

I-191 - AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR BIODEGRADAÇÃO E BIOFILTRAÇÃO EM FILTROS DE CARVÃO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA EM ESCALA DE BANCADA

Alessandro Minillo ⁽¹⁾

Oceanólogo e Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Pesquisador Visitante pela Faculdade de Engenharia (FAEN) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

William Deodato Isique

Biólogo pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP de São Jose do Rio Preto. Mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara. Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos – USP de São Carlos.

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Bióloga pela Universidade de São Paulo. Mestrado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Professora Titular do Departamento de Tecnologia da UNESP – Campus de Jaboticabal.

Edson Pereira Tangerino

Engenheiro Civil pela Escola de Engenharia de Lins (EEL), SP - Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS – Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Professor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Endereço ⁽¹⁾: Rodovia Dourados/Itahum, Km 12 - Unidade II – FAEN – UFGD – Dourados – MS – CEP: 79.804-970 – Brasil – Tel (67) 81077568 - e-mail: alminillo@yahoo.com.br

RESUMO

As microcistinas são toxinas produzidas por cianobactérias e representam um problema às companhias de saneamento devido seu efeito recalcitrante nos processos convencionais de tratamento de água. O desenvolvimento de novas tecnologias tem potencializado o aumento na capacidade de remoção desses compostos tóxicos, assegurando a produção de água destinada ao consumo humano em concordância às normas sanitárias estabelecidas. Neste contexto, uma série de estudos mostra a remoção de diferentes poluentes em filtros de carvão ativado granular (CAG) quando colonizados por microrganismos no leito destes filtros. A ação de biodegradação dessa toxina e de outros micropoluentes por microrganismos aderidos no biofilme é considerada uma alternativa na ação de remoção e eliminação destas substâncias no tratamento de água. O presente estudo avaliou a remoção de microcistinas em filtros de carvão ativados biologicamente (CAB), a biodegradação dessa cianotoxina por microrganismos aderidos nesses biofiltros, e a identificação filogenética dos microrganismos que participam no processo de degradação desta toxina. Os ensaios conduzidos em condições controladas demonstraram a remoção expressiva das microcistinas e carbono orgânico dissolvido nos filtros CAB em até 97 e 38%, respectivamente. Foi constatada a biodegradação da toxina, com domínio de bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Stenotrophomonas* presentes no biofilme, o que infere sobre a participação destes microrganismos durante o processo de biofiltração. A eficiência da biodegradação da microcistina utilizando consórcios microbianos pode representar uma proposta promissora no processo de tratamento de água, principalmente quando as condições adequadas para a biodegradação puderem ser identificadas, e impostas em sistemas de biofiltração.

PALAVRAS-CHAVE: Carvão biologicamente ativado, microcistinas, biofiltração, biodegradação, 16S rRNA.

INTRODUÇÃO

Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos pertencentes ao grupo das hepatotoxinas produzidos por diferentes gêneros de cianobactérias (e.g. *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Planktothrix* e *Nostoc*). A estrutura química desta toxina as tornam extremamente estáveis em águas com o pH próximo da neutralidade, podendo persistirem por meses a anos sob a ausência de luz (Chorus e Bartram, 1999). A potencial toxicidade crônica causada por esta cianotoxina levou a Organização Mundial da Saúde a estabelecer um valor guia de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para microcistina - LR como concentração máxima na água potável (Chorus e Bartram, 1999).

As microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público demonstram características como substância recalcitrante, apresentando tolerância a temperaturas elevadas, resistência a oxidação, e difícil remoção nos processos convencionais utilizados no tratamento de água (pré-cloração, coagulação/sedimentação, filtração e pós-cloração) nas Estações de Tratamento de Água (Saito et al., 2002; Newcombe e Nicholson, 2004). Consequentemente, avanços significativos sobre as tecnologias de tratamento de água nas últimas décadas têm sido providenciadas para solucionar a remoção eficiente destas toxinas de modo a atender as normatizações sanitárias estabelecidas para o consumo de água potável (Newcombe e Nicholson, 2004).

Neste contexto, novas tecnologias em desenvolvimento e readequação daquelas pré-existentes no tratamento de água para remoção de contaminadas na água bruta têm sido apresentadas, a exemplo destaca-se o uso de filtros biologicamente ativados (ambos de carvão ativado granular e areia). O uso destes filtros biológicos tem demonstrado ser promissora na remoção de cianotoxinas em águas naturais, em razão da degradação biológica poder atuar predominantemente no processo de eliminação destas substâncias (Newcombe e Nicholson, 2003; Ho et al., 2006).

Estudos recentes reportam a remoção de microcistinas em filtros de carvão com atividade biológica (CAB) como uma tecnologia promissora entre as existentes disponíveis (Ho et al., 2006; Wang et al., 2007). Em complemento durante o uso deste sistema de biofiltração para o tratamento de água, esta a possibilidade de prolongar o tempo de uso destes filtros, sem a necessidade de regeneração periódica do carvão no leito filtrante, reduzindo a formação de subprodutos da desinfecção (THMs, HAA) e a demanda de cloro na água tratada, em razão do maior consumo da matéria orgânica presente na água bruta (Simpson, 2008).

Entretanto, estas facilidades tornam-se dispendiosas para implantar e manter, com eficiência reduzida sob condições do aumento da carga de carbono decorrentes da elevação da eutrofização dos corpos de água. Os custos no tratamento de água combinados com a sua escassez e aumento da sua demanda de água apresentam um enorme problema no desenvolvimento em regiões onde populações são expostas frequentemente a toxinas de cianobactérias juntamente com outros contaminantes orgânicos e microbiológicos. Consequentemente, assumindo a conhecida susceptibilidade das microcistinas serem biodegradadas por populações naturais de microrganismos de diversos ecossistemas (Jones e Orr, 1994; Cousins et al., 1996; Christoffersen et al., 2002), são crescentes os estudos que exibem a capacidade destes microrganismos em remover efetivamente a total presença destas toxinas (Park et al., 2001; Saito et al., 2003a; Valeria et al., 2006; Manage et al., 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias que aumentem a eficiência do tratamento de água, como a seleção de microrganismos (bactérias) integrantes da camada biológica ou biofilme formado em filtros lento de areia e filtros de carvão, respectivamente, tem demonstrado uma perspectiva promissora na remoção de microcistinas na água durante seu tratamento em uma ETA (Bourne et al., 2006; Tsuji et al., 2006; Wang et al., 2007), além de promover uma disposição segura desta água para o consumo humano (Simpson, 2008).

OBJETIVO

O presente estudo avaliou a remoção da (D-Leu¹) – microcistina – LR utilizando filtros biológicos de carvão. Um objetivo adicional foi confirmar a que a remoção desta toxina foi primariamente associada a ação de biodegradação por microrganismos presentes no biofilme formado nos filtros de carvão, e a identificação filogenética destes microrganismos associados na degradação desta toxina.

MATERIAIS E MÉTODOS

DELINEAMENTO DO ENSAIO

Este estudo foi realizado em condições controladas de laboratório, sendo dividido em três etapas experimentais distintas: 1) uma envolvendo a remoção de microcistina e matéria orgânica utilizando filtros de carvão colonizados (CAB) e não colonizados por microrganismos (CAG); 2) uma avaliando a capacidade dos microrganismos presentes no efluente dos filtros CAB em degradarem a microcistina testada; 3) e finalmente a caracterização filogenética microrganismos presentes no biofilme dos filtros CAB que poderiam estar associados na degradação da cianotoxina utilizada no experimento

Etapa 1-

A cianotoxina (D-Leu¹) - microcistina - LR utilizados no estudo foi obtida a partir da concentração de culturas de *Microcystis* spp mantidas em laboratório. Cultivos massivos dessa cianobactéria foram produzidos em caixas plásticas transparentes (10 L), em meio de cultivo ASM-1, com temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo (12 horas luz) e intensidade luminosa ($107 \mu\text{E.m}^{-1}$) controlados. Ao final da fase de crescimento exponencial desta cultura (4 semanas), e com densidade da ordem de 10^6 cel/mL, estas foram recolhidas para a obtenção de extratos da cianotoxina microcistina. O cultivo massivo da cianobactéria foi liofilizado e diluído em solução de metanol 75% (v/v) por 18 horas, no escuro, a 4 °C. A solução obtida foi centrifugada (3500 rpm por 10 minutos), e sobrenadante recolhido e submetido ao processo de separação do metanol em um evaporador rotativo (80 rpm – 42 °C), sendo ao final obtido um concentrado contendo um semi-purificado de (D-Leu¹) - microcistina - LR que foi utilizada nos ensaios.

A água de estudo utilizada nos ensaios de laboratório (filtração com carvão ativado biologicamente e de biodegradação de microcistina) foi coletada no reservatório do Ipê, localizado na cidade de Ilha Solteira, região noroeste do Estado de São Paulo (Brasil), e imediatamente filtrada em membrana de celulose (1,0 μm) para remoção de material particulado. Esta água apresentou seu pH próxima da neutralidade (7,01 a 7,20) durante todo o período em que foi coletada para os ensaios de laboratório. O carvão ativado granular utilizado nos ensaios de biofiltração foi obtido do leito de filtros de uma Instalação Piloto de Tratamento de Água de Filtração em Múltiplas Etapas, sendo este de carvão de origem vegetal (casca de coco), com grânulos de tamanho de 0,35 a 0,50 mm.

Preparo dos filtros de carvão com atividade biológica em laboratório

Para os ensaios de bancada foram utilizados quatro filtros de carvão com atividade biológica (CAB), colonizados em condições de laboratório. Estes filtros constituem-se de seringas de vidro (borossilicato) de 10 cm, com diâmetro interno de 1,2 cm, preenchidos com 3,5 gramas de carvão. A colonização do carvão destes filtros por microrganismos foi induzida por meio de sua exposição a água natural provida de reservatório Ipê durante um período de 5 meses em laboratório. O controle foi representado por quatro filtros semelhantes com carvão ativado granular (CAG) não colonizados, os quais foram alimentados com a mesma água bruta suplementada com azida de sódio (6 mM). A atividade biológica dos filtros CAB foi estimada pela determinação da taxa do consumo do oxigênio, em comparação com o controle.

Água de estudo utilizada nos ensaios de biofiltração com microcistina

A água de estudo utilizada no experimento de biofiltração foi a mesma requerida na ativação biológica dos filtros de carvão. Contudo esta água após filtrada em uma membrana de celulose (1,0 μm), foi esterilizada (121 °C por 15 minutos), recebendo ao final um extrato celular de *Microcystis* spp, de modo obter uma concentração final de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de (D-Leu¹) - microcistina - LR.

Remoção de microcistina e do carbono orgânico dissolvido nos filtros CAB

Nos ensaios, foram utilizados quatro filtros colonizados (CAB) e quatro filtros não colonizados (CAG) por microrganismos, os quais foram expostos em uma água natural utilizada na ativação biológica dos filtros de carvão, contendo a cianotoxina, sendo seu preparo e trocas realizadas semanalmente. Esta etapa foi realizada no escuro, a 25 ± 2 °C, sendo a água bombeada nos filtros com fluxo contínuo utilizando uma bomba peristáltica multicanaís (ISMATEC RS 232 IN). O tempo de detenção hidráulica da água nos filtros foi de 13 minutos (vazão = $0,3 \text{ mL min}^{-1}$). Para prevenir a colonização dos filtros CAG por microrganismos, foi

adicionada à água de estudo uma solução de azida de sódio (6 mM). O experimento foi realizado durante de 120 dias, sendo recolhidas amostras (200 mL) afluente e efluente dos filtros semanalmente, para leituras do pH (DIGIMED DM 20), determinação das concentrações de microcistina (HPLC - Prominence, Shimadzu), e níveis de carbono orgânico dissolvido (TOC 5000-A, Shimadzu).

Etapa 2

Delineamento dos ensaios de biodegradação de microcistina

Foram realizados dois ensaios para avaliar a biodegradação da cianotoxina (D-Leu¹) - microcistina - LR, o qual cada um diferenciou a composição de elementos nutrientes utilizados na água de estudo. O meio inóculo contendo os microrganismos utilizados para os ensaios foi coletado em frascos estéreis da noite para o dia do efluente dos filtros CAB dos experimentos de biofiltração.

Ensaio 1

Para o ensaio foi utilizada a mesma água de estudo do experimento de biofiltração, sendo esta água filtrada em membrana de celulose (1,0 µm), esterilizada (120 °C por 15 min), recebendo juntamente com a (D-Leu¹) - microcistina - LR (c.a. 20 µg L⁻¹), a adição de um meio de cultura composto por glicose (90 µg L⁻¹), extrato de levedura (100 µg L⁻¹), peptona (100 µg L⁻¹), e acetato de sódio tri-hidratado (70 µg L⁻¹). Foi inoculado na água de estudo o efluente dos filtros CAB a 10% (v/v). O experimento foi realizado em galão de vidro, com volume útil de 4 L, em duplicata. O tratamento controle do ensaio também foi realizado em galão de vidro, com volume útil de 4 L, em duplicata, mantido nas mesmas condições apresentadas anteriormente, mas sem receber o inóculo com efluente dos filtros CAB. Este experimento foi realizado no escuro, com agitação orbital (100 rpm) e temperatura controlada (25 ± 2 °C) durante 84 dias.

Ensaio 2

Neste experimento foram reproduzidas as mesmas condições do ensaio 1, no entanto, a água de estudo foi desprovida da adição do meio de cultura. Para água de estudo contendo a (D-Leu¹) - microcistina - LR (c.a. 20 µg L⁻¹) foi inoculado o efluente dos filtros CAB a 10% (v/v). O experimento foi realizado em galão de vidro, com volume útil de 4 L, em duplicata. O tratamento controle do ensaio também foi realizado em galão de vidro, com volume útil de 4 L, em duplicata, mantido nas mesmas condições apresentadas anteriormente, mas sem receber o inóculo com efluente dos filtros CAB. Este experimento foi realizado no escuro, com agitação orbital (100 rpm) e temperatura controlada (25 ± 2 °C) durante 84 dias.

No início de cada um dos ensaios realizados foi coletada uma amostra (200 mL) de cada um dos tratamentos (tempo zero), seguida por coletas consecutivas semanais, para leitura do pH (DIGIMED DM 20) e determinação das concentrações de microcistina (HPLC- Prominence, Shimadzu).

Etapa 3

Isolamento e caracterização filogenética dos microrganismos nos filtros CAB

Os microrganismos presentes nos filtros CAB foram submetidos ao processo de isolamento e caracterização filogenética, por meio da retirada de um volume (1 mL) de amostra na superfície e interior dos filtros CAB. O material recolhido foi homogeneizado, sendo retirada uma alíquota (200 µL), que foi transferido para placas de Petri contendo a microcistina (20 µg L⁻¹) e um meio nutriente, composto por extrato de carne (3 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹) e agar (15 g L⁻¹). O líquido foi distribuído com o auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, no escuro. As colônias isoladas foram obtidas por meio de sucessivos plaqueamentos por esgotamento em estrias. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio, mantidos inclinados, contendo o agar nutriente. Essas colônias foram mantidas em refrigeração a 5 °C. Para cada colônia isolada foram observadas características morfológicas, coloração diferencial de Gram, e verificação da formação de esporos utilizando corante verde de malaquita, de modo a obter informações dos possíveis grupos microbianos presentes nos filtros, sendo posteriormente realizadas produções massivas de cada isolado, obtido para extração do DNA, para sua identificação filogenética.

Extração de DNA dos isolados e amplificação do gene 16S rRNA

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando o *Kit FastDNA® SPIN Kit for Soil* (BIO 101-Quantum Biotechnologies), seguindo as instruções do fabricante. O material genético foi usado na amplificação, por PCR, do gene 16S rRNA. Na reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores fd1 (posição 8 – 27) e rD1 (posição 1524 - 1540) do gene 16S rRNA em *Escherichia coli* estirpe K12, de acordo com Weisburg et al. (1991) e as condições acrescidas de modificações: Tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 200 µM de cada dntp, 2 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq Polimerase, 5 pmols de cada iniciador, 35 ng de DNA e água ultra pura completando o volume final de 50 µL na reação. Para isso, foi utilizado um termociclador (MJ Research Inc., modelo PTC – 200) ajustado com programação de: 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 50 seg, 72°C por 2 min e 72°C por 5 min. Os *amplicons* gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 mg mL⁻¹ de brometo de etídeo, tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3) e visualizado em um fotodocumentador (Gel Doc 1000) com luz UV (Bio Rad, USA). Os produtos de PCR do gene 16S rRNA foram seqüenciados usando 0,5 µL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 5 pmols do oligonucleotídeo iniciador fd1; 150 ng de DNA em um volume final de 10 µL. As condições no termociclador foram: 2 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 15 seg, 60°C por 2 min. Os *amplicons* foram seqüenciados em um seqüenciador de capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análises das seqüências

As seqüências foram analisadas com o auxílio do programa *Sequencing Analysis* 3.4 e pelo programa Phred/Phrap (Ewing et al.,1998; Ewing e Green, 1998) e comparadas com o banco de dados de genes ribossomais *Ribosomal Database Project II* (RDP II), através do programa *Classifier*. Em seguida, estas foram alinhadas usando o programa ClustalX 1.83 (Thompson et al.,1997). A árvore filogenética foi construída com o auxílio do programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) usando o algoritmo do vizinho mais próximo *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) e o modelo de substituição de nucleotídeo Kimura 2-P (Kimura, 1980). Todas as seqüências do gene 16S rRNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (*GenBank*) e encontram-se disponíveis com os números de acesso FJ848773 à FJ848782.

Quantificação de microcistina dos ensaios biofiltração e biodegradação

Cada amostra contendo (D-Leu¹) - microcistina - LR foi analisada e processada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence, Shimadzu), equipado com detector "Photodiode Array" (SPD-M20A), com duas bombas de alta pressão (LC-20AT e LC 20AD), em coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack) com 4,6 x 150 mm e diâmetro de partícula de 5 µm, segundo Meriluoto e Spoof (2005). A fase móvel foi constituída por dois componentes, uma com água Milli-Q e a outra por acetonitrila ambas acidificadas com 0,05% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA). Foi utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, com tempo de corrida cromatográfica de 12 minutos para cada amostra analisada em triplicatas. A microcistina foi identificada por meio do seu tempo de retenção e características de seu espectro UV (238 nm), juntamente com auxílio de um padrão comercial externo de calibração de (D-Leu¹) - microcistina - LR, com 99 % de pureza.

Tratamento estatístico dos dados obtidos

Os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise estatística com o teste de Tukey (p<0,05) utilizando o *software Origin 7.5*.

Remoção de microcistina nos filtros biológicos de carvão

Os resultados exibiram a remoção da (D-Leu¹) - microcistina - LR no efluente dos filtros CAB durante todo o período avaliado, sendo os valores registrados próximos aos encontrados no efluente dos filtros CAG (Figura 1a). Embora os filtros colonizados tenham apresentado um maior percentual de remoção (97%) de microcistinas em relação aos filtros não colonizados (92%), não foi verificada uma diferença significativa (p<0,05) na remoção da cianotoxina entre ambos os filtros testados. Pode-se constatar que os filtros testados apresentaram um padrão semelhante na remoção de microcistina, com uma redução gradativa temporal nos percentuais de sua remoção no ensaio (Figura 1b). O declínio temporal na remoção da microcistinas entre os filtros CAB e CAG, provavelmente poderia estar associada à presença da matéria orgânica natural (MON) na

água de estudo, refletindo diretamente no decréscimo da remoção da microcistina entre os filtros testados. Alguns autores apontam a redução na capacidade de adsorção do carvão para microcistinas decorrente do efeito competitivo da cianotoxina com a MON na água e também a matéria orgânica pré-adsorvida no carvão ativado (Lambert et al., 1996; Huang et al., 2007). Um estudo realizado por Newcombe e Nicholson (2004) em uma instalação piloto de tratamento de água constataram que a presença de carbono orgânico dissolvido (5 mg L^{-1}) promoveram competição entre os sítios de adsorção no carvão, reduzindo sua capacidade em remover microcistinas. Considerando que a água utilizada no estudo continha juntamente com a microcistina outros componentes orgânicos (MON), é provável que tenha ocorrido uma competição entre a toxina e a MON pelos sítios de adsorção do carvão, o que resultou na redução gradativa na capacidade adsorviva da cianotoxina testada.

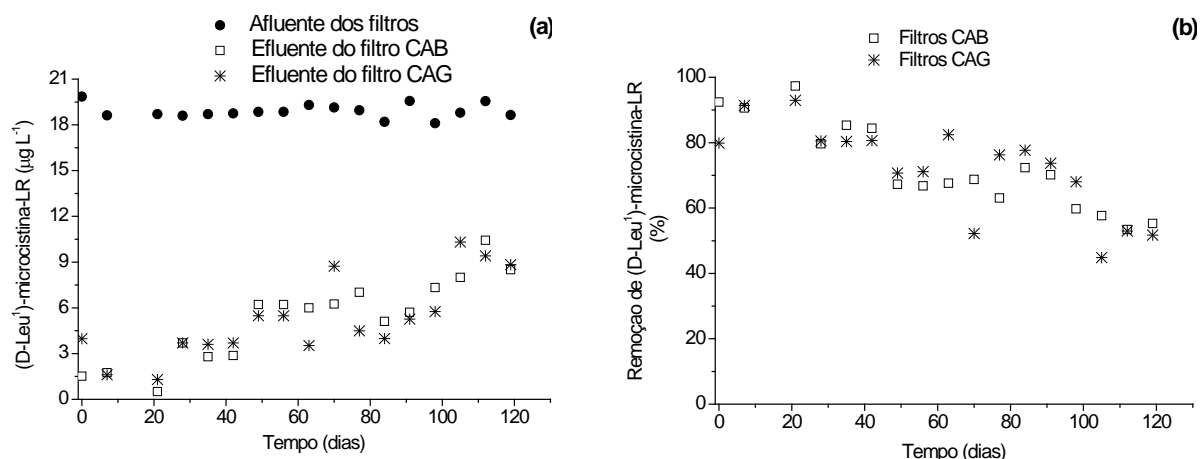


Figura 1. Remoção de (D-Leu¹) – microcistina - LR (a) e níveis percentuais (b) entre os filtros testados.

Remoção do COD nos filtros de carvão

Os resultados da remoção do carbono orgânico dissolvido demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre seus valores retidos no conjunto destes filtros testados. Os filtros CAB apresentaram os menores valores, em média, do COD no efluente final em relação aos filtros CAG (Figura 2a). Os filtros CAB apresentaram os maiores percentuais de remoção do carbono, com uma significativa ($p < 0,05$) diferença nos valores de remoção do COD em relação aos filtros CAG. Os percentuais médios de remoção do COD nos filtros CAB foram de 38%, enquanto que os filtros CAG obtiveram níveis médios de 15% de remoção (Figura 2b). Esta maior remoção do COD nos filtros CAB poderia estar diretamente associada à atividade biológica dos microrganismos presentes no biofilme, como resultado dos processos de biosorção e biodegradação da microcistina e outros componentes orgânicos na água. Os valores médios de oxigênio dissolvido registrados nos efluentes dos filtros CAB (dados não apresentados) foram aqueles que demonstraram as menores concentrações (média de $5,22 \text{ mg L}^{-1}$) em relação aos filtros CAG (média de $6,20 \text{ mg L}^{-1}$), o que corrobora para o efeito do consumo da microcistina e matéria orgânica natural na água pelos microrganismos no biofilme.

Os sistemas convencionais de tratamento da água apresentam dificuldades na remoção de matéria orgânica, e poluentes químicos orgânicos e sintéticos. A eficiência na remoção de matéria orgânica natural para a maioria dos sistemas convencionais de tratamento da água pode girar em torno de 30 % (Randtke, 1988; Simposon, 2008). Os resultados do presente estudo demonstraram que os filtros CAB obtiveram percentuais expressivos na remoção do COD, com valor máximo de 58%, contra 30% encontrados nos filtros CAG. O desempenho observado no presente estudo contrasta aos descritos por Wang et al (2007), em que o biofilme formado em filtros CAG foram incapazes de remover eficientemente o COD presente na água afluentes utilizada.

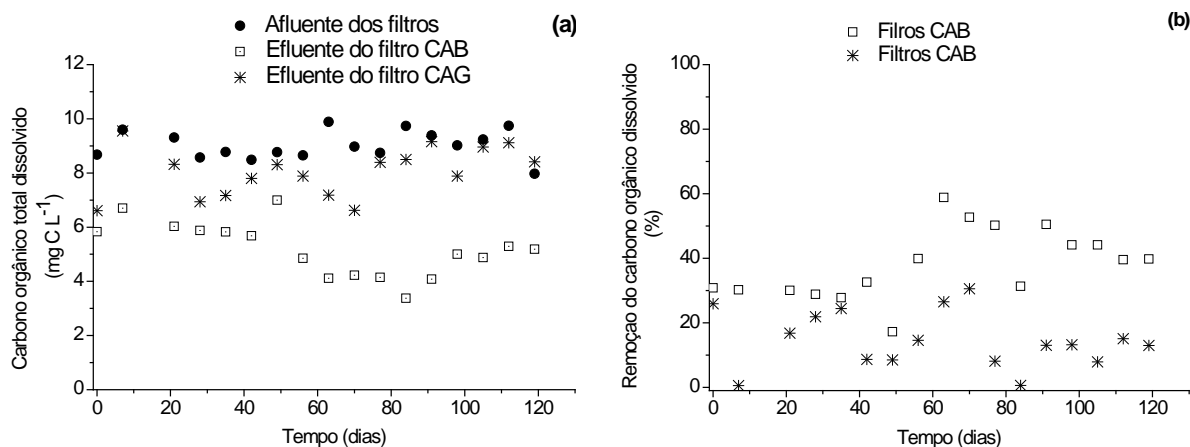


Figura 2. Remoção do carbono orgânico total dissolvido (a) e níveis percentuais (b) entre os filtros testados.

O pH medido das amostras afluente e efluente dos filtros CAB e CAG apresentou seus valores próximos da neutralidade no início do experimento, variando de 7,01 a 7,20. Contudo, o pH do efluente dos filtros CAB após a terceira semana de experimento apresentou declínio em seus valores (entre 6,50 e 6,69), mantendo-se abaixo dos níveis registrados nas amostras efluentes dos filtros CAG (entre 7,05 e 7,19). Esta tendência na redução do pH no efluente dos filtros colonizados apresentou um padrão semelhante ao reportado por Sobecka et al. (2006) em ensaios de laboratório com biofiltros de carvão. Uma possível explicação para o decréscimo nos valores de pH nos efluente dos filtros biológicos estaria associado à intensa atividade biológica promovida por microrganismos aderidos nas paredes dos filtros, que durante seu crescimento e metabolização dos compostos orgânicos estariam produzindo e liberando substâncias acidificadas para o meio (Caldwell et al., 1992).

Biodegradação de (D-Leu¹) - microcistina – LR

Os resultados demonstraram que houve a biodegradação da microcistina nos tratamentos contendo microrganismos do efluente dos filtros CAB. Pode-se verificar que os ensaios apresentaram um comportamento semelhante na degradação da microcistina. Contudo o ensaio 1, foi observado um rápido declínio da cianotoxina nas duas primeiras semanas, com uma redução aproximada de 70% do valor inicial, seguido por diminuição na taxa em seu consumo nas semanas seguintes. A partir da oitava semana de experimento, os níveis de microcistinas apresentaram suas concentrações próximos ou abaixo do limite de detecção (<0,07 µg L⁻¹), o que pode ser considerada como parcialmente consumida (Figura 3a). O ensaio 2 apresentou uma reduzida de degradação de microcistina durante o primeiro mês de experimento, com apenas 20% de consumo em relação ao valor inicial. Posteriormente, foi observada uma elevada degradação da cianotoxina nas semanas seguintes, atingindo valores não detectáveis com sétima semana de experimento (Figura 3b). A degradação natural da microcistina durante os experimentos foi reduzida (< 19%), o que corrobora para o efeito de metabolização da cianotoxina pelos microrganismos presentes no meio.

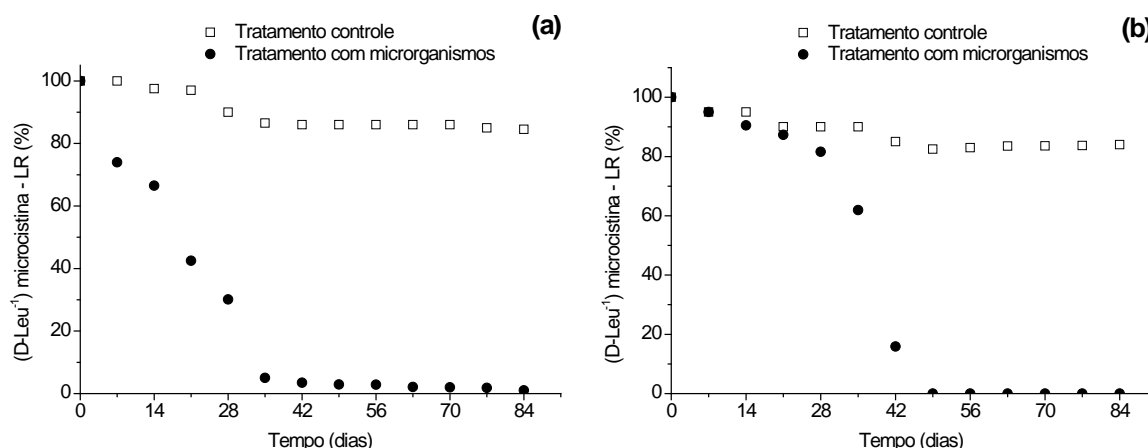


Figura 3. Degradação de (D-Leu¹) - microcistina - LR entre os tratamentos dos ensaios 1 (a) e 2 (b) testados durante o estudo.

A diferença temporal encontrada na degradação de microcistina entre os tratamentos avaliados possivelmente esteve associada à presença de outras fontes carbono na água de estudo utilizada, o que influenciou a biodegradação da toxina pelos microrganismos. O uso de um meio experimental no ensaio 1 contendo suplementos orgânicos juntamente com o extrato de microcistina, pode ter propiciado uma maior diversidade de fontes de alimentos a serem consumidos pelos microrganismos, o que refletiu em uma menor taxa de biodegradação da toxina no meio. Diferentemente no ensaio 2, houve uma menor disponibilidade de elementos nutrientes no meio experimental de estudo, a qual dispôs apenas dos elementos orgânicos naturalmente presentes na água coletada no reservatório de água, sem a presença de suplementos nutricionais adicionais. Com a ausência de fontes extras de carbono é provável que os microrganismos, presentes no meio, optassem preferencialmente pelo consumo daqueles elementos orgânicos presentes na água, sendo essas fontes primárias de carbono e energia, de fácil quebra de suas moléculas. Com o rápido declínio dos elementos nutricionais no meio, os microrganismos passaram a utilizar as microcistinas como uma fonte secundária de carbono e energia, o que proporcionou sua degradação em um menor período de tempo. Uma situação semelhante foi observada por Park et al. (2001), quando verificaram um tempo de degradação de microcistina quatro vezes superior em um meio suporte contendo a cianotoxina e nutrientes inorgânicos, quando comparado com um meio experimental contendo a toxina e nutrientes orgânicos.

Os resultados encontrados estabelecem a hipótese que as microcistinas, quando presente sob a forma exclusivamente purificadas, poderiam ser mais rapidamente consumidas pelos microrganismos, do que sob a forma de extratos semi-purificados, extraídas de culturas ou de florações naturais de cianobactérias. Esse fato decorre da presença de elementos orgânicos associados, não levando em conta as diferenças estruturais nas variantes de microcistinas testadas, que representam uma fonte de carbono e energia para esses microrganismos. Um estudo recente, realizado por Lemes et al. (2008), constatou que o uso de microcistinas purificadas em ensaios de biodegradação, foi um fator que condicionou seu rápido consumo por microrganismos isolados do ambiente natural. Estes autores inferem que uma população bacteriana quando exposta apenas à presença de um composto recalcitrante (microcistinas) irão promover sua decomposição de forma rápida, provavelmente em resposta à reduzida carência de outras fontes de alimento (Lemes et al., 2008).

Caracterização das bactérias que participam na biodegradação de microcistina

A partir do material isolado dos filtros CAB e cultivado segundo os métodos microbiológicos tradicionais, foram obtidas 10 amostras, sendo estas representadas em sua totalidade por colônias bacterianas integrantes do grupo das gram-positivas (80%), com ausência de esporos (80%), representadas por formas cocóides (60%) e em bastonetes curtos (40%). Conforme descrito na tabela 1 e figura 4, foram identificados as seqüências do gene 16S rRNA amplificado a partir do DNA das amostras isoladas um total de 4 gêneros (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Stenotrophomonas*), sendo que em 2 amostras foi possível uma classificação somente a nível de família (Burkholderiaceae e Oxalobacteraceae).

Tabela 1. Caracterização dos isolados obtidos dos filtros biológicos de carvão com destaque aos gêneros (a) e famílias (b) encontrados e disponibilizados no *GeneBank*.

Isolado	Gêneros (a) e família (b) de bactérias identificadas	Numero de acesso
T1	Oxalobacteraceae ^b	FJ848773
T2	<i>Acinetobacter</i> ^a	FJ848774
T3	<i>Pseudomonas</i> ^a	FJ848775
T4	<i>Cupriavidus</i> ^a	FJ848776
T5	Burkholderiaceae ^b	FJ848777
T6	Oxalobacteraceae ^b	FJ848778
T7	<i>Cupriavidus</i> ^a	FJ848779
T8	<i>Pseudomonas</i> ^a	FJ848780
T9	<i>Stenotrophomonas</i> ^a	FJ848781
T10	<i>Acinetobacter</i> ^a	FJ848782

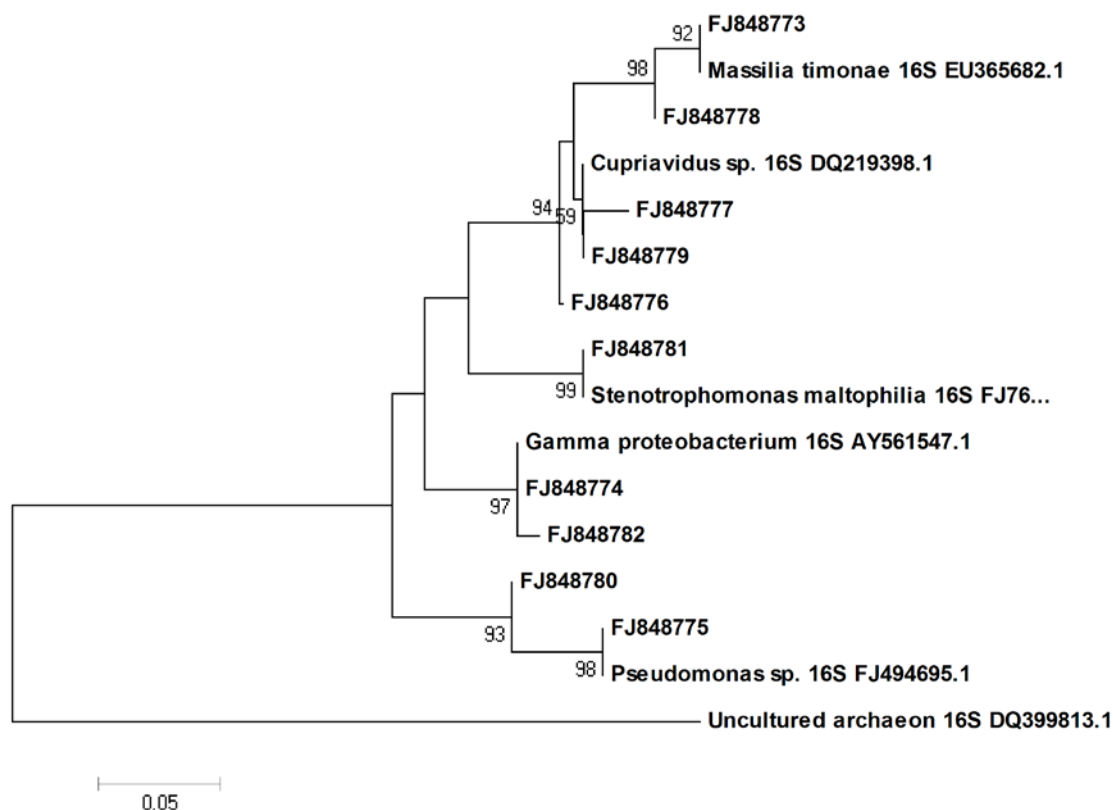


Figura 4. Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S rRNA do consórcio, gerada pelo programa MEGA versão 4. A matriz de distância foi calculada pelo algoritmo “Neighbor-Joining” e o método de substituição de nucleotídeos “Kimura 2-P”, com “bootstrap” de 1000 repetições.

Potencial de degradação de microcistinas por bactérias

A presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* e representantes da família Burkholderiaceae nos isolados cultivados dos filtros CAB evidencia o potencial desses microrganismos em biodegradarem microcistinas, tendo em vista trabalhos na literatura que reportam esta capacidade (Takenaka e Watanabe, 1997; Lemes *et al.*, 2008). Alguns estudos destacam os gêneros *Pseudomonas* e *Sphingomonas* como um dos poucos capazes em degradar microcistinas em águas naturais em condições aeróbicas (Bourne *et al.*, 1996; Takenaka e Watanabe, 1997; Saito *et al.*, 2003b). Contudo, trabalhos recentes têm demonstrado uma eficiente remoção de microcistinas em filtros biológicos de carvão e areia, quando inoculados com linhagens específicas de *Sphingomonas* no sistema filtrante (Bourne *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). A ocorrência de representantes da família Burkholderiaceae nas amostras analisadas representa um grupo potencialmente capaz de participar diretamente no consumo de microcistinas, visto que, trabalhos realizados com uma linhagem do gênero

Burkholderia, isolado do ambiente natural, reportam sobre sua ampla capacidade de degradar eficientemente microcistinas em condições controladas de laboratório (Lemes et al., 2007).

Influência dos valores de pH durante os ensaios de degradação de microcistinas

Os valores de pH observados nos ensaios realizados ficaram ligeiramente acima da neutralidade, com valores médios entre 7,55 e 7,28 nos ensaios 1 e 2, respectivamente. De modo geral não foram constatadas diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) nos valores registrados entre os tratamentos controle e com microrganismos, para cada um dos ensaios realizados. De acordo com Saito et al. (2003a) a elevada estabilidade e persistência das cianotoxinas nos ambientes aquáticos assim como em água potável, podem estar relacionadas com a alcalinidade do meio. O fato dos valores de pH nos ensaios 1 e 2 terem-se apresentados ligeiramente alcalinos pode ter potencializado uma redução na capacidade de degradação da microcistina pelos microrganismos nos tratamentos. Saito et al. (2003b) evidenciaram a redução no processo de biodegradação de microcistinas por bactérias (*Sphingomonas*) na presença de um pH alcalino, o que, segundo os autores, poderia estar promovendo um efeito repressor enzimático no processo de degradação da cianotoxina.

Efeito da temperatura dos ensaios de degradação de microcistinas

A temperatura utilizada durante os ensaios pode ser considerada um outro fator importante na biodegradação da microcistina. Trabalhos realizados por Park et al. (2001) e Wang et al. (2007) demonstram que a taxa de degradação de microcistinas quando expostas à bactérias estão diretamente condicionadas a temperatura de incubação do meio, do que simplesmente às características inerentes das bactérias quando testadas isoladamente. Estes autores verificaram que valores elevados de temperatura (22 a 30 °C) do meio apresentaram uma maior degradação de microcistinas, quando comparadas a valores menores (5 °C). Durante o estudo a temperatura utilizada nos tratamentos foi próxima aos valores considerados como ideais aos reportados por Park et al. (2001) e Wang et al. (2007), o que corrobora à elevada degradação da cianotoxina no conjunto dos ensaios realizados. Contudo, deve ser ressaltada que valores extremos de temperaturas podem interferir no consumo de microcistinas por microrganismos, em decorrência de um efeito direto sobre redução metabólica ou inativação dos microrganismos responsáveis pela biodegradação da cianotoxina (Wang et al., 2007).

Potencial de degradação de microcistinas por bactérias

A presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* e representantes da família Burkholderiaceae nos isolados cultivados dos filtros CAB evidencia o potencial desses microrganismos em biodegradarem microcistinas, tendo em vista trabalhos na literatura que reportam esta capacidade (Takenaka e Watanabe, 1997; Lemes et al., 2008). Alguns estudos destacam os gêneros *Pseudomonas* e *Sphingomonas* como um dos poucos capazes em degradar microcistinas em águas naturais em condições aeróbicas (Bourne et al., 1996; Takenaka e Watanabe, 1997; Saitou et al., 2003b). Contudo, trabalhos recentes têm demonstrado uma eficiente remoção de microcistinas em filtros biológicos de carvão e areia, quando inoculados com linhagens específicas de *Sphingomonas* no sistema filtrante (Bourne et al., 2006; Wang et al., 2007). A ocorrência de representantes da família Burkholderiaceae nas amostras analisadas representa um grupo potencialmente capaz de participar diretamente no consumo de microcistinas, visto que, trabalhos realizados com uma linhagem do gênero *Burkholderia*, isolado do ambiente natural, reportam sobre sua ampla capacidade de degradar eficientemente microcistinas em condições controladas de laboratório (Lemes et al., 2007).

A capacidade de biodegradação de microcistinas por bactérias esta normalmente associada ao fato dos microrganismos estarem condicionados à presença freqüente das toxinas. Christofersen (2002) demonstrou que bactérias heterotróficas de ocorrência natural podem degradar microcistinas quando a comunidade bacteriana está exposta à presença periódica da cianotoxina em seu habitat. Bourne et al. (2006) reportaram uma expressiva remoção (até 80%) da microcistina - LR após a inoculação de uma linhagem de *Sphingomonas* (ACM 3962), obtida em um lago eutrofizado, no reservatório de água de filtros de areia. Um estudo realizado por Eleutério (2007) destacou a presença de *Morganella morganii* em filtros biológicos de areia como uma das principais bactérias responsáveis na degradação de microcistinas. Este mesmo autor comenta sobre a importância de estudos direcionados sobre linhagens de bactérias de ocorrência natural em mananciais de abastecimento superficial, e em outros ambientes, como uma possível base às pesquisas sobre remoção de cianotoxinas no tratamento da água via processos de biodegradação (Eleutério, 2007). Consequentemente, novos estudos tem sido direcionados na busca e seleção de linhagens específicas de microrganismos capazes de

degradarem cianotoxinas em ETAs. Exemplos claros dessa tendência de estudos são trabalhos realizados por Meriluoto et al. (2005) e Nybom et al. (2008) na seleção e o uso de bactérias com propriedades benéficas à saúde (*Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium lactis*) com capacidade de remover microcistinas do meio por propriedades de adsorção, como uma possível base para tecnologia de tratamento de água.

O presente estudo demonstra claramente que alguns gêneros de bactérias participaram ativamente e de forma conjunta na degradação da microcistina. Na ordem de elucidar a degradação microbiológica da microcistina nos tratamentos avaliados, devemos focar a importância da atividade sinérgica dos microrganismos formadores da microflora no biofilme dos filtros de carvão como agentes da metabolização deste composto. Podemos inferir que a degradação completa da microcistina nos ensaios foi reduzida quando comparada com pesquisas centradas sobre apenas poucas bactérias como *Shingomonas*, *Pseudomonas*, *Paucibacter* sp. e *Sphingosinicella* sp., no entanto fica claramente demonstrado o potencial da grande variedade de gêneros de bactérias que podem degradar esta toxina, como já tem sido demonstrada em outros estudos (Maruyama et al., 2006; Manage et al., 2009).

Uso de microrganismos como agentes de biodegradação de microcistinas

Os resultados apontaram para duas taxas distintas de biodegradação das microcistinas nos ensaios realizados, uma com $0,23 \mu\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (ensaio 1) e outra ligeiramente maior, com $0,40 \mu\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (ensaio 3). As diferenças observadas entre os resultados dos ensaios sustentam a premissa de que a presença de fontes extras de carbono disponíveis poderia ter representado o fator crucial que atenuou as taxas de biodegradação das microcistinas, como observado no ensaio 1. Contudo, alguns trabalhos destacam que a presença de microrganismos em elevadas concentrações no biofilme em um filtro biológico de carvão ou areia não irá determinar efetivamente expressivas taxas de remoção de microcistinas durante o tratamento de água (Wang et al., 2007; Ho et al., 2006). Normalmente as microcistinas, quando presentes em águas naturais, são biodegradadas por microrganismos inerentes destes ambientes, embora o processo ocorra lentamente, podendo requerer um período de adaptação (Jones e Orr, 1994; Christoffersen et al., 2002). Em ambientes em que a presença de microcistinas é frequente, a sua degradação pelos microrganismos ocorre sem a necessidade de um período *Lag* para adaptação em seu consumo (Christoffersen et al., 2002). A este aspecto é reforçada a tese de que uma elevada degradação da microcistina poderia estar intrinsecamente dependente do tipo de microrganismos (bactérias) e sua capacidade em responder na produção de enzimas capazes de degradar essas toxinas em condições ambientais (Ho et al., 2006).

O potencial de biodegradação das microcistinas por bactérias normalmente é atribuído à capacidade natural de síntese de enzimas específicas produzidas por estes microrganismos (Bourne et al., 1996, 2001; Saito et al., 2003a; Ho et al., 2007). Segundo Bourne et al. (2001) a quebra da ligação peptídica das microcistinas requerem proteases com estruturas específicas, pois essas cianotoxinas apresentam estabilidade contra várias proteases, tripsina, quimiotripsina, elastase, trombina, papaína, collagenase, carboxipeptidase e pepsina (Saito, 2003). Trabalhos realizados com uma linhagem específica de *Sphingomonas* (ACM – 3962) constataram a presença de cluster de genes A, B, C e D que codificam enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica em regiões da molécula de microcistina, principalmente nos aminoácidos Adda-Arginina (Bourne et al., 2001). Presença do gene *mlrA* (microcistinase) que é uma metaloprotease é considerada a enzima mais importante do mecanismo de metabolização de microcistina, pois a estrutura cíclica promove estabilidade contra outras proteases e outros fatores químicos (Bourne et al., 1996; 2001).

Deve ser destacada a possível presença de linhagens de bactérias que eventualmente não se desenvolveram nas placas de cultivo, mas que poderiam atuar no consumo das microcistinas de forma direta ou, em consórcios microbianos formados no microecossistema do biofilme no filtro biológico de carvão. Desta forma, torna-se imprescindível a realização de uma varredura da diversidade microbiana presente no biofilme dos filtros biológicos de carvão, o que auxiliaria na verificação da presença de grupos bacterianos que estariam atuando conjuntamente na metabolização das cianotoxinas utilizadas no estudo.

CONCLUSÕES

Sobre as condições empregadas no presente estudo, verificou-se que filtração biológica foi um fator que favoreceu o efetivo processo de remoção da microcistina. Os níveis de remoção do carbono orgânico dissolvido por estes filtros biológicos demonstraram um desempenho considerável sobre este parâmetro considerado. O

sucesso dos microrganismos presentes no leito filtrante dos filtros biológicos de carvão em permanecerem nas condições semi-naturais e degradarem as concentrações de microcistinas promovem um encorajamento para o uso destas bactérias para amplas aplicações de biorremediação. Como uma opção do tratamento de água, a inoculação com populações de bactérias com melhor desempenho poderia promover uma rápida degradação inicial da microcistina, diminuindo a fase de aclimação e permitindo que a água bruta retorne para o abastecimento mais rapidamente. A completa degradação da toxina de cianobactéria por bactérias presentes no biofilme dos filtros biológicos de carvão demonstra a efetividade de uma infraestrutura tecnologia barata o qual o mecanismo de custo efetivo resguarda uma distribuição de água potável sem riscos.

Futuros estudos devem elucidar os genes envolvidos na síntese de enzimas produzidas pelas bactérias presentes nos filtros biológicos avaliados, possibilitando estabelecer a trajetória encarregada de degradação desta toxina. A análise no seqüenciamento dos genes dos isolados bacterianos obtidos no presente estudo, pode confirmar de forma precisa, a presença dos genes que manifestam potencial em degradação efetiva das microcistinas. Conjuntamente, a possibilidade de isolamento e uso das linhagens das bactérias com potencial em degradarem as cianotoxinas, representa uma base tecnológica a ser consolidada em trabalhos direcionados no uso destes microrganismos no tratamento biológico de águas contaminadas por estas toxinas. As investigações incluem a aplicabilidade das espécies de larga escala de uso no tratamento de água, principalmente quando as condições adequadas para a biodegradação puderem ser identificadas, e impostas sobre os filtros biológicos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (*Processo nº: 06/53502-0*) pela bolsa concedida e o financiamento do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BOURNE, D.G.; JONES, G.J.; BLAKELEY, R.L.; JONES, A.; NEGRI, A.P.; RIDDLES, P. Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR. *App. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 11, p. 4086–4094, 1996.
- 2- BOURNE, D.G.; RIDDLES, P.; JONES, G.J.; SMITH, W.; BLAKELEY, R.L. Characterisation of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin LR. *Environ. Toxicol.*, v. 16, p. 523–534, 2001.
- 3- BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R. L.; RIDDLES, P.; JONES, G.J. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Wat. Res.*, v. 40, p.1294–1302, 2006.
- 4- CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Inc. New York, 416p, 1999.
- 5- CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* v. 27, p.125 -136, 2002.
- 6- ELEUTERIO, L. Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by biofiltration: identification of toxin-degrading bacterial and effects of backwashing. Tese (Doutorado), Universidade de Nevada, Las Vegas, USA. 237p, 2007.
- 7- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, *Genome Res.* v. 8, p.186–194, 1998.
- 8- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, *Genome Res.* 8:175–185, 1998.
- 9- HO, L.; MEYN, T.; KEEGAN, A.; HOEFEL, D.; BROOKES, J.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G. Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Wat. Res.* v. 40, p, 768–774, 2006.
- 10- HO, L.; GAUDIEUX, A.L.; FANOK, S.; NEWCOMBE, G.; HUMPAGE, A. R. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. *Toxicon*, v. 50, p. 438–441, 2007.
- 11- JONES, G.J.; BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* v. 2, p. 228–235, 1994.
- 12- JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.* v. 28, n. 4, p. 871–876, 1994.

- 13-KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* v. 6, p. 111-120, 1980.
- 14-JONES, G.J.; BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* n. 2, p. 228-235, 1994.
- 15-JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.*, v. 28, n. 4, p. 871-876, 1994.
- 16-JONES, G.J.; BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* v. 2, p. 228-235, 1994.
- 17-LEMES, G.A.F.; KERNSANACH, R.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A. Biodegradation of Microcystin by Aquatic *Burkholderia* sp. From a South Brazilian Coastal Lagoon. *Ecotox. Environ. Saf.*, v. 69, p. 358-365, 2008.
- 18-MERILUOTO, J.; SPOOF, L. Solid phase extraction of microcystins in water samples. TOXIC European Project *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Abo Akademi University, Finland, 2005.
- 19-MERILUOTO, J.; GUEIMOND, M.; HASKARD, C.A.; SPOOF, L.; SJÖVALL, O.; SALMINEN, SEPPO. Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. *Toxicon*, v. 46, p. 111-114, 2005.
- 20-NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *J. of Wat. Suppl.: Res. and Technol. - AQUA*, v. 53, n.4, p. 227-239, 2004.
- 21-NYBOM, S.M.K.; SALMINEN, S.J.; MERILUOTO, J.A.O. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. *Toxicon*, v. 52, p. 214-220, 2008.
- 22-PARK, H.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K. Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by a New Bacterium Isolated from a Hypertrophic Lake. *Environ. Toxicol.* v. 16, p. 337-343, 2001.
- 23-RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINID, D.M. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research*, v. 636, p. 178-242, 2007.
- 24-SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.*, v. 4, p. 406-425, 1987.
- 25-SAITO, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M. Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. *J. Water SRT - Aqua* v. 52, p. 13 - 18, 2003a.
- 26-SAITO, T.; OKANA, K.; PARK, H.D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B.A.; BURNS, B.P.; SUGIURA, N. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 229, n. 2, p. 271 - 276, 2003b.
- 27-SAITO, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M. Degradation of microcystin by biofilm in a practical treatment facility. *Water Sci. Technol.* v. 46, p. 237 - 244, 2002.
- 28-TAKENAKA, S.; WATANABE, M.F. Microcystin-LR Degradation by *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *Chemosphere*, v. 34, n. 4, p. 749-757, 1997.
- 29-TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- 30-THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL - X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* v. 25, p. 4876- 4882, 1997.
- 31-TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in eutrophic lake. *Chemosphere*, v. 65, p. 117-124, 2006.
- 32-VALERIA, A.M.; RICARDO, E.J.; STEPHAN, P.; ALBERTO, W.D. Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba -Argentina). *Biodegradation*, v. 17, p. 447-455, 2006.
- 33-WANG, H.; HOB, L.; LEWISA, D.M.; BROOKESB, J.D.; NEWCOMB, G. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. *Wat. Res.*, v. 41, p. 4262 - 4270, 2007.
- 34-WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* v. 173, p. 697-703, 1991.
- 35-ZHANG, J. SUN, Z.; LI, Y.; PENG, Y.; LI, W.; YAN, Y. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. *J. Hazar. Materi.*, v. 163, p. 723-728, 2009.