR obtidos para a comunidade bacteriana autóctone inoculada na concentração 50% (v/v) e expostas a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (redução de 98, 90 e 96% da toxina na entrada da estação, entrada e saída do filtro rápido), foi acompanhado por um aumento na fase de adaptação dos inóculos (quatro dias versus três dias, como observado na Etapa 1). Zhu et al. (2014) e Hoefel et al. (2009) sugerem que há uma forte correlação entre a concentração da toxina, que irá induzir maior expressão gênica dos genes *cluster mlr* e a concentração dos microrganismos no meio, requerendo maior tempo de adaptação pelas cepas bacterianas às condições do meio.

Em especial, nesta etapa foi avaliada a eficiência de biotransformação da toxina por inóculos provenientes da entrada da ETA antes da etapa de mistura rápida. No fim do ensaio foi observado a degradação de 98% da toxina ($C_0 = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$), bem próximo aos valores encontrados pela comunidade bacteriana presente na estação (90 e 96% na entrada e saída do filtro rápido). Tal observação permite inferir que os microrganismos presentes na própria estação são capazes de biodegradar a toxina, sem a necessidade de acrescentar outros inóculos ao tratamento.

Figura 10 - Gráficos da Relação C/C_0 x tempo de contato (d) para as concentrações iniciais de 20 (A) e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (B) de MIC-LR nas amostras coletadas durante a Etapa 2 dos ensaios de biotransformação, para os diferentes inóculos analisados e Controle

Controle: extrato bruto de MIC-LR com sua comunidade microbiota associada

SP + BR: *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp

BR: *Brevundimonas* sp

EETA: Amostra coletada na entrada da estação, antes da etapa de mistura rápida

EF: Entrada do filtro rápido da ETA

SF: Saída do filtro rápido da ETA

10% (v/v): 10 mL dos inóculos por 100 mL das amostras

50% (v/v): 50 mL dos inóculos por 100 mL das amostras

Fonte: da própria autora (2018).

• Etapa 3 dos ensaios de biotransformação

A Figura 11 mostra a relação C/C_0 ao longo dos dez dias dos ensaios de biotransformação, para as concentrações iniciais de 20 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR sob diferentes temperaturas (22 e 25°C). Na degradação de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ da toxina observou-se uma fase de adaptação de dois dias (Figura 11A e Figura 11B) com as melhores eficiências de remoção obtidas pela comunidade bacteriana autóctone da saída do filtro da ETA a 25°C (97%),

seguido pelo mesmo inóculo a 22°C (96%) e controle acrescido de inóculo (90% para as duas temperaturas).

Já para a concentração de 100 µg.L⁻¹ de MIC-LR (Figura 11C e Figura 11D), os inóculos obtiveram uma eficiência de remoção de 70%, com diferentes fases lag (quatro dias para o controle acrescido de inóculo e dois dias para a comunidade bacteriana autóctone da saída do filtro rápido) na temperatura de 22°C (Figura 11C). Quando submetidos a 25°C (Figura 11D), maiores foram as eficiências obtidas (97 e 99% para o controle acrescido de inóculo e saída do filtro, respectivamente) e diminuição da fase de adaptação no controle acrescido de inóculo (de quatro para dois dias).

Diferente dos valores residuais obtidos nas Etapas 1 e 2, no fim do ensaio foi observado no grupo controle o decaimento de 90 (22°C) e 95% (25°C) da toxina e 70 (22°C) e 97% (25°C), quando expostos a 20 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹, respectivamente. Ao longo dos ensaios, a comunidade bacteriana autóctone presente no extrato bruto da toxina apresentou potencial em biodegradar MIC-LR. Vale ressaltar que o extrato foi obtido sem condições de assepsia, possibilitando o crescimento de diversos microrganismos.

O fator temperatura foi estatisticamente representativo ($p < 0,05$, ANOVA), exercendo significativa influência na concentração residual de MIC-LR e redução na fase de rápida degradação. Com o acréscimo da temperatura, já foi possível observar a partir do sétimo dia do ensaio, redução de 90 e 97% de MIC-LR pelo controle acrescido de inóculo e comunidade bacteriana autóctone da SF, expostos às concentrações de 20 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ da toxina, respectivamente.

Dziga et al. (2017), Grützmacher et al. (2002), Mowe et al. (2015) e Saito et al. (2003) demonstraram que as variações sazonais refletem no metabolismo bacteriano de filmes coletados em diferentes estações do ano. Para os períodos mais quentes, o aumento da temperatura da água favorece a aceleração do processo de biotransformação de MIC-LR, diferentemente do que é observado para os períodos mais frios.

Figura 11- Gráficos da Relação C/C_0 x tempo de contato (d) para a concentração inicial de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR incubadas na $T = 22^\circ\text{C}$ (A) e $T = 25^\circ\text{C}$ (B), e para a concentração inicial de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MIC-LR incubadas na $T = 22^\circ\text{C}$ (C) e $T = 25^\circ\text{C}$ (D), nas amostras coletadas durante a Etapa 3 dos ensaios de biotransformação, para os diferentes inóculos analisados e Controle

Controle: extrato bruto de MIC-LR com sua comunidade microbiota associada.

Controle acrescido de inóculo: 50 mL de inóculos por 100 mL das amostras.

SF: Saída do filtro rápido da ETA.

Fonte: da própria autora (2018).

Concluiu-se desta etapa que as melhores eficiências obtidas pelos inóculos foram para a temperatura de 25°C, quando expostos a concentrações de 100 µg.L⁻¹ de MIC-LR. Resultado similar foi observado por ZHU et al. (2016) ao utilizar a cepa bacteriana de *Rhizobium* sp. TH (α -Proteobacteria com gene cluster *mlrA* - microcistinase) exposta a concentração de 830 µg.L⁻¹ de MIC-LR a 25°C.

Somdee et al. (2013) estudaram a influência de seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C) em cepas bacterianas de *Sphingomonas* NV-3, durante 28 dias e concentração inicial de 25 µg.L⁻¹ de MIC-LR. Para estas condições, todas as temperaturas apresentaram uma fase de adaptação de um dia, no entanto, após o quinto dia dos ensaios foi possível detectar a completa degradação da toxina nas amostras incubadas nas temperaturas entre 20 e 35°C, diferentemente das temperaturas de 10 e 15°C, nas quais a degradação foi detectada apenas no último dia do experimento.

Davis et al. (2009), Ho et al. (2007a, 2012), Hu et al. (2011), Li et al. (2012, 2015) e Park et al. (2001) investigaram a influência de diferentes temperaturas, abrangendo faixas de 4 a 40°C, em inóculos potencialmente degradadores de MIC-LR, concluindo que a temperatura é um fator que afeta a biotransformação da toxina, com os melhores resultados obtidos entre 25 e 30°C. Segundo Ho et al. (2012) e Wang et al. (2007a) a temperatura pode afetar a taxa metabólica dos microrganismos biodegradadores da toxina. Quando submetidos a valores extremos de temperaturas (abaixo de 20°C e acima de 30°C), a degradação da microcistina pode apresentar declínio, em decorrência do efeito de redução da atividade metabólica ou mesmo da inativação dos microrganismos.

- **Análise filogenética da comunidade bacteriana envolvida na biotransformação de microcistina - LR**

Baseado nos dados do sequenciamento do gene 16S rRNA, o total de 464 Unidades Taxonômicas Operacionais (*operational taxonomic units* – OTU) foram obtidas da comunidade bacteriana autóctone presente no extrato bruto de MIC-LR (66 OTU), entrada (213 OTU) e saída (185 OTU) do filtro rápido da ETA, com quatro filos dominantes: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (Figura 12). Alguns microrganismos pertencentes a estes filos têm sido reportados como biorremediadores de compostos recalcitrantes em ambientes tais como lodos de refinarias de petróleo (rico em hidrocarbonetos) solos contaminados com metais [Ferro (III)], como mostraram os estudos de Jiang et al. (2011) e Sarkar et al. (2016). OTU com abundância abaixo de 3% foram

agrupadas em “outros” e incluíram os filos Cyanobacteria, Elusimicrobia, Planctomycetes e Verrucomicrobia (ANEXO A,B e C), que juntas, representaram 25,6%.

Figura 12 – Identificação dos filos microbianos para as 464 OTU obtidas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA

Filo		Extrato de MIC-LR	Entrada do filtro rápido	Saída do filtro rápido
Bacteria	Proteobacteria	33	106	101
	Actinobacteria	13	30	19
	Bacteroidetes	11	13	6
	Firmicutes	-	8	5
	Outros	9	56	54
OTU		66	213	185

Fonte: da própria autora (2018).

Particularmente, cepas bacterianas do filo Proteobacteria têm apresentando potencial na degradação de compostos tóxicos. Em estudo realizado por Höckenreiner, Neugebauer e Elango (2015) foi encontrado abundância de *Sphingomonas* e *Comamonadaceae* em comunidade bacteriana autóctone utilizada na biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto policíclico aromático (PAH – *Polycyclic aromatic hydrocarbon*). Na Antártica, Muangchinda et al. (2015) isolaram microrganismos presentes no solo e sedimentos de lagos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos, identificando principalmente *Pseudomonas* e *Sphingomonas*.

A Figura 13 representa a abundância relativa da comunidade bacteriana do extrato bruto de MIC-LR, de um total de 66 OTU encontradas. Destas, observa-se a predominância dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes que juntas, representaram 86,1% da comunidade bacteriana. Na Figura 14 é possível observar a abundância relativa (213 OTU) da comunidade bacteriana autóctone na entrada do filtro rápido da ETA, no qual houve predominância do filo Proteobacteria (39%) representado pelas famílias Comamonadaceae (34,6%) e Oxalabacteraceae (4,4%), seguido pelo filo Actinobacteria (25%), representado pela família Mycobacteriaceae (20,7%) e ACK-M1 (4,3%). Já para a amostra coletada na saída do filtro rápido da ETA (Figura 15), foram detectadas 184 OTU e predominância do filo

Proteobacteria (66,6%) representado pela família Comamonadaceae (63,1%) e Oxalabacteraceae (3,5%).

Figura 13 – Abundância relativa da comunidade bacteriana em amostra de extrato bruto de MIC– LR obtida por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

Fonte: da própria autora (2018).

Figura 14 - Abundância relativa da comunidade bacteriana em amostra coletada na entrada do filtro rápido da ETA obtida por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

Fonte: da própria autora (2018).

Figura 15 - Abundância relativa da comunidade bacteriana em amostra coletada na saída do filtro rápido da ETA, antes da etapa de desinfecção, obtida por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA

Fonte: da própria autora (2018).

Os filos encontrados nas amostras coletadas na unidade de filtração corroboram com a comunidade bacteriana encontrada nos estudos de Haig et al. (2014), Li et al. (2017) e Vandermaesen, Lievens e Springael (2017). Além disso, observou-se o decaimento da diversidade da comunidade bacteriana presente antes e depois do filtro rápido, fato que também foi observado por Zeng et al. (2013), no qual encontraram a predominância do filo Proteobacteria (73,7%), representado principalmente, pelas famílias Comamonadaceae (23,9%) e Oxalobacteraceae (7,4%) nas amostras coletadas após a unidade de filtração.

Do total de 464 OTU obtidas dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA, destaca-se a abundância relativa da família Comamonadaceae (6,5%) em relação aos demais microrganismos (variando de 3,4 a 0,2%) e, principalmente, àqueles pertencentes à ordem Sphingomonadales (3%), que são reconhecidos pela capacidade em sintetizar os genes *cluster mlr*, essenciais ao processo de biotransformação de MIC-LR.

A família Comamonadaceae tem sido relatada como degradadora em solos e águas contaminados por herbicidas (FELD et al., 2015; MÜLLER et al., 1999; MÜLLER; BABEL, 2004; SINGH; SINGH, 2016), demonstrando o potencial destes microrganismos como biorremediadores de compostos tóxicos e recalcitrantes. Com relação à MIC-LR, foi

encontrado apenas um trabalho relacionando estes microrganismos à biotransformação da toxina. No estudo de Kohler et al. (2014), cepas de Comamonadaceae (que representavam 45% das 956 OTU encontradas), foram expostas a 262 $\mu\text{g.L}^{-1}$ da toxina durante 21 dias. Após 15 dias de ensaio, já foi possível detectar concentrações residuais abaixo de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Apesar de terem sido encontradas em membrana de ultrafiltração (KOHLER et al., 2014), esta pesquisa é possivelmente a primeira a descrever o potencial da família Comamonadacea, presente em uma unidade de filtração rápida, na biotransformação de MIC-LR em águas de abastecimento público. Contudo, a técnica molecular realizada nesta pesquisa não inclui informações sobre a expressão gênica e nem sobre a presença dos genes de interesse, os genes *cluster mlr*, nas cepas pertencentes à esta família, sendo necessário estudos mais aprofundados.

6 CONCLUSÕES

Considerando as concentrações residuais de MIC-LR, foram obtidas as seguintes conclusões e recomendações sobre o processo de biotransformação avaliado na presente pesquisa:

- i. A biotransformação de MIC-LR foi afetado pela concentração inicial da toxina no meio, que encurtou a fase de adaptação dos inóculo. Observou-se a diminuição de um dia na fase de adaptação na maior concentração inicial da toxina. Tal fase é um importante fator a ser considerado, principalmente quando a biodegradação é aplicada em ETAs, que visam ao menor tempo de detenção hidráulica possível em suas unidades e à melhor qualidade da água destinada ao sistema de abastecimento público.
- ii. A comunidade bacteriana apta a degradar a toxina e a temperatura interferem na redução substancial da MIC-LR. Nesta pesquisa, a comunidade bacteriana autóctone presente na saída do filtro rápido da ETA e incubada a 25°C, obteve as máximas porcentagens de 99 e 97% de remoção partindo-se de uma concentração inicial de 100 e 20 µg.L⁻¹, respectivamente, para um período de 10 dias de contato entre os inóculos e a toxina.
- iii. A família das cepas bacterianas conhecidas como Comamonadaceae apresentou a maior abundância relativa nas amostras de extrato bruto de MIC-LR (11,9%), entrada (34,6%) e saída do filtro rápido da ETA (63,1%), sugerindo-se a participação destes microrganismos na redução da concentração da toxina ao longo dos ensaios de biotransformação. Não há estudos apontando se estas cepas sintetizam os genes *cluster mlr* e recomenda-se que pesquisas futuras contemplem análises mais aprofundadas sobre a capacidade destes microrganismos.
- iv. Recomenda-se que sejam estudados outros fatores bióticos e abióticos (e.g. presença de luz, meio suporte para o crescimento da biomassa bacteriana, pH, agitação das amostras) para a melhor compreensão do mecanismo de biodegradação da MIC-LR, com vistas à possível aplicação, em escala real, do processo biológico como etapa adicional às etapas de tratamento físico-químicos de água para abastecimento público.

v.   Recomenda-se a análise metagenômica dos microrganismos encontrados nesta pesquisa para a detecção do gene que codifica o *cluster mlr*, envolvido no mecanismo de biotransformação da MIC-LR, principalmente nas cepas de *Brevundimonas* sp. e na família Comamonadaceae.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L. S. **Comparação do Desempenho de Carvão Ativado Produzido a partir de Diferentes Matrizes para a Remoção de Microcistina - LR de Águas de Abastecimento.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.
- BOURNE, D. G. et al. Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4086–4094, 1996.
- BOURNE, D. G. et al. Characterization of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin LR. **Environment toxicology**, v. 16, p. 523–534, 2001.
- BOURNE, D. G. et al. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1294–1302, 2006.
- BRIAND, E. et al. Role of bacteria in the production and degradation of Microcystis cyanopeptides. **Microbiology Open**, v. 5, n. 3, p. 469–478, 2016.
- CAMPINAS, M.; JOÃO, M. Evaluation of cyanobacterial cells removal and lysis by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 70, p. 345–353, 2010.
- CAMPINAS, M. P. **Removal of Cyanobacteria and Cyanotoxins from Drinking Water by Powdered Activated Carbon Adsorption/Ultrafiltration.** [s.l.] Universidade do Algarve, 2009.
- CHORUS, INGRID; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequence monitoring and management. In: **Freshwater Biology**. London: [s.n.]. v. 48p. 1–400.
- CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 27, n. Falconer 1993, p. 125–136, 2002.
- COUSINS, I. T. et al. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. **Water Research**, v. 30, n. 2, p. 481–485, 1996.
- DAVIS, T. W. et al. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. **Harmful Algae**, v. 8, n. 5, p. 715–725, 2009.
- DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 953–962, 1998.
- DE FIGUEIREDO, D. R. et al. Microcystin-producing blooms - A serious global public health issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 2, p. 151–163, 2004.
- DIXON, M. B. et al. Removal of cyanobacterial metabolites by nanofiltration from two treated waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, n. 1–3, p. 288–295, 2011.
- DOUTERELO, I. et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. **Water Research**, v. 65, p. 134–156, 2014.

- DOWNING, J. A.; WATSON, S. B.; MCCAULEY, E. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 1908, n. Smith 1983, p. 1905–1908, 2001.
- DZIGA, D. et al. Microbial Degradation of Microcystins. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 841–842, 2013.
- DZIGA, D. et al. Characterization of enzymatic activity of MlrB and MlrC proteins involved in bacterial degradation of cyanotoxins microcystins. **Toxins**, v. 8, n. 3, 2016.
- DZIGA, D. et al. The biodegradation of microcystins in temperate freshwater bodies with previous cyanobacterial history. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, n. July, p. 420–430, 2017.
- EDWARDS, C. et al. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1315–1321, 2008.
- EDWARDS, C.; LAWTON, L. A. Bioremediation of Cyanotoxins. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 67p. 109–129.
- EPP, B. B. **Relatório Metagenoma - Sequenciamento NGS - região 16S V3-V4**. Botucatu - São Paulo: [s.n.].
- FELD, L. et al. Establishment of bacterial herbicide degraders in a rapid sand filter for bioremediation of phenoxypropionate-polluted groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 878–887, 2015.
- GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE, A. J. et al. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 276, p. 252–259, 2006.
- GOBLER, C. J. et al. Interactive influences of nutrient loading , zooplankton grazing , and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. v. 6, p. 119–133, 2007.
- GRÜTZMACHER, G. et al. Removal of microcystins by slow sand filtration. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 386–394, 2002.
- GURBUZ, F. et al. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 13, p. 4038–4046, 2009.
- HAIG, S. J. et al. Replicating the microbial community and water quality performance of full-scale slow sand filters in laboratory-scale filters. **Water Research**, v. 61, p. 141–151, 2014.
- HARADA, K. et al. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicon**, v. 44, p. 107–109, 2004.
- HASHIMOTO, E. H. et al. Further Investigation of Microbial Degradation of Microcystin Using the Advanced Marfey Method. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, p. 391–398, 2009.
- HAZEN, T. C. Cometabolic Bioremediation. In: N.TIMMIS, K. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 2505–2514.

HE, X. et al. Toxic cyanobacteria and drinking water : Impacts , detection , and treatment. **Harmful Algae**, v. 54, p. 174–193, 2016.

HEISLER, J. et al. Eutrophication and harmful algal blooms : A scientific consensus. v. 8, p. 3–13, 2008.

HITZFELD, B. C.; HOGGER, S. J.; DIETRICH, D. R. Cyanobacterial Toxins : Removal during Drinking Water Treatment , and Human Risk Assessment Cyanobacteria. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 113–122, 2000.

HO, L. et al. Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. **Water Research**, v. 40, p. 768–774, 2006.

HO, L. et al. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, v. 50, p. 438–441, 2007a.

HO, L. et al. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. **Water Research**, v. 41, n. 20, p. 4685–4695, 2007b.

HO, L. et al. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. **Chemosphere**, v. 87, n. 10, p. 1149–1154, 2012.

HÖCKENREINER, M.; NEUGEBAUER, H.; ELANGO, L. Ex situ bioremediation method for the treatment of groundwater contaminated with PAHs. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 285–296, 2015.

HOEFEL, D. et al. Development of an mlrA Gene-Directed TaqMan PCR Assay for Quantitative Assessment of Microcystin-Degrading Bacteria within Water Treatment Plant Sand Filter Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5167–5169, 2009.

HOTTO, A. M.; SATCHWELL, M. F.; BOYER, G. L. Molecular Characterization of Potential Microcystin-Producing Cyanobacteria in Lake Ontario Embayments and Nearshore Waters □. v. 73, n. 14, p. 4570–4578, 2007.

HU, L. BIN et al. Isolation of a *Methylobacillus* sp . that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. **New Biotechnology**, v. 26, n. October, 2009.

HU, L. et al. Biodegradation of microcystins by *Bacillus* sp. Strain EMB. **Energy Procedia**, v. 16, p. 2054–2059, 2011.

HUANG, W.; CHENG, B.; CHENG, Y. Adsorption of microcystin- LR by three types of activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 115–122, 2007.

IMANISHI, S. et al. Bacterial Degradation of Microcystins and Nodularin. **Chemical Research in Toxicology**, n. 18, p. 591–598, 2005.

JIANG, Y. et al. Active and silent members in the mlr gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 322, n. 2, p. 108–114, 2011.

JONES, G. J. et al. Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by Aquatic Bacteria. **Natural Toxins**, n. 1 994, p. 228–235, 1994.

JONES, G. J.; ORR, P. T. Release and degradation of microcystin following algicide

treatment of *Microcystis Aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. **Water Research**, v. 28, n. 4, p. 871–876, 1994.

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 13, p. 1349–1383, 2013.

KEIJOLA, A. M. et al. Removal of Cyanobacterial Toxins in Water Treatment Processes: Laboratory and Pilot Scale Experiments. **Toxicity Assessment**, v. 3, p. 643–656, 1988.

KLITZKE, S.; FASTNER, J. Cylindrospermopsin degradation in sediments e The role of temperature , redox conditions , and dissolved organic carbon. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1549–1555, 2011.

KOHLER, E. et al. Biodegradation of microcystins during gravity-driven membrane (GDM) ultrafiltration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

KORMAS, K. A.; LYMPEROPOULOU, D. S. Cyanobacterial Toxin Degrading Bacteria : Who Are They ? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 12, 2013.

LAWTON, L. A. et al. Rapid detection of microcystins in cells and water. **Toxicon**, v. 55, n. 5, p. 973–978, 2010.

LAWTON, L. A. et al. Novel bacterial strains for the removal of microcystins from drinking water. **Water Science and Technology**, v. 63, n. 6, p. 1137–1142, 2011.

LEE, J.; WALKER, H. W. Mechanisms and factors influencing the removal of microcystin-LR by ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 320, p. 240–247, 2008.

LEMES, G. A. F. et al. Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 358–365, 2008.

LI, C. et al. Characterization of bacterial community dynamics in a full-scale drinking water treatment plant. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 51, p. 21–30, 2017.

LI, H. et al. Simultaneous *Microcystis* Algicidal and Microcystin Degrading Capability by a Single *Acinetobacter* Bacterial Strain. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 21, p. 11903–11911, 2016.

LI, H.; PAN, G. Enhanced and continued degradation of microcystins using microorganisms obtained through natural media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 96, n. 1, p. 73–80, 2014.

LI, J. et al. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 27–35, 2012.

LI, J. et al. Assessment of the factors contributing to the variations in microcystins biodegradability of the biofilms on a practical biological treatment facility. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 175, p. 463–472, 2015.

- LI, J.; LI, R.; LI, J. Current research scenario for microcystins biodegradation – A review on fundamental knowledge, application prospects and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 615–632, 2017.
- LI, Y. et al. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from Russian space laboratory Mir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 819–825, 2004.
- MA, M. et al. Effects and mechanisms of pre-chlorination on *Microcystis aeruginosa* removal by alum coagulation : Significance of the released intracellular organic matter. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 19–25, 2012.
- MAGHSOUDI, E. et al. Biodegradation of multiple microcystins and cylindrospermopsin in clarifier sludge and a drinking water source: Effects of particulate attached bacteria and phycocyanin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 409–417, 2015.
- MANAGE, P. M. et al. Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6924–6928, 2009.
- MARUYAMA, T. et al. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen . nov ., sp . nov ., a microcystin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 56, p. 85–89, 2006.
- MASOUDZADEH, N. et al. Biosorption of cadmium by *Brevundimonas* sp. ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, p. 190–198, 2011.
- MATHYS, W.; SURHOLT, B. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, n. 6, p. 601–605, 2004.
- MCELHINEY, J.; LAWTON, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3 SPEC. ISS., p. 219–230, 2005.
- MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms. **Environmental International**, v. 59, p. 303–327, 2013.
- MINILLO, A. et al. Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu1) - microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 205–214, 2013.
- MORÓN-LÓPEZ, J.; NIETO-REYES, L.; EL-SHEHAWY, R. Assessment of the influence of key abiotic factors on the alternative microcystin degradation pathway (s) (mlr –): A detailed comparison with the mlr route (mlr +). **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 1945–1953, 2017.
- MOWE, M. A. D. et al. Tropical cyanobacterial blooms: A review of prevalence, problem taxa, toxins and influencing environmental factors. **Journal of Limnology**, v. 74, n. 2, p. 205–224, 2015.

MSAGATI, T. A. M.; SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 4, p. 382–397, 2006.

MUANGCHINDA, C. et al. Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4725–4735, 2015.

MÜLLER, R. H. et al. Comamonas acidovorans strain MC1: A new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. **Microbiological Research**, v. 154, n. 3, p. 241–246, 1999.

MÜLLER, R. H.; BABEL, W. Delftia acidovorans MC1 Resists High Herbicide Concentrations — a Study of Nutristat Growth on (RS)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propionate and 2,4-Dichlorophenoxyacetate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 622–630, 2004.

NEFFLING, M. R.; SPOOF, L.; MERILUOTO, J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins-Comparison of columns. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, n. 2, p. 234–241, 2009.

NEUMANN, U.; WECKESSER, J. Elimination of microcystin peptide toxins from water by reverse osmosis. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, n. 2, p. 143–148, 1998.

NICHOLSON, B. C.; ROSITANO, J.; BURCH, M. D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, v. 28, n. 6, p. 1297–1303, 1994.

OKANO, K. et al. Characteristics of a Microcystin-Degrading Bacterium under Alkaline Environmental Conditions. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 1–8, 2009.

ORTOLAN, A. V. S. **Adsorção com carvão ativado granular e degradação biológica para o tratamento avançado de águas de abastecimento: remoção de microcistina em escala laboratorial**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

PANTELIĆ, D. et al. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 421–441, 2013.

PARK, H. D. et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 337–343, 2001.

PARK, J. A. et al. Mesoporous carbon for efficient removal of microcystin-LR in drinking water sources, Nak-Dong River, South Korea: Application to a field-scale drinking water treatment plant. **Chemosphere**, v. 193, p. 883–891, 2018.

PINHO, L. X. et al. Effect of TiO₂ photocatalysis on the destruction of Microcystis aeruginosa cells and degradation of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. **Chemical Engineering Journal**, v. 268, p. 144–152, 2015.

QUESADA, A.; EL-SHEHAWY, R. Diversity and temporal shifts of the bacterial community associated with a toxic cyanobacterial bloom : An interplay between microcystin producers and degraders. **Water Research**, v. 125, p. 52–61, 2017.

- RAMANI, A.; REIN, K., SHETTY, K.G.; JAYACHANDRAN, K. Microbial degradation of microcystin in Florida's freshwaters. **Biodegradation** **23**, v. 29, n. 10, p. 35–45, 2012.
- RAPALA, J. et al. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, n. 2, p. 213–231, 2002.
- RASTOGI, R. P.; MADAMWAR, D.; INCHAROENSAKDI, A. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–22, 2015.
- RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. The cyanotoxin-microcystins : current overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, n. 13, p. 215–249, 2014.
- RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P.; INCHAROENSAKDI, A. The cyanotoxin-microcystins: Current overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 215–249, 2014.
- REVETTA, R. P. et al. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. **Water Research**, v. 44, n. 5, p. 1353–1360, 2010.
- RODRÍGUEZ, E., MAJADO, M.E., MERILLUOTO, J., ACERO, J. . Oxidation of microcystins by permanganate : Reaction kinetics and implications for water treatment. **Water Research**, v. 41, p. 102–110, 2007.
- ROSITANO, J. et al. OZONATION OF NOM AND ALGAL TOXINS IN FOUR TREATED WATERS. **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 23–32, 2001.
- ROSS, C.; SANTIAGO-V, L.; PAUL, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 66–73, 2006.
- SAITO, T. et al. Biodegradation of microcystis and microcystins by indigenous nanoflagellates on biofilm in a practical treatment facility. **Environmental Technology**, v. 24, n. 2, p. 143–51, 2003.
- SAITOU, T. et al. Degradation of microcystin by biofilm in practical treatment facility. **Water Science and Technology**, v. 46, n. 11–12, p. 237–244, 2002.
- SARKAR, J. et al. Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–20, 2016.
- SHIMIZU, K. et al. How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. **Lakes and Reservoirs: Research and Management**, v. 16, n. 3, p. 169–178, 2011.
- SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245–261, 2016.
- SOMDEE, T. et al. Degradation of [Dha 7] MC-LR by a Microcystin Degrading Bacterium Isolated from Lake Rotoiti , New Zealand. **ISRN Microbiology**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- SPOOF, L.; KARLSSON, K.; MERILLUOTO, J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 909, n. 2, p. 225–236, 2001.

- SUI, X. et al. A Novel Photocatalytic Material for Removing Microcystin-LR under Visible Light Irradiation : Degradation Characteristics and Mechanisms. v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.
- SUN, F. et al. The lysis of *Microcystis aeruginosa* in $AlCl_3$ coagulation and sedimentation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 193–194, p. 196–202, 2012.
- SVIR, Z. et al. Molecular Aspects of Microcystin-induced Hepatotoxicity and Hepatocarcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health , Part C : Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, n. December 2014, p. 37–41, 2010.
- TAKENAKA, S.; WATANABE, M. F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **Chemosphere**, v. 34, n. 4, p. 749–757, 1997.
- TRIANSTIS, T. et al. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. **Toxicon**, v. 55, n. 5, p. 979–989, 2010.
- VALLERO, D. A. Applied Microbial Ecology : Bioremediation. In: **Environmental Biotechnology: A Biosystems Approach**. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 750.
- VANDERMAESEN, J.; LIEVENS, B.; SPRINGAEL, D. Isolation and identification of culturable bacteria, capable of heterotrophic growth, from rapid sand filters of drinking water treatment plants. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 6, p. 594–607, 2017.
- VIERHEILIG, J. et al. Potential applications of next generation DNA sequencing of 16S rRNA gene amplicons in microbial water quality monitoring. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 11, p. 1962–1972, 2015.
- WANG, H. et al. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4262–4270, 2007a.
- WANG, J. et al. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1120–1128, 2007b.
- WESTRICK, J. A. et al. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1705–1714, 2010.
- WIDDEL, FRIEDRICH; PFENNING, N. Isolation of New Sulfate-Reducing Bacteria Enriched with Acetate from Saline Environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen.nov., sp.nov. **Archives of Microbiology**, n. 129, p. 395–400, 1981.
- WO, L. et al. Cylindrospermopsin production and release by the potentially invasive cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* under temperature and light gradients. v. 10, p. 668–675, 2011.
- YAN, H. et al. Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, n. 16, p. 1694–1698, 2004.
- ZENG, D.-N. et al. Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1573–84, 2013.

ZHANG, L.; PING, X.; YANG, Z. Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. **Talanta**, v. 62, n. 1, p. 193–200, 2004.

ZHANG, M. L.; YAN, H.; PAN, G. Microbial degradation of microcystin-LR by *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Technology**, v. 32, n. 15, p. 1779–1787, 2011.

ZHU, L. et al. Ecological dynamics of toxic *Microcystis* spp. and microcystin-degrading bacteria in Dianchi Lake, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1874–1881, 2014.

ZHU, X. et al. Biodegradation mechanism of microcystin-LR by a novel isolate of *Rhizobium* sp. TH and the evolutionary origin of the *mlrA* gene. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 115, p. 17–25, 2016.

ZINDER, S. H. et al. Methanogenesis in a Thermophilic (58 ° C) Anaerobic Digester : *Methanotherix* sp . as an Important Aceticlastic Methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796–807, 1984.

ZINDER, S. H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives of Microbiology**, n. 138, p. 263–272, 1984.

ANEXO A – Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone do extrato bruto de MIC-LR

OTUs	Extrato bruto de MIC-LR
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter	28,10%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__[Weeksellaceae];g__Chryseobacterium	23,30%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__[Exiguobacteraceae];g__Exiguobacterium	15,90%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Delftia	11,90%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas	6,80%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__[Exiguobacteraceae];g__	1,81%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__	1,76%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Sphingobacteriaceae;g__Sphingobacterium	1,54%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Stenotrophomonas	1,47%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Microbacterium	0,99%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Salinibacterium	0,91%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Sphingobacteriaceae;g__Pedobacter	0,69%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;Other	0,42%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__	0,42%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__[Exiguobacteraceae];Other	0,35%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Variovorax	0,35%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Mycobacteriaceae;g__Mycobacterium	0,29%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Rhizobiaceae;g__Agrobacterium	0,27%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__;g__	0,24%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__Rhodospirillaceae;g__	0,21%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__[Weeksellaceae];Other	0,19%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__Devosia	0,19%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;Other;Other	0,13%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Candidatus Rhodoluna	0,13%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;g__Arthrobacter	0,13%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__	0,10%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__ACK-M1;g__	0,08%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Hydrogenophaga	0,08%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__Dyadobacter	0,06%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Sphingobacteriaceae;Other	0,06%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Limnochabitans	0,06%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;Other	0,06%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__	0,06%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Nocardiaceae;g__Rhodococcus	0,05%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Caulobacteriales;f__Caulobacteraceae;g__Mycoplana	0,05%

K: Reino (*Kingdom*), p: filo (*phylum*), c: classe (*class*), o: ordem (*order*), f: família (*Family*), g: gênero (*genus*).

Continuação do ANEXO A

k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Brucellaceae;g__Ochrobactrum	0,05 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Rhizobiaceae;Other	0,05 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;g__	0,05 %
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Micrococcaceae;Other	0,03 %
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Nocardiodaceae;g__Aeromicrobium	0,03 %
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__	0,03 %
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__Sphingobacteriaceae;g__	0,03 %
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__	0,03 %
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Synechococcophycideae;o__Synechococcales;f__Synechococcaceae;g__Synecho coccus	0,03 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Caulobacterales;f__Caulobacteraceae;g__	0,03 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;Other;Other	0,03 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__C39	0,03 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;Other;Other;Other	0,03 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;Other	0,03 %
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Candidatus Aquiluna	0,02 %
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Prevotellaceae;g__Prevotella	0,02 %
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__Sediminibacterium	0,02 %
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Stramenopiles;f__;g__	0,02 %
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae;g__Caloramator	0,02 %
k__Bacteria;p__OD1;c__ABY1;o__;f__;g__	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylocystaceae;g__Methylosinus	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingo monas	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;Other;Other;Other	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Alcaligenaceae;g__	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;Other	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Dechloromonas	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Methylococcales;f__Methylococcaceae;g__Methylocal dum	0,02 %
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__Pseudoxa nthomonas	0,02 %
k__Bacteria;p__TM7;c__TM7-1;o__;f__;g__	0,02 %
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae;o__[Cerasicoccales];f__[Cerasicoccaceae];g__	0,02 %

ANEXO B –Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone da entrada do filtro rápido da ETA

OTUs	EF
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Mycobacteriaceae;g__Mycobacterium	20,72%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__	20,07%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;Other	14,57%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;g__	4,37%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__ACK-M1;g__	4,26%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__C39	3,50%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Hydrogenophaga	3,48%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Limnohabitans	3,32%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Candidatus Rhodoluna	1,92%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__	1,89%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Synechococcophycideae;o__Synechococcales;f__Synechococcaceae;g__Synechococcus	1,68%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Methylophilales;f__Methylophilaceae;g__	1,65%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Methylococcales;f__Methylococcaceae;g__Methylocaldum	1,29%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__Sediminibacterium	1,09%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Nocardiaceae;g__Rhodococcus	0,81%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;g__Polynucleobacter	0,73%
Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other	0,64%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Stramenopiles;f__;g__	0,58%
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae;o__[Cerasicoccales];f__[Cerasicoccaceae];g__	0,55%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Chlorophyta;f__Trebouxiophyceae;g__	0,49%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Alcaligenaceae;g__	0,41%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobiia;o__Acidimicrobiales;f__C111;g__	0,41%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Cryptophyta;f__;g__	0,37%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__	0,36%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylocystaceae;g__Methylosinus	0,36%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Dechloromonas	0,35%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobiia;o__Acidimicrobiales;f__;g__	0,32%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Legionellales;f__Coxiellaceae;g__Rickettsiella	0,28%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__;g__	0,27%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Oxalobacteraceae;Other	0,27%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Acinetobacter	0,27%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Hylemonella	0,27%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;Other	0,26%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Sinobacteraceae;g__	0,26%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__;g__	0,24%

Continuação do ANEXO B

k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Methylococcales;f__Methylococcaceae;Other	0,24%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__Rhodospirillaceae;g__	0,22%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Enterobacteriales;f__Enterobacteriaceae;g__	0,21%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__	0,21%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;Other	0,21%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Gloeobacterophycideae;o__Gloeobacterales;f__Gloeobacteraceae;g__Gloeobacter	0,21%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;Other;Other;Other	0,20%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobiia;o__Acidimicrobiales;f__EB1017;g__	0,19%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__[Weeksellaceae];g__Chryseobacterium	0,17%
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Chlorophyta;f__;g__	0,17%
k__Bacteria;p__OD1;c__ZB2;o__;f__;g__	0,17%
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae;o__Opitutales;f__Opitutaceae;g__Opitutus	0,17%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Solirubrobacterales;f__Conexibacteraceae;Other	0,16%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Candidatus Aquiluna	0,16%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__	0,14%
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__[Exiguobacteraceae];g__Exiguobacterium	0,13%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Delftia	0,13%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;Other;Other	0,13%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Myxococcales;f__;g__	0,13%
k__Bacteria;p__OD1;c__SM2F11;o__;f__;g__	0,12%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__;g__	0,12%
k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Holophagae;o__Holophagales;f__Holophagaceae;g__	0,11%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__	0,10%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Rhodoferax	0,10%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Methylococcales;f__Crenotrichaceae;g__Crenothrix	0,10%
k__Bacteria;p__Chlamydiae;c__Chlamydiia;o__Chlamydiales;f__Rhabdochlamydiaceae;g__Candidatus Rhabdochlamydia	0,10%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__Rhodoplanes	0,10%
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Spartobacteria];o__[Chthoniobacterales];f__[Chthoniobacteraceae]; g__Candidatus Xiphiematobacter	0,10%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Methylocystaceae;g__	0,09%
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__	0,09%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;Other;Other	0,07%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__;f__;g__	0,07%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Myxococcales;f__Myxococcaceae;g__Anaeromyxobacter	0,07%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Bradyrhizobiaceae;g__	0,07%
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria;o__Actinomycetales;f__Microbacteriaceae;g__Mycetocola	0,06%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Hyphomicrobiaceae;g__	0,06%
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__MIZ46;f__;g__	0,06%

Continuação do ANEXO B

k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Methylacidiphilae];o_Methylacidiphilales;f_LD19;g__	0,06%
k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-1;o_:f_:g__	0,05%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Streptomycetaceae;g_Streptomyces	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_:f_:g__	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Comamonas	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales;f_Aeromonadaceae;g__	0,05%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Pedosphaerae];o_[Pedosphaerales];f_R4-41B;g__	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales;f_Xanthomonadaceae;g_Stenotrophomonas	0,04%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia;o_Flavobacteriales;f_Flavobacteriaceae;g_Flavobacterium	0,04%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Euglenozoa;f_:g__	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Ramlibacter	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_MND1;f_:g__	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;Other	0,04%
k_Bacteria;p_TM6;c_SJA-4;o_:f_:g__	0,04%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Opitutae;o_Opitutales;f_Opitutaceae;g__	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Pseudomonadaceae;g_Pseudomonas	0,04%
k_Bacteria;p_Chlamydiae;c_Chlamydiia;o_Chlamydiales;f_:g__	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_Methylophilaceae;g_Methylotenera	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Bdellovibrionales;f_Bacteriovoracaceae;g__	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales;f_Xanthomonadaceae;g_Luteibacter	0,04%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Kineosporiaceae;Other	0,03%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Cryocola	0,03%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Coriobacteriia;o_Coriobacteriales;f_Coriobacteriaceae;g__	0,03%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Thermoleophilia;o_Solirubrobacterales;f_Conexibacteraceae;g_Conexibacter	0,03%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_S24-7;g__	0,03%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia;o_Sphingobacteriales;f_:g__	0,03%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Nostocophycideae;o_Nostocales;f_Nostocaceae;g__	0,03%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Cohnella	0,03%
k_Bacteria;p_OD1;c_:o_:f_:g__	0,03%
k_Bacteria;p_OP3;c_BD4-9;o_:f_:g__	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Ellin329;f_:g__	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g__	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_KD1-23	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_:f_:g__	0,03%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia;o_Sphingobacteriales;f_Sphingobacteriaceae;g_Sphingobacterium	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Variovorax	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia;o_Acidimicrobiales;f_Microthrixaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Intrasporangiaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Leucobacter	0,02%
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Chloroflexi;o_[Roseiflexales];f_:g__	0,02%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_:g__	0,02%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium	0,02%
k_Bacteria;p_GN02;c_GKS2-174;o_:f_:g__	0,02%

Continuação do ANEXO B

k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Azospirillum	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Telmatospirillum	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Oxalobacter	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Ellin6067;f_;;g_	0,02%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Spartobacteria];o_[Chthoniobacterales];f_[Chthoniobacteraceae];g_	0,02%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_[Exiguobacteraceae];g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Micrococcaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Caloramator	0,01%
k_Bacteria;p_OD1;c_ABY1;o_;;f_;;g_	0,01%
k_Archaea;p_[Parvarchaeota];c_[Micrarchaea];o_[Micrarchaeles];f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_AC1;c_HDBW-WB69;o_;;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_[Chloracidobacteria];o_RB41;f_Ellin6075;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Pseudonocardiaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Streptomyetaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Thermoleophilia;o_Solirubrobacterales;f_Conexibacteraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia;o_Flavobacteriales;f_[Weeksellaceae];g_Cloacibacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprospirae];o_[Saprospirales];f_Chitinophagaceae;g_Flavisolibacter	0,01%
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Anaerolineae;o_Caldilineales;f_Caldilineaceae;g_Caldilinea	0,01%
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Anaerolineae;o_WCHB1-50;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;Other;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Streptophyta;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Nostocophycideae;o_Nostocales;f_Nostocaceae;g_Cylindrospermopsis	0,01%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_Elusimicrobiales;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Gemmatales;f_Isosphaeraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Planctomycetales;f_Planctomycetaceae;g_Planctomyces	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Methylobacteriaceae;g_Methylobacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Rhodobacter	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Magnetospirillum	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_;;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Methylibium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Paucibacter	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Roseateles	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Hydrogenophilales;f_Hydrogenophilaceae;g_Thiobacillus	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_Methylophilaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_Vogesella	0,01%

Continuação do ANEXO B

k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Azospira	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Uliginosibacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_SBla14;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Bdellovibrionales;f_Bdellovibrionaceae;g_Bdellovibrio	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfuromonadales;f_Geobacteraceae;g_Geobacter	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Myxococcales;f_Polyangiaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Spirobacillales;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Chromatiales;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Coxiellaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Coxiellaceae;g_Aquicella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Legionellaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Legionellaceae;g_Legionella	0,01%
k_Bacteria;p_TM6;c_SBRH58;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_TM7;c_SC3;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-3;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Pedosphaerae];o_[Pedosphaerales];f_Ellin515;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Pedosphaerae];o_[Pedosphaerales];f_auto67_4W;g_	0,01%
k_Bacteria;p_WS3;c_PRR-12;o_Sediment-1;f_PRR-10;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Microbacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Salinibacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhizobiaceae;g_Agrobacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Prevotellaceae;g_Prevotella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales;f_Xanthomonadaceae;g_Pseudoxanthomonas	0,01%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Solibacteres;o_Solibacterales;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Solibacteres;o_Solibacterales;f_Solibacteraceae;g_Candidatus Solibacter	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Pseudoclavibacter	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Thermoleophilia;o_Solirubrobacterales;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprospirae];o_[Saprospirales];f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Chlorobi;c_Ignavibacteria;o_Ignavibacteriales;f_[Melioribacteraceae];g_	0,01%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_MLE1-12;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_FAC88;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_MVP-88;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Acidaminobacteraceae];g_Acidaminobacter	0,01%
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes;c_Gemmatimonadetes;o_KD8-87;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira;o_Nitrospirales;f_Nitrospiraceae;g_Nitrospira	0,01%
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira;o_Nitrospirales;f_[Thermodesulfovibrionaceae];g_DCE29	0,01%
k_Bacteria;p_Plactomycetes;c_Plactomycetia;o_Gemmatales;f_Gemmataceae;g_Gemmata	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;Other;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Beijerinckiaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Beijerinckiaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Hyphomicrobium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_Rickettsiaceae;g_	0,01%

Continuação do ANEXO B

k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Gallionellales;f_Gallionellaceae;g_Gallionella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_ ;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_Chromobacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae;g_Desulfovibrio	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Syntrophobacterales;f_Syntrophaceae;g_Desulfomonile	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Alteromonadales;f_211ds20;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Legionellaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales;f_Methylococcaceae;g_Methylomonas	0,01%

ANEXO C – Análise filogenética da comunidade bacteriana autóctone da saída do filtro rápido da ETA

OTUs	SF
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_	28,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;Other	24,11%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Hydrogenophaga	6,90%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Limnohabitans	4,08%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_	3,45%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Cytophagia;o_Cytophagales;f_Cytophagaceae;g_	3,26%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_C39	3,10%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_Methylophilaceae;g_	2,24%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Candidatus Rhodoluna	1,95%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_ACK-M1;g_	1,92%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Synechococcophycideae;o_Synechococcales;f_Synechococcaceae;g_Synechococcus	1,55%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprospirae];o_[Saprospirales];f_Chitinophagaceae;g_Sediminibacterium	1,33%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Opitutae;o_[Cerasiococcales];f_[Cerasiococcaceae];g_	1,31%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales;f_Methylococcaceae;g_Methylodum	1,27%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_	0,87%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacterales;f_Enterobacteriaceae;g_	0,76%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Polynucleobacter	0,72%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Myxococcales;f_Myxococcaceae;g_Anaeromyxobacter	0,61%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Xanthomonadales;f_Sinobacteraceae;g_	0,60%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;Other	0,54%
Unassigned;Other;Other;Other;Other;Other	0,53%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Dechloromonas	0,52%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_	0,50%

Continuação do ANEXO C

k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Hylemonella	0,48%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Chlorophyta;f_Trebouxiophyceae;g__	0,47%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_[Saprospirae];o_[Saprospirales];f_Chitinophagaceae;g__	0,47%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales;f_Methylococcaceae;Other	0,42%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g__	0,41%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f__;g__	0,33%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g__	0,28%
k_Bacteria;p_OD1;c_ZB2;o_;f__;g__	0,27%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;Other	0,26%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Opitutae;o_Opitutales;f_Opitutaceae;g_Opitutus	0,25%
k_Bacteria;p_OD1;c_SM2F11;o_;f__;g__	0,24%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Methylocystaceae;g_Methylosinus	0,23%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;Other;Other;Other	0,22%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia;o_Acidimicrobiales;f__;g__	0,21%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Coxiellaceae;g_Rickettsiella	0,20%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Cryptophyta;f__;g__	0,20%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;Other;Other	0,17%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia;o_Acidimicrobiales;f_C111;g__	0,17%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Myxococcales;f__;g__	0,16%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Stramenopiles;f__;g__	0,15%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium	0,14%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteriia;o_Acidobacteriales;f_Koribacteraceae;g_Candidatus Koribacter	0,14%
k_Bacteria;p_Plantomycetes;c_Plantomycetia;o_Gemmatales;f_Isosphaeraceae;g__	0,14%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f__;g__	0,13%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g__	0,12%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales;f_Crenotrichaceae;g_Crenothrix	0,10%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_;f__;g__	0,09%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Opitutae;o_Opitutales;f_Opitutaceae;g__	0,09%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Rhodoplanes	0,08%
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_TK17;o_mle1-48;f__;g__	0,08%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Rhodoferrax	0,08%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_MND1;f__;g__	0,08%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Holophagae;o_Holophagales;f_Holophagaceae;g__	0,08%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Thermoleophilia;o_Solirubrobacterales;f__;g__	0,07%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Sphingobacteriia;o_Sphingobacteriales;f__;g__	0,07%
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira;o_Nitrospirales;f_Nitrospiraceae;g_Nitrospira	0,07%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_MIZ46;f__;g__	0,07%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Euglenozoa;f__;g__	0,06%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Beijerinckiaceae;Other	0,06%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;Other	0,06%
k_Bacteria;p_Plantomycetes;c_Plantomycetia;o_Pirellulales;f_Pirellulaceae;g__	0,06%

Continuação do ANEXO C

k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g	0,06%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Synechococcophycidae;o_Pseudanabaenales;f_Pseudanabaenaceae;g_Pseudanabaena	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas	0,05%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Acidaminobacteraceae;g_Acidaminobacter	0,05%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Comamonas	0,05%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_ML635J-21;o_f_g	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;Other;Other;Other	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_g	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Ramlibacter	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Uliginosibacterium	0,04%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;Other;Other	0,04%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Mycetocola	0,04%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_MLE1-12;f_g	0,04%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_Elusimicrobiales;f_g	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Methylocystaceae;g	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Telmatospirillum	0,04%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_Spartobacteria;o_Chthoniobacterales;f_Chthoniobacteraceae;g_Candidatus Xiphinematobacter	0,04%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Delftia	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;Other	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Azospirillum	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Bdellovibrionales;f_Bacteriovoracaceae;g	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Gallionellales;f_Gallionellaceae;g_Gallionella	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_Methylophilaceae;Other	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_Methylophilaceae;g_Methylotenera	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;Other	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae;g_Desulfovibrio	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Caulobacterales;f_Caulobacteraceae;g	0,03%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Prevotellaceae;g_Prevotella	0,03%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteria-6;o_iii1-15;f_g	0,03%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_g	0,03%
k_Bacteria;p_Chlorobi;c_o_f_g	0,03%
k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_Chloroplast;o_Chlorophyta;f_g	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Magnetospirillum	0,03%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Acidovorax	0,03%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Mycobacteriaceae;g_Mycobacterium	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Nocardiaceae;g_Rhodococcus	0,02%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Caloramator	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Kineosporiaceae;Other	0,02%
k_Bacteria;p_Armatimonadetes;c_Fimbriimonadia;o_Fimbriimonadales;f_Fimbriimonadaceae;g_Fimbriimonas	0,02%
k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Anaerolineae;o_SBR1031;f_oc28;g	0,02%

Continuação do ANEXO C

k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Veillonellaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Acidaminobacteraceae];g_Fusibacter	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_Rickettsiaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Oxalobacter	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Ralstonia	0,02%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Methylacidiphilae];o_Methylacidiphilales;f_LD19;g__	0,02%
k_Bacteria;p_WPS-2;c_o_ ;f_ ;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;Other;Other;Other	0,02%
k_Bacteria;p_OD1;c_ABY1;o_ ;f_ ;g__	0,02%
k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-1;o_ ;f_ ;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Flavobacteriia;o_Flavobacteriales;f_Flavobacteriaceae;g_Flavobacterium	0,02%
k_Bacteria;p_Chlorobi;c_Ignavibacteria;o_Ignavibacteriales;f_[Melioribacteraceae];g__	0,02%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Gemmatales;f_Gemmataceae;g_Gemmata	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Hyphomicrobium	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;Other;Other	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_KD1-23	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Bdellovibrionales;f_Bdellovibrionaceae;g_Bdellovibrio	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_34P16;f_ ;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Aeromonadales;f_Aeromonadaceae;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Pedosphaerae];o_[Pedosphaerales];f_ ;g__	0,02%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Candidatus Aquiluna	0,01%
k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Solibacteres;o_Solibacterales;f_ ;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Acidimicrobiia;o_Acidimicrobiales;f_JdFBGBact;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Elusimicrobia;o_FAC88;f_ ;g__	0,01%
k_Bacteria;p_GN02;c_GKS2-174;o_ ;f_ ;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira;o_Nitrospirales;f_[Thermodesulfovibrionaceae];g_DCE29	0,01%
k_Bacteria;p_Nitrospirae;c_Nitrospira;o_Nitrospirales;f_[Thermodesulfovibrionaceae];g_GOUTA19	0,01%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Gemmatales;f_Gemmataceae;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Planctomycetales;f_Planctomycetaceae;g_Planctomyces	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Beijerinckiaceae;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Blastomonas	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Methylophilales;f_ ;g__	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_Vogesella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_[Entotheonellales];f_[Entotheonellaceae];g__	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Legionellales;f_Legionellaceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Pseudomonadales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter	0,01%

Continuação do ANEXO C

k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_[Exiguobacteraceae];g_Exiguobacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;Other	0,01%
k_Archaea;p_Crenarchaeota;c_MBGA;o_NRP-J;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_;c_;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Cellulomonadaceae;g_Cellulomonas	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Microbacteriaceae;g_Agrococcus	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Actinomycetales;f_Streptomyetaceae;g_Streptomyces	0,01%
k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_OPB41;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Chlamydiae;c_Chlamydia;o_Chlamydiales;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Elusimicrobia;c_Endomicrobia;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_GAL15;c_;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Gemmatimonadetes;c_Gemmatimonadetes;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_OD1;c_;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_OP3;c_PBS-25;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_vadinHA49;o_DH61;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Pedomicrobium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Skermanella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;Other;Other	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_Sutterella	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Comamonadaceae;g_Giesbergeria	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Oxalobacteraceae;g_Janthinobacterium	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_Chitinilyticum	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Azospira	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_Rhodocyclaceae;g_Zoogloea	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_SC-I-84;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfobacterales;f_Desulfobulbaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_FAC87;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Myxococcales;f_0319-6G20;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Syntrophobacterales;f_Syntrophaceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Syntrophobacterales;f_Syntrophaceae;g_Desulfomonile	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Alteromonadales;f_211ds20;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Alteromonadales;f_HTCC2188;g_HTCC	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Methylococcales;f_Methylococcaceae;g_Methylomonas	0,01%
k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_[Marinicellales];f_[Marinicellaceae];g_	0,01%
k_Bacteria;p_Spirochaetes;c_[Brachyspirae];o_[Brachyspirales];f_Brachyspiraceae;g_	0,01%
k_Bacteria;p_TM7;c_;o_;f_;g_	0,01%
k_Bacteria;p_Verrucomicrobia;c_[Spartobacteria];o_[Chthoniobacterales];f_[Chthoniobacteraceae];g_	0,01%
k_Bacteria;p_WS4;c_;o_;f_;g_	0,01%