



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**BIODEGRADAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE TOXINAS DE
CIANOBACTÉRIAS, MICROCISTINA E ANATOXINA-A, POR
BACTÉRIAS AQUÁTICAS DA REGIÃO ESTUARINA DA LAGOA DOS
PATOS E DA PRAIA DO CASSINO (RS -BRASIL).**

GILMAR ANTONIO FARIAS LEMES

Dissertação apresentada a Fundação Universidade Federal do Rio Grande – **FURG**, como requisito para obtenção do grau de mestre em Oceanografia Biológica.

Orientador: **Prof. Dr. João Sarkis Yunes**

Co-orientador: **Prof. Dr. Alexandre Matthiensen**

RIO GRANDE – RS – BRASIL

MAIO/2005



**Os mares são o cinto de segurança da vida neste planeta.
A vida nasceu no mar e está umbilicalmente ligada a suas águas.**

Jacques-Yves Cousteau

Navegador e explorador Francês

NO JOGO DA VIDA...

No jogo da vida, na trama do destino, você escolhe os seus caminhos e pagará o preço por suas escolhas.

Se você errou, olhe para trás e admita “Eu errei”, e então olhe para frente e pense “Eu posso acertar”.

A cada tropeço no caminho, levante-se e caminhe, porque a vitória pertence aqueles que aprendem a levantar-se e a caminhar, nunca àqueles que ficam a margem, desiludidos, lamentosos...

O mundo machuca, mas você tem que aprender a superar sua dor.

Acredite, sempre, na força poderosa que move o universo. Sempre haverá alguém, um familiar, um amigo ou até mesmo um estranho para lhe estender a mão em um momento difícil.

Aceite as regras do jogo do destino, mas nunca esqueça que a vida

é mais que um jogo...

...ela é a força que nos move;

é um suspiro de Deus;

é um sentimento no coração;

é um aperto de mão;

é uma lembrança que nunca se apaga;

é a força de um coração que não se cansa de bater...

é vida, maravilhosa vida...

No jogo da vida você pode mudar de sonhos,
mas não pode, jamais, deixar de sonhar, por isso... nunca desista.

Um grande abraço.

Gilmar Lemes

Março, 2005

AGRADECIMENTOS

Ao final da jornada é bom saber que nunca estivemos sozinhos durante a caminhada, por isso agradeço....

À minha família: Meu pai Actaciano Lemes, minha mãe Ivone Lemes, meu tio Ivanil Estabel, todos já partiram... Também a meu tio Ivaldir Estabel, minha avó Ambrozina Estabel, minha filha Andréia Lemes e meus irmãos Silmar, Lindomar, Onara e Rosane. Obrigado pelo seu amor.

Ao Prof. João Sarkis Yunes pela oportunidade fantástica de fazer parte do “povo da UPC” e pelo respeito de sempre. Muito obrigado.

Ao Prof. Alexandre Matthiensen pela amizade e confiança nos momentos difíceis, por seus conselhos sinceros. Muito obrigado.

Aos Professores Paulo Abreu (Furg – Rio Grande) e Marli Fiore (USP – Piracicaba) por terem aceito, de maneira tão simpática, participar de banca de defesa. Obrigado

Ao Prof. Ralf Kersanach pelos ensinamentos em biologia molecular. Obrigado.

Aos companheiros e colegas da UPC que sempre fizeram um clima de alegria e paz no ambiente do laboratório: Nérile, Patrícia, Wilson, Éder, Janaína, Priscilla, Sheila, Luciano e Paula. Muito obrigado.

À Deus, pai incansável, que tem me sustentado no meu caminho. Obrigado Senhor.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, através do fornecimento da bolsa de mestrado. Obrigado.

A todos, embora anônimos, que em algum momento deram sua contribuição.

Obrigado.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 O FIM DA ÁGUA POTÁVEL.....	1
I.2 POLUIÇÃO.....	3
I.3 O QUE SÃO CIANOBACTÉRIAS.....	4
I.4 FORMAÇÃO DE FLORAÇÕES.....	8
I.5 OCORRÊNCIAS DE FLORAÇÕES TÓXICAS DE CIANOBACTÉRIAS....	10
I.6 CIANOTOXINAS, SEUS EFEITOS E SUA DEGRADAÇÃO.....	13
I.6.1 HEPATOTOXINAS.....	14
I.6.2 NEUROTOXINAS E DERMATOTOXINAS.....	18
I.6.3 BIODEGRADAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DE CIANOTOXINAS.....	20
II. OBJETIVOS	26
III. ÁREA DE ESTUDO	27
IV. MATERIAL E MÉTODOS	30
IV.1. CULTIVOS.....	30
IV.2. EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS.....	30
IV.3. COLETAS DE ÁGUA.....	32

IV.4. EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO COM EXTRATOS DE <i>Microcystis</i> RST 9501 E MICROCISTINA COMERCIAL.....	33
IV.5. EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO DE ANATOXINA-A.....	34
IV.6. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINA POR HPLC.....	35
IV.7. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ANATOXINA-A POR HPLC.....	36
IV.8. ISOLAMENTO DAS CEPAS RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO DE TOXINAS	37
IV.9. ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR IMUNOENSAIO ELISA.....	38
IV.10. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR MEIO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	38
IV.11. SEQUENCIAMENTO.....	40
V. RESULTADOS.....	42
V.1 MICROCISTINAS.....	42
V.2 ANATOXINA-A.....	53
VI. DISCUSSÃO.....	60
VII. CONCLUSÃO.....	71
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
IX. ANEXO.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ANTX-a	=	Anatoxina-a
BCB	=	Banco de Cultura de Bactérias
DL ₅₀	=	Dose Letal 50% (Dose que mata 50% dos organismos testados)
dNTP	=	Deoxiribonucleotídeo
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
i.p.	=	Injeção intraperitoneal
IE	=	Experimento com amostra de água da região da Praia do Cassino e extrato purificado de <i>Microcystis</i> RST 9501.
IP	=	Experimento com amostra de água da região da Praia do Cassino e microcistina comercial (Sigma®).
ME	=	Experimento com amostra de água da região do Museu Oceanográfico e extrato purificado de <i>Microcystis</i> RST 9501.
MP	=	Experimento com amostra de água da região do Museu oceanográfico e microcistina comercial (Sigma®).
MC-LR	=	Microcistina variante Leucina-Arginina
MC-YR	=	Microcistina variante Lisina-Arginina
MC-RR	=	Microcistina variante Arginina-Arginina
p.c.	=	Peso corporal
p.s.	=	Peso seco
PCR	=	Reação em Cadeia da Polimerase
UPC	=	Unidade de Pesquisas em Cianobactérias
HPLC	=	Cromatografia Líquida de Alta Performance

RPM	=	Rotações por minuto
g	=	Gravidade
SDS	=	Detergente, Lauril sulfato de sódio
TAE	=	Tris + Ácido acético + EDTA
TE	=	Solução tampão, tris e EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Países em desenvolvimento enfrentam escassez de água potável.....	2
Figura 02. Variações morfológicas mais comuns das cianobactérias.....	7
Figura 03. Fotomicrografia mostrando o heterocito de <i>Anabaena verrucosa</i> do Banco de Culturas da UPC (Unidade de Pesquisas em Cianobactérias) com comprimento e largura maiores que as células normais.....	8
Figura 04. Ocorrência de floração de <i>Microcystis</i> sp. no estuário da Lagoa dos Patos, em dezembro de 2004, em frente a região do Museu Oceanográfico (Rio Grande – RS).....	12
Figura 05. (A) Células controle mostrando a rede de actina (vermelho) altamente organizada e os núcleos dos hepatócitos (verde) perfeitamente arredondados. (B e C) Hepatócito exposto a 50 nM de MC-LR por 3h. Nestas células os filamentos de actina sofrem colapso para o centro da célula formando uma estrutura semelhante a uma estrela e os núcleos perdem sua forma característica. Em (C) as células mais severamente afetadas apresentam-se encolhidas e em fragmentos.....	15
Figura 06. Fígado normal e Fígado sob efeito das toxinas microcistinas.....	17
Figura 07. Fórmula estrutural da neurotoxina anatoxina-a.....	19
Figura 08. Ação da ANTX-a, provocando uma superestimulação muscular.....	20
Figura 09. Estrutura química das microcistinas, onde o X e o Y representam os amino ácidos variáveis e nodularina-Har.	23
Figura 10. Esquema de degradação microbiana de microcistina-LR onde ocorre uma linearização da molécula.....	24
Figura 11. Lagoa dos Patos. Em detalhe o estuário.....	28
Figura 12. Estuário da Lagoa dos Patos mostrando os pontos de coleta.....	29

Figura 13. Cultivos massivos de <i>Microcystis</i> RST9501, pertencente ao Banco de Culturas da UPC (Unidade de Pesquisas em Cianobactérias).....	31
Figura 14. Câmara protetora, onde foram realizados os experimentos de biodegradação de microcistinas e anatoxina-a.	35
Figura 15. Sistema de cromatografia líquida (HPLC), com seus periféricos.....	37
Figura 16. Padrão de bandas e eletroforese em gel de agarose 1,0%, observando-se as bandas da amostra de DNA	41
Figura 17. Extensão da Praia do Cassino, mostrando local (flecha em vermelho) de coletas de amostras de águas.	42
Figura 18. ME. Percentual das concentrações de microcistina no experimento de degradação com extrato tóxico de <i>Microcystis</i> RST 9501 e amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1). 100% equivale ao total de microcistina presente no extrato celular adicionado à amostra.....	44
Figura 19. MP. Percentual das concentrações de MC-LR no experimento de degradação com toxina purificada e amostra de água da região do Museu Oceanográfico. 100% equivale ao total de MC-LR adicionada à amostra.....	44
Figura 20. IE. Percentual das concentrações de microcistinas no experimento de degradação com extrato de <i>Microcystis</i> RST 9501 e amostra de água da região costeira da praia do Cassino (P2), próximo à estátua de Iemanjá. 100% equivale ao total de MC-LR adicionada à amostra.....	45
Figura 21. IP. Percentual das concentrações de MC-LR no experimento de degradação com toxina purificada e amostra de água da região da Praia do Cassino. 100% equivale ao total de MC-LR adicionada à amostra.....	45

Figura 22. ME. Cromatogramas mostrando a diminuição do pico de [D-Leu ⁻¹] MC-LR presente no extrato celular do experimento de degradação com amostra de água do ponto P1.....	46
Figura 23. MP. Cromatogramas mostrando diminuição pico de MC-LR do experimento de degradação com amostra de água do ponto P1.....	47
Figura 24. IE. Cromatogramas mostrando a diminuição dos picos de [D-Leu ⁻¹] MC-LR do experimento de degradação de extrato celular com amostra de água do ponto P2.....	48
Figura 25. IP. Cromatogramas mostrando a diminuição dos picos de MC-LR purificada do experimento de degradação com amostras de águas do ponto P2.....	49
Figura 26. ME. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina, com amostra de água da região do Museu Oceanográfico e extrato de <i>Microcystis</i> RST 9501.....	50
Figura 27. MP Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina, com amostra de água da região do Museu Oceanográfico e microcistina purificada.....	50
Figura 28. IE. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina com amostra de água da Praia do Cassino (Iemanjá) e extrato de <i>Microcystis</i> RST 9501.....	51
Figura 29. IP. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina com amostra de água da Praia do Cassino (Iemanjá) e microcistina purificada.....	51
Figura 30. MA. Percentual das concentrações de anatoxina-a do experimento de biodegradação, com amostras de águas da região do Museu Oceanográfico (P1). 100% equivale ao total de anatoxina-a adicionada as amostras de águas.....	55

Figura 31. IA. Percentual das concentrações de anatoxina-a do experimento de biodegradação, com amostras de águas da região da Praia do Cassino (P2). 100% equivale ao total de anatoxina-a adicionada às amostras de águas.	55
Figura 32. MA. Cromatogramas mostrando diminuição do pico de anatoxina-a do experimento de degradação, com amostra de água do ponto (P1).....	56
Figura 33. IA. Cromatogramas mostrando diminuição do pico de anatoxina-a do experimento de degradação com amostras de águas do ponto (P2).....	57
Figura 34. IPrx. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR com amostras de água da Praia do Cassino (P2).....	58
Figura 35. IPam. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR com amostra de água da Praia do Cassino (P2).....	58
Figura 36. MEam. Bactéria isolada do experimento de degradação de extrato de <i>Microcystis</i> RST 9501 em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).....	59
Figura 37. MPrs. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Parâmetros físico-químicos das águas utilizadas nos experimentos de biodegradação de microcistinas.....	43
TABELA 2. Taxas de degradação de microcistina-LR e microcistina presente no extrato de <i>Microcystis</i> RST 9501.....	52
TABELA 3. Parâmetros físico-químicos das águas utilizadas nos experimentos de biodegradação de anatoxina-a.....	53
TABELA 4. Taxas de degradação de anatoxina-a.....	54

RESUMO

Cianobactérias são organismos cosmopolitas. Algumas espécies possuem a capacidade de produzirem um crescimento exponencial, sob determinadas condições, denominado de floração. Estas florações têm, geralmente, conseqüências danosas para os outros organismos e o ambiente onde ocorrem, ameaçando o equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos. Florações de cianobactérias tóxicas têm sido observadas, nos últimos 15 anos, nas águas do estuário da Lagoa dos Patos e em regiões costeiras adjacentes, como a Praia do Cassino. Quando essas florações ocorrem em reservatórios naturais, utilizados como fonte de água potável, podem inviabilizar seu uso devido ao fato das toxinas (cianotoxinas) produzidas por esses organismos não serem prontamente removidas pelos processos convencionais utilizados nas Estações de Tratamento de Água. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo da biodegradação de cianotoxinas, realizado por bactérias da região estuarina e costeira da Lagoa dos Patos. A coleta de água de superfície foi realizada em dois pontos, um dentro do estuário e outro na Praia do Cassino. Experimentos foram realizados utilizando-se extratos de *Microcystis* RST 9501 (pertencente ao Banco de Cultura de Cianobactérias, da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias) e toxinas padrões disponíveis comercialmente (microcistina-LR e anatoxina-a). As toxinas foram adicionadas às amostras de água do ambiente, numa série de três experimentos diferenciados pelo tipo de toxina. Análises das concentrações das toxinas foram realizadas por HPLC e imunoenaios específicos (ELISA), que confirmaram a diminuição da concentração das toxinas por degradação biológica. Foi feita a semeadura de amostras dos experimentos em Placas de Petri com meio sólido, visando o isolamento das bactérias responsáveis pela degradação das cianotoxinas. Após o isolamento foi possível realizar o seqüenciamento genético da subunidade 16S do DNAr.

Comparações da seqüência obtida com seqüências depositadas em bancos de dados na Internet possibilitaram encontrar, com um índice de similaridade de 94%, o gênero *Burkholderia* como uma das bactérias isoladas, de amostras da degradação de microcistinas.

ABSTRACT

Cyanobacteria are cosmopolitan organisms. Some species may produce under specific conditions, an exponential growth named blooms. These blooms normally present harmful consequences to the environment and to other organisms, threatening the ecological equilibrium of aquatic systems. Toxic cyanobacterial blooms have been reported in the last 15 years in the Patos Lagoon estuary and adjacent coastal regions, as the Cassino Beach. When these blooms happen in natural reservoirs used as source of drinking water, it may become unavailable for usage due to the toxins (cyanotoxins) produced by these organisms are not readily removed by conventional treatment processes applied in Water Treatment Plants. This work has studied the biodegradation of cyanotoxins by bacteria from estuarine and coastal regions of the Patos Lagoon. Surface water was collected from two sampling points, one inside the estuary and other at Cassino Beach. Experiments were performed using cell extract of *Microcystis* RST 9501 (from the Cyanobacterial Culture Bank, UPC/FURG) and pure toxin standards commercially acquired (microcystin-LR and anatoxin-a). The toxins were spiked to the environmental water samples in series of three different experiments differentiated by the toxin type. The toxin concentration analysis were carried out by HPLC and specific immunoassay testes (ELISA), which confirmed the decrease in toxin concentrations due to biological degradation. Sub-samples from the experiments were inoculated in Petri dishes with solid

medium aiming the isolation of the responsible cyanotoxin-degrading bacteria. After isolation it was possible to perform the genetic sequencing of the rDNA 16S sub-unity. Comparisons of the obtained sequence with Internet sequence data banks resulted in a 94% similarity index for the genus *Burkholderia* as one of the isolated bacteria from samples the microcystin degradation.

I. INTRODUÇÃO

I.1 O fim da água potável

Em um de seus relatórios a Organização das Nações Unidas (ONU) previa projeções desesperançadas para as épocas futuras da humanidade. Segundo a ONU, devido a maneira com que os povos têm utilizado os recursos hídricos do planeta, projeta-se, para 2050, que mais de 45% da população mundial não terá acesso a uma porção mínima de água para suas necessidade básicas. Atualmente aproximadamente 1,1 bilhão de excluídos não têm acesso a água doce e, daqui a 40 anos, quando a população atingir o índice de 9,3 bilhões de pessoas, a situação tornar-se-á crítica, se medidas urgentes não forem postas em práticas. Mas os dados sobre o problema de qualidade da água no mundo não param por aí. Além dos mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo que não têm acesso a água potável, estima-se também que por volta de 2 bilhões não contam com saneamento adequado e, pelo menos, 6 mil crianças morrem diariamente nos países em desenvolvimento, vítimas de doenças provocadas por águas contaminadas (Kelman, 2004).

No Brasil, segundo estudos do Ministério das Cidades, 45 milhões de brasileiros não têm acesso a água que esteja dentro dos padrões de qualidade e, devido a isto, estatísticas confirmam que 65% das internações hospitalares são decorrentes de doenças relacionadas ao problema da água potável. Mas o mais grave de todos os dados é que estimativas afirmam que mais de 20% de toda a água doce do planeta está ameaçada em virtude de construções de barragens, diminuição do volume devido a drenagens e, principalmente, por causa da poluição e contaminação (Tundisi, 2003); a eutrofização marinha e costeira é uma das principais conseqüências da poluição, contaminação e

degradação de recursos costeiros e marinhos. A escassez de água potável, assim como a poluição e a contaminação das fontes, ultrapassaram todas as fronteiras que separam as diversas regiões do mundo, preocupando não só autoridades governamentais, mas também entidades e órgãos não-governamentais do mundo inteiro (Kelman, 2004).

Sabe-se que menos de 3% da água existente na terra é água-doce, onde a maioria encontra-se na forma de gelo polar ou são subterrâneas, sendo, portanto, inacessíveis. O restante faz parte de água salgada imprópria para consumo. Embora o Brasil possua uma das maiores fontes de água potável do planeta (mais ou menos 12% da água do mundo e próximo de 53% das reservas da América Latina), muitos estados brasileiros já estão enfrentando o problema da escassez de água para o consumo (Weissheimer, 2005). A escassez é decorrente do aumento da população, do uso crescente de água em processos produtivos dos quais não pode ser reaproveitada e, principalmente, da poluição.

Segundo dados da ONU publicados através de programas como, por exemplo, o PNUMA (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente), atualmente mais de 80 países estão com dificuldades para manter água potável disponível, sendo que estes representam 40% da população mundial (Tundisi, 2003) (Fig. 01).



Figura 01. Países em desenvolvimento enfrentam escassez de água potável.

Fonte: www.terra.com.br/planetaweb/352/jornal_352_01.htm

I.2 Poluição

A poluição, sem dúvida nenhuma, é a principal responsável pela perda da potabilidade da água dos mananciais. Desde os tempos mais remotos o homem costuma lançar seus detritos nos cursos de água. Antes da Revolução Industrial essa atitude, porém, não causava grandes problemas, já que os rios, lagos e oceanos têm considerável poder de resiliência. Foi a partir da Revolução Industrial que a poluição passou a constituir um problema para a humanidade. O grau de poluição aumentou muito com a industrialização (devido à mecanização e produção acelerada) e urbanização e sua escala deixou de ser local para se tornar planetária. Com o advento da industrialização, o volume de detritos despejados nas águas tornou-se cada vez maior, superando a capacidade de recuperação dos rios e oceanos, a qual é limitada. Também começou a ser despejados nas águas uma grande quantidade de produtos industrializados não biodegradáveis, como plásticos, a maioria dos detergentes e pesticidas. Sabe-se que alguns destes compostos acumulam-se na cadeia trófica, potencializando seus efeitos danosos nos níveis tróficos superiores, prejudicando, assim, todo o sistema aquático. Entretanto, não é apenas a indústria a principal responsável pelo lançamento de poluentes no meio ambiente, mas a urbanização, com grandes concentrações humanas em algumas cidades, também contribuiu pesadamente, criando outros grandes problemas ambientais, como o acúmulo de lixo, enormes volumes de esgotos e congestionamentos de tráfego.

Hoje, graças aos relatórios da ONU e organizações não-governamentais, já se sabe que 120.000 Km³ de água estão contaminados e que para 2050 há uma estimativa de 180.000 Km³, se medidas urgentes, que permitam a diminuição acentuada da poluição, não forem tomadas (Tundisi, 2003). Cerca de 73% da população mundial vive em regiões

próximas à costa, onde a entrada de esgotos nos sistemas costeiros é a principal fonte de contaminação (Tundisi, 2003). A entrada de compostos orgânicos nos ecossistemas aquáticos pode resultar em um processo chamado de “eutrofização”. Eutrofização significa, basicamente, o enriquecimento dos corpos d’água por grandes quantidades de substâncias, orgânicas e inorgânicas, que contêm nitrogênio (N) e fósforo (P) (Carmichael, 1994; Persich *et al.*, 1996; Chorus & Bartram, 1999; Codd, 2000; Briand *et al.*, 2003), elementos essenciais na composição da matéria orgânica. Esse excesso de nutrientes atua como um fertilizante, podendo favorecer o crescimento de uma ou mais espécies do fitoplâncton em particular, resultando em um fenômeno denominado “floração” (crescimento excessivo de determinados organismos). Um dos grupos que freqüentemente formam florações em águas doces, salobras e marinhas são as cianobactérias. Como consequência do aumento exagerado da biomassa de cianobactérias pode haver redução da qualidade da água para uso humano.

I.3 O que são cianobactérias

Cianobactérias são microrganismos procariotas que possuem uma parede celular composta de peptidoglicano e lipopolissacarídeos ao invés de celulose das algas verdes. Estes organismos realizam fotossíntese com liberação de oxigênio. Devido ao fato de possuírem pigmentos como clorofila-a e ficobiliproteínas, entre elas ficocianina, foram erroneamente denominadas de algas verde-azuis (ou cianofíceas), pois elas possuem relação filogenética e taxonômica mais próxima das bactérias que das algas (Perry & Staley, 1997).

Cianobactérias são uma das formas de vida mais antiga da terra. Evidências de sua existência derivam de registro fóssil de períodos de 3,5 bilhões de anos atrás, situando-as no início da Era Pré-cambriana (Schopf, 1993; Oberholster *et al.*, 2004).

Acredita-se que as cianobactérias tiveram um papel muito importante no desenvolvimento da vida no planeta Terra. Há cerca de 2,5 bilhões de anos, o hidrogênio começou a ficar escasso e os organismos que faziam fotossíntese anaeróbica conseguiram sobreviver apenas em locais muito específicos, mas as cianobactérias começaram a fazer fotossíntese aeróbica, aproveitando do hidrogênio da molécula de água e liberando oxigênio para atmosfera. Este evento alterou os processos bioquímicos e teria permitido que os organismos adaptassem seus metabolismos para sobreviver em um ambiente oxidado. Isto possibilitou que organismos superiores, como os vertebrados, surgissem muitos milhões de anos depois (Carr & Whiton, 1982; Mckay & Hartman, 1991).

A liberação de oxigênio na atmosfera, pelas cianobactérias, foi um evento biológico sem precedentes na história da evolução da vida no planeta Terra. Nem mesmo a grande explosão de diversidade de formas de vida no Período Cambriano é comparada com este fenômeno. Este fato levou o Doutor em Ciências Atmosféricas, James Kasting (Kasting, 2004) a afirmar: “Há cerca de 2,3 bilhões de anos micróbios incomuns insuflaram vida nova no jovem planeta Terra preenchendo os céus com oxigênio. Sem esses seres, hoje denominados cianobactérias, a maior parte da vida que hoje conhecemos nunca teria evoluído”.

Cianobactérias são comuns em muitos tipos de habitats naturais, sendo que muitas espécies são cosmopolitas, vivendo em ambientes hostis, onde as condições são extremas, como fontes hidrotermais, lagos alpinos e ambientes altamente poluídos, incluindo lagos Antárticos, desertos áridos e solos tropicais ácidos (Mur *et al.*, 1999; Kaebernick & Neilan, 2001). Elas desempenham papel chave na ciclagem biogeoquímica da matéria, na

estrutura e manutenção da biodiversidade microbiana e na comunidade de organismos superiores (Codd *et al.*, 2005).

As cianobactérias desenvolveram uma ampla diversidade de formas, adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, que lhes permitiram um longo registro evolutivo. A morfologia das cianobactérias é muito diversa, incluindo células esféricas ou alongadas, coloniais e espécies multicelulares cilíndricas (filamentosas) (Fig. 02).

Em alguns casos, a identificação por microscopia óptica, em nível de espécie, pode tornar-se difícil devido a sua alta plasticidade fenotípica (Briand *et al.*, 2003). Elas podem viver livremente ou em forma simbiote com plantas e fungos, no bentos ou, mais comumente, como membros do plâncton (Kaebernick & Neilan, 2001).

Algumas espécies têm habilidade para diferenciar células normais em especializadas, como, por exemplo, o “heterocito” (Fig. 03), que mesmo em presença de O₂, é capaz de fixar nitrogênio, quando este elemento se encontra limitado no meio (Briand *et al.*, 2003). Algumas cianobactérias conseguem realizar a fixação de nitrogênio mesmo não possuindo heterocito. Elas fazem uma fixação temporal, onde alternam fotossíntese no período de luz e fixação de N₂ nos períodos sem luminosidade (Rowell & Kerby, 1991). Outra especialização apresentada por cianobactérias, os acinetos, permitem sua sobrevivência quando as condições ambientais tornam-se estressantes, como períodos de baixas temperaturas ou secas prolongadas.

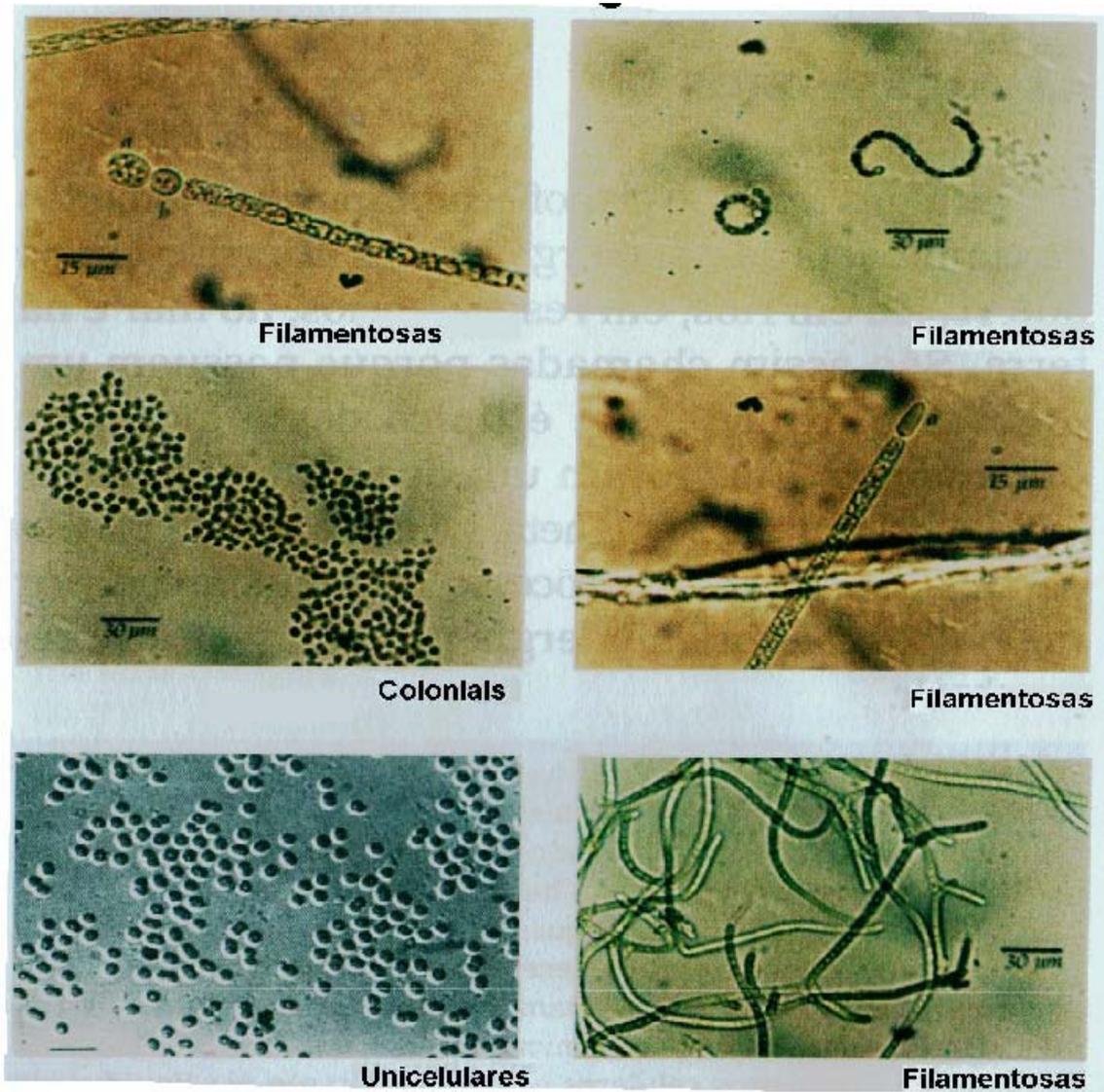


Figura 02. Variações morfológicas mais comuns das cianobactérias: Cianobactérias filamentosas sem heterocitos (a); filamentosas com heterocitos (d) e (b); unicelular coloniais (c); unicelulares de vida livre (e) e filamentosas ramificadas (f).

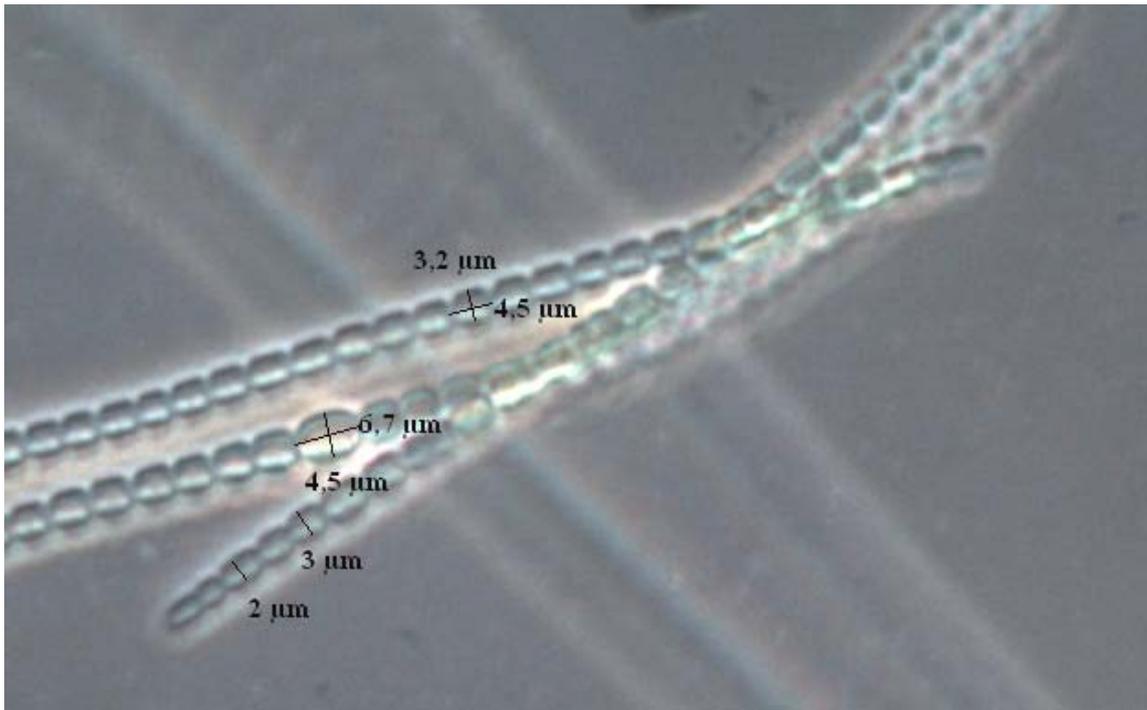


Figura 03. Fotomicrografia mostrando o heterocito de *Anabaena verrucosa* do Banco de Culturas da UPC (Unidade de Pesquisas em Cianobactérias) com comprimento e largura maiores que as células normais.

I.4 Formação de florações

As florações de cianobactérias representam um crescimento exponencial, geralmente de uma única espécie. Estas florações têm, geralmente, conseqüências danosas para os organismos e o ambiente, alterando o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático (Carmichael, 1994; Chorus & Bartram, 1999; Codd, 2000; Fogg, 2002; Briand *et al.*, 2003). Acredita-se que entre as passagens da Bíblia que citam as sete pragas do Egito, há uma descrição de uma floração de algas causando a morte de peixes no Rio Nilo (Fogg, 2002). Na atualidade as ocorrências destes fenômenos são popularmente identificados pela expressão “Florações de Algas Nocivas” (FAN). Em verdade, o termo “FAN” está mais

intensamente ligado, na literatura antiga, aos eventos de “marés vermelhas” (Smayda, 1997), entretanto tem sido usado atualmente para as ocorrências de cianobactérias.

As ocorrências de florações de cianobactérias pressupõem um conjunto de fatores ambientais ideais como: temperatura em torno de 25°C, pH variando entre 7,0 e 9,0 e locais que apresentem estabilidade da coluna d’água. Outros fatores importantes são as altas concentrações de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, juntamente com a intensidade luminosa (Carmichael, 1994; Yunes *et al.*, 1998; Chorus & Bartram, 1999; Matthiensen *et al.*, 1999; Kaebernick & Neilan, 2001; Haider *et al.*, 2003). É devido a estes fatores que as florações geralmente ocorrem na primavera ou verão (Fig. 04).

A ocorrência de florações geralmente conduz a uma série de eventos ambientais que podem gerar problemas graves. Estes eventos se sucedem começando com a formação de um denso material que forma um biofilme (Codd *et al.*, 2005) ou espessa camada que cobre a superfície da água, diminuindo a sua transparência. A seguir são claramente identificados gosto e odor desagradáveis, devido à liberação de compostos voláteis como, por exemplo, a geosmina e o 2-metilisoborneol (MIB) (Velzeboer *et al.*, 1995; Paerl & Millie, 1996). Segue-se a conseqüente desoxigenação aquática, podendo resultar em mortandade de peixes e outros animais.

As diversas espécies de cianobactérias formadoras de florações podem produzir promovem a produção de uma série de diferentes tipos de compostos, sendo alguns considerados tóxicos para uma gama muito grande de organismos (Codd *et al.*, 1997; Issa, 1999; Kreitlow *et al.*, 1999; Schaeffer & Krylov, 2000; Burja *et al.*, 2001).

I.5 Ocorrências de florações tóxicas de cianobactérias

No estuário da Lagoa dos Patos as principais florações que ocorrem ao longo do ano são: diatomáceas, pequenos flagelados como, prasinofíceas, criptofíceas, haptofíceas, e clorofíceas. As cianobactérias são mais abundantes em períodos de baixa salinidade e os dinoflagelados em alta salinidade (Odebrecht & Abreu, 1998).

Torna-se cada vez mais comum o relato de ocorrência de grandes massas verdes de cianobactérias em lagos, rios, represas e estuários. Esses fenômenos têm chamado a atenção mundial devido ao potencial risco para a saúde humana (Lawton & Codd, 1991; Carmichael, 1994; Yunes *et al.*, 1996; Chorus & Bartram, 1999; Falconer, 1999; Matthiensen *et al.*, 2000a).

Casos de ocorrência de grandes densidades de cianobactérias são citados na literatura mundial. Uma floração de cianobactérias *Anabaena circinalis* cobriu 1000 Km do Rio Darling na Austrália, no verão de 1999, e teve como consequência danosa a morte de vários animais selvagens e gado (Falconer, 1999).

A descrição de florações tóxicas e a intoxicação por água contaminada por espécies tóxicas de cianobactérias, que tem conduzido à mortalidade de vários animais como peixes, bovinos, ovelhas, porcos, cães, pássaros, já foram relatados em diversas partes do mundo em países como Austrália, Inglaterra, China, África do Sul, Chile, Alemanha, Itália, Escócia, Brasil, Argentina (Beasley *et al.*, 1983; Carmichael, 1992; Edwards, 1992; Yunes *et al.*, 1996; Lagos, 1998; Falconer, 1999; Fastner *et al.*, 1999; Giovannardi *et al.*, 1999; Pizzolon *et al.*, 1999; Siame *et al.*, 2000).

Existem evidências de toxinas de cianobactérias produzindo câncer primário de fígado (PLC) em províncias e cidades da China (Ueno *et al.*, 1996). Relatos de intoxicação em seres humanos no Brasil tem uma história relativamente recente, sendo alguns não

devidamente documentados. Em 1988, na represa de Itaparica, estado da Bahia, ocorreram 2000 casos de gastroenterites, sendo que 70,6% dos casos eram crianças (Teixeira *et al.*, 1993). Suspeita-se que a epidemia foi causada por agente infeccioso (bacteriano ou viral) ou então toxinas de cianobactérias, mas a falta de dados não permitiu uma exatidão do fenômeno ocorrido.

Existem casos, entretanto, que estão bem documentados e esclarecidos, sendo um dos mais graves da literatura microbiológica mundial, envolvendo toxinas de cianobactérias, o ocorrido em Caruaru, estado de Pernambuco, onde aproximadamente 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise desenvolveram intoxicação tendo como conseqüência a morte, após tratamento na clínica que utilizava um reservatório que continha água contaminada com toxinas de cianobactérias (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998).

No estuário da Lagoa dos Patos, florações de cianobactérias não são novidades visto que estudos passados já confirmavam sua presença nos últimos 15 anos (Yunes *et al.*, 1998) (Fig. 04).

Matthiensen *et al.* (1999) relataram no período de 12 meses a presença de *Microcystis aeruginosa* na região estuarina, com valor máximo de $1,3 \cdot 10^6$ cél.L⁻¹ em dezembro de 1994 e valor mínimo de $1,5 \cdot 10^5$ cél.L⁻¹ no período de agosto de 1995. Estas florações se revelaram altamente tóxicas, mediante testes de toxicidade intraperitoneal em camundongos com DL₅₀ - 24h menores que 100 µg.Kg⁻¹ p.c. e concentrações de toxinas nas células que superaram 1,0 µg.mg⁻¹p.s. Yunes *et al.* (2003) registraram a presença de florações de cianobactérias ao norte do estuário da Lagoa dos Patos, sendo que *Cylindrospermopsis raciborskii* ocorreu nos rios Cai e Sinos, enquanto que na Barragem do Rio Duro, que cruza a cidade de Camaquã, foi verificado a presença de uma floração mista de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Pseudoanabaena limnetica*. Estes dados

evidenciam a região norte da Lagoa dos Patos como a principal fonte de entrada de diferentes cianobactérias (Matthiensen *et al.*, 1999) e, que eventualmente, podem formar florações na região sul da lagoa.



Figura 04. Ocorrência de floração de *Microcystis* sp. no estuário da Lagoa dos Patos, em dezembro de 2004, em frente a região do Museu Oceanográfico (Rio Grande – RS).

I.6 Toxinas, seus efeitos e sua degradação

A ocorrência de uma floração com organismos produtores de toxinas representam um dos eventos mais nocivos para o ambiente e para quem faz uso dessa água. Estas toxinas produzidas são liberadas para a água do ambiente quando ocorre a lise, a ruptura da membrana celular, e conseqüente morte do organismo. Essas cianotoxinas são pouco removidas da água através dos tratamentos convencionais realizados pelas empresas públicas de abastecimento de água potável. Dependendo da intensidade da floração elas resistem a cloração, permanganato e amônia, sendo que todos estes métodos provaram ser ineficientes na redução do odor e concentração de toxina da água (Kiviranta *et al.*, 1999; Haider *et al.*, 2003). Devido à ocorrência de casos envolvendo a morte de seres humanos e animais, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estipulou um valor padrão máximo de microcistina-LR, a cianotoxina de ocorrência mais comum, de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para água potável (WHO, 1998). O governo brasileiro, através da portaria 518 do Ministério da Saúde do Brasil, de 25 de março de 2004, exige que as Estações de Tratamento de Água (ETA) monitorem mensalmente a presença de cianobactérias tóxicas nos pontos de captação, estipulando um valor máximo permitido de $10.000 \text{ células.mL}^{-1}$ e, em casos do número de células alcançar $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ e comprovação de toxicidade avaliada por meio de bioensaios com camundongos, passa a ser obrigatória a análise de cianotoxinas na água tratada. A legislação brasileira também proíbe o uso de compostos algicidas no controle das florações, com o objetivo de evitar que ocorra a lise celular e as cianotoxinas passem a estar dissolvidas na água do ambiente.

No caso da neurotoxina anatoxina-a, não existem leis que estipulem um valor máximo permitido em água potável. Os estudos em relação a estas toxinas são relativamente escassos.

As toxinas de cianobactérias podem ser caracterizadas por suas propriedades químicas ou toxicológicas, ou então agrupadas de acordo como o sistema fisiológico, órgãos, tecidos ou células que são primariamente afetados (Codd *et al.*, 2005; Briand *et al.*, 2003). Dependendo do órgão afetado, elas podem ser classificadas como: hepatotoxinas (ciclo peptídeos hepatotóxicos), neurotoxinas (alcalóides neurotóxicos) e uma terceira classe denominada de dermatotoxinas (toxinas alergênicas e irritante ao contato).

I.6.1 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas são heptapeptídeos e pentapeptídeos cíclicos contendo, como característica, o amino ácido hidrofóbico (3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico, denominado resumidamente de radical “Adda”) (Falconer, 1999). São produzidas por cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* e *Nostoc*. São conhecidas coletivamente como “microcistinas e nodularinas” (Fig. 08), sendo potentes inibidores das proteínas fosfatases 1 e 2A (Mackintosh *et al.*, 1990; Fujiki, 1992). Nas células do fígado a inibição dessas enzimas causa hiperfosforilação das proteínas estruturais vimentina e citoqueratina, causando deformação celular do hepatócito através da desagregação dos filamentos intermediários (Bourne *et al.*, 1996; Falconer, 1999). O alvo da toxina é o fígado devido ao fato de haver uma ligação específica do

sistema de transporte de ânions orgânicos da membrana celular dos hepatócitos (Kaebernick & Neilan, 2001). A mudança da arquitetura celular conduz ao acúmulo de sangue no fígado gerando, como conseqüência, perda de sangue da circulação, conduzindo à morte o animal contaminado com a toxina (Fig. 06). Estudos sobre os efeitos da microcistina-LR (MC-LR) sobre os filamentos de actina do citoesqueleto e o núcleo de hepatócitos humano têm demonstrado a severa deformação causada nestes tipos de célula (Fig. 05).

Microcistinas são compostas por sete amino ácidos, sendo cinco geralmente fixos e dois amino ácidos variáveis, por exemplo MC-LR contém leucina e arginina. Nodularina tem apenas cinco amino ácidos e uma das diferenças em relação as microcistinas é a ausência dos amino ácidos variáveis (Ishii *et al.*, 2004). Existem mais de 70 variantes estruturais relatadas dos ciclo heptapeptídeos microcistinas e 6 variantes dos ciclo pentapeptídeos nodularinas conhecidas (Codd *et al.*, 2005).

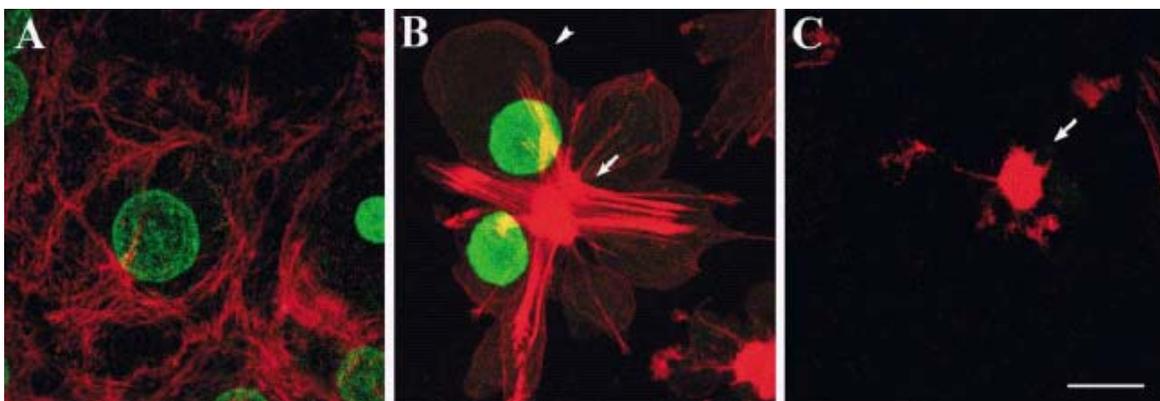


Figura 05. (A) Células controle mostrando a rede de actina (vermelho) altamente organizada e os núcleos dos hepatócitos (verde) perfeitamente arredondados. (B e C) Hepatócito exposto a 50 nM de MC-LR por 3h. Nestas células os filamentos de actina sofrem colapso para o centro da célula formando uma estrutura semelhante a uma estrela e os núcleos perdem sua forma característica. Em (C) as células mais severamente afetadas apresentam-se encolhidas e em fragmentos.

Fonte: Batista *et al.*, 2003.

As microcistinas e nodularinas apresentam toxicidade variável conforme a composição estrutural molecular. A microcistina-LR apresenta valores de $DL_{50} = 50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ p.c. em camundongo por injeção intraperitoneal (I.P.), enquanto que nodularina apresenta $DL_{50} = 30\mu\text{g.Kg}^{-1}$ p.c. (I.P.). A toxicidade oral para microcistina apresenta uma variação de 30 a 100 vezes menor que toxicidade por injeção intraperitoneal, dependendo da variante (Briand *et al.*, 2003).

Existem evidências de que os pentapeptídeos nodularinas são promotores de tumores mais potentes que as microcistinas. Suportam esses dados a baixa concentração de nodularinas necessárias para inibir enzimas fosfatases *in vitro* (Falconer, 1999).

A sintomatologia dos animais intoxicados é diversa, podendo apresentar astenia, anorexia, palidez das extremidades e membranas das mucosas, torpor, perda de equilíbrio, espasmo rígido que puxa a cabeça para trás. Estas intoxicações podem ser fatais, resultado da hemorragia intra-hepática e do choque hipovolêmico. Em humanos foi registrado fraqueza, náuseas e vômitos e sintomas neurológicos de vertigem (Pouria *et al.*,1998).

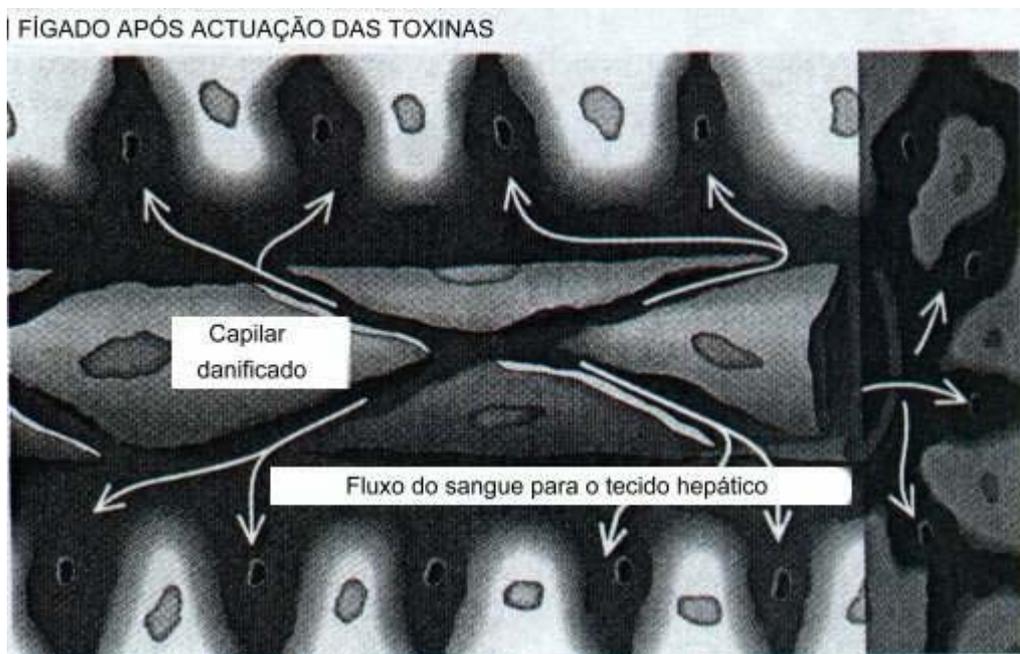
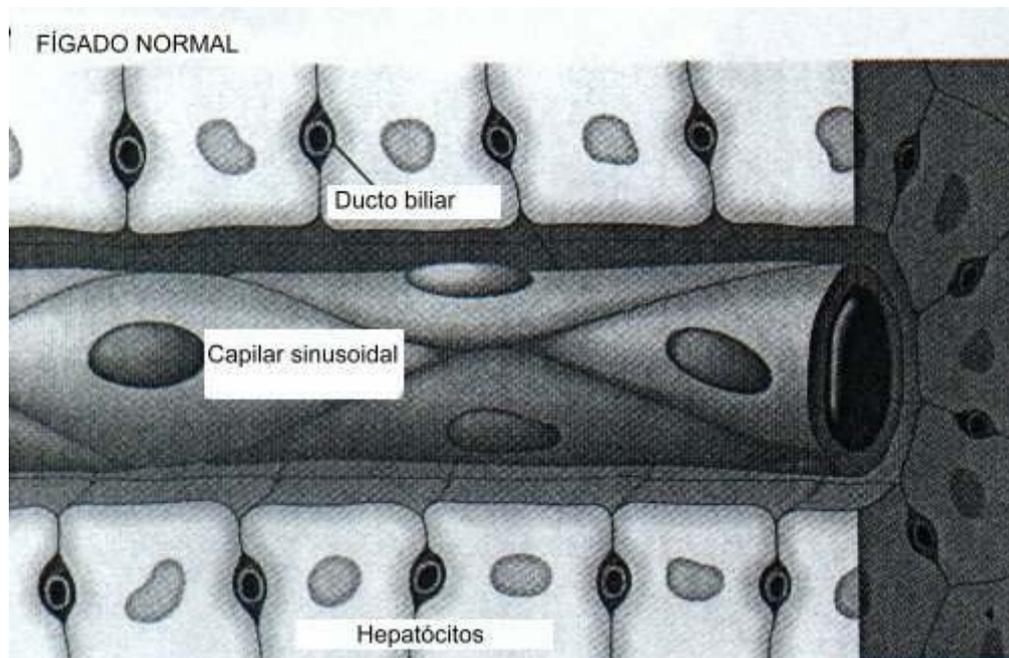


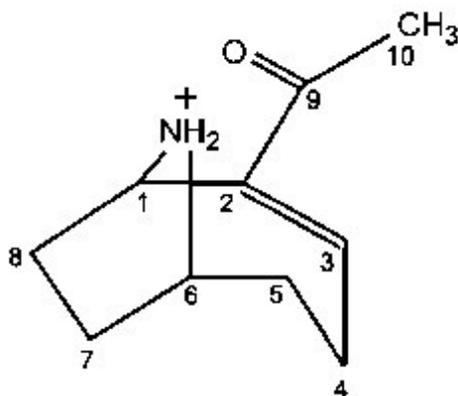
Figura 06. Fígado normal e Fígado sob efeito das toxinas microcistinas.
Fonte: Carmichael, 1994.

I.6.2 Neurotoxinas e dermatotoxinas

As neurotoxinas de cianobactérias são toxinas produzidas por espécies dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis* (Chorus & Bartram, 1999). Três tipos de neurotoxinas são estudadas em detalhes, sendo anatoxina-a e antoxina-a(S) únicas de cianobactérias enquanto que o grupo das saxitoxinas, que apresenta cerca de dezenove variantes (Sivonen & Jones, 1999), também são produzidas por algumas algas marinhas (Carmichael, 1994).

Essas toxinas são classificadas como alcalóides e atuam fundamentalmente na transmissão de impulsos nervosos. As cianobactérias *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena planktonica*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermum* são conhecidas por produzirem anatoxina-a, cuja fórmula é (C₁₀H₁₅NO) (Sivonen & Jones, 1999) (Fig. 07). A ANTX-a (anatoxina-a) é uma amina secundária com peso molecular de 165 Daltons e antoxina-a(S) (C₇H₁₇N₄O₄P), é uma N-hidroxiguanidina metil éster de fosfato com peso molecular de 252 (Briand *et al.*, 2003). A ANTX-a é um dos mais potentes agonistas conhecidos para os receptores nicotínicos de acetilcolina, atuando como um agente bloqueador despolarizante pós-sináptico neuromuscular (Rapala *et al.*, 1994). Essas toxinas inibem a transmissão do sinal eletroquímico do sistema nervoso na junção neuromuscular, sendo que a anatoxina-a(S) causa hipersalivação em animais e morte devido ser um inibidor da acetilcolinesterase com mecanismo semelhante ao dos inseticidas organofosforados (Falconer, 1999; Codd, 2000).

Em condições fisiológicas normais a acetilcolina liga-se ao seus receptores provocando a abertura dos canais de sódio, que proporciona o movimento iônico que induz a contração muscular; entretanto a acetilcolinesterase degrada a acetilcolina prevenindo uma super estimulação do tecido muscular, mas a ANTX-a não é degradada



Anatoxina-a

Figura 07. Fórmula estrutural da neurotoxina Anatoxina-a.

pela acetilcolinesterase, ligando-se definitivamente aos receptores de acetilcolina, pois mimetisa o neurotransmissor, tornando-se assim um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos, provocando uma super estimulação muscular que conduz o animal intoxicado à fadiga e à paralisia podendo ser fatal se os músculos respiratórios forem atingidos (Carmichael, 1994) (Fig. 08).

As toxicidades das neurotoxinas, de um modo geral, são altas, sendo que anatoxina-a possui uma $DL_{50} = 200 - 250 \mu\text{g.Kg}^{-1}(\text{p.c.})$ e anatoxina-a(S) $DL_{50} = 20 \mu\text{g.Kg}^{-1}(\text{p.c.})$ (I.P.) em camundongo (Chorus & Bartram, 1999; Carmichael, 2000; Briand *et al.*, 2003). Os sinais clínicos de envenenamento por ANTX-a seguem progressão de fasciculação muscular, diminuição dos movimentos, respiração abdominal, cianose, convulsão e morte (Carmichael, 2000).

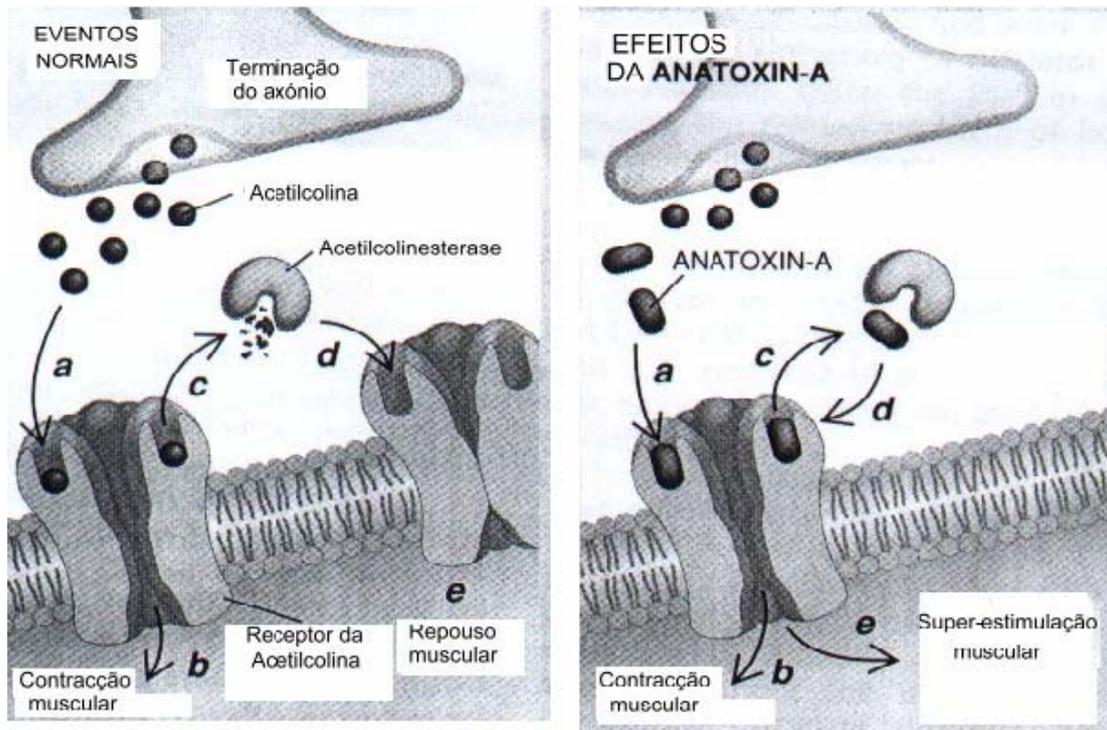


Figura 08. Ação da ANTX-a, provocando uma superestimulação muscular.

Fonte: Carmichael, 1994.

As cianobactérias produzem uma terceira classe de compostos conhecidos como dermatotoxinas que são alergênicas e irritantes ao contato. Existem relatos de seus efeitos em banhistas de praias e rios após o contato com águas que continham cianobactérias. Um dos compostos responsáveis por este tipo de intoxicação, os lipopolissacarídeos (LPS), são também encontrados na membrana da parede celular de bactérias Gram-negativas. São compostos pirogênicos e podem produzir respostas irritantes e alérgicas em humanos e animais quando em contato, além de estarem associados a casos de gastroenterites e problemas inflamatórios (Chorus & Bartram, 1999; Codd *et al.*, 2005; Briand *et al.*, 2003).

Existem outras dermatotoxinas produzidas por cianobactérias marinhas (*e. g.* lyngbyatoxina-A e aplysiatoxina) que foram relacionadas a casos de dermatites agudas, envenenamento e morte de animais, especialmente no Japão e Havaí (Briand *et al.*, 2003).

I.6.3 Biodegradação e biotransformação de cianotoxinas

O termo biodegradação refere-se exatamente a decomposição de uma substância orgânica, natural ou artificial (antropogênica), como por exemplo petróleo, pesticidas, húmus, toxinas e outras. Sabe-se que algumas bactérias apresentam a habilidade de atacarem enzimaticamente e degradarem compostos orgânicos naturais presentes no ambiente aquático. Do ponto de vista ecológico, a “detoxificação” é o papel mais importante dos microrganismos na transformação de um poluente ou de um composto tóxico que ocorre naturalmente. Entretanto a biodegradação de um composto tóxico não significa que os subprodutos resultantes sejam necessariamente menos tóxicos. Geralmente a biodegradação ou transformação completa de uma molécula é função do tempo, visto que algumas substâncias se decompõem mais rapidamente e de forma mais completa que outras (Alexander, 1994).

Segundo Harada & Tsuji (1998), existem cinco vias que podem ser consideradas como contribuintes para as rotas naturais de detoxificação de microcistinas: diluição, adsorção, decomposição térmica auxiliada por pH, fotólise e degradação biológica. Atualmente mais e mais estudos sobre biodegradação de toxinas de cianobactérias estão sendo realizados, visando a busca pela eliminação destes contaminantes dos reservatórios (Lam *et al.*, 1995; Cousins *et al.*, 1996; Takenaka & Watanabe, 1997; Inamori *et al.*, 1998; Lahti *et al.*, 1998; Chorus & Bartram, 1999; Kiviranta *et al.*, 1999; Matthiensen *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2004), uma vez que a biodegradação é uma

alternativa viável e segura de tratamento para remoção de cianotoxinas das águas (Ishii *et al.*, 2004).

Microcistinas são quimicamente estáveis em solução aquosa e microcistinas liberadas das células persistem em lagos por um longo período (Ishii *et al.*, 2004), e só são degradadas sob hidrólise quando expostas a condições altamente ácidas, conforme afirmam Jones *et al.* (1994). Existem trabalhos relatando que mesmo após um período de degradação de um mês, ainda pode haver pequenas concentrações de toxina na água (Jones & Orr, 1994).

Dados comprovam que a porção do radical Adda e do ácido D-glutâmico da molécula de microcistina-LR desempenham papel importante na hepatotoxicidade da microcistina e que a esterificação do grupo carboxil livre do ácido glutâmico resulta, essencialmente, na inativação do composto (Oberholster *et al.*, 2004). Estudos relatam que uma simples mudança na seqüência dos amino ácidos da molécula de microcistina, ou mesmo uma simples metilação ou demetilação de um grupo, pode alterar a hidrofobicidade e alterar drasticamente a toxicidade de alguns compostos, resultando num produto menos perigoso ou mesmo promover a perda da toxicidade desta substância (Matthiensen *et al.*, 2000). Recentemente estudos possibilitaram descobrir uma bactéria aeróbica Gram-negativa, em forma de bastonete, denominada 7CY, com habilidade de realizar a decomposição de toxinas cianobacterianas, isoladas do Lago Suwa, no Japão (Ishii *et al.*, 2004). Essas toxinas eram variantes de microcistinas, MC-LR, -LY, -LW, -LF e nodularina-Har (Fig 09); a bactéria pertence ao gênero *Sphingomonas*.

Estudos realizados por Harada *et al.* (2004) conseguiram degradar a molécula de microcistina isolando o radical Adda por meio de dois produtos intermediários, microcistina-LR linearizada e tetrapeptídeo (Fig. 10). A degradação foi realizada por uma cepa do gênero *Sphingomonas* denominada B-9, e o produto resultante não apresentou

toxicidade, avaliado pelos testes de bioensaio com camundongo e teste de inibição da proteína fosfatase.

Matthiensen *et al.* (2000) realizaram o primeiro estudo que comprovou a biotransformação de microcistinas por uma população bacteriana originária da Lagoa dos Patos, sendo que os compostos resultantes desta biotransformação ainda apresentavam toxicidade, comprovada pela realização de testes de inibição de fosfatases. Bourne *et al.* (1996) isolaram espécies bacterianas do gênero *Sphingomonas* que apresentaram uma nova via enzimática que atua na degradação de microcistina-LR. A rota inicial encontrada foi a abertura do anel de peptídeo da ligação Adda-arg-peptídeo, resultando em um oligopeptídeo linear, o qual foi subseqüentemente degradado. A degradação desta toxina foi mediada por, no mínimo, três enzimas hidrolíticas intracelulares, sendo a primeira e mais importante delas a microcistinase, considerada uma nova metaloprotease. A atividade enzimática da microcistinase produziu a redução de 160 vezes a atividade da hepatotoxina microcistina.

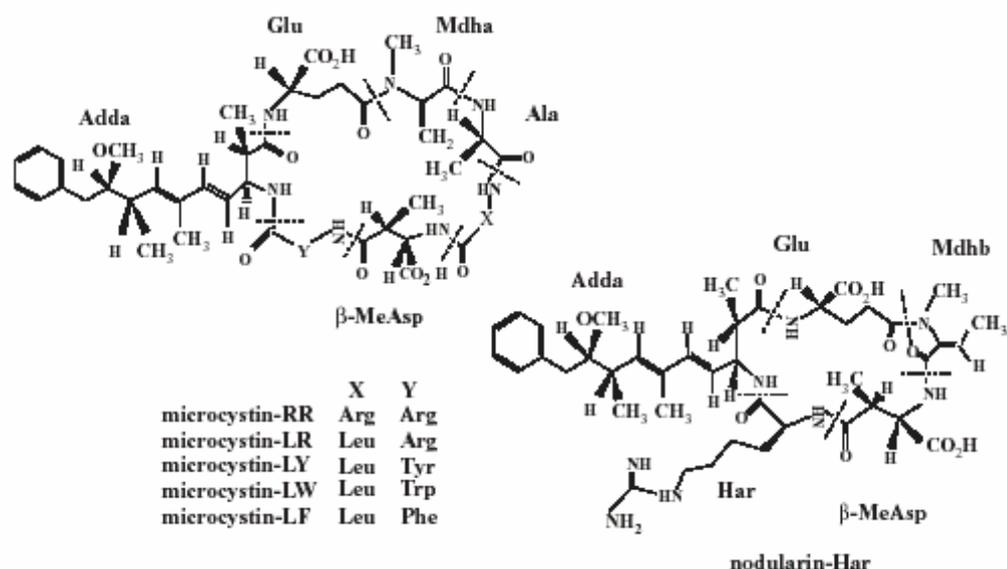


Figura 09. Estrutura química das microcistinas, onde o X e o Y representam os amino ácidos variáveis e nodularina-Har.

Fonte: Ishii *et al.*, 2004.

Jones *et al.* (1994) conseguiram isolar uma bactéria capaz de degradar microcistina-RR e LR, mas não nodularina. A bactéria era uma Gram-negativa esférica, provavelmente do gênero *Pseudomonas* sp.

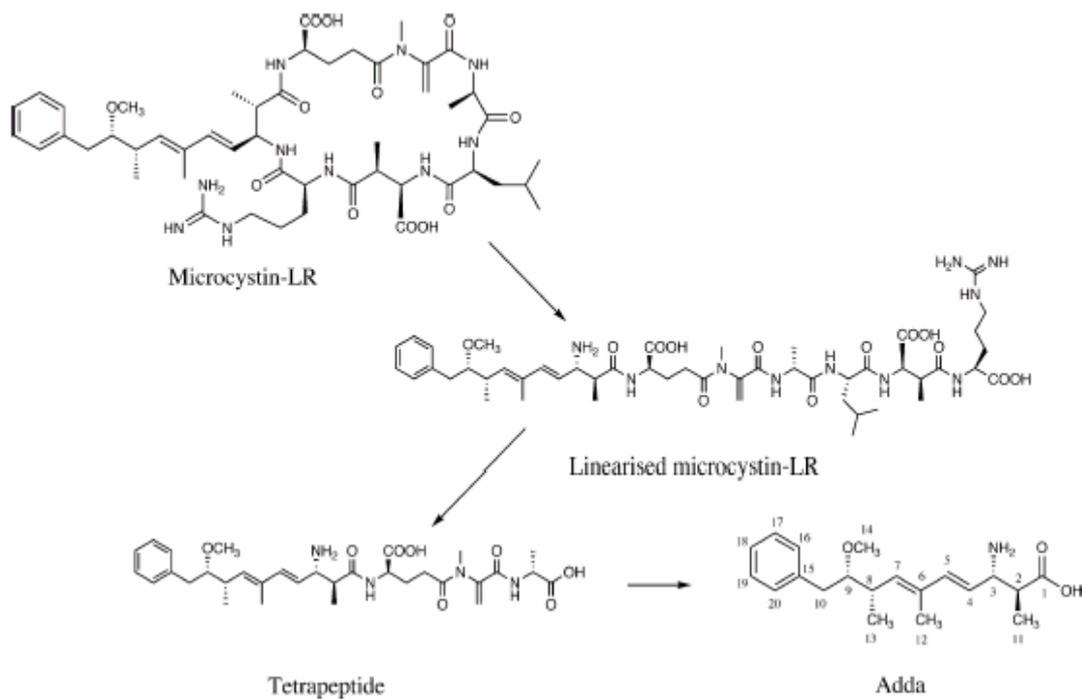


Figura 10. Esquema de degradação microbiana de microcistina-LR onde ocorre uma linearização da molécula.

Fonte: Harada *et al.*, 2004.

Existem trabalhos citando, além da degradação de microcistinas, também a degradação de neurotoxina ANTX-a (Kiviranta *et al.*, 1991; Rapala *et al.*, 1994). Kiviranta *et al.* (1991) observaram degradação de ANTX-a realizada por bactérias esféricas Gram-negativas, provavelmente cepas do gênero *Pseudomonas fluorescens*, identificada pela análise dos ácidos gordurosos da célula. Essa bactéria conseguiu degradar ANTX-a em uma taxa de $6-30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em 3 dias. Inamori *et al.* (1998) realizaram um estudo no qual combinaram microrganismos predadores de cianobactérias com bactérias endêmicas

isoladas de um biofilme. Os organismos do zooplâncton *Aeolosoma hemprichi* e *Philodina erythrophtalma* predavam as células de *Microcystis viridis*, enquanto bactérias realizavam a biodegradação de microcistina-RR.

A utilização de sedimentos em trabalhos de biodegradação de toxinas cianobacterianas (Rapala *et al.*, 1994) também tem apresentado resultados positivos. Esses autores utilizaram água e sedimentos do lago eutrófico Tuusulanjärvi, na Finlândia, durante e depois de uma floração de cianobactéria hepatotóxica ter ocorrido. A ocorrência de degradação de microcistina por bactérias associadas à mucilagem de cianobactéria *Microcystis* também tem sido observada (Maruyama *et al.*, 2003). Para verificar o processo de degradação, estes autores, utilizaram HPLC quantificando a diminuição da concentração de microcistina e, também, a concentração de microcistina extracelular foi analisada através de imunoenaios específicos (ELISA). Alguns trabalhos utilizaram-se de ferramentas genéticas para identificar os microrganismos degradantes de toxinas (Lahti *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Maruyama *et al.*, 2003). Park *et al.* (2001) conseguiram, através do sequenciamento da subunidade 16S do DNAr, identificar uma cepa do gênero *Sphingomonas* designada de Y2, que era capaz de degradar microcistinas RR, YR e LR.

A biodegradação de toxinas de cianobactéria tem sido demonstrada em vários estudos. Além de ser uma alternativa ecológica, é importante devido ao fato da longa persistência das toxinas de cianobactérias, com altas taxas de toxicidade, em águas naturais. Porém o nosso conhecimento sobre degradação de cianotoxinas ainda é muito incompleto e análises bioquímicas das vias degradativas apenas estão no começo.

II. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a dinâmica da biodegradação e/ou biotransformação de microcistinas e anatoxina-a por bactérias aquáticas encontradas no ambiente da região estuarina da Lagoa dos Patos e da região marítima adjacente à praia do Cassino.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1º - Avaliar a existência de degradação biológica de cianotoxinas purificadas e extratos tóxicos de cianobactérias por cepas bacterianas das águas do estuário da Lagoa dos Patos e praia adjacente.

2º - Determinar a taxa de degradação e o tempo necessário para que ocorra a degradação ou transformação completa das cianotoxinas estudadas.

3º - Isolar e identificar, se possível em nível de espécie, as bactérias responsáveis pela degradação de microcistina e anatoxina-a. Em adição a esta atividade, cogita-se a criação de um banco de cultura de bactérias (BCB/UPC), com o objetivo de disponibilizar material biológico necessário a futuras pesquisas.

III. ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa dos Patos está situada entre as latitudes 30° 20' S e 32° 20' S (Fig. 11). É o segundo maior corpo de água do Brasil e o maior sistema lagunar da América do Sul. Ao norte a imensa bacia de drenagem de aproximadamente 200.000 Km², é formada por diversos rios que provêm 75 a 80% da água doce da Lagoa dos Patos (Yunes *et al.*, 1998). A Lagoa dos Patos apresenta um comprimento de aproximadamente 250 Km por 38 Km de largura, perfazendo uma área de 10.360 Km², sendo que a região estuarina representa um décimo da área total da Lagoa dos Patos (Castello, 1978) (Fig. 12).

A cidade do Rio Grande fica às margens do estuário da Lagoa dos Patos. Sendo uma cidade industrial e portuária, contribui com grande carga de nutrientes para as águas do estuário. Próximo a saída do canal da Barra de Rio Grande, as concentrações de nutrientes presentes na água são elevadas, provavelmente devido à contaminação por esgotos domésticos e à descarga de resíduos industriais (Niencheski *et al.*, 1994).

Neste trabalho foram escolhidos dois pontos para coleta de água: Museu Oceanográfico (P1) (Fig. 04 e Fig. 12), localizado dentro do estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino (P2) (Fig. 17), localizado conforme a estátua de Iemanjá (Fig. 12). Estes pontos foram escolhidos na intenção de obter-se amostras de água com diferentes salinidades, visto que o estuário da Lagoa dos Patos apresenta uma disponibilidade de nutrientes e um gradiente de salinidade (Yunes *et al.*, 1990) que possibilita uma variação e diversificação dos organismos locais e, portanto, comunidades bacterianas de locais distintos podem apresentar características distintas.

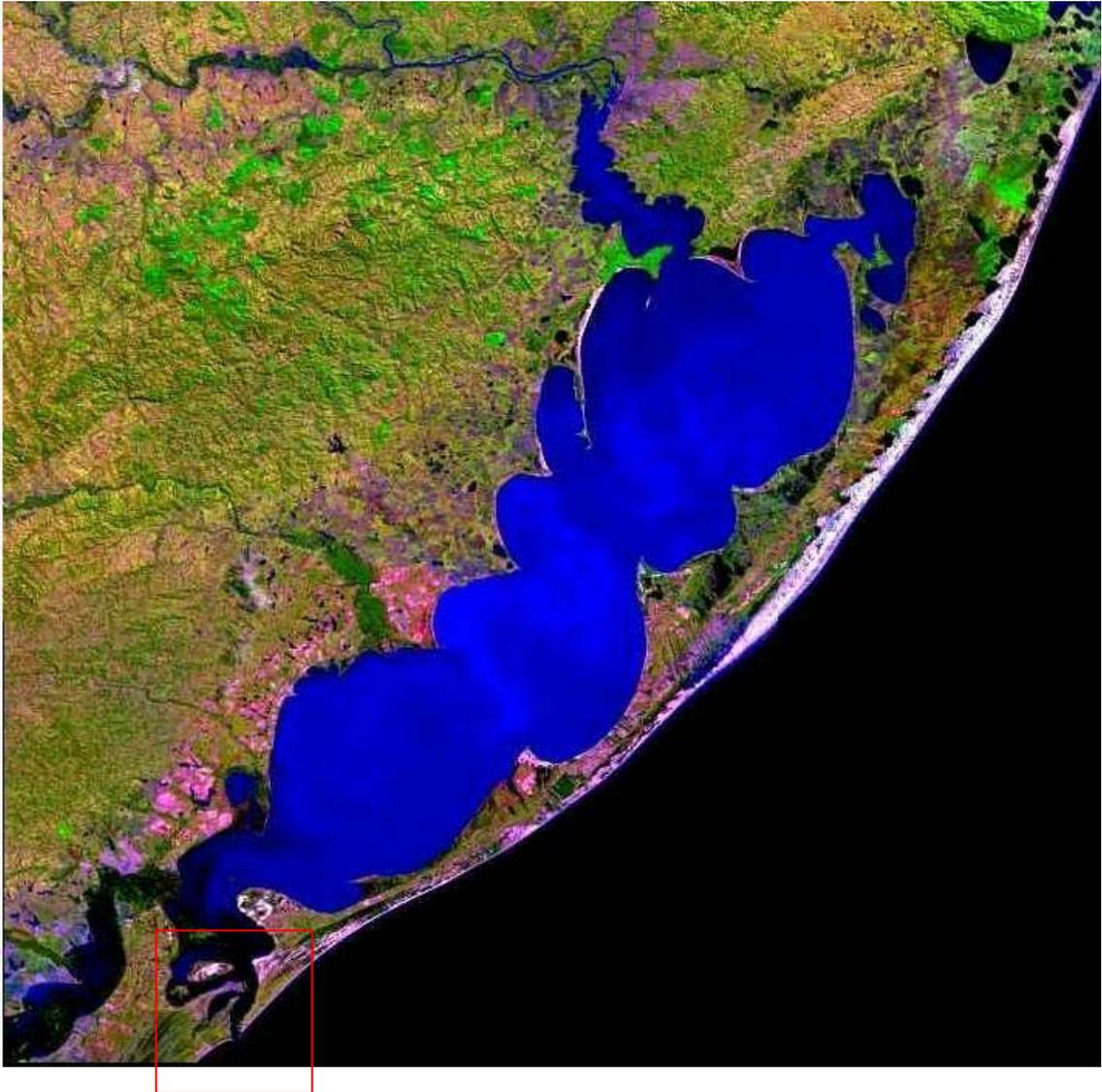


Figura 11. Lagoa dos Patos. Em detalhe o estuário (Fig. 12).

Fonte: www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br/index.htm

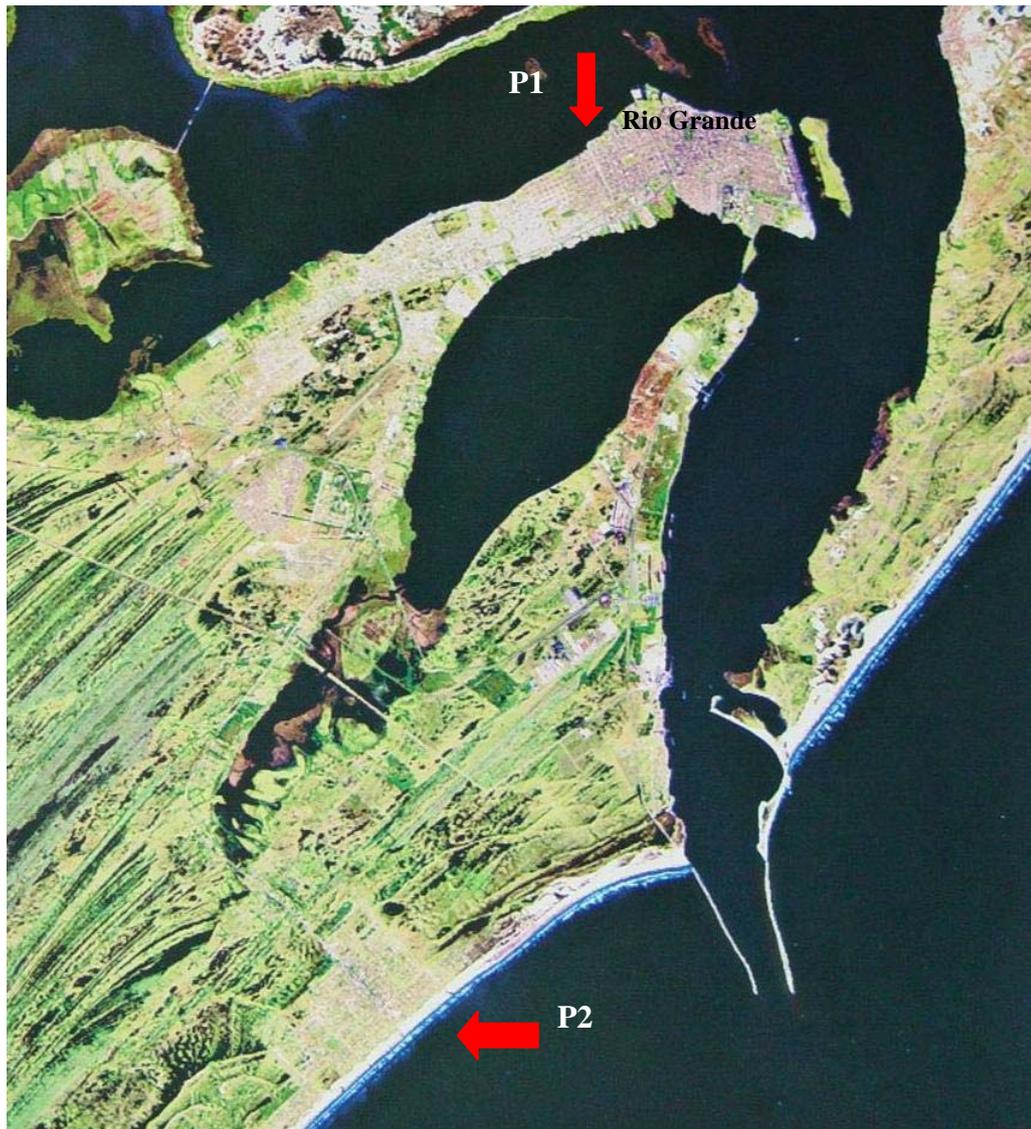


Figura 12. Estuário da Lagoa dos Patos mostrando os pontos de coleta.
Fonte: Ab'Sáber, 2001.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. 1. CULTIVOS

Cultivos massivos de cianobactéria tóxica *Microcystis* RST 9501, proveniente do Banco de Culturas da UPC, foram realizados com o intuito de obter extratos de células contendo a toxina microcistina. Em Erlenmeyers de 2L contendo meio BGN/2 (Rippka *et al.*, 1979) foram feitos os inóculos de *Microcystis* RST 9501 e mantidos em câmara de cultivo (Fig. 13), onde foram permanentemente monitorados. O monitoramento dos cultivos foi feito pela estimativa do aumento da concentração de clorofila-a (Mackiney, 1941), para avaliar a biomassa celular, realizado através da espectrofotometria com UV-visível (Espectrofotômetro – FEMTO 482) (ISO 1992) e a coleta das culturas realizada durante a fase final do crescimento exponencial (curva de crescimento), quando então apresentam a maior concentração de microcistina por célula. Os cultivos foram mantidos em câmara de cultivo (FANEM 347), com temperatura ($20\text{C}^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade controladas ($60 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com alternância de luminosidade (12 horas-luz/12 horas-escuro).

IV. 2. EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS

Os cultivos visaram a extração e semi-purificação de microcistina, segundo Lawton *et al.* (1994). Para o processo de obtenção de extratos celulares contendo microcistinas, seguiu-se o protocolo que se inicia pela coleta dos cultivos e por centrifugação (centrífuga HERMLE Labnet Z323) a 12.000 rpm por 10 min. O material

centrifugado foi congelado e liofilizado (EDWARDS Micromodulyo). Ao material liofilizado foram acrescentados ácido acético em água-destilada (5% v/v) na proporção de 250 mL para cada grama de material liofilizado. A mistura foi agitada por 1 hora. Após a agitação a mistura foi novamente centrifugada a 12.000 rpm por 10 min. Como resultados desta centrifugação obteve-se um sobrenadante e um pellet (centrifugado). Este sobrenadante (S₁) foi armazenado.



Figura 13. Cultivos massivos de *Microcystis* RST9501, pertencente ao Banco de Culturas da UPC (Unidade de Pesquisas em Cianobactérias).

O pellet resultante da primeira centrifugação sofreu o mesmo processo anteriormente descrito (acréscimo de A.A. + H₂O-Destilada (5% v/v) 250 mL e agitação por 1h). Após, a centrifugação da mistura a 12.000 rpm durante 10 min, o pellet foi descartado e o sobrenadante (S₂) foi adicionado ao S₁. Os 500 mL resultantes (S₁ + S₂) foram mantidos em congelador pelo período de 24 horas. Após o descongelamento o extrato foi centrifugado novamente a 12.000 rpm por 10 min e o pellet resultante descartado.

Em uma segunda etapa o extrato foi passado por cartuchos C₁₈ de 3ml/1g (Sep-Pak cartridges) em uma bomba peristáltica (Millipore corporation, USA). Os cartuchos C₁₈ foram previamente ativados com a passagem de 10 mL de metanol e, posteriormente, 10 mL de água-destilada. Após a passagem dos extratos os cartuchos foram congelados por 24 horas. Após o descongelamento os cartuchos foram eluídos com 20 mL de metanol (100%), e os extratos dos cartuchos secos em rota-evaporador a 40°C, à vácuo. Após evaporação o resíduo foi resuspenso com dois volumes de 500µL de metanol e posteriormente analisados em HPLC (cromatografia líquida de alta performance) para determinação da concentração de microcistinas dos extratos purificados. Estes extratos foram utilizados nos experimentos de biodegradação/biotransformação de microcistinas.

IV. 3. COLETAS DE ÁGUA

Foram realizadas duas coletas de água da região estuarina da Lagoa dos Patos (próximo ao Museu Oceanográfico) e da Praia do Cassino (no local em frente à estátua de Iemanjá) com o objetivo de servirem de fonte de bactérias aquáticas para os experimentos de biodegradação/biotransformação de cianotoxinas. Estes dois pontos

foram escolhidos devido às suas distintas condições de salinidade (Tab. 1 e 3) e de possível aporte diferenciado de substâncias orgânicas. Foram coletados com balde plástico, volumes de 1L de amostras de água de superfície, as quais foram armazenadas em garrafas plásticas e acondicionadas em isopor durante o transporte para o laboratório. A temperatura da água foi medida *in situ* no momento da coleta (termômetro INCOTERM) e o pH (pHmetro Marte – DIGIMED) e a salinidade, medida através dos valores de condutividade (condutímetro DIGIMED DM31) (IAPSO, 1985), foram analisados imediatamente após a chegada ao laboratório.

IV. 4. EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO COM EXTRATOS DE *Microcystis* RST 9501 E MICROCISTINA COMERCIAL.

Os experimentos de biodegradação foram divididos em quatro partes, com duplicatas, sendo identificados pelas regiões Museu Oceanográfico (P1) e região da Praia do Cassino (P2), e pelos compostos (toxina comercial pura (Sigma®) e extrato celular purificado de *Microcystis* RST 9501), ficando, assim, denominados: ME (Museu Extrato), IE (Iemanjá Extrato), MP (Museu toxina comercial Pura) e IP (Iemanjá toxina comercial Pura). Amostras de água dos pontos de coleta P1 e P2 foram filtradas, em filtro Whatman 7,0 cm, poro 0,42 µm. Uma fração do extrato foi analisada em HPLC para se quantificar a concentração de microcistina, antes de ser adicionado aos frascos contendo amostras de água do ambiente. Foram adicionados um volume de extrato contendo, aproximadamente, 30 µg de microcistina em 30 mL de amostra de água para obter-se uma concentração aproximada de 1µg.mL⁻¹. Nas amostras com toxinas comerciais foram

colocados 46 µg de microcistina-LR pura (Sigma®) em 45 mL de amostra de água, para obter-se uma concentração aproximada de 1µg.mL⁻¹. As amostras de água com os extratos purificados e com a toxina comercial foram colocadas em frascos âmbar, com tampa de bucha de algodão, e dispostas em uma câmara posicionada na penumbra para evitar uma possível degradação fotolítica (Fig. 14).

A cada 3 ou 4 dias foram retirados um volume de 500µL de sub-amostras, com micropipeta, em uma capela de fluxo contínuo e próximo a um bico de Bunsen, e colocadas em Eppendorfs devidamente etiquetados e congelados (-20°C), para posterior análise em HPLC. No total foram retiradas onze sub-amostras em um período de quarenta e três dias. Antes de serem injetadas em HPLC as sub-amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5415c, Alemanha) a 10.000 rpm por 10 min. As amostras de água destinadas aos controles dos experimentos foram autoclavadas à 120 Kg/cm² por 30min, e posteriormente tratadas como as amostras descritas anteriormente.

IV. 5. EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO DE ANATOXINA-A.

Os experimentos com ANTX-a foram realizados apenas para toxina comercial.

Para o experimento de biodegradação de anatoxina-a, amostras de água dos pontos P1 e P2, em duplicata, foram colocadas em frascos âmbar. A estes frascos, contendo 30 mL de água ambiental, foram adicionados a toxina anatoxina-a (Sigma®) na concentração final de 0,02 µg.mL⁻¹. Estes frascos âmbar, tampados com buchas de algodão, ficaram ao abrigo da luz e da variação brusca de temperatura ambiental, em uma câmara protetora. A cada 3 ou 4 dias foram retirados 500µL de sub-amostras de cada frasco, com micropipeta em uma capela de fluxo contínuo, próximo ao bico de Bunsen, colocados em Eppendorfs devidamente rotulados, e imediatamente congeladas (-20°C) para futura análises em

HPLC. As amostras destinadas aos controles dos experimentos foram autoclavadas e posteriormente sujeitas ao mesmo tratamento e às mesmas condições físicas do restante do experimento.



Figura 14. Câmara protetora, onde foram realizados os experimentos de biodegradação de microcistinas e anatoxina-a.

IV. 6. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE MICROCISTINAS POR HPLC.

As análises das concentrações de microcistina-LR comercial e microcistina do extrato celular purificado de *Microcystis* RST 9501 foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Foi utilizado um sistema cromatográfico Shimadzu SCL-10A_{vp}, equipado com um detector UV-SPD 10A_{vp}, bomba quaternária LC-10AD_{vp} e forno de coluna CTO-10AS_{vp} (Fig. 15), controlados por meio do software CLASS-VP 6.21 SP5. Para esta análise foi utilizado uma coluna C₁₈ (Luna 250X4.6 mm, 5µm) e uma fase móvel de acetonitrila:água a uma proporção inicial de 35:65, variando o gradiente linearmente para 60:40 em 15 min; com fluxo de 1mL/minuto. Os resultados foram monitorados em 238 nm de comprimentos de onda. Um volume de 20µL foi injetado no sistema e quantificados por uma curva padrão para microcistina-LR em metanol. Os experimentos contendo extratos purificados de *Microcystis* RST 9501 foram quantificados como MC-LR equivalentes.

IV. 7. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ANATOXINA-A POR HPLC.

As análises das concentrações de anatoxina-a foram realizados pelo método de derivatização pré-HPLC. A derivatização da toxina anatoxina-a foi alcançada usando uma modificação do procedimento desenvolvido por Watanabe & Imai (1981). As amostras foram misturadas com 4-fluoro-7nitro-2,1,3-benzodiazole (NBD-F) em acetonitrila (1mg.L⁻¹, 50µL) e borato de sódio 0,1M em frasco âmbar a temperatura ambiente por

10min. A reação foi terminada adicionando HCl 1M (50 μ L) à mistura de reação. Para análise de anatoxina-a o cromatógrafo foi equipado com coluna C₁₈ (Synergi 250X4.6mm, 4 μ m). Foi utilizado uma fase móvel isocrática de acetonitrila:água (55:45), com fluxo de 0,9 ml/minuto. As amostra foram injetadas (20 μ L) e analisadas por um detector RF 10 Axl dotado de um monitor de fluorescência (λ_{ex} =470 λ_{em} =530nm). Os dados foram analisados pelo software CLASS VP 6.21 SP5.



Figura 15. Sistema de cromatografia líquida (HPLC), com seus periféricos.

IV. 8 ISOLAMENTO DAS CEPAS RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO DE TOXINAS.

No final do experimento, após a última coleta de amostras para análises em HPLC, sub-amostras foram retiradas de cada frasco, com auxílio de micropipetas e utilizando bico de Bunsen, em capela de fluxo contínuo, e foram inoculadas em Placas de Petri com meio sólido contendo Meio Minimum Salt (MMS, Morsen & Rehn, 1987) + glicose + Ágar. Após o surgimento de colônias mistas de bactérias na placa de Petri, estas bactérias foram semeadas isoladamente em meio sólido contendo MMS + microcistina comercial + Ágar. Os inóculos foram incubados a temperatura controlada de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e períodos de alternância de luminosidade (12 horas-luz/ 12 horas-escuro).

IV. 9. ANÁLISE DE MICROCISTINAS POR IMUNOENSAIO ELISA

As análises das concentrações de microcistinas por teste de imunoenaios (ELISA), usando anticorpos específicos para microcistina, foram realizadas com o objetivo de avaliar o reconhecimento pelos anticorpos da presença das moléculas desta toxina após a observação de degradação biológica. A primeira e a última amostra dos experimentos foram diluídas 4000x em água-destilada para adequação das concentrações à curva de calibração do imunoensoio. Foi utilizado Kit ELISA Envirologix® (Microcystin Plate Kit). O protocolo de execução seguiu a metodologia recomendada pelo fabricante.

IV. 10. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR MEIO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Para a identificação dos microrganismos isolados, por demonstrarem capacidade de biodegradação ou biotransformação das cianotoxinas testadas, utilizou-se de métodos de biologia molecular, uma vez que estes métodos permitem atualmente identificar com precisão um grande número de bactérias. Foi utilizado um protocolo no qual o DNA foi purificado utilizando-se métodos de isolamento por precipitação com sal (Aljanabi & Martinez, 1997). Os organismos foram coletados das culturas em Placas de Petri, e transferidos para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL contendo tampão de extração (0,4M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 2mM EDTA pH 8,0, 2% SDS, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteinase K) num volume final de 400 μL . Após a incubação adicionou-se 300 μL de uma solução saturada de NaCl (aproximadamente 6 M). Os Eppendorfs foram agitados para homogeneizar a solução. As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5min, sendo transferido 600 μL do sobrenadante para novos Eppendorfs. O DNA foi precipitado com a adição de 600 μL de álcool isopropílico, e a mistura foi incubada por, pelo menos, 1h a -20°C . Cada amostra foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C . Descartou-se todo o sobrenadante e ao pellet foi adicionado 1mL de etanol 70% e agitado para lavagem. Centrifugou-se a 10.000g por 5 – 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e secou-se a amostra a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. O precipitado foi resuspenso em 50 μL TE pH 8,0. O material extraído foi analisado para verificar sua integridade e estimar sua concentração em eletroforese de gel de agarose 0,8%. A concentração foi estimada utilizando-se como padrão um marcador molecular (ΦX -174/HaeIII – Invitrogen®).

Para identificação foi utilizado como marcador molecular a subunidade 16S DNAr. O marcador foi amplificado através do método de PCR utilizando os primers universais 5'EPSILON (GAG AST TTG ATC MTG GCT CAG) e o Primer 1541R (AAG GAG GTG ATC CAG CC). As reações de PCR foram feitas em 50µL, utilizando-se 5µL de cada amostra. Em tubos Eppendorfs de 1mL preparou-se um MIX (36µL de H₂O ultrapura (Milli-Q) autoclavada, 5µL tampão (Buffer) 10X, na concentração 1X, 1µl de primer 5'EPSILON (10 µM), 1µL Primer 1541R (10 µM), 1µL de dNTP (0,2 µM) , 1µL de Tth DNA-polimerase (1U/1µl) e 5µL de DNA da amostra). O perfil utilizado no termociclador (GeneAmp PCR System 2400 Perkin Elmer) foi denominado de “chu_45°C” (Chu *et al.*, 2003), o qual foi composto de 30 ciclos, com variação de temperatura de 94°C, 45°C e 72°C, a cada ciclo. Os resultados das reações foram verificados através de eletroforese em um gel de agarose submerso de 1,0% (Sambrook *et al.*, 1989) (Fig. 16) utilizando como marcador padrão 1 kb Ladder – Plus (Invitrogen®). O material de PCR foi enviado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (**UFPel**), para sequenciamento.

Os sequenciamentos possibilitaram a comparação das subunidades 16S do DNAr como marcador (Aman *et al.*, 1995), com seqüências depositadas no site do Ribossomal Database Project II (<http://www.rdp.cme.msu.edu/html>).

IV. 11. SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR foram tratados com ExoSap ou gel purificado usando o kit de purificação de DNA GFX PCR (Amersham Biosciences) e seqüenciado conforme descrito abaixo.

A seqüência do produto de PCR foi determinada utilizando-se 1µL da reação de amplificação juntamente com o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET termination (Amersham Biosciences, Upsala, Suécia) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. As reações de sequenciamento foram analisadas em um seqüenciador automático MegaBACE 500 (Amersham) e os fragmentos seqüenciados quatro vezes sendo a qualidade das seqüências verificadas pela sobreposição dos fragmentos reunidos utilizando os programas BioEdit e Vector NTI 8.0, AlingnX e ContigExpress (InforMax, Inc.). A determinação da seqüência consenso foi feita pelo alinhamento dos produtos obtidos utilizando o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997).

A seqüência consenso foi comparada à seqüência depositadas no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

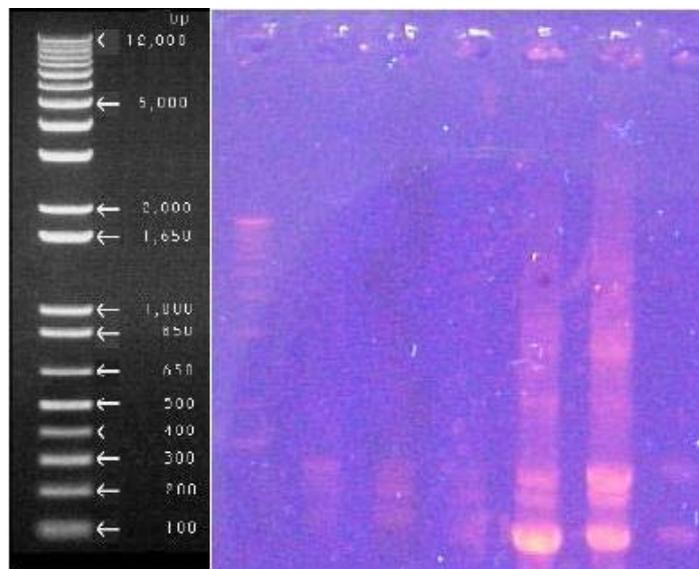


Figura 16. Padrão de bandas e eletroforese em gel de agarose 1,0%, observando-se as bandas das amostras de DNA.

V. RESULTADOS

V.1. MICROCISTINAS

A verificação do crescimento dos cultivos de *Microcystis* RST 9501 foi estimado através do monitoramento da concentração de clorofila-a. Estes dados permitiram inferir o final da fase exponencial de crescimento dos cultivos, quando então foram realizadas as colheitas para extração e purificação dos extratos celulares. O período escolhido para as coletas variaram entre 45 e 50 dias aproximadamente, quando os valores de clorofila-a ultrapassaram as concentrações de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os dados que caracterizam as águas dos pontos P1 (Fig. 04) e P2 (Fig. 17), situados em locais de grande distância entre si (Fig. 12), apresentam variação em termos de salinidade e uma ligeira variação na temperatura indicando que estas águas possuem características diferenciadas (Tab. 1), que provavelmente influíram na obtenção das espécies bacterianas dos experimentos de biodegradação.



Figura 17. Extensão da Praia do Cassino, mostrando local (flecha em vermelho) de coletas de amostras de águas.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos das águas utilizadas nos experimentos de biodegradação de microcistinas.

Local	DATA	pH	CONDUTIV.	SALINIDADE	t°C água
Museu (P1)	13/07/2004	7,76	18,90 mS/cm	11,16	14°C
Iemanjá (P2)	13/07/2004	7,87	35,2 mS/cm	22,14	15°C

As comunidades bacterianas da Lagoa dos Patos e da região da Praia do Cassino foram hábeis para realizar a degradação de microcistinas. Nos experimentos em que foram testados extratos celulares de *Microcystis* RST 9501 e microcistina comercial pura foram observados degradação das toxinas pelas comunidades bacterianas destas regiões (Fig. 18, 19, 20, 21). As concentrações de microcistinas são apresentadas como percentual do total de toxina inicialmente adicionada aos experimentos visando uma padronização para apresentação dos dados e para facilitar a comparação entre tratamentos. Os dados apresentados indicam que nos experimentos em que se utilizou extratos celulares de *Microcystis* RST 9501 foi necessário um período maior para a ocorrência do início da degradação. Nos experimentos em que se utilizou a toxina comercial pura foram observados diminuição das concentrações desta toxina, verificando-se a degradação total em um período médio de tempo de aproximadamente 10 dias (Fig. 19 e 21), enquanto que nos experimentos com extratos celulares esse tempo foi de cerca de 20 dias (Fig. 18 e 20), ou seja, o dobro do tempo necessário para biodegradação total. A confirmação da ocorrência de degradação foi observada por meio da diminuição dos picos cromatográficos (Fig. 22, 23, 24, 25). As taxas de biodegradação são mostradas na Tab. 2.

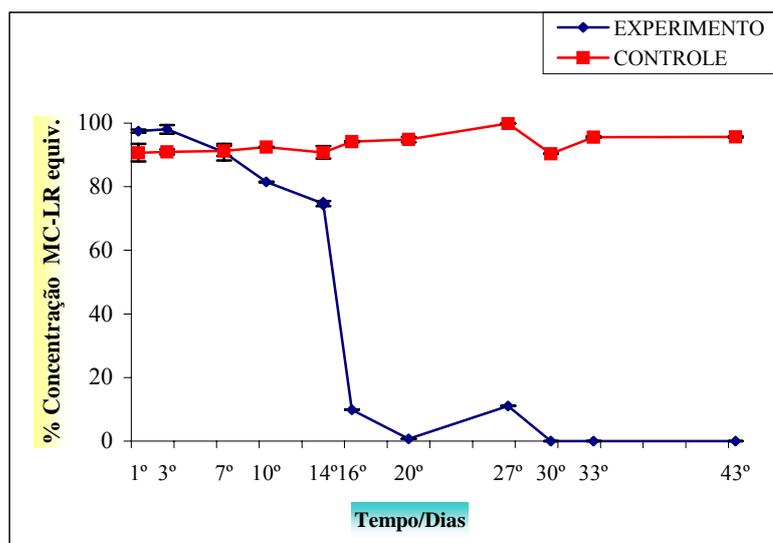


Figura 18. ME. Percentual das concentrações de microcistina no experimento de degradação com extrato purificado tóxico de *Microcystis* RST 9501 em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1). 100% equivale ao total de microcistina presente no extrato celular adicionado à amostra.

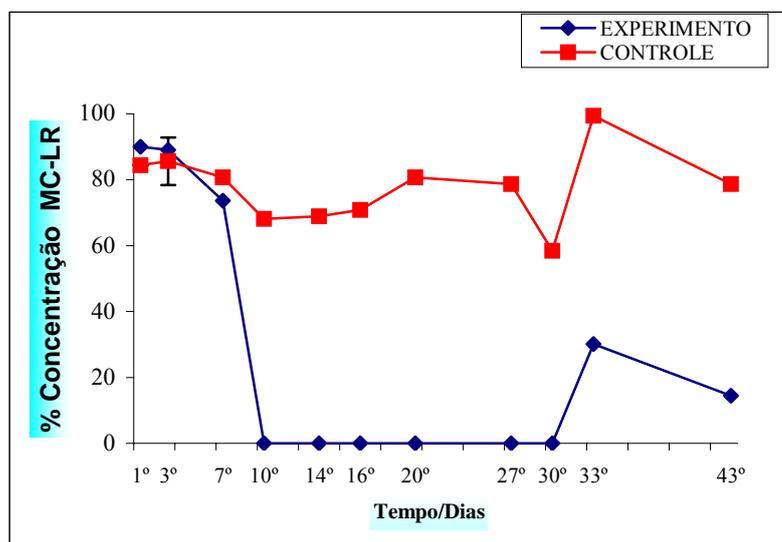


Figura 19. MP. Percentual das concentrações de MC-LR no experimento de degradação com toxina comercial pura em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1). 100% equivale ao total de MC-LR adicionada à amostra.

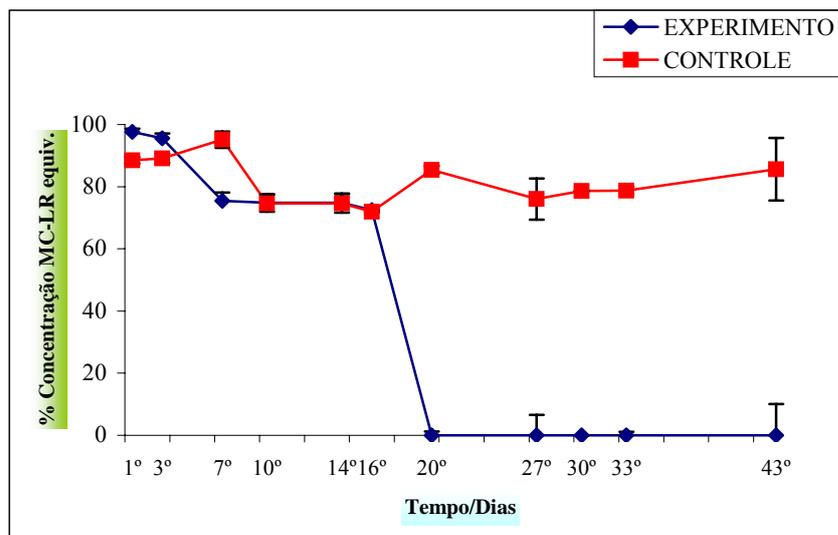


Figura 20. IE. Percentual das concentrações de microcistinas no experimento de degradação com extrato purificado de *Microcystis* RST 9501 em amostra de água da região da Praia do Cassino (P2). 100% equivale ao total de microcistina presente no extrato celular, adicionada à amostra.

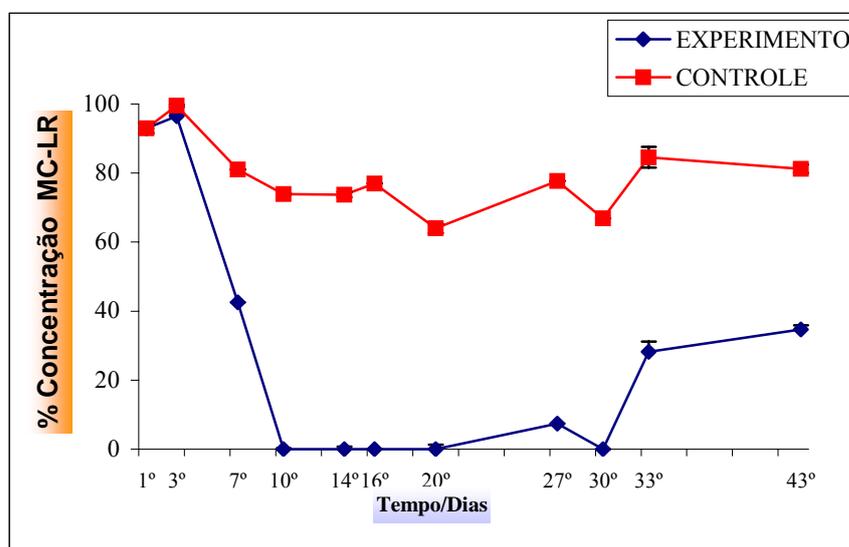


Figura 21. IP. Percentual das concentrações de MC-LR no experimento de degradação com toxina comercial em amostra de água da região da Praia do Cassino (P2). 100% equivale ao total de MC-LR adicionada à amostra.

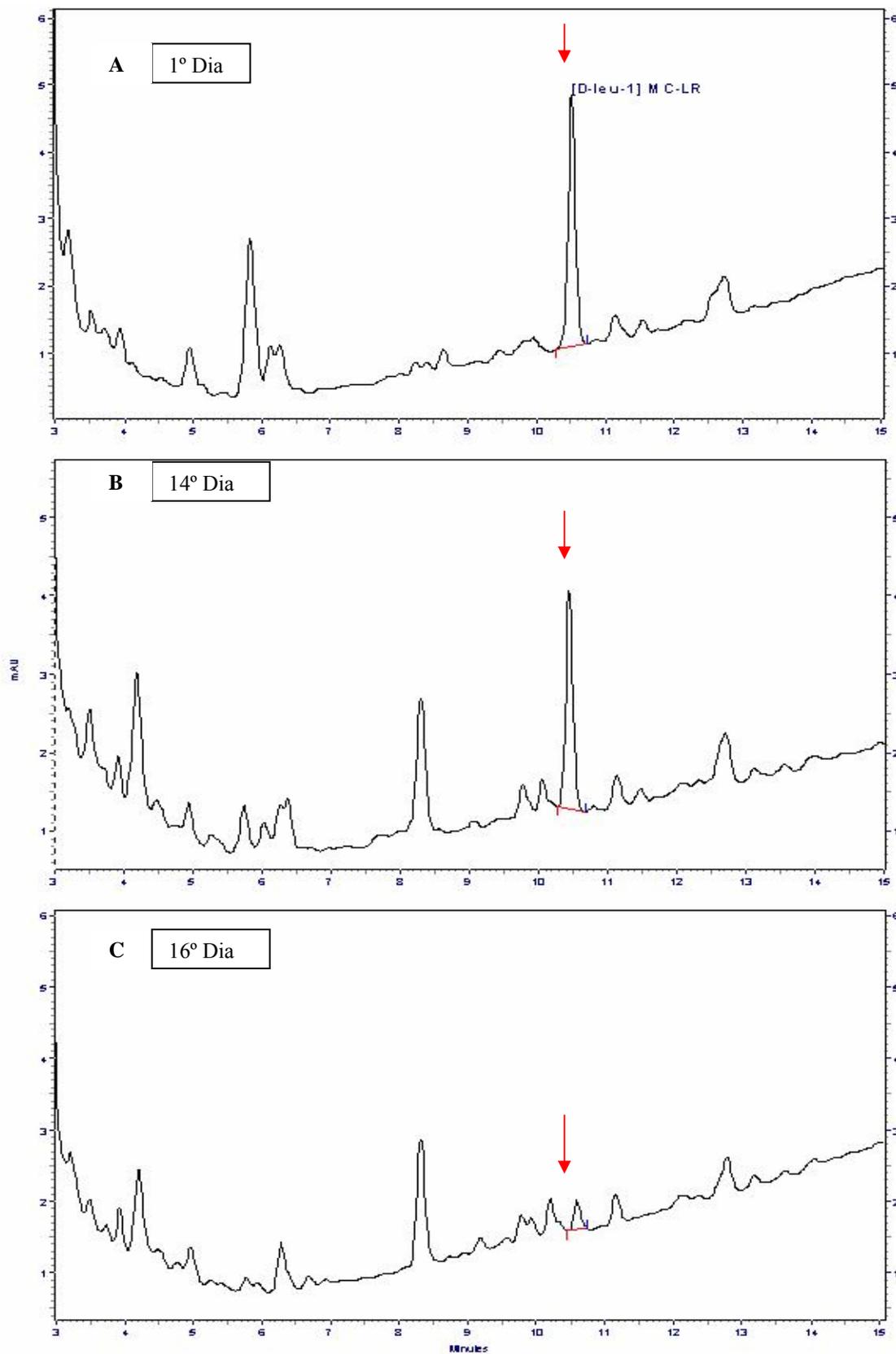


Figura 22. ME. Cromatogramas mostrando a diminuição do pico de [D-Leu¹] MC-LR do extrato celular do experimento de degradação com amostra de água do ponto P1.

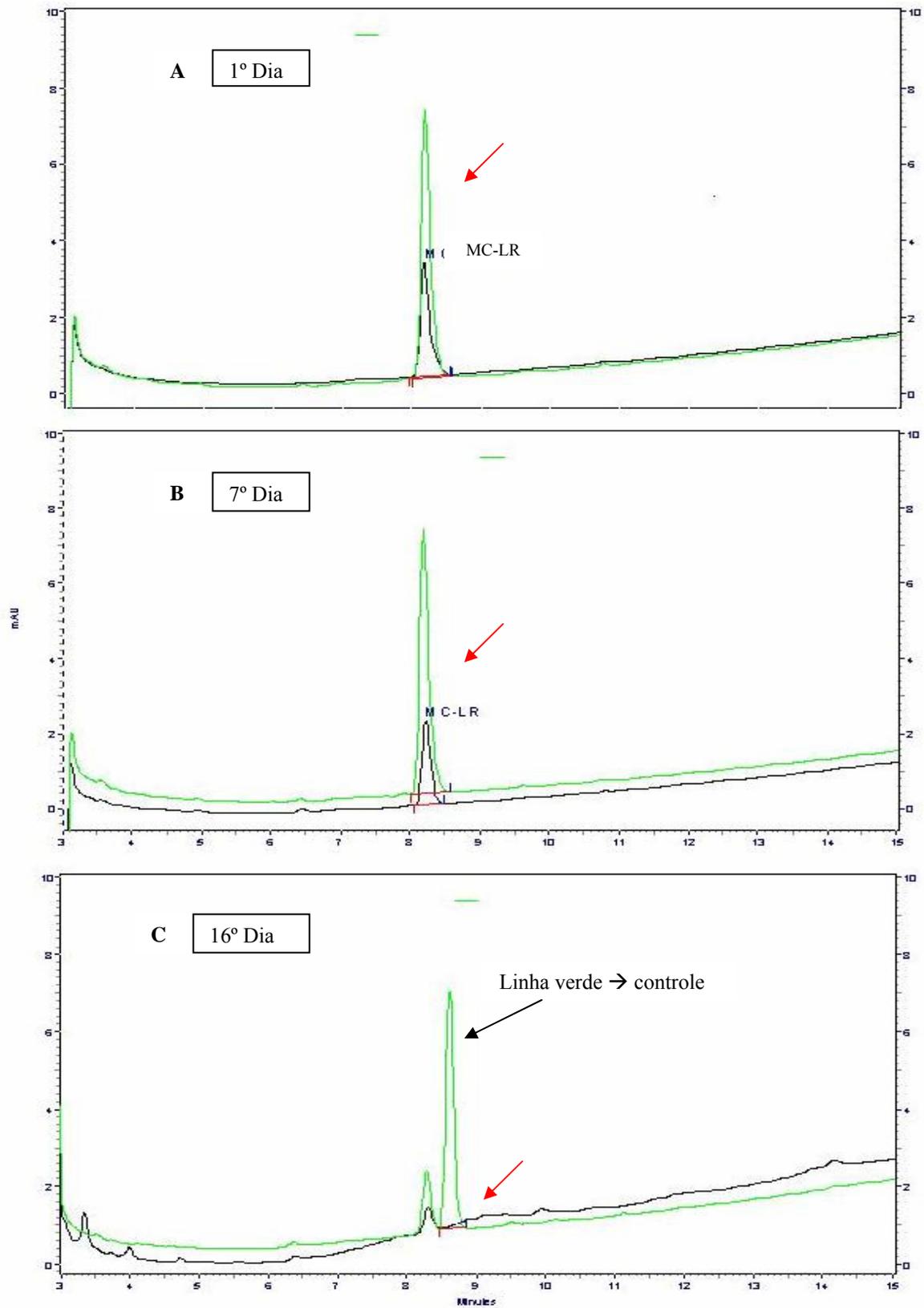


Figura 23. MP. Cromatogramas mostrando diminuição do pico de MC-LR comercial do experimento de degradação com amostra de água do ponto P1.

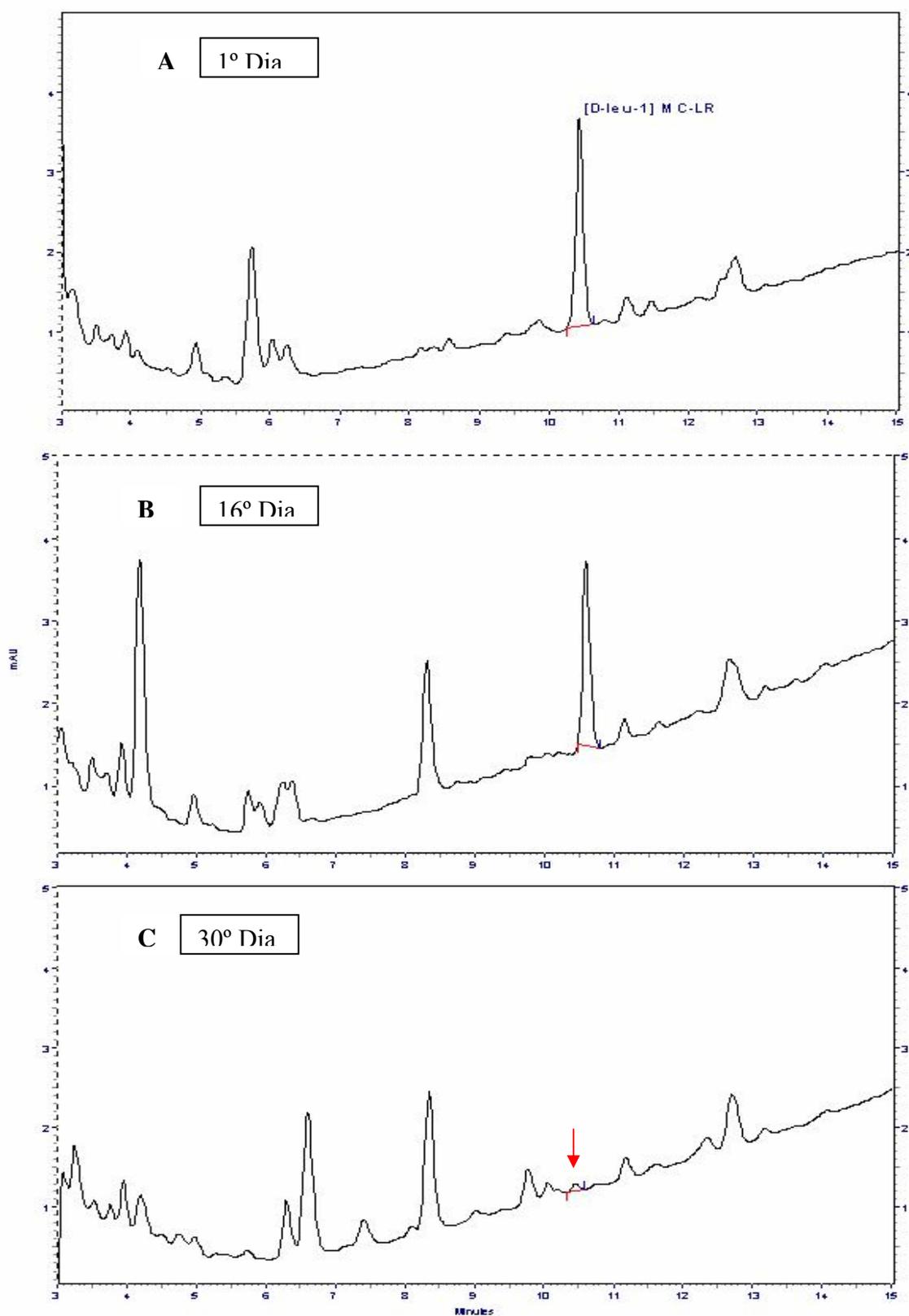


Figura 24. IE. Cromatogramas mostrando a diminuição do pico de [D-Leu¹] MC-LR do experimento de degradação de extrato celular com amostra de água do ponto P2.

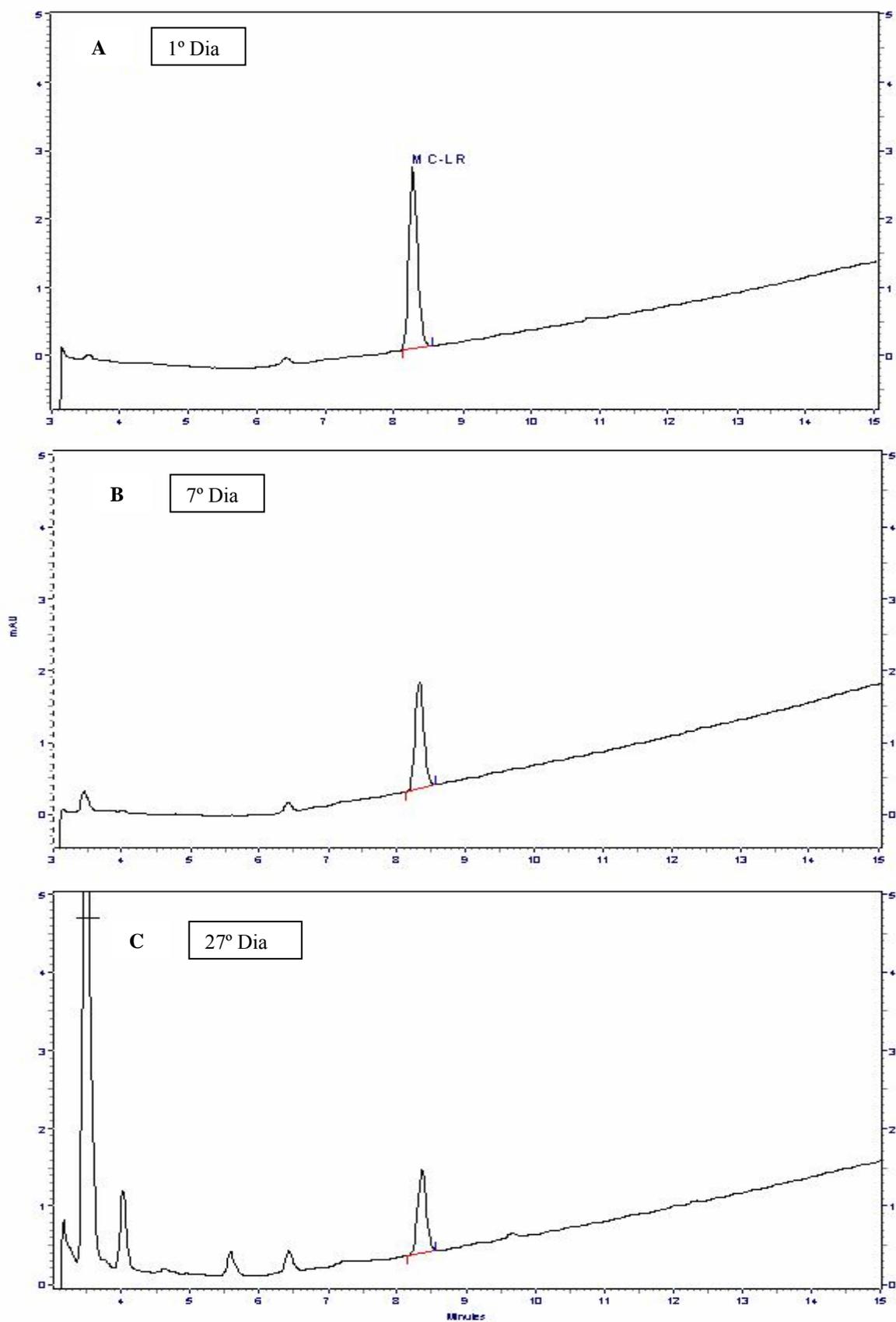


Figura 25. IP. Cromatogramas mostrando a diminuição do pico de MC-LR comercial do experimento de degradação com amostras de águas do ponto P2.

Os gráficos das figuras 26, 27, 28, 29 apresentam os resultados dos testes de imunoenaios específicos (ELISA) para microcistinas. Estes testes foram realizados com amostras do 1º e último dias de coletas dos experimentos com microcistinas e permitiram avaliar se ao final do 43º dia os anticorpos específicos para microcistina ainda reconheciam moléculas da toxina.

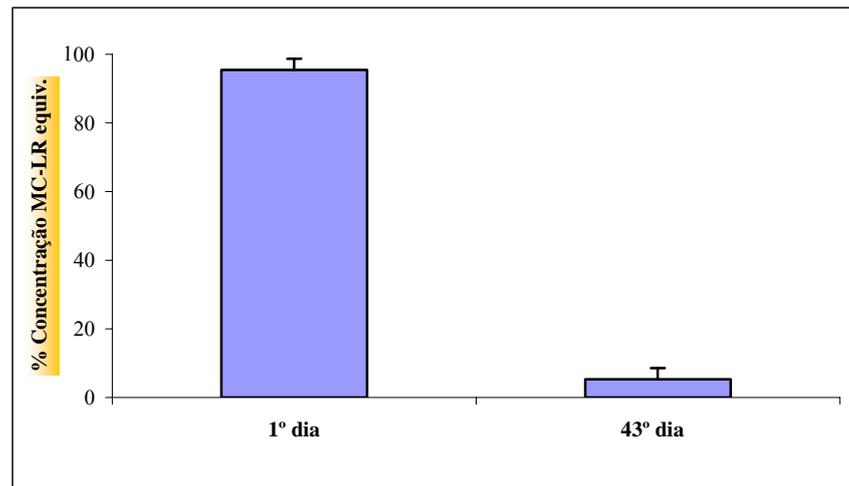


Figura 26. ME. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina do extrato de *Microcystis* RST 9501 com amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).

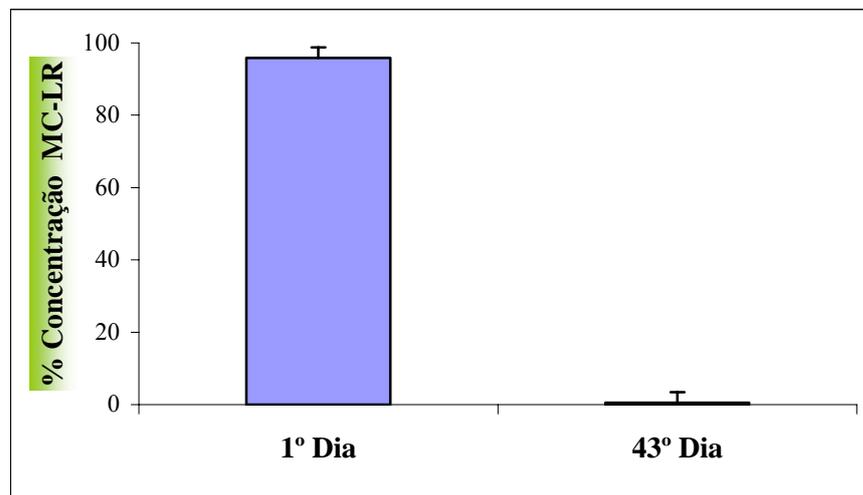


Figura 27. MP Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina comercial com amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).

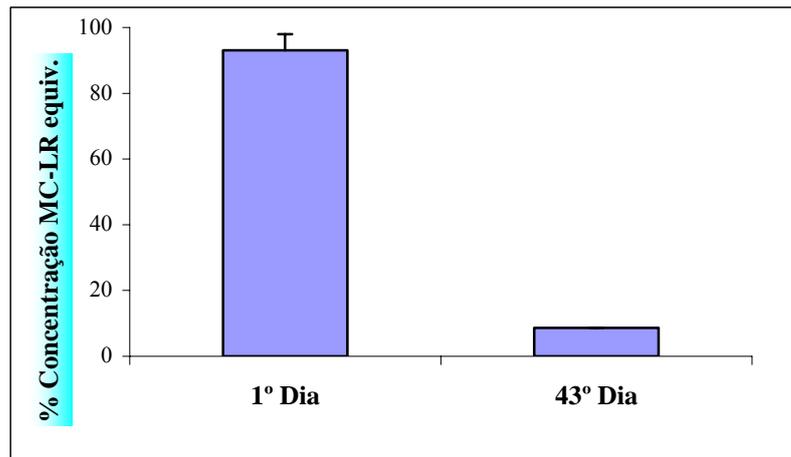


Figura 28. IE. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina do extrato purificado de *Microcystis* RST 9501 com amostra de água da Praia do Cassino (P2).

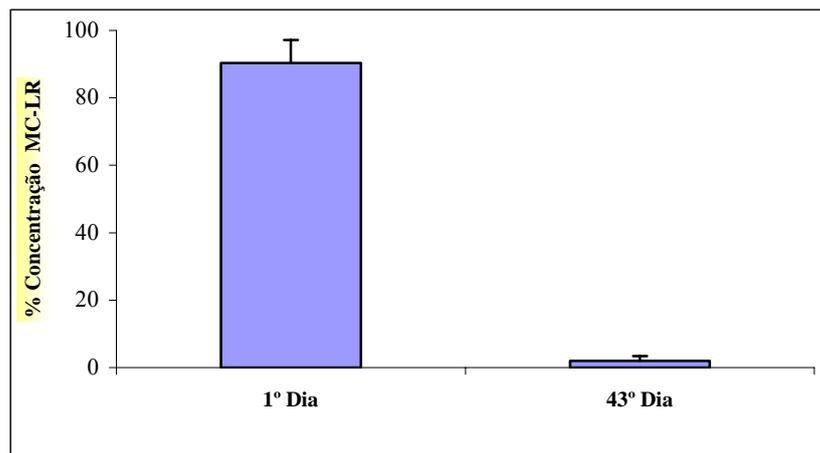


Figura 29. IP. Teste ELISA do experimento de biodegradação de microcistina comercial com amostra de água da Praia do Cassino (P2).

Estes resultados mostram que ao final dos experimentos (43º dia) de biodegradação de microcistinas os anticorpos dos testes ELISA não reconheceram, ou então reconheceram em baixas concentrações (menos de 10% da concentração inicial), os possíveis compostos biotransformados presentes no extrato celular purificado e na toxina comercial, para ambos os pontos de coleta (P1 e P2).

Tabela 2. Taxas de degradação de microcistina-LR e microcistina presente no extrato de *Microcystis* RST 9501.

EXP.	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE TOXINA µg/L	TAXA DE DEGRADAÇÃO TOTAL	% DE DEGRADAÇÃO TOTAL [] toxina/dia	TAXA DEG. EFETIVA [] toxina/dia
ME	914,20	45,71 µg.MC- LR.equiv.L ⁻¹ .dia ⁻¹	5%	5,7 %
MP	862,30	86,23 µg.MC-LR.L ⁻¹ .dia ⁻¹	10%	12,71 %
IE	16,30	0,81 µg.MC- LR.equiv.L ⁻¹ .dia ⁻¹	5%	5,64 %
IP	811,30	81,13 µg.MC-LR.L ⁻¹ .dia ⁻¹	10%	13,71 %

Obs: EXP. = Experimento

[] = Concentração

* A taxa de degradação total foi calculada pela divisão da concentração total de toxina adicionada ao experimento pelo tempo no qual não foi mais detectada a toxina no experimento (incluindo a fase “lag”).

** A taxa de degradação efetiva foi calculada pela divisão da concentração total de toxina presente no experimento no tempo de coleta imediatamente anterior a observação de biodegradação pelo número de dias no qual não foi mais detectada a toxina no experimento.

Os resultados obtidos com os experimentos de degradação de microcistina possibilitaram estimar as taxas de degradação total e as taxas de degradação efetiva dos experimentos, demonstrando haver uma razão numérica entre degradação da toxina presente nos extratos e a degradação da toxina comercial pura. Embora as concentrações das toxinas adicionadas às amostras de água dos dois pontos de coleta fossem diferentes, a estimativa das taxas permitiu verificar a proporção entre tempo de degradação da toxina dos extratos e das toxinas comerciais.

V.2 ANATOXINA-A

Dentre as características das amostras de água coletadas para o experimento de degradação de anatoxina-a (Tabela 3), a salinidade foi o parâmetro mais variável.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos das águas utilizadas nos experimentos de biodegradação de anatoxina-a.

Local	DATA	pH	CONDUTIV.	SALINIDADE	t°C água
Museu (P1)	01/10/2004	8,28	18,90 mS/cm	17,73	13°C
Iemanjá (P2)	01/10//2004	8,05	35,2 mS/cm	23,82	13,5°C

Nos experimentos com anatoxina-a, a toxina purificada sofreu degradação (Fig. 29 e 30) tanto pela comunidade bacteriana das águas da região do Museu Oceanográfico, como por bactérias das águas da região da Praia do Cassino. Deve-se notar que as duas comunidades bacterianas apresentaram características próprias, degradando a toxina em tempos diferentes (Tabela 4).

Tabela 4. Taxas de degradação de anatoxina-a.

EXP.	TAXAS DE DEGRADAÇÃO TOTAL	% DEGRADAÇÃO TOTAL	TAXA DEG. EFETIVA
MA	1360 $\mu\text{g}.\text{ANTX-a}.\text{L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	5,88 %	5,88%
IA	1190 $\mu\text{g}.\text{ANTX-a}.\text{L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$	5,26 %	5,26%

Os resultados obtidos na degradação da anatoxina-a possibilitaram verificar que as taxas de degradação não apresentaram grande variação. As taxas de degradação efetiva foram iguais as taxas de degradação total pelo fato que a degradação da toxina começou imediatamente a adição da toxina à amostra de água, não havendo uma fase de adaptação do metabolismo bacteriano.

As figuras 30 e 31 mostram a degradação de anatoxina-a já a partir da 2ª coleta de amostras do experimento, demonstrando uma ausência de fase “lag”.

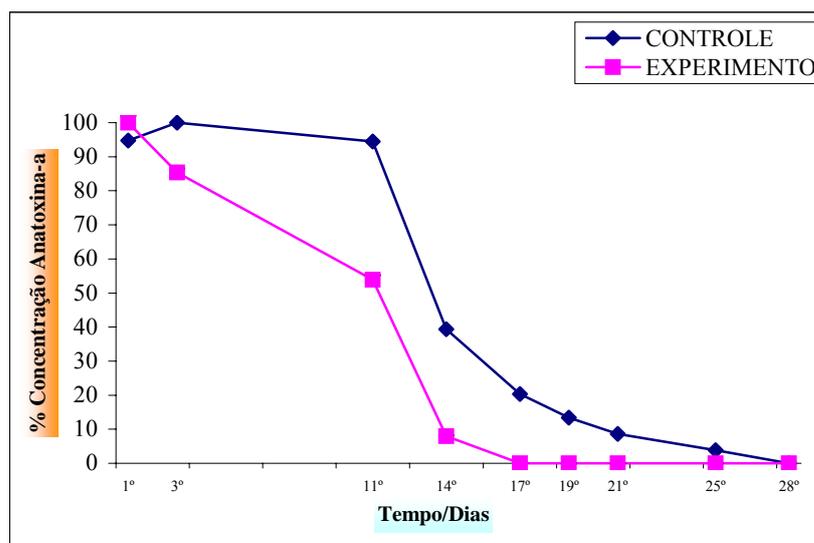


Figura 30. MA. Percentual das concentrações de anatoxina-a do experimento de biodegradação, com amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1). 100% equivale ao total de anatoxina-a adicionada à amostra.

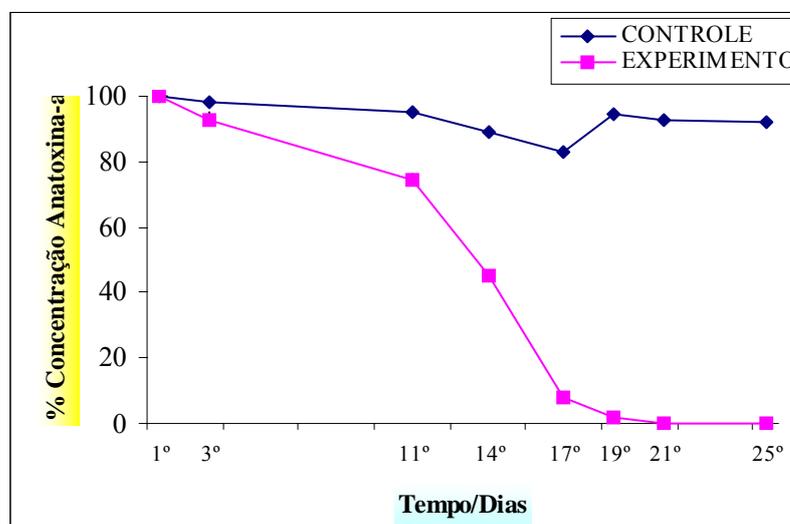


Figura 31. IA. Percentual das concentrações de anatoxina-a do experimento de biodegradação, com amostra de água da região da Praia do Cassino (P2). 100% equivale ao total de anatoxina-a adicionada à amostra.

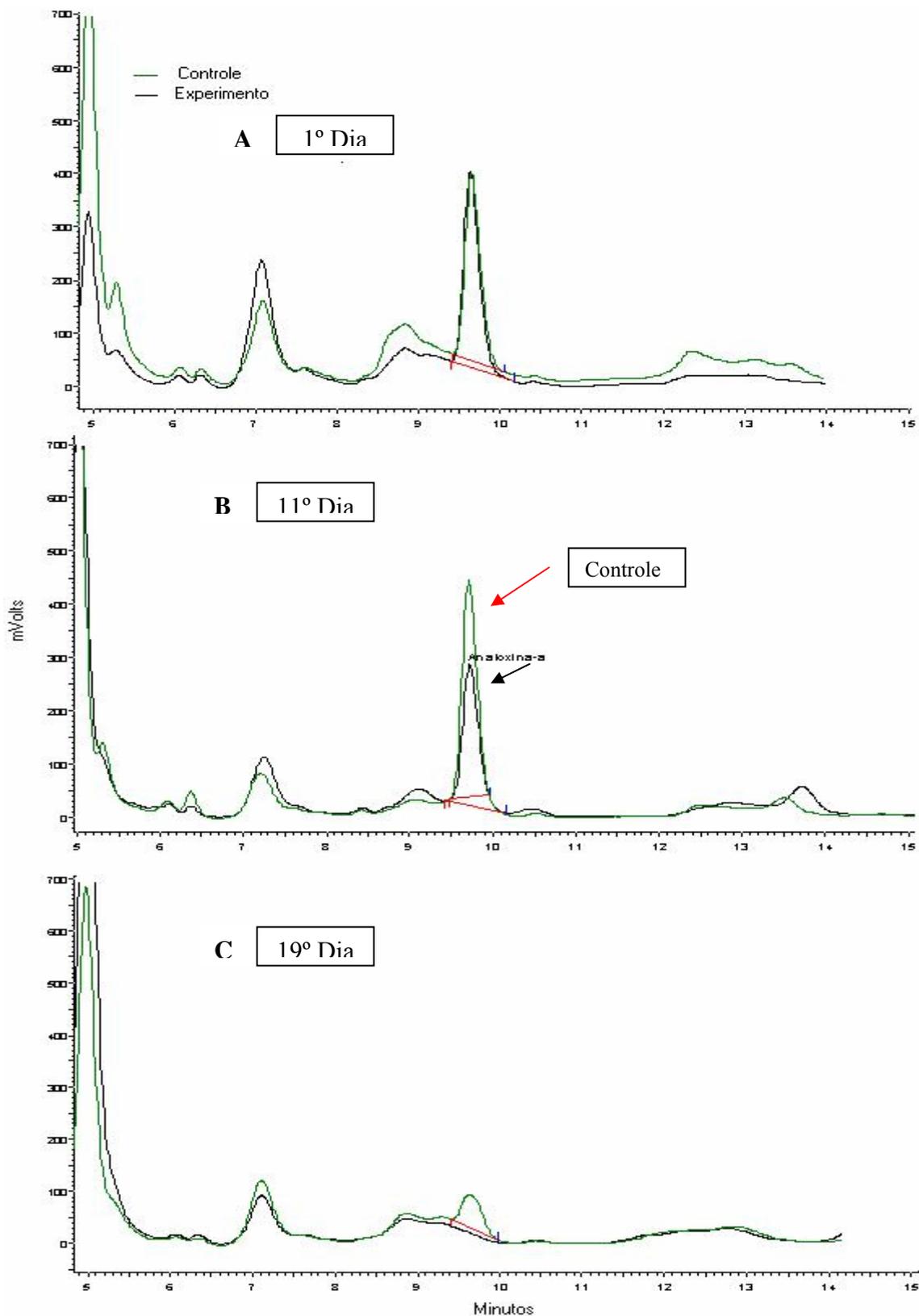


Figura 32. MA. Cromatogramas mostrando diminuição do pico de anatoxina-a do experimento de degradação, com amostra de água do ponto (P1).

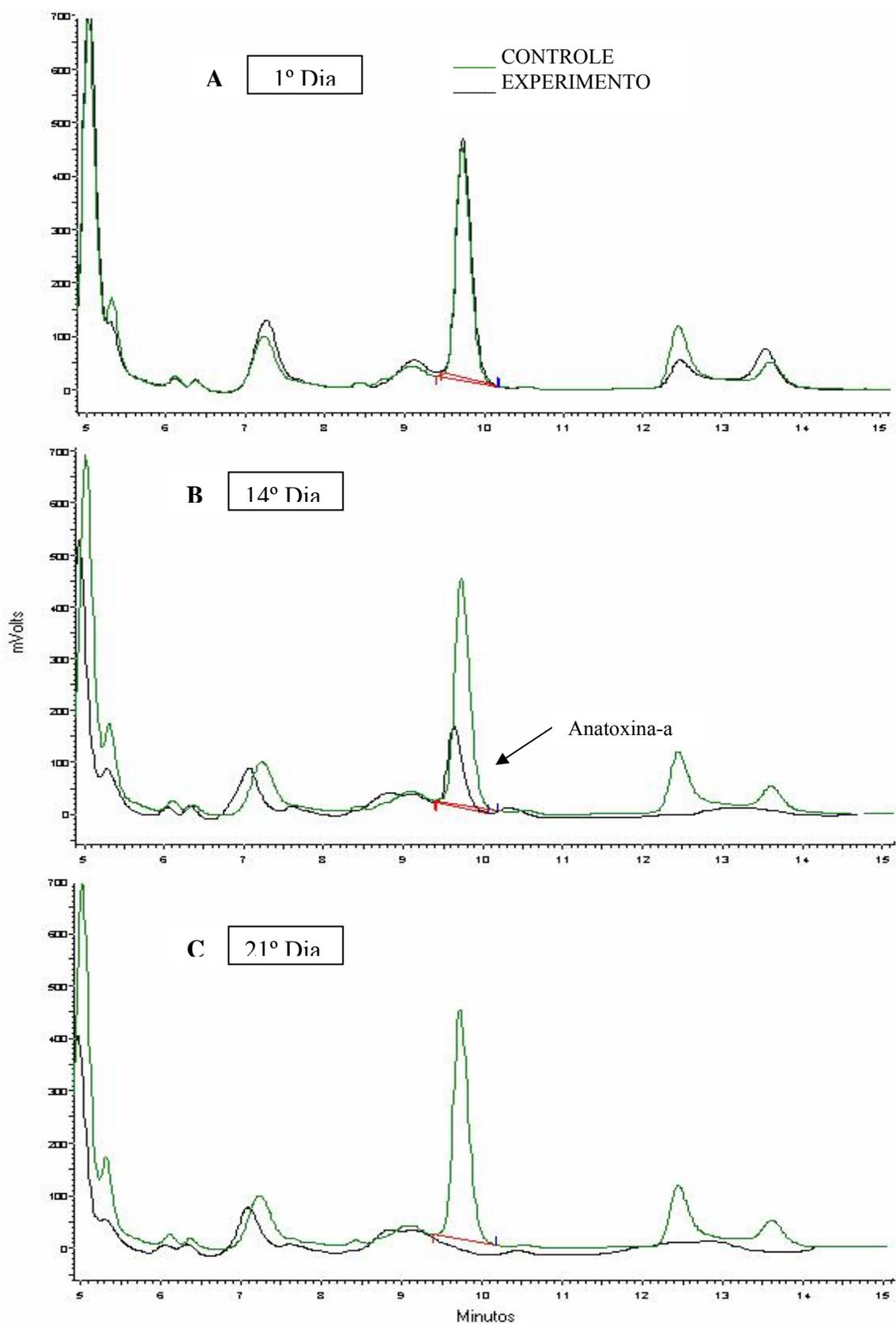


Figura 33. IA. Cromatogramas mostrando diminuição do pico de anatoxina-a do experimento de degradação com amostras de águas do ponto (P2).

As cepas de bactérias isoladas dos experimentos de biodegradação de microcistinas (comerciais e dos extrato de *Microcystis* RST 9501) nas regiões do Museu Oceanográfico e Praia do Cassino estão mostradas nas figuras 34, 35, 36 e 37.



Figura 34. IPrx. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR comercial com amostras de água da Praia do Cassino (P2).



Figura 35. IPam. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR comercial com amostra de água da Praia do Cassino (P2).



Figura 36. MEam. Bactéria isolada do experimento de degradação de extrato de *Microcystis* RST 9501 em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).



Figura 37. MPrs. Bactéria isolada do experimento de degradação de microcistina-LR em amostra de água da região do Museu Oceanográfico (P1).

VI. DISCUSSÃO

Investigações sobre a persistência e a degradação de toxinas de cianobactérias vêm crescendo em importância devido ao aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em reservatórios de água para consumo humano e o potencial efeito de longa duração destas toxinas torna-se mais claro (Bourne *et al.*, 1996). Enquanto a produção cianobacteriana de microcistinas em ambientes aquáticos tem sido investigada, muito limitada têm sido as pesquisas sobre degradação de microcistinas (Park *et al.*, 2001) e, particularmente, de outras toxinas de origem cianobacterianas que também tornam os reservatórios naturais inapropriados para uso humano.

Neste estudo os locais de coleta de água para os experimentos de biodegradação (Tab. 1 e 3) de microcistina e anatoxina-a foram escolhidos devido às características diferenciais que poderiam apresentar. As águas do estuário, ponto P1, têm um grande aporte de nutrientes orgânicos e inorgânicos nitrogenados de despejos de origem antropogênica. O balanço de nutrientes no estuário da Lagoa dos Patos revelou que o sistema contém grandes quantidades de nitrogênio e fósforo e dissolvidos. A concentração média de fosfato nos canais do estuário e nas áreas norte e nordeste da cidade de Rio Grande é de 1 μM , mas pode alcançar 3 μM durante o verão. Altas concentrações de nitrato e amônio foram verificados na desembocadura do estuário e próximo a cidade do Rio Grande (Niencheski, & Baumgarten 1998). As concentrações de nutrientes nitrogenados alcançaram 13,6 μM no Saco da Mangueira e 8,6 μM no Saco do Arraial (região estuária). Estes nutrientes lançados nesse ambiente atuam sobre o crescimento do fitoplâncton (Persich *et al.*, 1996). O ponto P2, Praia do Cassino, apresenta uma salinidade mais elevada com grande hidrodinâmica das zonas de arrebentação com aporte

de nutrientes de origem continental, o qual pode apresentar grandes variações temporais e/ou espaciais, que favorecem o crescimento de bactérias (Odebrecht & Abreu, 1997).

Tanto na época de coleta de água para o experimento de degradação de microcistina (13/07/2004) como para o experimento de degradação de anatoxina-a (01/10/2004) a salinidade foi o parâmetro mais variável, visto que a temperatura e o pH tiveram pouca oscilação entre os dois pontos de coleta. Isto ressalta a importância do local que se retira amostra de água para experimentos de degradação.

A detoxificação de um composto resulta na inativação, com a substância toxicologicamente ativa sendo convertida em um produto inativo. Devido a atividade toxicológica estar associada com muitas entidades químicas, substituintes e modos de ação, a detoxificação inclui uma grande variedade de diferentes tipos de reações (Alexander, 1994). Os experimentos com comunidades bacterianas mistas de amostras ambientais capazes de degradar microcistinas confirmam a habilidade que certas espécies de bactérias apresentam em biodegradar ou biotransformar compostos complexos.

Microrganismos que degradam hepatotoxinas e anatoxinas de cianobactéria ocorrem normalmente na natureza (Rapala *et al.*, 1994). Estudos têm confirmado previamente que microcistinas podem ser degradadas por uma complexa população natural de microorganismos de diversos ecossistemas, tais como efluentes de esgotos, sedimentos e águas de lagos (Bourne *et al.*, 1996). Estudos demonstram que *Microcystis* RST 9501 produz no mínimo 4 variantes de microcistinas, sendo que [D-leu¹] microcistina-LR é responsável por, aproximadamente, 90% do pool de microcistinas produzidas por esta cultura (Matthiensen, 2000). O extrato tóxico de *Microcystis* RST 9501 testado com amostras de água dos pontos P1 e ponto P2 apresentou um período de degradação total de aproximadamente 20 dias. Estudos realizados por Lam *et al.* (1995) observaram biodegradação total com efluentes de esgotos de Edmonton (Alberta) em um

período de 27 dias. Nos experimentos que se utilizou microcistina comercial, tanto para o local P1 como para o local P2, o período de degradação total da toxina foi de 10 dias (Fig. 19 e 21). Deve-se salientar que a variação súbita nas concentrações de toxinas no experimento e no controle ocorridos a partir do 30º dia (Fig. 19 e 21), deve-se a problemas na obtenção de dados no HPLC e não a contaminação ou outra causa qualquer. A comparação dos períodos de degradação das toxinas presentes nos extratos purificados e das toxinas comerciais confirmam os dados encontrados em estudos anteriores (Jones *et al.*, 1994), nos quais as bactérias que realizam a degradação das microcistinas presente nos extratos celulares provavelmente só se desenvolvem após outras fontes de carbono terem se exaurido, ou então possivelmente a estrutura cíclica da hepatotoxinas seja mais resistente a mineralização que outros compostos orgânicos solúveis excretados ou liberados por cianobactérias (Kiviranta *et al.*, 1991).

Nos experimentos de biodegradação de microcistina (Fig. 18, 19, 20, 21), verificou-se um período inicial no qual não houve redução da concentração de toxina. Este período, chamado de “fase lag”, que é um período de adaptação que os organismos procarióticos apresentam quando mudam de local de colonização e onde o substrato geralmente é diferente, ocorre na maioria dos experimentos envolvendo bactérias. Nos experimentos com biodegradação de microcistinas, tanto nos que utilizaram extratos como nos que foram usados toxina comercial, a fase lag ocorreu em um período de, aproximadamente, 3 dias. Esses resultados concordam com outros estudos realizados por Takenaka & Watanabe, (1997), sobre degradação de microcistinas por *Pseudomonas*. Segundo Lam *et al.* (1995), que encontraram em seus estudos de biotransformação de microcistinas uma fase lag de 7 dias, a população microbiana que realiza a biodegradação necessita de um período de adaptação para transformar as microcistinas. Deve-se notar, entretanto, que no experimento com biodegradação de anatoxina-a (Fig. 30 e 31), não foi

observado uma fase inicial lag, sendo que a toxina já começa a sofrer transformação nos primeiros momentos que foram feitos os inóculos. Do ponto de vista bioquímico este fato é importante, pois provavelmente a anatoxina-a, que é um composto altamente instável, seja mais facilmente degradável pela comunidade bacteriana.

Jones *et al.* (1994) e Matthiensen (2000), em seus experimentos com MC-LR, afirmam que após observado uma degradação total de toxinas, uma readição da toxina faz com que o processo degradativo comece rapidamente. A ausência de uma fase lag após a readição de microcistina-LR para amostras de água foi consistente com estudos de biodegradação que sugerem que a população degradativa é selecionada durante a fase lag. Esses resultados também sugerem que a biodegradação pode ser comumente mais rápida em corpos d'água que já tenham sido expostos à florações de cianobactérias produtoras de toxinas (Jones *et al.*, 1994).

As concentrações de moléculas de microcistinas foram analisadas por HPLC e imunoenensaio específico (ELISA). A figura 22 mostra os cromatogramas do experimento com amostra de água da região do Museu Oceanográfico com utilização de extrato de *Microcystis* RST 9501. Nesta figura observa-se a diminuição do pico cromatográfico que representa a [D-Leu¹] MC-LR (seta em vermelho). No décimo sétimo dia de experimento a concentração de toxina havia diminuído para menos de ¼ da concentração total inicial, alcançando os valores próximos a zero nos dias posteriores. A observação dos cromatogramas demonstra que a medida que a [D-Leu¹] MC-LR diminui de concentração, outra substância não identificada começa a surgir, visualmente detectada por um pico que aparece entre 8 e 9 minutos de tempo de retenção, à esquerda do pico da toxina. Portanto evidencia-se que a degradação do extrato celular conduz ao surgimento de outras substâncias em diferentes tempos de corrida cromatográfica (entre 3 e 5 min.) e ao

desaparecimento do pico da [D-Leu¹] MC-LR já a partir do décimo quarto dia de experimento (Fig. 22-B e C e 24-B e C). A degradação da toxina comercial não apresentou proporcionalmente o surgimento de outros novos compostos em HPLC, mas foram observados alguns novos picos ao 16º dia (Fig. 23-C) e 27º dia (Fig. 25-C). A comparação cromatográfica do experimento (seta vermelha) e do controle (linha verde) é útil para evitar considerar-se o pico de outras substâncias que possam apresentar o mesmo espectro cromatográfico, surgindo próximo ou no mesmo tempo de retenção da toxina (Fig. 23-C). A transformação e conseqüente degradação da toxina (presente no extrato) gerou, também, o surgimento de outras substâncias, visualizadas pelo aparecimento dos picos cromatográficos em diferentes tempos de retenção. A diminuição da toxina presente no extrato celular do experimento com amostra de água da Praia do Cassino (Fig. 24) apresentou um espectro cromatográfico semelhante ao do experimento com amostra de água do Museu Oceanográfico (Fig 22), possibilitando-se inferir que a comunidade bacteriana da Praia do Cassino agiu metabolicamente do modo similar a comunidade bacteriana do Museu Oceanográfico. O padrão de degradação da microcistina comercial com amostra de água da Praia do Cassino (Fig 25) foi semelhante ao padrão de degradação da toxina comercial com amostra de água do Museu Oceanográfico (Fig. 23), apresentando o surgimento de pequenos picos cromatográficos, inclusive no experimento-controle, indicando uma transformação não-biológica, com o possível surgimento de outras substâncias, apenas em direção ao final do experimento, a partir do 16º dia (Fig. 23-C), (linha verde). Estas substâncias surgiram em tempos diferentes de corrida cromatográfica e apenas ao final do experimento, indicando serem uma transformação de outras substâncias. Tais resultados indicam que as propriedades cromatográficas da MC-LR foram alteradas. Lam *et al.* (1995) sugerem que o radical Adda pode ser modificado biologicamente resultando na perda de absorvância e o anel heptapeptídico de MC-LR

pode ser aberto, o que resultaria na diminuição da concentração desta toxina neste tipo de análise. Outros autores (Cousins *et al.*, 1996) também sugerem uma possível via degradativa envolvendo a abertura do anel, via fissão de uma ligação peptídica com resultado da quebra da cadeia heptapeptídica. A toxina linearizada pode, então, ser mais rapidamente degradada pelas peptidases à peptídeos menores.

Os testes ELISA com extratos de *Microcystis* RST 9501 e amostra de água da região próxima ao Museu (Fig. 26) e da região da Praia do Cassino (Fig. 28) ao final do experimento (43º dia) registraram concentração de microcistina, sendo 5% do total de equivalente de MC-LR para o ponto P1 e cerca de 10% do total de equivalente de MC-LR para o ponto P2. O teste ELISA realizado com microcistina comercial com água do ponto P1 (Fig. 27) não apresentou valores de concentração de microcistina, enquanto o teste realizado com toxina comercial em amostra de água do ponto P2 (Fig. 29) apresentou concentrações de toxina menores que 5% total de MC-LR. Os testes ELISA foram realizados devido ao surgimento de novos picos cromatográficos observados nos resultados das análises por HPLC. Uma pequena alteração na molécula de microcistina pode resultar em alteração em seu peso molecular, ou em seu caráter hidrofóbico, refletindo em tempo de retenção diferenciado pela análise cromatográfica. Porém, essa molécula alterada ainda pode reter sua forma característica original reconhecida pelo anticorpo do teste ELISA, específico para microcistinas (Matthiensen *et al.* 2000b).

As baixas concentrações encontradas nos resultados dos testes ELISA no 43º dia de experimento (< 10%) indicam que moléculas de microcistinas sofreram degradação biológica considerável, ao ponto de mais de 90% de seu total não mais ser reconhecido pelo imunoensaio.

As taxas de degradação da microcistina purificada e da toxina presente no extrato celular de *Microcystis* RST 9501 demonstraram uma característica importante: a toxina comercial pura foi mais rapidamente degradada do que a toxina presente no extrato (Tab. 2). Enquanto a toxina comercial com amostra de água dos dois pontos de coleta teve uma taxa de degradação de 10% da concentração de toxina por dia, a toxina do extrato purificado com amostra de água dos dois pontos de coleta apresentaram um taxa de degradação de cerca 5% da concentração de toxina por dia. Isto pode ser decorrente do fato de que no extrato celular estavam presentes conjuntos de substâncias que foram degradadas primeiramente e, somente após, a microcistina foi degradada. Com o experimento da toxina comercial a quantidade de outras substâncias presentes era menor e, portanto, o metabolismo da população bacteriana pôde adaptar-se para utilizar a molécula de toxina mais rapidamente e eficientemente. A observação e análise da Tab. 2 permite inferir porque a taxa de degradação do experimento **ME**, que é de 45, 71 $\mu\text{g.MC-LR.equiv.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e contém extrato celular de *Microcystis* RST 9501 é maior do que a taxa de degradação do experimento **IE**, que é de 0,81 $\mu\text{g.MC-LR.equiv.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e também contém extrato celular. Tanto no experimento **IE** como em **ME**, a taxa de toxina degradada em ambos correspondeu a 5% do total da toxina por dia. Entende-se que as comunidades bacterianas, por terem características diferentes, degradariam a toxina em tempos diferentes, mas isto não se verifica aos experimentos **MP** e **IP**, no qual foram utilizados toxinas comercialmente puras. As amostras de águas distintas com comunidades bacterianas distintas apresentam taxas muito semelhantes. Possivelmente a taxa de degradação não dependa da concentração de toxina, e sim do tempo e da quantidade de bactérias envolvidas no processo degradativo. Não foram estimadas as quantidades de bactérias nos experimentos de degradação, pois não se procurava uma avaliação quantitativa de bactérias, mas sim por unidade de amostra de água do ambiente. Além

disso, mesmo que fosse feita a quantificação não poderia-se concluir que todas as bactérias ali quantificadas fossem responsáveis pela degradação das toxinas.

As taxas de degradação encontradas no experimento de degradação de microcistina comercial com amostra de água da região do Museu Oceanográfico (MP), aproximam-se das taxas de degradação com amostras de água desta mesma região encontradas por Matthiensen *et al.* (2000). Enquanto neste estudo encontrou-se $0,08 \mu\text{g.MC-LR.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (aproximadamente $86,23 \mu\text{g.MC-LR.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) (Tab. 2) em um período de 10 dias, Matthiensen *et al.* (2000b) encontraram $0,06 \mu\text{g.MC-LR.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em um período de aproximadamente 17 dias. Este fato é importante visto que confirma a região do Museu Oceanográfico (e possivelmente do estuário da Lagoa dos Patos) como habitat de comunidades bacterianas diversificadas, degradadoras de microcistinas e possivelmente de outras cianotoxinas.

Os estudos envolvendo degradação de anatoxina-a são raros. Rapala *et al.* (1994), realizando experimentos com sedimento, relatam a diminuição da concentração de 25 a 48%, durante um período de 22 dias, demonstrando que microrganismos capazes de degradar anatoxina-a ocorrem em diferentes tipos de sedimentos, em lagos que tiveram ou não história anterior de florações. A anatoxina-a foi biodegradada rapidamente e não apresentou uma fase lag. Esses resultados diferem dos dados apresentados por Rapala *et al.* (1994), os quais obtiveram um período de fase lag de aproximadamente 4 dias, enquanto Kiviranta *et al.* (1991) relatam que anatoxina-a foi rapidamente degradada após um período de 7 semanas e apenas traços desta toxina foram encontrados na água em estudo.

As análises por HPLC do experimento de degradação de anatoxina-a, tanto com amostras de água do Museu Oceanográfico como com as amostras da Praia do Cassino, mostraram um período de degradação que variou entre 17 e 19 dias (Fig. 30 e 31). A seqüência de cromatogramas do experimento de degradação de anatoxina-a com água da região do Museu Oceanográfico (MA) (Fig. 32) revelou a diminuição do pico cromatográfico situado entre 9 e 10 minutos de retenção, confirmando a degradação desta toxina.

A figura 33 mostra a seqüência de cromatogramas do experimento de degradação de anatoxina-a com amostra de água da região da Praia do Cassino (IA). As análises destes cromatogramas enfatizam a diminuição da toxina, que ao 19º dia já havia alcançado o valor zero, permanecendo assim nos dias posteriores, visto ter havido degradação total da toxina. A comparação entre os picos cromatográficos do experimento (linha preta) e do controle (linha verde) possibilitou a verificação da permanência da concentração de anatoxina-a no controle, ao longo do experimento.

O experimento de biodegradação de ANTX-a em amostras de água do Museu Oceanográfico (MA) apresentou contaminação do controle, com bactérias do experimento, apresentando este o mesmo período de degradação que o experimento (Fig. 30). Os cromatogramas do controle registraram a diminuição dos picos cromatográficos (Fig. 32 – linha verde). Ao 19º dia a concentração de toxina no controle já estava muito reduzida (Fig. 32-C) e a concentração do experimento já havia alcançado o valor zero. Este fato ocorrido a revelia teve papel importante, visto que confirmou a dinâmica do metabolismo apresentado pelas bactérias do experimento. Pelo fato dos experimentos de degradação de anatoxina-a com amostras de água do Museu Oceanográfico (MA) e degradação de anatoxina-a com amostras de água da Praia do Cassino (IA) terem sido realizados ao

mesmo tempo e sob as mesmas condições, é descartada a possibilidade da diminuição da concentração do controle ser devido à degradação química ou física. As taxas de degradação do experimento, 5,88% ANTX-a.dia⁻¹ e a taxa de degradação efetiva apresentaram o mesmo valor, visto que a degradação de anatoxina-a não apresentou fase lag, sendo verificado o seu decréscimo já na segunda coleta de amostra de experimento. A degradação em amostra com água do ponto P2 ocorreu em uma taxa similar (5,26% ANTX-a.dia⁻¹). Kiviranta *et al.* (1991) conseguiram isolar e identificar uma bactéria do gênero *Pseudomonas* sp e, identificá-la por apresentar forma característica de bastão, ser Gram-negativa, sendo esta capaz de degradar anatoxina-a em uma taxa de 6-30 µg.mL⁻¹ em 3 dias.

Alguns estudos observaram biodegradação de microcistina sem isolar as bactérias responsáveis pela transformação (Rapala *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 1995; Cousins *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 2004). Entretanto, vários trabalhos de biodegradação de microcistinas têm conseguido isolar e identificar bactérias que são hábeis em transformar esta toxina (Kiviranta *et al.*, 1991; Takenaka & Watanabe, 1997; Inamori *et al.*, 1998; Lahti *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004).

Maruyama *et al.*, (2003) pesquisaram as bactérias aderidas à mucilagem de *Microcystis* e, baseando-se em trabalhos que encontraram o grupo das *Flavobacterium*/Citófagas como responsável por lisar células de *Microcystis* e degradar produtos internos de *Microcystis* presente na mucilagem sugerem que as bactérias aderidas à mucilagem das colônias de *Microcystis* podem contribuir para lise das células e detoxificação da microcistina. Também citam que o grupo das α -proteobactérias e β -proteobactérias (às quais pertencem bactérias como *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, reconhecidamente degradadoras de compostos orgânicos) são conhecidas por fazer a lise de células de *Microcystis* e atacar seus compostos. Entretanto, apesar do uso de recursos

de biologia molecular, a cepa identificada, por aqueles autores, pertence a um gênero não descrito.

Neste trabalho conseguiu-se isolar quatro cepas bacterianas de amostras de água dos pontos coletados, que degradaram microcistina-LR e variantes de microcistinas presentes nos extratos celulares de *Microcystis* RST 9501. Análises preliminares, através da observação dos caracteres morfológicos e coloração de Gram indicaram que: com relação ao experimento que se utilizou amostras de água da Praia do Cassino, com inóculos de toxina microcistina comercial foram obtidas duas cepas bacterianas denominadas **IPrx** e **IPam**. As duas bactérias têm formas cocóides, sendo a primeira Gram-negativa e a segunda Gram-positiva. Estas duas cepas apresentam colônias de coloração roxa e amarela (Fig. 34 e 35). No experimento utilizando amostra de água do Museu Oceanográfico conseguiu-se isolar duas cepas Gram-negativas; **MEam** do experimento com extrato de *Microcystis* RST 9501 e **MPrs** do experimento com toxina comercial, em forma de bastonete alongado de coloração amarelo e em forma de bastonete curto, quase ovóide, de coloração rosa claro, respectivamente (Fig. 36 e 37).

O uso de ferramentas de biologia molecular e a comparação com os bancos de dados possibilitou que se identificasse, com apenas um terço da seqüência total, uma percentagem de 94% de similaridade, a cepa **MEam** como sendo pertencente ao gênero *Burkholderia*. Há grande possibilidade desta cepa encontrada neste experimento de degradação de microcistinas pertencer ao denominado “complexo *Burkholderia cepacia*” (Coenye & Vandamme, 2003). Esta afirmação deve-se a fato de que a seqüência da cepa **MEam** ser muito próxima da seqüência de bactérias encontradas em outros estudos (Ramette *et al.*, 2005). Esta bactéria pertence ao grupo das β -proteobactérias, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae. É um bacilo Gram-negativo aeróbico não-fermentativo, geralmente não patogênico, mas que pode colonizar trato respiratório de

pacientes que possuem fibrose cística. È encontrada no solo, na água, em plantas e animais e pode sobreviver por longos períodos de seca. A presença de múltiplos cromossomas, ampla variação do tamanho do genoma, sendo maior que a maioria das bactérias, e extraordinária adaptabilidade, refletida por sua versatilidade nutricional e habilidade para colonizar tecidos de plantas e animais, faz desta bactéria um atrativo para estudos de interação parasita/hospedeiro (Lessie *et al.*,1996), e de pesquisas como agente degradador de compostos orgânicos.

VII. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo comprovam a degradação biológica de microcistinas adquiridas comercialmente e de microcistinas presentes nos extratos celulares da cepa tóxica de *Microcystis* RST 9501, por bactérias aquáticas da região do estuário da Lagoa dos Patos e da Praia do Cassino.

A taxa de degradação média para que ocorresse a degradação total da quantidade de toxina presente nos experimentos variou de 10% da concentração de toxina/dia para toxina comercial e de 5% da concentração de toxina/dia para a toxina presente no extrato.

Foram isoladas 4 cepas de bactérias aeróbias no final do experimento de biodegradação de microcistinas, as quais mostraram crescimento em meio de cultura contendo apenas microcistina como fonte de carbono.

Em uma dessas bactérias isoladas, foi realizado o sequenciamento genético da subunidade 16S do DNAr. O sequenciamento permitiu, com um índice de 94% de similaridade, encontrar o provável gênero da bactéria biodegradadora de microcistinas, denominada de *Burkholderia*.

A degradação biológica da anatoxina-a por microrganismos aquáticos da região estuarina e praia adjacente, também foi comprovada, sendo que a taxa de degradação da anatoxina-a ficou em média de 5,57% da concentração de toxina por dia.

Devido ao fato das toxinas de cianobactérias em reservatórios de água de uso humano terem causado graves problemas e diante da impossibilidade de remoção das cianotoxinas, por meios convencionais, dos corpos aquáticos onde ocorreram florações de cianobactérias tóxicas, os estudos de biodegradação de cianotoxinas têm surgido como possível solução ao manejo e controle de águas contaminadas, visto que a remediação de ambientes impactados por poluentes é possível.

Acredita-se que o processo degradativo empregado neste estudo possa ser utilizado em mecanismos, como bioreatores e compartimentos de biodegradação em estações de tratamento de água. Porém para isto seriam necessários estudos mais aprofundados.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SÁBER, A. N. 2001. Litoral do Brasil. Brazilian Coast. Metalivros, São Paulo.
- ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and bioremediation . Academic Press, NY, 302p.
- ALJANABI, S. M. & MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, (22):4692-4693.
- AMANN, R.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *In Situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, (1):143 – 169.
- BATISTA, T.; SOUZA, G.; SUPUT, J. S. RAHMANI, R. & SUPUT, D. 2003. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 65: 85-91.
- BEASLEY, V. R.; COPPOCK, R. W.; SIMON, J.; ELY, R. BUCK, W. B. & CORLEY, R. A. 1983. Apparent blue-green algae poisoning in swine subsequent to ingestion of a bloom dominated by *Anabaena spiroides*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 182, (4): 413-414.
- BOURNE, D. G.; JONES, G. J.; BLAKELEY, R. L.; JONES, A.; NEGRI, A. P. & RIDDLES, P. 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, (11): 4086-4094.
- BRIAND, JF.; JACQUET, S.; BERNARD, C. & HUMBERT, JF. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research*, 34:361-377.

- BURJA, A. M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J. G. & WRIGHT, .
C. 2001. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron*,
57: 9347 – 9377.
- CARMICHAEL, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins.
Journal of Applied Bacteriology, 27: 445-459.
- CARMICHAEL, W. W. 1994. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270, (1):
64-72.
- CARR, N. G. & WHITTON, B. A. 1982. The biology of cyanobacteria. Alden Press,
Oxford. Vol. 19.
- CASTELLO, J. P. 1978. (Coord) Projeto Lagoa, Relatório do 1º ao 15º Cruzeiro.
Fundação Universidade do Rio Grande, B. O. A., Ser. Rel., (1-9).
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Eds.) 1999. Toxic cyanobacteria in water – A guide to
their public health consequences, Monitoring and management. WHO, E & FN
Spon, London.
- CHU, K. H.; LI, C. P.; TAM, Y. K. & LAVERRY, S. 2003. Application of
mitochondrial control region in population genetic studies of the shrimp *Penaeus*.
Molecular Ecology Notes, 3: 120-122.
- COENYE, T. & VANDAMME, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia*
species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5, (9):
719-729.
- CODD, G. A.; WARD, C. J. & BELL, S. G. 1997. Cyanobacterial toxins: Occurrence,
modes of action, health effects and exposure routes. In: Seiler J. P. and Vilanova E.
(Eds.). Applied toxicology: Approches through Basic Science, *Arch. Toxicol. Suppl.*
19. Springer-verlag, Berlin: 399-410.
- CODD, G. A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the
priorisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16: 51-60.

- CODD, G. A.; MORRISON, L. F. & METCALF, J. S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (3): 264 – 272.
- COUSINS, I. T.; BEALING, D. J.; JAMES, H. A. & SUTTON, A. 1996. Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. *Water Research*, 30 (2): 481-485.
- EDWARDS, C.; BEATTIE, K. A.; SCRIMGBOUR, C. M. & CODD, G. A. 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (Blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*, 30 (10): 1165-1172.
- FALCONER, I. R. 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology*. 14: 5-12.
- FASTNER, J.; NEUMANN, U.; WIRSING, B.; WECKESSER, J.; WIEDNER, C.; NIXDORF, B. & CHORUS I. 1999. Microcystins (Hepatotoxic Heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology*, 14: 13-22.
- FOGG, G. E. 2002. Harmful algae – a perspective. *Harmful Algae*, 1: 1-4.
- FUJIKI, H. 1992. Is the inhibition of protein phosphatase 1 e 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? *Molecular Carcinogenesis*, 5: 91- 94.
- GIOVANNARDI, S.; POLLEGIONI, L.; POMATI, F.; ROSSETI, C. SACCHI, S. SESSA, L. & CALAMARI, C. 1999. Toxic cyanobacterial blooms in Lake Varese (Italy): A multidisciplinary approach. *Environmental Toxicology*, 14: 127-134.
- HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P. N. & KAKKAR, P. 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*, 52: 1-21.

- HARADA, K.-I. & TSUJI, K. 1998. Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environmental. *Journal Toxicology. – Toxin reviews*, 17(3): 385-403.
- HARADA, K.-I.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUMO, M.; ITO, E. & TSUJI, K. 2004. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon*, 44: 107-109.
- IAPSO 1985. The International System of Units (SI) in Oceanography. Publication Scientific N° 32. Unesco.
- INAMORI, Y.; SUGIURA, N.; IWANI, N.; MATSUMURA, M.; HIROKI, M. & WATANABE, M. 1998. *Phycological Research*, 46: 37-44.
- ISHII, H.; NISHIJIMA, M. & ABE, T. 2004. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Research*, 38: 2667-2676.
- ISO 1992. Water Quality Measurement of biochemical parameters. Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentrations. ISO 10260 International Organization for Standardization, Geneva.
- ISSA, A. A. 1999. Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calotrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8: 33 –37.
- JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO D. M.; COOKSON, S. T. HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, B. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O. & JARVIS, W. R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialyses center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 558: 873-878.

- JONES, G. J.; BOURNE, D. G.; BLAKELEY, R. L. & DOELLE, H. 1994. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Natural Toxins*, 2: 228-235.
- JONES, G. J. & ORR, P. T. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreacional lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research*, 28 (4): 871-876.
- KAEBERNICK, M. & NEILAN, B. A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35:1-9.
- KASTING, J. F. 2004. Quando o metano ditava o clima. *Scientific American (Brasil)*, 28: 38-45.
- KELMAN, J. 2004. Água potável: o Brasil precisa acabar com a cultura da abundância. *Folha do Meio Ambiente*, Brasília, ano 14, 145.
- KIVIRANTA, J.; SIVONEN, K.; LAHTI, K.; LUUKKAINEN, R & NIEMELA, S. I. 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins – a laboratory study. *Archive Hydrobiology*, 121(3): 281-294.
- KREITLOW, S. MUNDT, S. & LINDEQUIST, U. 1999. Cyanobacteria – a potential source of new biological active substances. *Journal of Biotechnology*, 70: 61-63.
- LAHTI, K.; NIEMI, R. M.; RAPALA, J. & SIVONEN, K. 1998. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins – characterization of toxin degrading. *In: Harmful Algae*. Reguera, B.; Blanco, J.; Fernández, M. L. & Wyatt, T. Eds. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998.
- LAM, A. K.-Y.; FEDORAK, P. M. & PREPAS, E. E. 1995. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environmental. Scientific Technology*,

29: 242-246.

LAGOS, N. 1998. Microalgal blooms: A global issue with negative impact in Chile.

Biology Research, 31: 375-386.

LAWTON, L. & CODD, G. A. 1991. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) toxins and their significance in UK and European waters. *Journal Institute Water Environmental*

Man, 5: 460-465.

LAWTON, L.; EDWARDS, C. & CODD, G. A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*, 119:1525-1530.

LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D. & DEVEREUX, R. 1996.

Genomic complexity and plasticity of *Burholderia cepacia*. *FEMS Microbiology Letters*, 144: 117-128.

MACKINNEY, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biology and Chemistry*, 140: 315-322.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; & CODD, G. A.

1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 e 2A from both mammals and higher plants. *FEBS*, 264 (2): 187-192.

MARUYAMA, T.; KATO, K.; YOKOYAMA, A.; TANAKA, T. HIRAISHI, A. &

PARK, H.-D. 2003. Dynamics of Microcystin-Degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*. *Microb. Ecol*, 46: 279-288.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S. & CODD, G. A. 1999. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(3): 361-376.

- MATTHIENSEN, A. 2000. Environmental and laboratory studies on the properties and fate of microcystins from the cyanobacterium *Microcystis*. Phd thesis, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK. 307p.
- MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; YUNES, J. S.; KAYA, K. & CODD, G. A. 2000a. [D-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*, 55: 383-387.
- MATTHIENSEN, A.; METCALF, J. S.; FERREIRA, A. H. F.; YUNES, J. S. & CODD, G. A. 2000b. Biodegradation and biotransformation of microcystin by aquatic microbes in estuarine waters from the Patos Lagoon, RS, Brazil. *In*: "Proceedings of the 10^o Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins". WILLEM Y. DE KOE, MYRNA SABINO. Eds. 21-25 May. Guarujá (Brazil).
- MCKAY, C. P. & HARTMAN, H. 1991. Hydrogen peroxide and the evolution of oxygenic photosynthesis. Origins of life and evolution of the biosphere: *The Journal of the International Society for the study of the origin of life*, 21: 157-163.
- MORSEN, A. & REHM, H. J. 1987. Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinonii* adsorbed on activated carbon. *Applied Microbial Biotechnology*, 26: 283-288.
- MUR, L. C.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. 1999. Cyanobacteria in the environment. *In*: Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their Public Health consequences, monitoring and management. E& FN Spon, London, 414p.
- NIENCHESKI, L. F. H.; BAUNGARTEN, M. G.; FILLMAN, G. & WINDOM, H. L. 1994. Nutrient and suspended matter behavior in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. Estuary of South America. PERILLO, G. Ed..Am. Geophys Union.

- NIENCHESKI, L. F. H.; BAUNGARTEN, M. G. 1998. Química Ambiental. *In:* In: SEELIGER, U.; ODEBRECT, C. & CASTELLO, J. P. Eds. Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul. *Ecoscientia*, 341p.
- OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A.-M. & GROBBELAAR, J. U. 2004. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology*, 3(3): 159-168.
- ODEBRECHT, C. & ABREU, P. 1997. Microorganismos em praias arenosas expostas: importância, aspectos metodológicos e estado da arte para o sul do Brasil. *In:* OECOLOGIA BRASILIENSIS. Vol. III. Ecologia de praias arenosas do litoral brasileiro. ABSALÃO, R. S. & ESTEVES, A. M. Eds: Programa de pós-graduação em ecologia – Instituto de Biologia – UFRJ – Rio de Janeiro – RJ. 01-18.
- ODEBRECHT, C. & ABREU, P. 1998. Microalgas. *In:* SEELIGER, U.; ODEBRECT, C. & CASTELLO, J. P. Eds. Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul. *Ecoscientia*, 341p.
- PARK, H.-D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRASHI, A. & KATO, K. 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. IAN FALCONER. Ed. *Environmental Toxicology*, 16(4): 337-343.
- PAERL, H. W. & MILLIE, D.F. 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35: 160-167.
- PERRY, J. J. & STALEY, J. T. 1997. Microbiology. Dynamics & Diversity. Saunders College Publishing. United States of America. 127p.
- PERSICH, G.; ODEBRECHT, C.; BERGESCH, M. & ABREU, P. 1996. Eutrofização e fitoplâncton: Comparação entre duas enseadas rasas no estuário da Lagoa dos Patos. *Atlântica*, Rio Grande, 18: 27-41.

- PIZZOLON, L.; TRACANNA, B.; PRÓSPERI, C. & GUERRERO, J. M. 1999. Cyanobacterial blooms in Argentinean inland waters. *Lakes & Reservoirs and management*, 4: 101-105.
- POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H. & CODD, G. A. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*; 352: 21-26.
- RAMETTE, A.; LIPUMA, J. L. & TIEDJE, J. M. 2005. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1193-1201.
- RAPALA, J.; LAHTI, K.; SIVONEN, K. & NIEMELÄ, S. I. 1994. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a.. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 423-428.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. 1979. Generic Assignments, Strain Histories, and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal General Microbiology*, 111: 1 - 61.
- ROWEEL, P. & KERBY, N. W. 1991. Cyanobacteria and their symbionts. In: DILWORTH, M. J. & GLENN A. R. (Eds.) *Biology and Biochemistry of nitrogen fixation*. Studies in plant science 1, Murdoch University, Australia. Elsevier.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning*. A laboratory manual. Second Edition. Cold spring harbor laboratory press. United State of America.
- SCHAEFFER, D. J. & KRYLOV, V. S. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 208-227.

- SCHOPF, J. W. 1993. Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life, *Science*, 260: 640-646.
- SIAME, B. A.; SHUSHU, D. D. & MASUNDIRE, H. M. 2000. Occurrence of highly toxic *Microcystis* species in Botswana. In: "Proceedings of the 10^o Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. WILLEM Y. DE KOE, MYRNA SABINO. Eds. 21-25 May. Guaruja (Brazil).
- SIVONEN, K. & JONES, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Eds). Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, E&FN Spon, London: 41-111.
- SMAYDA, T. J. 1997. Bloom dynamics: Physiology, behavior, trophic effects. *Limnology and Oceanography*, part 2. The ecology and oceanography of harmful algal blooms, 42 (5): 1132-1136.
- TAKENAKA, S. & WATANABE, M. F. 1997. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34 (4); 749-757.
- TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C. N.; CARVALHO, V. L. P.; PEREIRA, M. S. & HAGE, E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil, *Bulletin of PAHO*, 27(3): 244-253.
- TUNDISI, J. G. 2003. Água no Século XXI: Enfrentando a escassez. RiMa, IIE. São Paulo. 208p.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. & PLEWNIAK, F. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 1(24): 4876-4882.
- UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F. PARK, H.-D.; CHEN, G.-C.; CHEN, G. & YU, S.-Z. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen

- and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6):1317-1321.
- VELZEBOER, R.; DRIKAS, M.; DONATI, C.; BURCH, M. & STEFFENSEN, D. 1995. Release of geosmin by *Anabaena circinalis* following treatment with aluminium sulphate. *Water Science Technology*, 31(1): 187-194.
- WATANABE, Y. & IMAI, K. 1981. High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Journal Chromatography*, 515: 723 – 725.
- WEISSHEIMER, M. A. 2005. Números alarmantes. (www.cidadania.org.br)
- WHO, 1998. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR, Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edition, World Health Organization, Geneva.
- YUNES, J. S.; SUZUKI, M. T.; SILVERA, A. G.; CAMARGO, M. & WERNER, V. 1990. Cianobactérias fixadoras de nitrogênio do estuário da Lagoa dos Patos, RS: *Nostoc muscorum*. *Ciência e cultura* (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência), 42(5): 375-383.
- YUNES, J. S.; SALOMÓN, P. S.; MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT, S. L. & CODD, G. A. 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5: 223-229.
- YUNES, J. S.; NIENCHESKI, L. F. H.; SALOMÓN, P. S.; MARCELO, P.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT, S. L. & CODD, G. A. 1998. Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol*, 26:1796-1800.
- YUNES, J. S.; CUNHA, N. T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L. A. O. & MONSERRAT, J. M. 2003. Cyanobacterial neurotoxins from southern Brazilian freshwater. *Comments on toxicology*, 9: 103-115.

IX. ANEXO

A seqüência de nucleotídeos (códon), abaixo foi obtida pela técnica PCR e sequenciamento da bactéria encontrada no experimento de degradação de microcistina com amostra de água da região do Museu Oceanográfico:

Seqüência 16S do DNAr da bactéria - **MEam** , posteriormente identificada como pertencente ao gênero *Burkholderia*:

```
AATAAACGATCACACCCGCTCGTGGGGAGATATCACGKGCCCGACAAGAAGT
TATAAAACATCCTCAAGAGTAATTGTAGCAGCGKGGGRCGCCCTCGACCAA
CAACGCGTGGTGAGTACGACTAGTTGGTGTGTTTATATATCTCAGATCGACAA
CGCCGGCCGAAGAAGAACACCTCTTATCACCACGTGCGCCTTCTTGTAGCAAC
TAGTTCCCAGCGGGGGTACAAGCTCCTATCGACGAAAGAAATAGTTTGAGGT
ATATTTGCTCGCTTCTTCTGCGGGGGAAACACCGCGGATAGCAAGCCAACGA
GGTGGTCGTCGTCGAGCTAGTGGCGTGCGTTGCTGCTGCTACGACGTCCTGCT
GTTGCTTTTGGTAGGAAAAT
```