

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**EFEITOS DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO PROCESSO
DE DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS.**

ANA CLÁUDIA PIMENTEL DE OLIVEIRA



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – área de concentração em Biotecnologia Vegetal.

Rio de Janeiro – RJ - Brasil

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**EFEITOS DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO PROCESSO
DE DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS.**

ANA CLÁUDIA PIMENTEL DE OLIVEIRA

**DISSERTAÇÃO DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
BIOTECNOLOGIA VEGETAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE INTEGRANTE
DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
VEGETAL.**

Aprovada por:

Prof^a Dr^a Sandra Maria Feliciano de Oliveira Azevedo – IBCCF/ UFRJ
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Cristina Célia Silveira Brandão – ENC/UNB
(Examinadora Externa)

Prof^a Dr^a Eli Ana T. Gomes – Biologia/UFRJ
(Examinadora Externa)

Prof^a Dr^a Fernanda Reinert – Biologia/UFRJ
(Examinadora Interna)

**EFEITOS DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO PROCESSO
DE DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS.**

ANA CLÁUDIA PIMENTEL DE OLIVEIRA

Banca Examinadora:

Titulares

Cristina Célia Silveira Brandão

Eli Ana T. Gomes

Fernanda Reinert

Suplentes

Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Valéria Freitas Magalhães

Orientadora

SANDRA MARIA FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO

**"...mais inteligente é aquele que sabe
que não sabe..."**

Sócrates

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, Ana Cláudia Pimentel

EFEITOS DE FATORES FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO
PROCESSO DE DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS.

147 p: 19 figuras, 15 tabelas

Tese de Doutorado do Programa de Biotecnologia Vegetal da Universidade
Federal do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: 1. *Microcystis aeruginosa* 2. Microcistinas 3. pH 4.
Temperatura 5. Cloreto férrico 6. Sulfato de alumínio 7. Degradação 8.
Qualidade de água 9. Metais 10. Quantificação 11. Detecção 12. Atividade
biológica 13. Carbono orgânico dissolvido 14. Bactérias 15. Remoção 16.
Filtração lenta 17. Adsorção 18. Carvão ativado granular 19. Tratamento
dialítico.

Agradecimentos:

Primeiramente a Deus.

Em especial, a minha família que é um pilar em minha vida.

À Professora Sandra M.F.O. Azevedo, do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – IBCCF – UFRJ, pela orientação, incentivo e principalmente dedicação e amizade durante todos esses 13 anos de convívio.

À Professora Cristina Célia Silveira Brandão, do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília, pela amizade e parceria iniciada ao longo deste trabalho.

À professora Rosalie Reed Rodrigues Coelho, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela revisão deste trabalho.

Às Professoras Cristina Célia Silveira Brandão, Eli Ana T. Gomes, Fernanda Reinert, Rosali Reed Rodrigues Coelho e Valéria Freitas Magalhães, membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

À Professora Fernanda Reinert, Coordenadora da Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal pela ajuda financeira para participações em congressos.

À amiga Valéria pelo carinho nas horas necessárias e revisão deste trabalho.

À Jazielle pela colaboração para a realização de parte deste trabalho, e principalmente pela amizade.

Às queridas Simone Maciel e Raquel Soares que se tornaram minhas grandes amigas, simplesmente por existirem e estarem perto nos momentos difíceis durante esta longa caminhada.

Em especial, a Simone minha companheira diária por me ouvir, se saindo uma boa terapeuta.

A querida Andreia, minha primeira aluna de iniciação científica pela amizade e dedicação no desenvolvimento de parte desse trabalho.

Ao João pelo companheirismo nas coletas e amizade.

A toda equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias: Valéria, Robson, Marcelo, Aloysio, Simone, Raquel, Andreia, João, Renato, Alessandra, Ludmila, Ricardo, Jobson e Nélio pelo carinho e amizade.

A Patrícia Domingos pela amizade.

Ao Marcelo Einecker pela antiga amizade.

Ao Professor Luís Otávio pela amizade e ajuda na parte estatística.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

A todos os amigos da Cedae pela colaboração em parte do trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e financiamento de parte do projeto.

E aos meus novos amigos de trabalho da Feema: Hugo, Gisele, Gláucia, Paulo, Fernando e Tamar pelo companheirismo e compreensão nessa fase final do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 – INTRODUÇÃO	3
1.1 – Considerações gerais:	3
1.2 – Fatores físicos, químicos e biológicos que atuam na degradação e remoção das microcistinas	6
1.3 – Relevância do estudo proposto	11
1.4 – Objetivos	12
2 – EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH, TEMPERATURA E FLOCULANTES EM MICROCISTINAS DISSOLVIDAS (HEPATOTOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS).	13
Resumo	14
1 – Introdução	15
2 – Material e Métodos	18
3 – Resultados e Discussão	23
4 – Conclusão	30
5 – Bibliografia	31
3 – INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE ÁGUA NO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS E NA ATIVIDADE BIOLÓGICA.	42
Resumo	43
1 – Introdução	44
2 – Material e Métodos	47
3 – Resultados e Discussão	51
4 – Bibliografia	55

4 – EFEITO DA ATIVIDADE BACTERIANA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO NA BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS (CIANOTOXINA).	61
Resumo	62
1 – Introdução	63
2 – Material e Métodos	66
3 – Resultados e Discussão	70
4 – Bibliografia	73
5 – REMOÇÃO DE <i>Microcystis aeruginosa</i> E MICROCISTINAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE FILTRAÇÃO LENTA.	78
Resumo	79
1 – Introdução	80
2 – Material e Métodos	82
3 – Resultados e Discussão	88
4 – Conclusão	95
5 – Bibliografia	96
6 – AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DE MICROCISTINAS POR DIFERENTES TIPOS DE CARVÃO ATIVADO GRANULAR UTILIZADOS EM SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA DE CENTROS DE DIÁLISE.	109
Resumo	110
1 – Introdução	111
2 – Material e Métodos	115
3 – Resultados e Discussão	119
4 – Bibliografia	124

7 – DISCUSSÃO FINAL	134
8 – CONSIDERAÇÃO FINAL	137
9 – CONCLUSÕES	137
10 - BIBLIOGRAFIA	139

RESUMO

Florações de cianobactérias tóxicas vêm ocorrendo freqüentemente em vários reservatórios de abastecimento público no Brasil. O tratamento convencional da água pode propiciar a lise celular de cianobactérias, promovendo a liberação de cianotoxinas para água que não são removidas por esse tipo de tratamento. Nesse contexto, o presente trabalho teve como proposta avaliar o processo de degradação de microcistinas dissolvidas sob diferentes condições ambientais, assim como avaliar a eficiência de remoção de células de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) e microcistinas através do processo de filtração lenta e de adsorção em carvão ativado granular. Os resultados dos testes de degradação de microcistinas em diferentes condições de pH (3,0; 5,0 e 7,0) e temperaturas (12, 22 e 30°C) evidenciaram que o processo de degradação dessas moléculas foi extremamente lento, no entanto, em meio mais ácido e temperaturas mais elevada a degradação mostrou-se mais intensa. A aplicação de diferentes concentrações de FeCl_3 (3,5; 7,5 e 10,1 mg.L^{-1}) e de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (5,14 e 28 mg.L^{-1}) favoreceu a lise das células da cepa NPLJ-4. Entretanto, não foi detectada microcistinas na fração dissolvidas dos tratamentos. Além disso, pode-se verificar que a qualidade da água influenciou nas análises quantitativas das microcistinas dissolvidas. Águas com alta condutividade e concentração de Fe e Al promoveram uma redução significativa na quantificação dessas moléculas bem como na sua atividade biológica. Por outro lado, águas com alta concentração de carbono orgânico dissolvido favoreceram o crescimento bacteriano e a degradação de microcistinas dissolvidas, ficando evidente a influência da comunidade bacteriana na biodegradação de microcistinas. Quanto aos experimentos de remoção, os resultados apontaram que o sistema de filtração lenta foi efetivo para a remoção completa de células da cepa NPLJ-4 em concentrações de até 10^5 células. mL^{-1} com taxa de filtração de 2 m^3/m^2 .dia. Nessa condição, não foram detectadas microcistinas intracelulares nem extracelulares na água efluente. Os testes para verificar a capacidade de adsorção de microcistinas por diferentes tipos de carvão ativado granular, normalmente utilizados nos sistemas de purificação de água de centros de diálise, revelaram a não eficiência desses carvões para a adsorção completa das concentrações de microcistinas dissolvidas testadas (1, 10 e 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Conseqüentemente, a água filtrada foi considerada imprópria para a produção de injetável e para o tratamento dialítico.

ABSTRACT

Toxic cyanobacterial blooms have been frequently occurring in several reservoirs and water supplies in Brazil. The conventional water treatment train generally leads to break of cyanobacteria cells, promoting release of cyanotoxins to the water, which are poorly removed by that treatment. Taking this into account, this work had as proposal to investigate degradation process of dissolved microcystins under different environmental conditions as well as to investigate the removal of *Microcystis aeruginosa* cells (NPLJ-4 strain) and microcystins by slow sand filtration and granular activated carbon. The results of the microcystins degradation experiments using different conditions of pH (3,0; 5,0 and 7,0) and temperatures (12, 22 and 30° C) showed that the degradation of these molecules was extremely slow. However, in acidic medium and higher temperatures, the degradation was more intense. The application of different concentrations of ferric chloride (3,5; 7,5 and 10,1 mg L⁻¹) and aluminum sulfate (5,14 and 28 mg L⁻¹) favored the breakage of NPLJ-4 cells. Nevertheless, microcystins were not detected in the dissolved fraction. It could be also verified that the water quality influenced on the quantitative analyses of dissolved microcystins. High conductivity water, Fe and Al concentrations promoted a great deal of reduction on the detection of these molecules, as well as on its biologic activity. On the other hand, water with high dissolved organic carbon concentrations favored the degradation of dissolved microcystins and bacteria growth, which makes evident the influence of the bacteria community on the biodegradation of microcystins. Concerning the removal experiments, the results indicated the slow sand filtration system was effective to the complete removal of NPLJ-4 cells in concentrations up to 10⁵ cells.mL⁻¹ with ration flow rate of 2 m³/m².day. Under these conditions, either intracellular and extracellular microcystins was not detected in filtered water. The experiments carried out to verify the microcystins adsorption capacity of different types of granular activated carbon, commolly used in the purification systems of dialysis centers in Brazil, reveled that those activated carbons were ineffective to complete the adsorption of the dissolved microcystins on the concentrations tested (1,10 e 18 µg L⁻¹). Consequently, the filtered water was considered unsuitable to production of injectable solutions and to the dialysis treatment.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

As cianobactérias ou cianofíceas, também conhecidas popularmente como algas azuis, fazem parte de um grupo de microrganismos que possui organização celular procariótica, uma das formas mais primitivas de vida. Diferem dos eucariotos por não apresentarem uma estrutura organizada do seu material genético e demais organelas (Whitton & Potts, 2000), no entanto, são de grande importância para o ecossistema devido a sua capacidade de realizar fotossíntese oxigênica, como os vegetais superiores, contribuindo para o início do acúmulo de O₂ na atmosfera terrestre.

A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das características marcantes das cianobactérias. Entretanto, os ambientes de água doce são os mais favoráveis para o crescimento das cianobactérias, visto que a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutro-alcálinas (pH 6-9), com temperatura entre 15 a 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Fogg & Thake, 1987).

Normalmente, um grande número de espécies faz parte da comunidade fitoplanctônica. Entretanto, o acelerado processo de eutrofização que os corpos d'água vêm sofrendo, devido principalmente a grande descargas de esgotos industriais e domésticos, tem favorecido o crescimento intenso de poucos gêneros ou espécies, levando a formação de florações.

As cianobactérias também são conhecidas por produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, que incluem compostos que agem como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e cianotoxinas (Gleason & Wood, 1987).

Dentre esses, as cianotoxinas têm sido investigadas por diferentes grupos de pesquisas, devido a seus efeitos danosos em células e organismos. As cianotoxinas mais frequentemente reportadas fazem parte do grupo das neurotoxinas e das hepatotoxinas.

As neurotoxinas de cianobactérias já caracterizadas são alcalóides produzidos principalmente pelos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis* (Landsberg, 2002). Essas

neurotoxinas foram quimicamente já definidas como: anatoxina-a, a anatoxina-a(s) e as saxitoxinas.

As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente produzidas pelas cianobactérias, principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (Carmichael, 1992; Landsberg, 2002). Essas toxinas são oligopeptídeos cíclicos, como as microcistinas e nodularinas ou alcalóide como a cilindrospermopsina.

As hepatotoxinas mais freqüentemente encontradas são as microcistinas que comprovadamente agem como inibidoras potentes e específicas de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A (PP1 e PP2) (Falconer & Buckey, 1989). Essas hepatotoxinas causam danos aos hepatócitos através dos receptores dos ácidos biliares, promovendo uma desorganização dos filamentos intermediários e dos microfilamentos de actina, que são os polímeros protéicos do citoesqueleto. Assim, ocorre uma diminuição do tamanho dos hepatócitos. Conseqüentemente, o fígado perde a sua arquitetura e passa a desenvolver graves problemas hepáticos (Yu, 1994.; Clalysseus *et al.*, 1995).

Os sinais clínicos das hepatotoxicoses observados em animais incluem: fraqueza, anorexia, vômito, extremidades do corpo frias, palidez e diarreia. A morte pode ocorrer de poucas horas a poucos dias, após a exposição inicial a toxina, resultado de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, caracterizado com o aumento de cerca de 100% do peso do fígado (Carmichael, 1994).

A estrutura das microcistinas foi determinada como sendo um heptapeptídeo monocíclico, composto de três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos e dois aminoácidos não usuais: N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4, 6-ácido dienóico, conhecido abreviadamente como Adda (Figura 1) (Harada *et al.*, 1996).

A diferença estrutural das mais de 60 microcistinas já descritas depende principalmente da variação de pelo menos um dos dois L-aminoácidos e da presença ou ausência de grupos metilados em β -Me-Asp e/ou Mdha. As variações dos L-aminoácidos podem gerar combinações conhecidas como microcistina-LA (leucina-alanina); -LR (leucina-arginina); -YR (tirosina-arginina); -YA (tirosina-alanina); -RR (arginina-arginina). Outra característica importante

da molécula das microcistinas é a presença do β -aminoácido Adda. Este aminoácido aumenta a hidrofobicidade dessas moléculas e é considerado essencial para sua atividade biológica (Sivonen & Jones, 1999).

As microcistinas têm peso molecular de aproximadamente 1000 daltons e são consideradas quimicamente estáveis, podendo permanecer biologicamente ativas na coluna d'água durante várias semanas a meses (Park *et al.*, 2001).

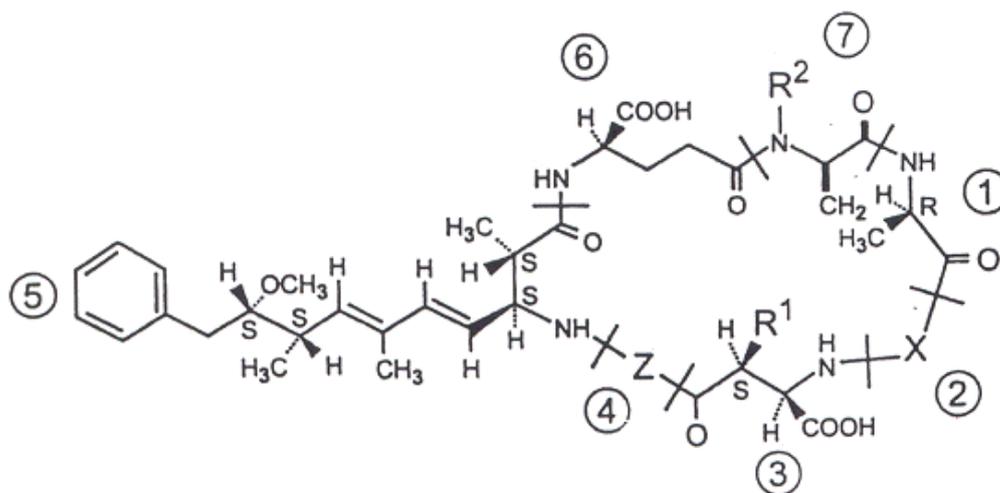


Figura 1 – Estrutura geral das microcistinas, X (2) e Z (4) representam os dois aminoácidos que podem variar e R¹ e R² são os locais de possíveis metilações. (Carmichael, 1994).

1.2 - Fatores físicos, químicos e biológicos que atuam na degradação e remoção das microcistinas

Os estudos do tempo de residência na coluna d'água e da degradação das microcistinas são de extrema importância, devido a grande frequência de florações de cianobactérias produtoras dessas hepatotoxinas em mananciais utilizados como fonte de abastecimento público. Essas hepatotoxinas têm sido comumente detectadas em vários reservatórios de abastecimento em todo o mundo (Watanabe *et al.*, 1989; Sivonen, 1990; Azevedo, 1998; Carmichael *et al.*, 2001). Este fato sugere que essa toxina pode causar sérios riscos a população através da água potável.

Usualmente, a água bruta é tratada seguindo-se uma série de procedimentos que pode resultar na lise celular das cianobactérias (Tsuji *et al.*, 1995). As microcistinas são endotoxinas e, portanto, somente uma pequena proporção é liberada naturalmente para a coluna d'água. Entretanto, quando ocorre a lise celular devido a um tratamento químico, as microcistinas são substancialmente liberadas para a água (Watanabe, 1996).

Os estudos já realizados relatam que a degradação total de microcistinas em ambientes aquáticos irá depender da sua concentração inicial, dos microrganismos presentes, da temperatura da água, do pH e das disponibilidades de outras fontes de carbono orgânico (Jones *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996).

O trabalho de Harada *et al.* (1996) relata a temperatura e o pH como as variáveis limitantes para a degradação das microcistinas. Segundo estes autores, a degradação dessa molécula foi mais eficaz em meio acidificado a 40°C, mas foram necessários 80 dias para que 99% das microcistinas fossem degradadas, e os produtos da degradação detectados não apresentaram efeitos tóxicos. Bourne *et al.* (1996) também relataram a atividade biológica de microcistina-LR na água durante 2 semanas, até a ocorrência de uma epidemia de bactérias que degradaram esta molécula, sendo ainda possível detectar uma pequena concentração após 30 dias. O mesmo foi observado por Watanabe (1996), que verificou a rápida degradação de microcistina-LR e YR na presença de bactérias.

Além disso, Tsuji *et al.* (1995) verificaram que a irradiação solar nas células de cianobactérias era um fator atuante na decomposição de microcistinas, no entanto, a degradação dessa molécula purificada exposta a irradiação solar foi bastante lenta. Estes autores concluíram que os pigmentos fotossintéticos contidos nas células aceleraram o processo de degradação e isomerização para 6(z)- Adda microcistina.

Estudos realizados têm mostrado que o tratamento convencional da água, que inclui os processos de coagulação, por exemplo, com sulfato de alumínio ou cloreto de ferro, sedimentação, filtração em areia e cloração, não são suficientes para remoção das hepatotoxinas, principalmente das microcistinas. As microcistinas dissolvidas podem dispersar-se ou serem diluídas no corpo d'água, mas não são removidas através dos processos convencionais de tratamento (Hrudey *et al.*, 1999; Drikas *et al.*, 2001).

Mouchet e Bonnélye (1998) verificaram que a dosagem necessária de um agente coagulante durante o processo de tratamento de água, para a remoção de células de cianobactérias é dependente da concentração de células, da alcalinidade da água e da fase de crescimento das células. Estes autores também verificaram que o processo de coagulação não é eficiente para a remoção das microcistinas. Somente 17% das microcistinas dissolvidas foram removidas após um tratamento com sulfato de alumínio.

A utilização de algicidas nos mananciais onde é feita a captação de água para o tratamento é uma prática relativamente comum, mas indesejada, pois afeta a vida aquática e exige aplicações freqüentes favorecendo a proliferação de organismos altamente resistentes ao algicida, o que faz com que, ao longo do tempo, seja necessária aplicações de doses cada vez maiores para ter o efeito desejado (Hrudey *et al.*, 1999). Jones e Orr (1994) recomendam a não utilização de água tratada com algicidas durante um determinado período para que ocorra a degradação das microcistinas e de outras substâncias que liberam gosto e odor. Entretanto, pouco se sabe a respeito do tempo necessário para que ocorra a degradação dessas moléculas.

Kenefick *et al.* (1992) estudaram a liberação de microcistinas após um tratamento com sulfato de cobre e com hidróxido de cálcio dado às células de cianobactérias. O primeiro tratamento mostrou que sulfato de cobre promoveu lise da célula, ocorrendo a liberação de microcistinas para a água. No

tratamento com hidróxido de cálcio, as células tenderam a precipitar sem que houvesse a lise das células e liberação dessa cianotoxina.

Com relação ao cloro, que é o oxidante mais utilizado nas estações de tratamento de água, Jones *et al.* (1993) verificaram a ocorrência de remoção das microcistinas dissolvidas somente quando a concentração de cloro livre era superior a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, com tempo de contato variando entre 60 a 120 minutos e valores de pH entre 7 e 8; uma vez que a velocidade das reações é reduzida em pH alcalino.

Quanto aos fatores biológicos, têm sido demonstrado um importante papel das bactérias no processo de degradação das microcistinas. Bactérias do gênero *Sphingomonas* foram capazes de degradar microcistina-LR e o produto de degradação mostrou-se 200 vezes menos tóxico (Jones *et al.*, 1994). A espécie *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de um lago no Japão, também é conhecida por degradar microcistinas. Estas bactérias atacaram o aminoácido Adda que é considerado essencial para a atividade biológica da molécula de microcistina (Takenaka e Watanabe, 1997).

Outro exemplo da importância de microrganismos na remoção de células de cianobactérias e suas cianotoxinas pode ser observado com os resultados obtidos com o sistema da filtração lenta. A utilização desse sistema é uma prática antiga de tratamento de água, mas pouco utilizada devido ao pequeno volume de água obtido durante o tratamento, sendo possível aplicá-la somente em regiões com baixa densidade demográfica. Esse sistema se assemelha ao que ocorre na natureza, quando a água da chuva atravessa as diversas estratificações do solo até encontrar um aquífero (Vargas, 1992 – citado em Sá, 2002)

A efetividade da filtração lenta é atribuída principalmente à ação biológica localizada no biofilme, “*schumutzdecke*”, formado na interface água e areia. Neste filme biológico ocorrem os processos oxidativos da matéria orgânica.

Este tratamento não envolve o uso de coagulante e é amplamente reconhecido por produzir água de boa qualidade, mostrando-se bastante efetivo para a remoção de bactérias patogênicas, vírus e cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (Hendricks *et al.*, 1991).

Alguns trabalhos já foram realizados para verificar a capacidade desse tratamento para a remoção de células de cianobactérias e de suas toxinas. Os trabalhos de Mouchet & Bonnelye (1998) e Melo (1998) - citado em Brandão e Azevedo (2001) indicam que este sistema de tratamento apresentou remoção média de 98% das células de cianobactérias. Entretanto, é importante enfatizar que o potencial desse sistema está relacionado às condições operacionais, assim como a qualidade de água afluyente.

Keijola *et al.* (1991) relataram resultados satisfatórios para a remoção de microcistinas dissolvidas através da filtração lenta.

Por outro lado, a utilização de carvão ativado em estações de tratamento de água tem sido uma prática cada vez mais freqüente, devido principalmente a necessidade da remoção de gosto e odor na água causados muitas vezes por florações de cianobactérias no manancial. Entretanto, poucos são os estudos visando compreender o processo de adsorção das microcistinas pelo carvão ativado. Porém, já é sabido que a eficiência do carvão ativado granular (CAG) na adsorção de microcistinas está relacionada a diferentes fatores, sendo a concentração de matéria orgânica bastante relevante. Lambert *et al.* (1996) verificaram redução de 40-60% na capacidade de adsorção do CAG para a remoção de 0,6-1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas em água contendo 20 mg.L^{-1} de carbono orgânico dissolvido. Ou seja, águas com altas concentrações de matéria orgânica podem apresentar outras substancias preferencialmente adsorvidas ao carvão ativado.

A condição considerada ótima para a adsorção de microcistinas pelo carvão ativado granular (CAG) é que a água apresente concentrações baixas de carbono orgânico dissolvido, o que não reflete as condições das águas normalmente encontradas nos reservatórios brasileiros, particularmente quando sujeitos à florações.

De acordo com os dados apresentados pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, o grave caso de intoxicação humana por microcistinas ocorrido em Caruaru -PE (Brasil), em 1996 foi decorrente da utilização de água sem o tratamento convencional. Esta foi apenas clorada e, conseqüentemente, esse processo acarretou a lise das células de cianobactérias e liberação das toxinas para a fração dissolvida. Essa água contaminada com microcistinas dissolvidas, com dose estimada de 19,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foi utilizada por uma clínica de

diálise nos períodos de falha no abastecimento público. O sistema de purificação de água desta clínica, que incluía processos de filtração em areia, carvão ativado e troca-iônica, não foi eficiente para remoção das microcistinas, deixando a água imprópria para a utilização no tratamento dialítico. Tal fato, ocasionou a morte de pelo menos 52 pacientes devido a uma intoxicação por microcistinas, que foi confirmada através da detecção de microcistinas nos sangue e fígado dos pacientes (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001).

1.3 - Relevância do Estudo Proposto

Como já enfatizado, nas últimas décadas vem ocorrendo um aumento na frequência de florações de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público, lagos artificiais, lagoas salobras, rios e outros corpos d'água brasileiros devido ao crescente processo de eutrofização.

A equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), IBCCF, UFRJ, tem confirmado a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias em diversos corpos d'água localizados nas várias regiões brasileiras. O gênero mais frequentemente identificado nessas florações tóxicas é *Microcystis*, sendo as microcistinas as cianotoxinas mais comumente detectadas (Oliveira *et al.*, 1998).

Em face desses dados, acreditamos ser de extrema importância estudos visando verificar o efeito de fatores físicos, químicos e biológicos tais como: temperatura, pH, concentração de cloreto férrico, sulfato de alumínio e comunidade bacteriana no processo de degradação das microcistinas. Assim como, analisar a eficiência do sistema de filtração lenta para a remoção de células de *M. aeruginosa* e de microcistinas e também avaliar a remoção dessas moléculas através do processo de adsorção por carvão ativado granular utilizados em sistemas de purificação de água de centros de diálise brasileiros.

A partir dos conhecimentos adquiridos teve-se o objetivo de estabelecer as condições mais apropriadas para promover a degradação e/ou remoção das microcistinas, disponibilizando os resultados de forma a torná-los aplicáveis nas estações de tratamento de água, a fim de melhorar a qualidade da água fornecida a população.

1.4 - OBJETIVOS

Geral

- Estudar a influência de processos físicos, químicos e biológicos na degradação de microcistinas, procurando também estabelecer condições eficazes para a remoção destas moléculas.

Específicos

- Verificar o efeito de diferentes valores de temperatura e de pH na degradação de microcistinas dissolvidas;
- Verificar o efeito de diferentes concentrações de cloreto férrico e sulfato de alumínio na lise celular da cepa NPLJ-4 da espécie *Microcystis aeruginosa* e na degradação das microcistinas extracelulares;
- Verificar o efeito da qualidade de água na detecção e atividade biológica de microcistinas dissolvidas;
- Relacionar o processo de degradação das microcistinas dissolvidas com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido;
- Verificar a influência de bactérias de grupos morfológicos diferentes no processo de degradação da microcistina;
- Avaliar a eficiência do processo de filtração lenta em areia para a remoção de células da cepa NPLJ-4 da espécie de *Microcystis aeruginosa* e de microcistinas dissolvidas;
- Avaliar a capacidade de adsorção de microcistinas por diferentes tipos de carvão ativado granular normalmente utilizados em sistemas de purificação de água de centros de diálise brasileiros.

2 - EFEITO DA VARIAÇÃO DE pH, TEMPERATURA E USO DE FLOCULANTES EM MICROCISTINAS DISSOLVIDAS (HEPATOTOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS)

Oliveira, A.C.P¹ & Azevedo, S.M.F.O

Universidade Federal do Rio de Janeiro – CCS – IBCCF - Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Rio de Janeiro, Brasil.

¹ anacpimentel@aol.com

Palavras chave: *Microcystis aeruginosa*, microcistinas, pH, temperatura, cloreto férrico, sulfato de alumínio, degradação.

RESUMO

Cianobactérias tóxicas vêm ocorrendo em vários reservatórios de abastecimento público no Brasil. O tratamento convencional da água geralmente propicia a lise das células de cianobactérias promovendo a liberação de cianotoxinas para a água. As microcistinas, que são as cianotoxinas mais comumente encontradas, são moléculas estáveis e são pouco removidas através do processo convencional de tratamento da água. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de diferentes valores de pH e temperatura no processo de degradação de microcistinas dissolvidas e o efeito de diferentes concentrações de cloreto férrico e sulfato de alumínio na lise das células da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) produtora de microcistinas e na estabilidade das moléculas de microcistinas dissolvidas. As análises de quantificação destas toxinas foram realizadas através da técnica de HPLC. A condição de pH 3,0 foi a que propiciou uma maior redução nas concentrações de microcistinas. Entretanto, após 42 dias ainda foi possível detectar-se 9% da concentração inicial ($11 \mu\text{g.L}^{-1}$). No teste com diferentes temperaturas pode-se verificar que a 30°C o processo de degradação das microcistinas foi mais acentuado. As maiores concentrações de cloreto férrico (7,1 e $10,1 \text{ mg.L}^{-1}$) favoreceram a lise celular. Entretanto, não foi possível detectar-se microcistinas na fração dissolvida. O mesmo foi verificado no tratamento com sulfato de alumínio. Pode-se inferir que altas concentrações de ferro na água favoreceram uma redução na concentração de microcistinas dissolvidas analisadas, seja devido a degradação da molécula de microcistinas ou a uma mudança conformacional em sua estrutura química, tornando-a indetectável pelo método analítico utilizado. Outros íons, como o alumínio, comumente utilizados nas estações de tratamento de água também podem favorecer essa reação química.

1 - INTRODUÇÃO

A ocorrência de cianobactérias tóxicas em ambientes aquáticos já foi verificada em quase todo o mundo. As hepatotoxinas são as toxinas mais comumente produzidas pelas cianobactérias, principalmente dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (Sivonen & Jones, 1999), sendo as microcistinas as hepatotoxinas mais freqüentemente encontradas nos ambientes aquáticos (Lahti, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2002). A estrutura química das microcistinas foi determinada como sendo um heptapeptídeo monocíclico, composto por três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos e dois aminoácidos não usuais: N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8 – trimetil-deca-4, 6-ácido dienóico, conhecido abreviadamente como Adda (Luukkainen *et al.*, 1994). Este aminoácido é considerado essencial para a atividade biológica da molécula (Carmichael, 1994; Harada *et al.*, 1996).

As microcistinas são conhecidas como compostos estáveis, possivelmente devido a sua estrutura cíclica (Chorus & Bartram, 1999).

Estas toxinas podem provocar sérios danos no fígado por promoverem uma desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto (Runnegar e Falconer, 1986), sendo também reconhecidas como inibidoras potentes e específicas de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2 A (PP1 e PP2) (Ward *et al.*, 1997; Heresztyn & Nicholson, 2001). Testes de toxicidade determinaram a DL₅₀ de microcistina-LR em concentrações variando de 36 a 122 µg/kg via intraperitonal (i.p) ou venosa (i.v.) em camundongos ou ratos, podendo-se verificar também toxicidade similar via inalação (Dawson, 1998).

O processo de degradação das microcistinas pode levar de várias semanas a meses, sendo que a degradação total das microcistinas irá depender de sua concentração inicial, dos microrganismos presentes, da temperatura da água, do pH e da disponibilidade de outras fontes de carbono orgânico (Takenaka & Watanabe, 1997; Robertson *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001).

A estabilidade e toxicidade das microcistinas indicam que estas moléculas podem causar sérios riscos a população através do consumo da água potável. As intoxicações humanas podem ser causadas pelo contato direto com células

tóxicas ou pelo consumo de água contaminada com cianotoxinas. A utilização de água com cianobactérias tóxicas, sem o tratamento adequado para a remoção das células ou das cianotoxinas, pode ser a causa de doenças agudas e crônicas, dependendo da dose e tempo de exposição (Falconer, 1998).

Usualmente, a água bruta é tratada seguindo-se uma série de procedimentos que pode resultar na lise celular das cianobactérias. As microcistinas são endotoxinas mas quando ocorre a lise celular, seja devido ao processo de morte natural ou a um tratamento químico, essas toxinas são liberadas para a coluna d'água. Essa liberação pode ser rápida ou pode ocorrer entre 3 a 24 horas, dependendo do produto químico utilizado e da dosagem aplicada. Os procedimentos convencionais de tratamento de água como: floculação, sedimentação e filtração em areia não são capazes de remover eficientemente as microcistinas dissolvidas (Hrudey *et al.*, 1999; Drikas *et al.*, 2001). A aplicação de carvão ativado particulado minimiza a concentração de microcistinas na água, mas não apresenta 100% de eficiência de remoção (Schmidt *et al.*, 2002). Deste modo, as cianotoxinas (principalmente as microcistinas) vêm representando um desafio às empresas responsáveis pelo tratamento de água.

Em alguns países da Europa, a aplicação de produtos químicos utilizados como algicidas é proibida ou limitada devido ao grande impacto ambiental, sendo desfavorável o uso por longo período. A aplicação de um determinado produto nos mananciais deve ser preferencialmente no início de florações de cianobactérias, quando a densidade celular é baixa, para reduzir o potencial de liberação de toxinas intracelulares (Hrudey *et al.*, 1999). No Brasil, o uso de produtos químicos ainda é uma prática comum nas estações de tratamento de água, embora a portaria 1469/MS, em seu artigo 19, vete o uso de algicidas para o controle de crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção que provoque a lise das células, quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células.mL⁻¹.

Os produtos químicos que vêm sendo mais utilizados nos processos de floculação nas estações de tratamento de água brasileiras, são os que incluem íons de alumínio e ferro, mas recentemente polímeros orgânicos também têm sido utilizados.

Muito já se sabe sobre o tratamento convencional de água, que envolve a combinação de vários processos como coagulação, sedimentação, flotação e filtração para a remoção do material particulado. Entretanto, as pesquisas têm sido muito limitadas no que se refere a remoção de microcistinas por meio da combinação de processos convencionais, assim como o efeito de produtos químicos usados no tratamento sobre as moléculas de microcistinas dissolvidas.

Além disso, os trabalhos relativos ao efeito de condições físicas, químicas e microbiológicas no processo de degradação das microcistinas, assim como a eficiência de produtos químicos utilizados para promover o processo de coagulação/floculação se referem principalmente a estudos realizados na Europa e na Austrália. Desse modo, faz-se necessário a condução de estudos no Brasil, já que as espécies de cianobactérias assim como as cianotoxinas podem ser sensíveis as variações ambientais, que são muito distintas nas diferentes regiões brasileiras em relação a países de ambiente temperado.

Portanto, o nosso estudo teve como objetivo verificar o efeito de diferentes valores de pH e temperatura no processo de degradação de microcistinas dissolvidas e o efeito de diferentes concentrações de cloreto férrico e sulfato de alumínio na lise das células de *Microcystis aeruginosa* e na estabilidade da molécula de microcistinas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A cepa NPLJ-4 da espécie *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistinas foi isolada, em 1996, pela equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia, da Lagoa de Jacarepaguá, situada na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro (Lat. 23° 00' S - Long. 43° 20' W).

2.1 - Condições de Cultivo

A cepa NPLJ-4 foi cultivada em condições unialgais no meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 citado em Gibson e Smith, 1982), sob intensidade luminosa de $55 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 8,0, fotoperíodo de 12 horas. As células da cepa NPLJ-4 foram concentradas ao atingir a fase exponencial de crescimento (de 15 a 20 dias de cultivo) e este concentrado de células foi utilizado nos testes descritos a seguir.

Todos os testes foram realizados em triplicatas.

2.2 – Condições Experimentais

- Variação do pH

O teste para verificar a influência do pH no processo de degradação de microcistinas foi realizado utilizando os seguintes valores de pH: 3,0; 5,0 e 7,0. Para tanto em 09 erlenmeyers de 2 litros, cada um contendo 900 mL de água deionizada autoclavada, foi adicionado o concentrado de células da cepa NPLJ-4 numa concentração final de 10^6 células. mL^{-1} , após sofrer um processo de congelamento e descongelamento para promover a lise celular. A concentração de células. mL^{-1} utilizadas continha $141 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de equivalente de microcistina-LR. Os valores de pH foram ajustados previamente utilizando-se uma solução de HCL 0,1 N ou NaOH 0,1 N.

O teste foi realizado sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, sendo analisadas as seguintes variáveis:

- concentração de microcistinas nas frações particulada (intracelular) e dissolvida (extracelular);
- concentração de clorofila *a*;
- quantificação da população bacteriana.

Para tanto, foram retiradas alíquotas de 50 mL nos tempos de 0, 1/2, 1, 2, 4, 8, 13, 17, 21, 27, 34, 42 e 50 dias.

- Variação de temperatura

As diferentes temperaturas testadas (12, 22 e 30°C) estão de acordo com as normalmente encontradas nos ecossistemas aquáticos de diferentes regiões brasileiras. Essas temperaturas foram obtidas através de um banho termostatizado. Para cada temperatura foram utilizados 28 tubos de ensaios contendo água deionizada autoclavada a pH 7,0, sendo adicionado o concentrado de células da cepa NPLJ-4 (10^6 células.mL⁻¹), após sofrer um processo de congelamento e descongelamento, com concentração final de 120 µg.L⁻¹ de equivalente de microcistina-LR.

As variáveis analisadas foram as mesmas do teste anterior. Para tanto, foram retirados 3 tubos, de cada condição experimental, nos tempos amostrais de 0, 1, 5, 12, 20 e 27 dias.

- Cloreto férrico (FeCl₃)

As concentrações de FeCl₃ testadas foram de 3,5; 7,1 e 10,1 mg.L⁻¹. As concentrações utilizadas foram determinadas em teste preliminar que avaliou quais concentrações propiciariam o processo de floculação das células da espécie *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4), e estas estão de acordo com as concentrações normalmente aplicadas nas estações de tratamento de água brasileiras.

Para cada concentração testada foram utilizados 28 tubos de ensaio contendo uma solução de água deionizada autoclavada, FeCl₃ e o concentrado de células intactas da cepa NPLJ-4, obtendo-se um volume final de 20 mL com 2×10^6 células.mL⁻¹. A concentração total de equivalentes de microcistina-LR nessa solução era de 200 µg.L⁻¹.

O efeito do produto químico na integridade celular foi analisado através da determinação da concentração de clorofila *a* e das concentrações de microcistinas nas frações particulada e dissolvida. O tratamento controle foi realizado sem a aplicação de cloreto férrico.

O teste foi realizado em banho termostático a 22°C, pH entre 6,8 a 7,0, intensidade luminosa de 80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. Os tempos amostrais foram de 1, 24, 48, 96 e 192 horas. No decorrer do teste foi quantificada a população bacteriana e no último dia amostral determinada a concentração de ferro nas frações particulada e dissolvida, além das variáveis anteriormente citadas.

– Sulfato de alumínio ($\text{Al}(\text{SO}_4)_3$)

As concentrações de $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ testadas foram 5, 14 e 28 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Essas concentrações também foram estabelecidas a partir de teste preliminar que verificou quais concentrações propiciariam um melhor processo de floculação e as dosagens utilizadas também estão de acordo com as normalmente aplicadas nas estações de tratamento de água brasileiras. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas no teste com FeCl_3 . A concentração de células intactas da cepa NPLJ-4 utilizada foi de 2×10^5 células.mL, equivalente a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de microcistinas. Os tempos amostrais determinados foram de 0, 2, 6 e 24 horas. No decorrer do teste a população bacteriana também foi quantificada, além das variáveis já citadas.

2.3 – Variáveis analisadas

- Extração e quantificação de microcistinas através da técnica de HPLC

Um volume conhecido de cada amostra, aproximadamente 25 mL, foi filtrado em filtro de fibra de vidro e este foi utilizado para a extração das microcistinas na fração particulada de acordo com a metodologia citada em Krishnamurthy *et al.* (1986). A extração das microcistinas na fração dissolvida seguiu a metodologia descrita por Tsuji *et al.* (1994).

A quantificação das microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um aparelho Shimadzu com detector UV/VIS. SPD 10A, bombas LC-10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, utilizando-se uma coluna analítica (Lickrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e absorção a 238 nm. O espectro de absorção foi analisado numa faixa de 195 a 300 nm, podendo-se, comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma).

A concentração das microcistinas foi calculada através dos valores de área obtidos nos cromatogramas e uma curva padrão de microcistina-LR. O resultado final da concentração de microcistinas está expresso em equivalente de microcistina-LR.

Este método apresenta um limite de detecção de 0,5 µg.L⁻¹.

- Quantificação de ferro

Fração particulada: Um volume conhecido da amostra foi filtrada em filtro de fibra de vidro e o filtro sofreu um processo de digestão com 10 mL de uma solução de HNO₃:HCl (3:1), até completa digestão do material particulado, sendo evaporado em placa aquecedora à 100°C. Após evaporação completa foram adicionados 15 mL de HCl 0,1 M e a concentração de ferro determinada através de análise em espectrofotômetro de absorção atômica – Varian, modelo AA1475.

Fração dissolvida: A fração filtrada foi evaporada totalmente em placa aquecedora à 100°C. Durante a evaporação foi adicionado HNO₃ 65% até completa evaporação. Após evaporação completa foram adicionados 15 mL de HCl 0,1 M e a concentração de ferro determinada de acordo com o descrito para a fração particulada.

- Concentração de Clorofila a

A concentração de clorofila a foi determinada após filtração de um volume conhecido de cada uma das amostras, em filtro de fibra de vidro. A este

filtro foram adicionados 6 mL de metanol 100% e, após a agitação em vortex, a suspensão foi incubada durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 2000 g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e a detecção da clorofila *a* determinada por espectrofotometria a 665 nm e 730 nm (Shimadzu, modelo U – 1240).

Para a determinação das concentrações de feofitina foi adicionado ao sobrenadante, após a detecção de clorofila *a*, 50 µl de HCl 0,18 M e após 3 minutos a adição de 50 µL NaOH 0,18 M. A detecção foi repetida nos mesmos comprimentos de onda citados acima (Carmouze, 1994).

Para o cálculo da concentração de clorofila *a* foi determinada a diferença entre as absorbâncias de clorofila *a* e de feofitina, utilizando o coeficiente de extinção determinado por Mackinney (1941).

Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

- Quantificação da população bacteriana

A população bacteriana de cada um dos testes de degradação realizados foi quantificada através do plaqueamento da amostra em meio de cultura Mueller Hinton Broth (MARCA) solidificado em agar e contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) que se desenvolveram nas placas após 24 horas a 30°C.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Cepa NPLJ-4 é caracterizada por produzir 4 tipos diferentes de microcistinas. A Figura 1-A,-B,-C e -D evidencia cada um dos 4 sinais de microcistinas obtidos nos cromatogramas por HPLC após purificação utilizando uma coluna semi-preparativa. Oitenta por cento da concentração total de microcistinas produzidas por essa cepa corresponde a microcistina-LR com D-Leucina (Figura 1-A) (Matthiensen *et al.*, 2000).

As demais microcistinas produzidas por essa cepa não foram caracterizadas (Figura 1-B, -C e -D).

- Efeito de diferentes valores de pH na degradação de microcistinas

As maiores concentrações de microcistinas foram detectadas na fração dissolvida desde a primeira amostragem (Figura 2-B). Tal fato foi decorrente do processo de congelamento e descongelamento prévio dado ao concentrado de células da cepa NPLJ-4, que promoveu a lise celular, comprovada pelas baixas concentrações de clorofila *a* mostradas na Figura 2-C.

As análises realizadas com as frações dissolvidas demonstraram que a condição de pH 3,0 foi a que propiciou maior redução nas concentrações de microcistinas (Figura 2-B). Entretanto, no 42^o dia ainda era possível detectar-se 9% da concentração inicial de microcistinas, equivalente a 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para as condições de pH 5,0 e 7,0 pode-se verificar que 62% e 63%, respectivamente, da concentração inicial de microcistinas dissolvidas ainda eram detectados no 50^o dia.

A Figura 2-A mostra as concentrações de microcistinas na fração particulada. Na condição de pH 3,0 foram detectadas 9,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas na primeira amostragem, enquanto que, nas condições de pH 5,0 e 7,0 as concentrações de microcistinas foram de 1,8 e 0,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A maior concentração de microcistinas detectada na condição de pH 3,0 foi provavelmente devido a um processo de floculação do material particulado observado por inspeção visual. Este material particulado pode ter adsorvido parte das microcistinas da fração dissolvida.

Nas condições analíticas utilizadas, não foi possível verificar novos sinais nos cromatogramas que pudessem ser considerados produtos de degradação das microcistinas. Desta forma, pode-se apenas dizer que ocorreu uma redução nas concentrações das microcistinas dissolvidas, sem aparente formação de outros produtos.

Os resultados das concentrações de microcistinas dissolvidas evidenciam que o processo de degradação foi bastante lento (Figura 2-B). Esses dados estão de acordo com os de Lahti (1997) que verificou a redução decimal de microcistinas na fração dissolvida em 30 dias e os Jones e Orr (1994) que detectaram essa molécula ativa na coluna d'água por mais de 3 semanas.

- Efeito de diferentes valores de temperatura no processo de degradação das microcistinas

Os resultados obtidos evidenciam que embora o processo de degradação desta molécula seja lento, é diretamente proporcional à temperatura da água.

As maiores concentrações de microcistinas foram detectadas nas frações dissolvidas (Figura 3-B). A condição de 12°C apresentou uma redução de 28,6% da concentração inicial de microcistinas em 12 dias, enquanto que as condições de 22°C e 30°C a redução foi de 15,5% e 10,2%, respectivamente. No 50º dia amostral, a condição de 30°C foi a que apresentou a maior redução de microcistinas dissolvidas (42% da concentração inicial). Na fração particulada (Figura 3-A), nas três condições, foram detectadas baixas concentrações de microcistinas na primeira amostragem, variando de 2,06 a 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo observado um declínio constante até o 12º dia amostral, quando a partir daí não foi mais possível detectar-se microcistinas, através do método utilizado.

O perfil cromatográfico observado nos diferentes cromatogramas também não evidenciou sinais que pudessem ser considerados produtos de degradação de microcistinas.

Portanto, fica evidente que em ecossistemas aquáticos que apresentam temperaturas mais elevadas, o processo de degradação das microcistinas pode ser mais acelerado.

Altas temperaturas favorecem o crescimento da população bacteriana que tem um papel importante no processo de degradação das microcistinas. Park *et*

al. (2001) verificaram que a taxa de degradação de microcistinas por bactérias Gram negativas é dependente da temperatura de incubação. A maior taxa de degradação de microcistina-RR foi verificada em temperatura de 30°C. Este resultado concorda com os obtidos no teste (Figura 3-B).

As concentrações de clorofila *a* apresentaram a mesma tendência observada nas amostras do teste de variação de pH, evidenciando a lise total das células a partir do 20º dia amostral (Figura 3-C)

Harada *et al.* (1996) estudaram o efeito do pH e da temperatura na degradação de microcistinas e verificaram que em meio acidificado a 40° C a degradação era mais eficaz. No entanto, foram necessários 80 dias para que 90% das microcistinas fossem degradadas. Os produtos de degradação também não apresentaram efeitos tóxicos.

- Efeito de diferentes concentrações de cloreto férrico na lise celular de *M. aeruginosa* e na estabilidade das moléculas de microcistinas dissolvidas

As maiores concentrações de microcistinas foram detectadas nas frações particulada e dissolvida do tratamento controle, sem a adição do cloreto férrico (Figuras 4-A e -B). A partir de 48 horas de teste, as concentrações de microcistinas na fração particulada apresentaram concentrações constantes, sendo no último dia amostral ainda possível detectar-se 53,7% da concentração inicial de microcistinas na fração particulada (Figura 4-A). Provavelmente, essa redução ocorreu pelas condições não serem adequadas para a manutenção do metabolismo normal das células o que deve ter propiciado a lenta liberação de microcistinas para o meio, como pode ser verificado na Figura 4-B.

Na fração dissolvida, da condição controle, foi possível detectar-se um aumento crescente nas concentrações de microcistinas a partir da 2º amostragem, sendo a maior concentração detectada no último dia amostral (Figura 4-B).

O tratamento com 3,5 mg.L⁻¹ de cloreto férrico, dado às células de *M. aeruginosa*, promoveu uma leve floculação sem alteração de cor do meio, enquanto que os tratamentos com 7,1 e 10,1 mg.L⁻¹ de cloreto férrico favoreceram uma intensa floculação e coloração amarelada do meio.

Na primeira amostragem (tempo de contato de 1 hora), o tratamento com $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloreto férrico favoreceu uma redução de 26,9% da concentração de microcistinas na fração particulada. Na maior concentração de cloreto férrico essa redução foi de 96,9% (Figura 4-A). Na última amostragem (192 horas) foram detectadas $2,65 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ que representa 2,1% da concentração inicial de microcistinas apenas na condição com menor concentração de cloreto férrico (Figura 4-A). Entretanto, na fração dissolvida em nenhum tempo amostral foi possível detectar-se microcistinas ou sinais que pudessem ser considerados produtos de degradação dessa molécula (Figura 4-B).

A eficiência de um produto químico no processo de coagulação está relacionada com as características química da água. Himberg *et al.* (1989) avaliaram a remoção de microcistinas utilizando um tratamento consistido de coagulação com cloreto férrico seguida de filtração em areia e cloração. A dose de 55 mg.L^{-1} de cloreto férrico removeu apenas 16% da concentração inicial de $38 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas. Entretanto, Chow *et al.* (1998) verificaram que as dosagens de 15 e 30 mg.L^{-1} de cloreto férrico aplicadas em uma cultura de células de *M. aeruginosa* não promoveram lise celular, sendo ainda possível observar um estímulo ao crescimento dessas células.

Além disso, a dosagem necessária de um coagulante para a remoção de cianobactérias é dependente da concentração células, alcalinidade da água, fase de crescimento das células e concentração de matéria orgânica total. Estudos realizados pelo Water Research Centre de Londres evidenciaram que microcistinas dissolvidas não foram removidas após um tratamento com sulfato de alumínio e sulfato férrico (WRc, 1996 – citado em Chorus e Bartram, 1999).

De acordo com os dados apresentados na Figura 4-A, pode-se verificar que o tempo de contato das células da cepa NPLJ-4 com o floculante é um fator importante no processo de lise celular. Entretanto, como já mencionado, as microcistinas dissolvidas não foram detectadas em nenhum dos tratamentos nos diferentes tempos amostrais (Figura 4-B).

Estes dados concordam com os de Takenaka e Tanaka (1995) que verificaram que a molécula de microcistina sofreu um rápido processo de degradação em ambientes aquáticos com alta concentração de cloreto férrico. Esses autores constataram que 50% da concentração inicial de microcistinas ($100 \text{ } \mu\text{g}$) foi decomposta em apenas 10 minutos de contato com 1 mg de cloreto

férrico, sendo após 16 horas não mais detectadas microcistinas na fração aquosa. O produto de decomposição das microcistinas foi o DmAdda ((2S,3S,8S)-3-amino-2,6,8 trimetil-10-fenildeca-4E, 6E-ácido dienóico), que não apresentou toxicidade em bioensaios realizados com camundongos.

As concentrações de ferro livre nas frações particulada e dissolvida da condição controle e dos tratamentos com diferentes concentrações de cloreto férrico dado às células de *M. aeruginosa* foram determinadas no último dia amostral e estão apresentadas na Tabela 1. Pode-se verificar que nas concentrações de ferro livre de 0,38 a 1,2 mg.L⁻¹ não foi possível a detecção de microcistinas na fração dissolvida dos tratamentos (Figura 4-B e Tabela 1), provavelmente devido a degradação da molécula ou a uma mudança conformacional da molécula deixando-a de forma indetectável pelo método analítico utilizado.

A determinação da concentração de clorofila *a* foi possível somente no tratamento controle. Nessa condição, os resultados obtidos a partir de 48 horas mostram que as concentrações de clorofila *a* não apresentaram variação quantitativa, indicando a viabilidade das células nesse período, mesmo em água deionizada. Os resultados das concentrações de clorofila *a* dos diferentes tratamentos demonstram que todas as concentrações de cloreto férrico aplicadas reduziram os valores de clorofila *a* abaixo do limite de detecção, evidenciando a lise celular (Figura 4-C).

- Efeito de diferentes concentrações de sulfato de alumínio na lise celular de *M. aeruginosa* e nas moléculas de microcistinas dissolvidas

O tratamento controle foi o que apresentou a maior concentração de microcistinas na fração particulada, podendo-se observar um aumento nas concentrações de microcistinas nas primeiras 6 horas provavelmente devido manutenção do metabolismo celular neste período, evidenciada pelo aumento nas concentrações de clorofila *a* (Figuras 5-A e B). Nesta condição, não foi detectada microcistinas na fração dissolvida em nenhum tempo amostral. Provavelmente, esse resultado foi devido ao menor número de células.mL⁻¹ utilizadas neste teste, portanto, se ocorreu a lise celular na condição controle, a concentração de microcistinas pode estar abaixo do limite do método. Entretanto, cabe ressaltar

que a duração deste experimento foi de apenas 24 horas, enquanto que o do tratamento com cloreto férrico teve duração de 192 horas.

O tratamento com 5 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio promoveu uma redução de 73,7% das microcistinas intracelulares no primeiro contato; após 6 horas não foi mais possível detectar-se microcistinas nessa condição (Figura 5-A). Além disso, na primeira amostragem, foi possível verificar que os tratamentos de 14 e 28 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio propiciaram lise das células da cepa NPLJ-4, evidenciada pela não detecção de microcistinas na fração particulada e pelos dados da determinação da concentração de clorofila *a* (Figuras 5-A e B).

Lam *et al.* (1995) observaram que a aplicação de 200 mg.L⁻¹ de alumínio na água bruta favoreceu a liberação para a fração aquosa de 23% das microcistinas intracelulares em 48 horas, enquanto que Lambert *et al.* (1996) verificaram a remoção de até 39% da concentração inicial de microcistinas (~3 µg.L⁻¹) durante o processo de floculação e sedimentação utilizando 60 mg.L⁻¹ de alumínio .

Drikas *et al.* (2001) verificaram, em teste piloto, que a aplicação de 70 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio na água bruta de um reservatório contendo 10⁶ células.mL⁻¹ de *Microcystis aeruginosa* promoveu a remoção de 70 a 85% de células, sendo na fração dissolvida detectada concentração de microcistinas de 2 a 3 µg.L⁻¹. Entretanto, essa concentração de microcistinas dissolvidas não foi removida durante o tratamento convencional, portanto, esse resultado evidencia, mais uma vez, que o processo de tratamento convencional de água não é eficiente para a remoção de microcistinas dissolvidas.

Na fração dissolvida dos tratamentos com diferentes concentrações de sulfato de alumínio também não foi possível detectar-se microcistinas. Tal fato é um indicativo de que o íon de alumínio também pode favorecer reações químicas que alteram a estrutura química da molécula de microcistinas, modificando assim o seu espectro de absorção e impossibilitando a detecção dessa molécula pelo método analítico de HPLC.

Na condição controle as concentrações de clorofila *a* foram diretamente proporcionais a concentração de microcistinas intracelulares, sendo determinado o mesmo valor de clorofila *a* (0,5 µg.L⁻¹) de 6 a 24 horas.

- Efeito da população bacteriana no processo de degradação das microcistinas

A população bacteriana pode influenciar no tempo de degradação de microcistinas. Jones *et al.* (1994) observaram que o processo de degradação de microcistina-LR dissolvida na água do rio Murrumbidgee (Austrália) foi de 100% em 8 dias, enquanto que em condições assépticas o processo de degradação foi de apenas 10% em 14 dias.

Park *et al.* (2001) verificaram a degradação total de 20 mg.L⁻¹ de microcistina-RR e -LR por uma bactéria Gram negativa, *Sphingomonas paucimobilis* (2,5x10⁶ células.mL⁻¹), num período de 6 dias. Foi também possível verificar que essa bactéria utilizou a molécula de microcistina como fonte de carbono. Bactérias do gênero *Pseudomonas* também degradam microcistina-LR segundo Takenaka e Watanabe (1997).

Nos testes de variação de valores de pH e temperatura, a população bacteriana foi quantificada durante todo período. Os mesmos tipos morfológicos de bactérias foram encontrados ao longo dos experimentos. As bactérias isoladas apresentaram-se na ordem de 10⁶ colônias.mL⁻¹, a partir da 4^ª amostragem, podendo-se verificar que não ocorreu uma variação quali-quantitativa na população bacteriana que pudesse ser um fator indicador da variação da concentração de microcistinas no processo de degradação (Figuras 2-A, 2-B e 3-A, 3-B). O meio de crescimento bacteriano utilizado favoreceu o crescimento predominantemente de bactérias do grupo das Gram negativas. Entretanto, não se pode deixar de considerar que mesmo a população bacteriana apresentando-se qualitativa e quantitativamente semelhante, podem ter ocorrido variações importantes em suas taxas metabólicas que levariam a diferenças nas concentrações de microcistinas determinadas nas diferentes condições.

A quantificação da população bacteriana presente nos testes com cloreto férrico e sulfato de alumínio demonstrou que somente na condição controle foi possível observar o crescimento bacteriano.

4 – CONCLUSÃO

Os parâmetros analisados evidenciaram que o processo de degradação das microcistinas é dependente das condições físicas, químicas e possivelmente microbiológicas da água. Como já havia sido evidenciado por outros autores, a degradação de microcistinas se dá de forma mais rápida em condições ácidas e em temperaturas elevadas. Entretanto, os dados apresentados não comprovam uma efetiva participação da atividade bacteriana na degradação dessas toxinas.

Cabe ainda ressaltar que mesmo nas melhores condições de pH e temperatura a degradação das microcistinas ocorreu de forma lenta, demonstrando a necessidade de um rigoroso monitoramento da concentração de microcistinas dissolvidas quando for utilizado o processo de cloração como alternativa para a degradação dessas toxinas.

A não detecção de microcistinas nas frações dissolvidas dos tratamentos com FeCl_3 e $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ dado às células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) demonstra que estes agentes floculantes mostraram-se bastante eficientes, nas condições utilizadas, para a degradação e/ou remoção de microcistinas. Entretanto, há a necessidade de estudos mais aprofundados para verificar a interferência dos íons de Fe e Al no processo de quantificação de microcistinas, analisando-se também o seu efeito na atividade biológica dessa molécula.

5 - BIBLIOGRAFIA

- Carmichael, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 270: 78-86.
- Carmouze, J-P. (1994). O metabolismo dos ecossistemas aquáticos – Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. ORSTOM SBL. Ed. Edgard Blúcher Ltda, FAPESP, 204-209.
- Chorus, I. & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rowlledge, London.
- Chow, C.W.K.; House, J.; Velzeboer, A.; Drikas, M.; Burch, M.D.; Steffensen, D.A. (1998). The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research* 32: 808-814.
- Dawson, R.M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36: 953-962.
- Drikas, M., Chow; C.W.K., House; J., Burch, M.D. (2001). Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *Journal American Water Works Association*, 100-111.
- Falconer, I.R. (1998). Algal toxins and human health. *The Handbook of Environmental Chemistry* 5: 53-82
- Gibson C.E.. & Smith, R.V. (1982). Freshwater Plankton. In: *The Biology of Cyanobacteria*, Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 463-490.
- Harada, K-I.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M.; Kondo, F. (1996). Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* 34 (1): 73-84.

- Heresztyn, T. & Nicholson, B. (2001). A colorimetric protein phosphatase inhibition assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins based on the dephosphorylation of phosvitin by recombinant protein phosphatase 1. *Environ toxicol* 16: 242-252.
- Himberg, K.; Keijola, A.M.; Hiisvirta, L.; Pyysalo, H.; Sivonen, K. (1989). The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria; a laboratory study. *Water Research* 23: 979-984.
- Hrudey, S.; Burrch, M.; Drikas, M.; Ross, G. Remedial measures. In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rortledge, London, 275-312.
- Jones, G.J.; Bourne, D.G.; Blakeley, R.L.; Doelle, H. (1994). Degradation of 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 recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Reseach* 28 (4): 871-876.
- Krishnamurthy, T.; Carmichael, W.W.; Sarver, E.W. (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria blue-green algae. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 24 (9):865-873.
- Lam, A.K.Y.; Prepas, E.E.; Spink, D.; Hrudey, S.E. (1995). Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Reseach* 29: 1845-1854.

- Lambert, T.W.; Holmes, C.F.B.; Hrudey, S.E. (1996). Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30: 1411-1422.
- Lahti, K. (1997). Cyanobacterial hepatotoxins and drinking water supplies – aspects of monitoring and potential health risks. Monographs of Boreal Environment Research. Finnish Environment Institute, Finland.
- Luukkainen, R.; Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Rinehart, K.L.; Niemelä, S.L. (1994). Isolation and identification of 12 microcystins from strains and two samples of *Microcystis sp.*, structure of a new hepatotoxin. *Toxicon* 32(1); 133-139.
- Mackinney, G. (1941). Adsorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biology Chemistry*. 140: 315-322.
- Matthiensen, A.; Metcalf, J.S.; Ferreira, A.H.F.; Yunes, J.S.; Cood, G.A. (2000). Biodegradation and biotransformation of microcistins by aquatic bacteria in estuarine waters from the Patos Lagoon, RS, Brasil. In: Sabino, M.; Rodriguez-Amaya, D.; Corrêa, B. (Eds.). X International IUPAC. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Organized by Instituto Adolfo Lutz, Guarujá, 21-25 may.
- Oliveira, A.C.P.; Soares, R.M.; Costa, S.M.; Azevedo, S.M.F.O. (1998). Ocorrência de cianotoxinas em reservatórios de abastecimento público do Brasil. 5^o Ecotox – Encontro Brasileiro de ecotoxicologia, 1^o Coban – colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 05-08 de outubro – Itajaí – SC.
- Park, H-D.; Sasaki, Y.; Maruyama, T.; Yanagisawa, E.; Hiraishi, A., Kato, K. (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16: 337-343.

- Robertson, P.K.J.; Lawton, L.A.; Cornish, B.J.P.A. (1999). The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 3: 544-551.
- Runnegar, M.T.C. & Falconer, I.R. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and action polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* 24 (2): 109-115.
- Schmidt, W.; Willmitzer, H.; Bornmann, K.; Pietsch, J. (2002). Production of drinking water from raw water containing cyanobacteria – pilot plant studies for assessing the risk of microcystin breakthrough. *Environmental Toxicology* 17: 375-385.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rovtledge, London, 41-111.
- Takenaka, S. & Tanaka, Y. (1995). Behavior of microcystins and its decomposition product in water treatment process. *Chemosphere* 31: 3635-3641.
- Takenaka, S. & Tanaka, Y. (1995). Decomposition of cyanobacterial microcystins by iron (III) chloride. *Chemosphere* 30: 1-8.
- Takenaka, S. & Watanabe, M.F. (1997). Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34: 749-757.
- Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Harada, K-I. (1994). A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxin* 32 (10):1251-1259.
- Yuan, B-L.; Qu, J-H.; Fu, M-L. (2002). Removal of cyanobacterial microcystin-LR by ferrate oxidation-coagulation. *Toxicon* 40: 1129-1134.

Ward, C.J.; Beattie, K.A.; Lee, E.Y.C.; Cood, G.A. (1997). Colorimetric protein phosphatase assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters* 153: 465-473.

Tabela 1 – Concentrações de ferro livre, nas frações particulada e dissolvida (mg.L^{-1}) do tratamento de cloreto férrico dado às células de *M. aeruginosa*, no último dia amostral.

Tratamento com Cloreto férrico (mg.L^{-1})		Fração particulada	Fração dissolvida
FeCl_3	Fe	Fe (mg.L^{-1})	Fe (mg.L^{-1})
Controle	-	0,00096	0,015
3,5	1,2	0,081	0,38
7,1	2,4	0,034	0,91
10,1	3,5	0,02	1,20

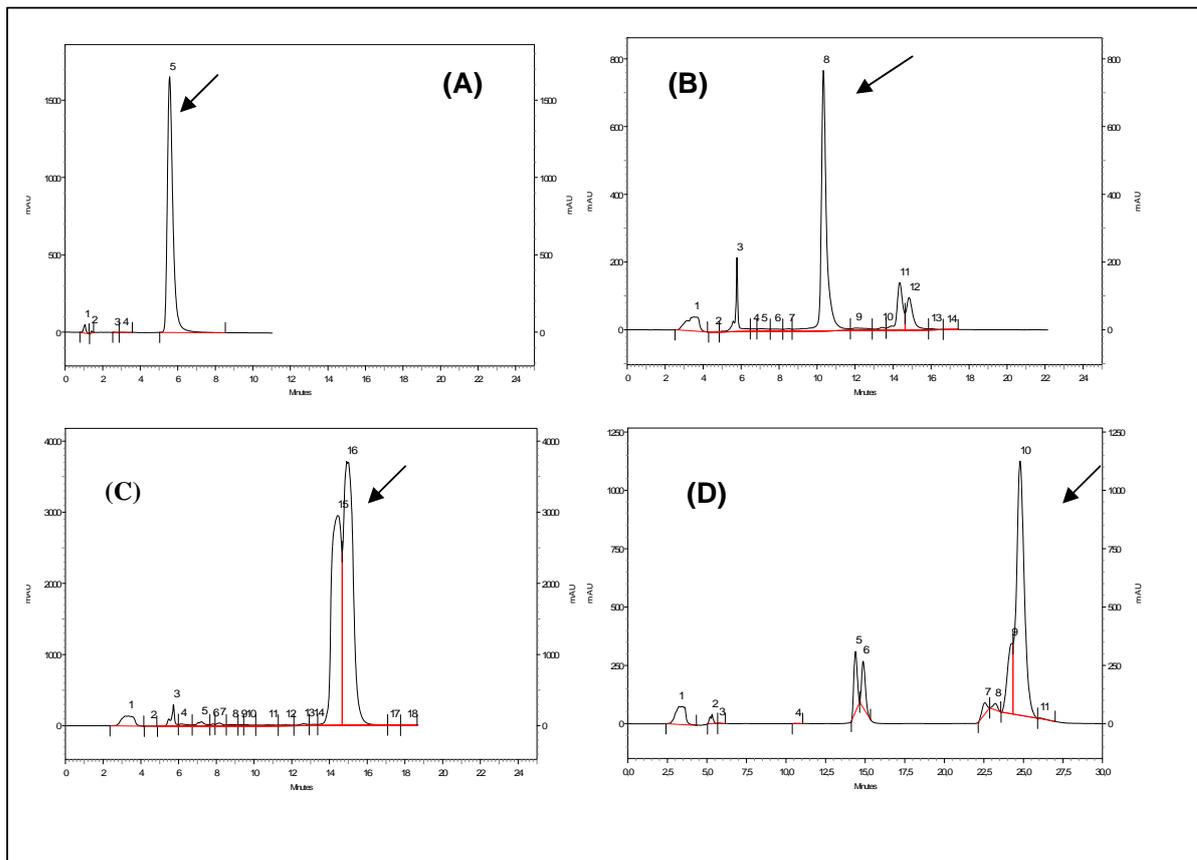


Figura 1 - Cromatogramas por HPLC da fração metanol 100% dos 4 tipos de microcistinas purificados produzidos pela Cepa NPLJ-4. (A) microcistina-LR com D-Leucina, principal microcistina produzida por essa cepa; (B), (C) e (D) microcistinas não caracterizadas.

→ Indica sinal tóxico de microcistinas, através da comparação no U.V. com o espectro do padrão de microcistina-LR.

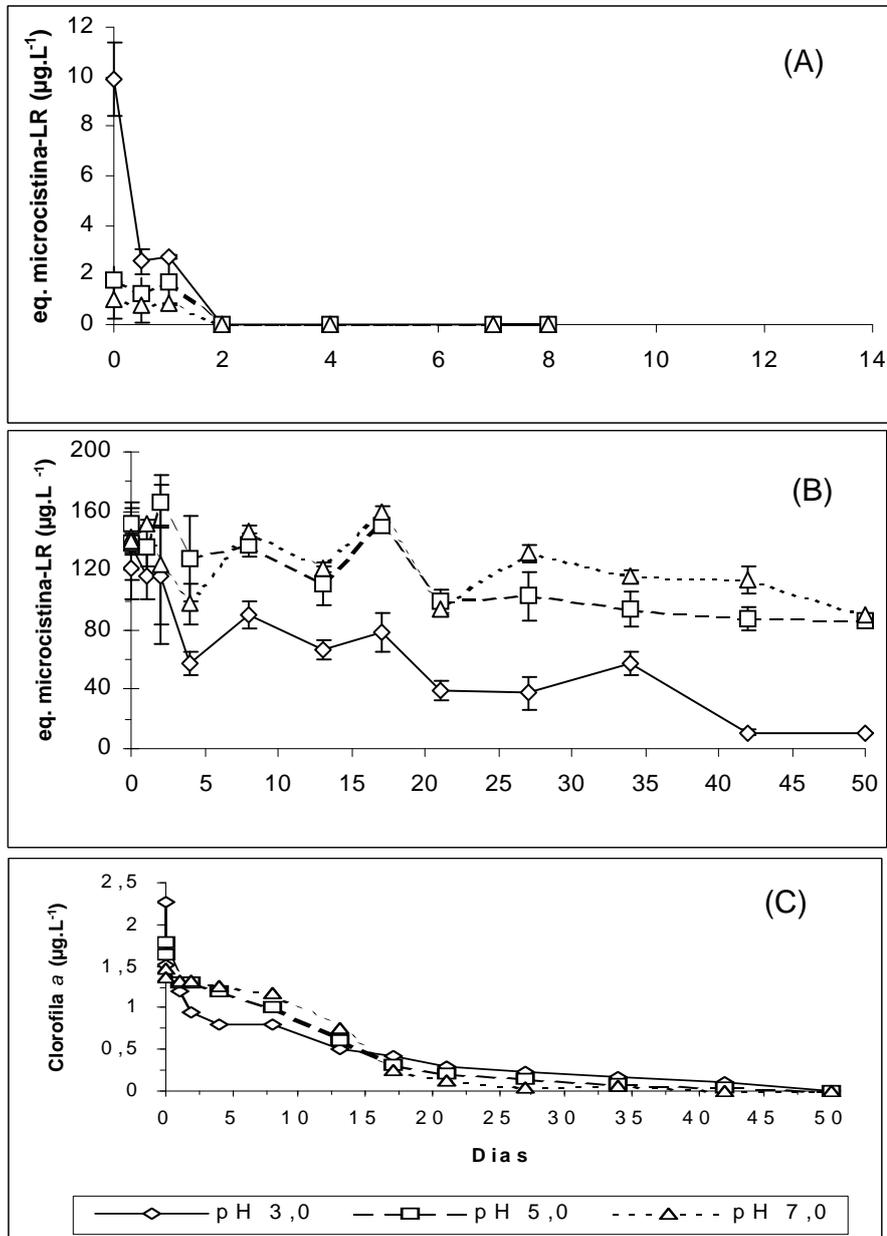


Figura 2 – Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas frações particulada (A) e dissolvida (B) e das concentrações de clorofila a (C), em diferentes valores de pH.

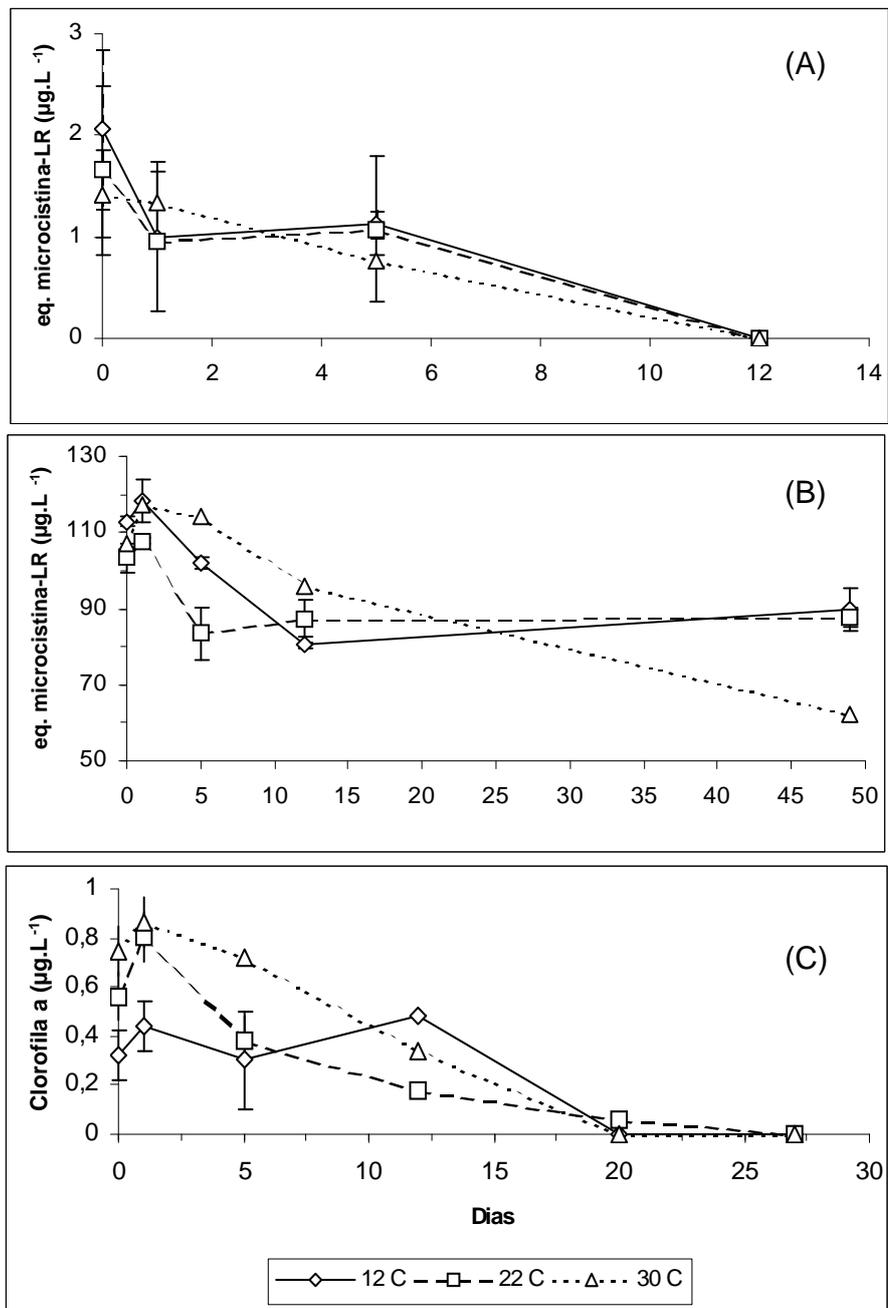


Figura 3 - Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas frações particulada (A) e dissolvida (B) e das concentrações de clorofila a (C), em diferentes valores de temperatura.

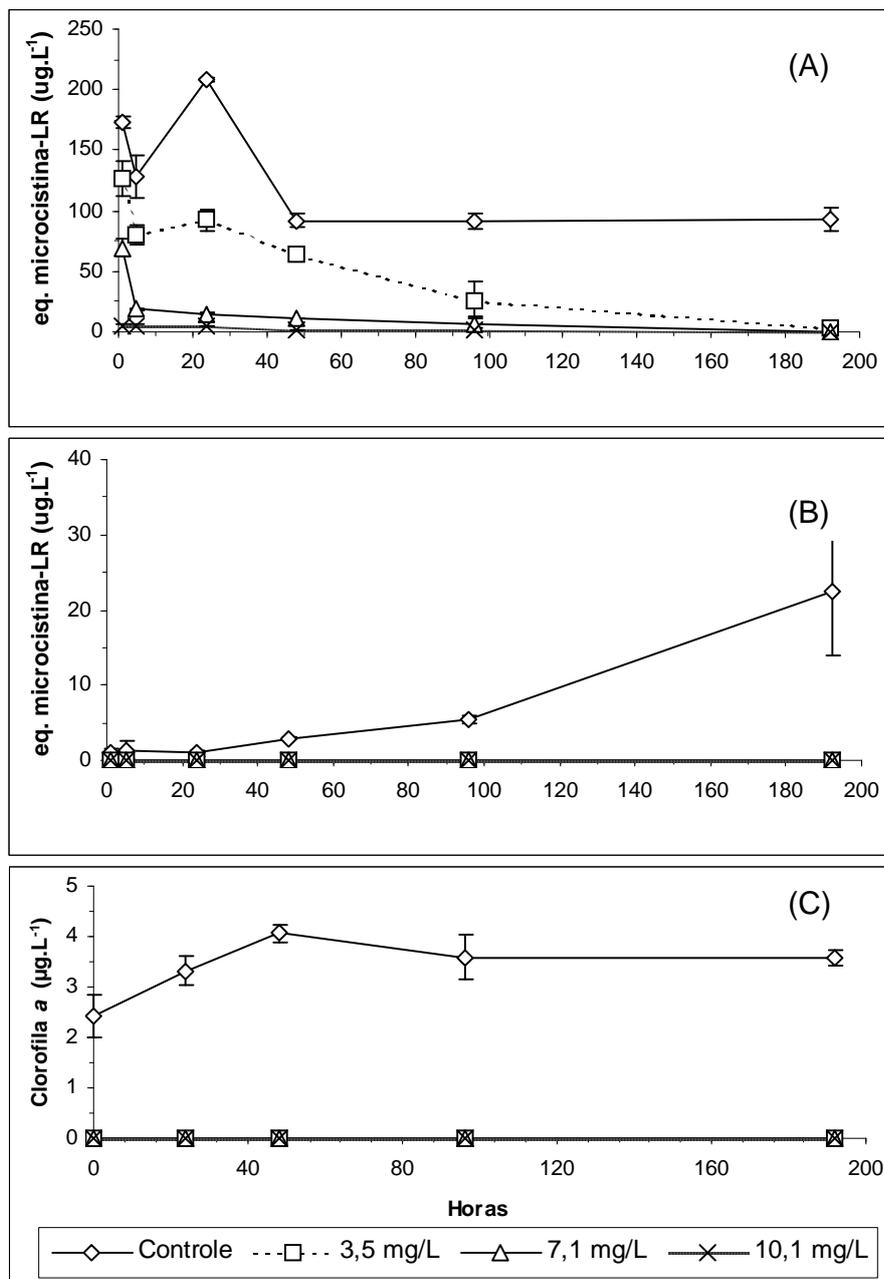


Figura 4 – Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas frações articulada (A) e dissolvida (B) e das concentrações de clorofila a (C) no tratamento com cloreto férrico dado às células de *M. aeruginosa*.

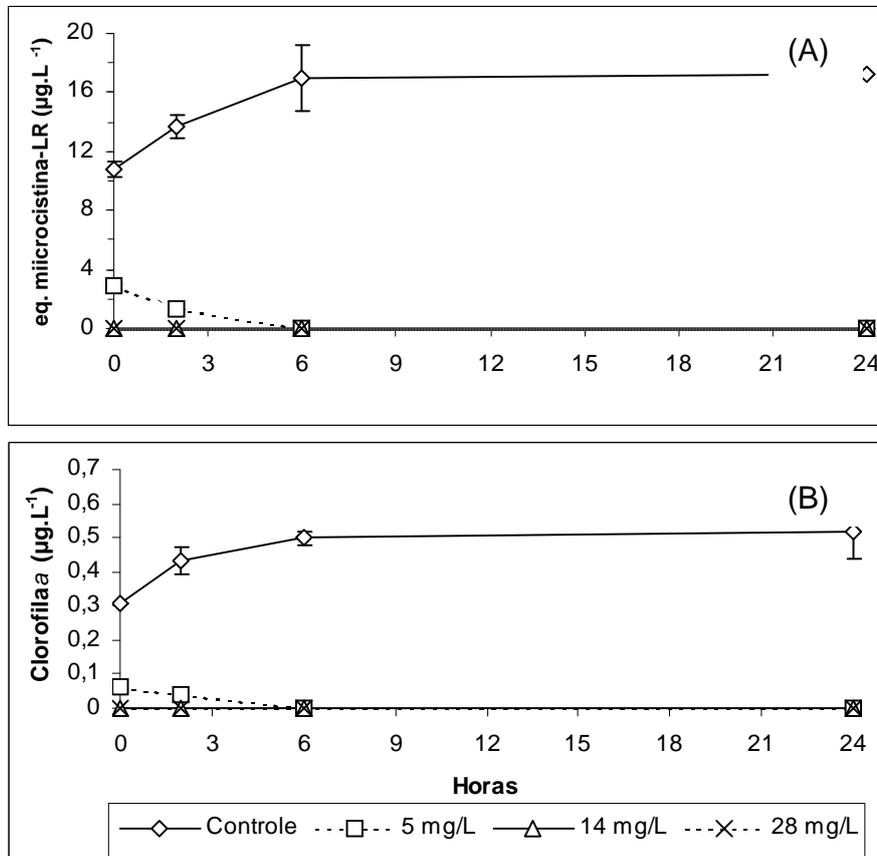


Figura 5 - Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na fração particulada (A) e das concentrações de clorofila a (B) no tratamento com sulfato de alumínio dado às células de *M. aeruginosa*.

3 – INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE ÁGUA NO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO DE MICROCISTINAS DISSOLVIDAS E NA SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Oliveira, A.C.P¹; Magalhães, V.F; Soares, R.M; Bernardo, R.R; Azevedo, S.M.F.O.

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro – CCS - IBCCF – Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Rio de Janeiro, Brasil.

¹ anacpimentel@aol.com

Palavras chave: microcistinas, qualidade de água, metais, quantificação, detecção, atividade biológica

RESUMO

A presença de microcistinas dissolvidas na água pode representar um sério risco a saúde pública. Entretanto, a quantificação dessas hepatotoxinas, assim como sua atividade biológica podem ser influenciadas pela qualidade da água, em especial por agentes químicos comumente utilizados no processo de tratamento de água. Portanto, esse trabalho visou verificar o efeito da qualidade da água na quantificação e atividade biológica de microcistinas dissolvidas analisadas por diferentes métodos analíticos como o de cromatografia líquida de alta eficiência, imunoenensaio do tipo ELISA e inibição de proteínas fosfatases. As diferentes concentrações de microcistinas quantificadas em água deionizada estavam de acordo com a concentração inicial adicionada, comprovando a eficiência de todos os métodos analíticos. Todas as concentrações testadas de microcistinas solubilizadas em água da rede de distribuição pública apresentaram redução na quantificação dessa molécula através dos diferentes métodos analíticos utilizados. Na água da rede foi verificada concentração de Fe de $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ e condutividade de $69,8 \text{ }\mu\text{S}$, enquanto que na água deionizada não foi detectada a presença de Fe e apresentava condutividade de $1,6 \text{ }\mu\text{S}$. Os testes realizados em água deionizada adicionando-se microcistinas dissolvidas e diferentes concentrações de Fe e Al comprovaram os resultados obtidos com o teste realizado em água da rede, demonstrando a influência desses íons na quantificação de microcistina. Esses íons metálicos poderiam promover uma mudança conformacional da molécula, deixando-a de forma indetectável, através dos diferentes métodos analíticos utilizados. Os ensaios de inibição de proteínas fosfatases concordaram com os demais resultados apresentados, mostrando que a composição química da água da rede além de alterar o processo de quantificação dessa molécula também inibiu a atividade biológica das microcistinas.

1 – INTRODUÇÃO

O crescente nível de poluição dos ecossistemas aquáticos tem acompanhado o aumento da população urbana e o desenvolvimento industrial e da agricultura. O acelerado processo de eutrofização destes ambientes vem favorecendo o aparecimento freqüente de florações de cianobactérias nos corpos d'água utilizados como fonte de abastecimento público em todo o mundo.

Vários gêneros de cianobactérias são potencialmente produtores de toxinas (cianotoxinas). As cianotoxinas têm sido identificadas como alcalóides neurotóxicos (anatoxina-a, anatoxina(s) e saxitoxinas) e são produzidas por espécies principalmente dos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lygbya* e *Cylindrospermopsis*. Entretanto, o tipo mais comum de cianotoxinas são as hepatotoxinas (peptídeos hepatotóxicos) que são frequentemente produzidas pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Umezakia* e *Aphanizomenon* (Sivonen & Jones, 1999; Landsberg, 2002).

As microcistinas são as hepatotoxinas mais comumente encontradas nas florações tóxicas. Estas são potentes inibidoras de proteínas fosfatases do tipo 1 2A e são reconhecidas como promotoras de tumores hepáticos (Falconer, 1991).

A utilização de água com a presença de cianobactérias tóxicas, sem o tratamento adequado para a remoção das células tóxicas ou das cianotoxinas, pode ser a causa de doenças agudas e crônicas, dependendo da dose e do tempo de exposição (Vasconcelos & Araújo, 1994; Hunter, 1992).

Vários casos de intoxicações humanas já foram relatados. Yu (1994) constatou uma alta taxa de mortalidade por carcinoma hepatocelular na população que era abastecida com água contendo cianobactérias tóxicas, predominando o gênero *Microcystis*. Sintomas de intoxicação humana também foram observados em uma população abastecida com a água do rio Guadiana, em Portugal, onde surgiram vários casos de dermatites e desordens gastrointestinais, após a ingestão da água com intensa floração de *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasconcelos, 1994).

Falconer (1994) relatou que na Austrália a água de um reservatório de abastecimento público contendo células tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii*

teve como único tratamento a cloração; após uma semana de consumo desta água foi notificada uma epidemia de hepatoenterites que levou a hospitalização aproximadamente 136 pessoas.

No Brasil, dois casos de intoxicação humana seguida de morte já foram relatados. O primeiro ocorreu na Bahia em 1988, onde uma grave epidemia de gastroenterite atingiu a região de Paulo Afonso, logo após o alagamento do reservatório de Itaparica. As 2.392 pessoas infectadas apresentaram sintomas típicos de hepatotoxicoses, destas 88 morreram devido a uma intensa diarreia. A análise da água utilizada para abastecimento revelou a presença de algas flageladas pigmentadas e cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* (Teixeira *et al.*, 1993).

O primeiro caso confirmado de intoxicação humana por microcistinas aconteceu em 1996 na cidade de Caruaru-PE (Brasil), onde foi constatado a intoxicação por essa hepatotoxina via intravenosa. Pacientes hemodializados apresentaram sintomas típicos de hepatotoxicoses, sendo detectada a presença de microcistinas no sangue e no fígado das pessoas intoxicadas (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001).

Em decorrência da gravidade de tais fatos, em 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou como limite máximo a concentração de $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de microcistinas na água potável. Portanto, é de extrema importância que a quantificação dessas hepatotoxinas seja feita de forma segura.

Entretanto, embora alguns trabalhos já tenham demonstrado que a qualidade da água pode interferir na quantificação de microcistinas dissolvidas (Takenaka e Tanaka, 1995; Yuan *et al.*, 2002), pouco se sabe ainda sobre a influência de íons metálicos com Fe e Al, que comumente compõem os agentes coagulantes utilizados no tratamento de água, na quantificação e atividade biológica dessas hepatotoxinas.

Os resultados já obtidos por Oliveira e Azevedo (Capítulo 2) demonstram que a utilização de cloreto férrico e sulfato de alumínio na presença de células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) produtora de microcistinas, não permitiu a detecção dessas hepatotoxinas na fração dissolvida, embora houvesse claros indícios de lise celular. Porém, isso não comprovou que as microcistinas tivessem tido sua atividade

biológica reduzida ou anulada, o que levanta uma séria preocupação quanto a possível subestimação do potencial tóxico da água tratada com esses agentes flocculantes.

Visando verificar então o efeito da qualidade de água na detecção e na atividade biológica das microcistinas dissolvidas foram realizados testes de quantificação dessa molécula em água deionizada e em água potável da rede de distribuição pública por meio de diferentes processos analíticos normalmente utilizados para a quantificação de microcistinas.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Microcistinas dissolvidas

Microcistinas dissolvidas foram obtidas a partir do cultivo da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4). Esta cepa produz 4 tipos diferentes de microcistinas, sendo que 80% destas trata-se de uma microcistina-LR com D-leucina. A referida cepa foi isolada da Lagoa de Jacarepaguá - RJ (Lat. 23° 00' S – Long. 43°20' W) e cultivada em condições unialgais em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 citado em Gibson e Smith, 1982) sob intensidade luminosa de 55 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 8,0 e fotoperíodo de 12 horas.

As células, ao atingirem a fase exponencial de crescimento (entre 15 a 20 dias de cultivo), foram concentradas através de filtração tangencial e sofreram um processo de congelamento e descongelamento para favorecer a lise celular. Esse concentrado de células lisadas foi filtrado em filtro de fibra de vidro para a retirada da matéria orgânica particulada e as microcistinas dissolvidas em solução aquosa foram utilizadas nos testes.

2.1 – Condições experimentais

Efeito da qualidade de água na quantificação de microcistinas dissolvidas

Para verificar a influência da qualidade da água no processo de detecção e quantificação de microcistinas foram realizados testes comparativos utilizando como meio solúvel água deionizada e água potável fornecida pela rede de distribuição pública da cidade do Rio de Janeiro obtida na torneira do Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia de Cianobactérias - UFRJ. Diferentes concentrações de microcistinas dissolvidas foram adicionadas à água deionizada e à água potável da rede, obtendo-se concentrações finais de 1; 2,4; 10; 15 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após pelo menos 2 horas de contato das microcistinas com o meio solúvel foram analisadas as seguintes variáveis:

- Concentração de microcistinas, através dos métodos de imunoenensaio do tipo ELISA e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Concentração de Fe livre através de espectrofotômetro de absorção atômica;
- Condutividade;
- A atividade biológica das microcistinas, através do método de inibição de proteínas fosfatases.

Todas as condições experimentais foram realizadas em triplicatas.

Efeito de íons de Fe e Al na quantificação de microcistinas dissolvidas

Para verificar o efeito isolado dos íons de Fe e Al no processo de quantificação de microcistinas foram realizados os seguintes testes:

Ferro: Diferentes concentrações de Fe (0,14; 0,22; 0,30 e 1,2 mg.L⁻¹) foram obtidas a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de Fe de 1000 mg.L⁻¹ (Merck). Essas diferentes concentrações foram adicionadas a 10 mL do concentrado de microcistinas dissolvidas contendo 14 µg.L⁻¹. O tempo de contato do íon de Fe com o concentrado de microcistinas foi de 2 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi liofilizada e ressuspensa em 1 mL de metanol 50%.

Alumínio: As concentrações de íons de alumínio testadas foram 2, 4 e 10 mg.L⁻¹ obtidas também através de uma solução padrão de Al de 1000 mg.L⁻¹ (Merck). Para a realização do teste foi seguido o mesmo procedimento do teste anterior.

As variáveis analisadas nos dois testes foram:

- Concentração de microcistinas, através da técnica de HPLC;
- Concentração de Fe e Al, através de espectrofotômetro de absorção atômica.

2.2- Variáveis analisadas

Quantificação de microcistinas

- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A extração das microcistinas na fração dissolvida seguiu a metodologia descrita por Tsuji *et al.* (1994).

A quantificação das microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi feita em um aparelho Shimadzu com detector UV/VIS. SPD 10A, bombas LC-10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, utilizando-se uma coluna analítica (Lichrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e UV a 238 nm. O espectro de absorção foi analisado numa faixa de 195 a 300 nm, podendo-se comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma).

A concentração de microcistinas foi calculada através dos valores de área obtido no cromatograma e uma curva padrão de microcistina-LR. O resultado final da concentração de microcistinas foi expresso em equivalente de microcistina-LR.

Este método apresenta um limite de detecção de 0,5 µg.L⁻¹ de microcistinas.

- Imunoensaio do tipo ELISA

A quantificação das microcistinas através da técnica de imunoensaio do tipo ELISA foi realizada utilizando “kits” específicos para microcistinas (Envirologix Inc[®]), com pelo menos 3 repetições por amostra.

Este método apresenta um limite médio de detecção de 0,16 µg.L⁻¹ de microcistinas.

- Inibição de proteínas fosfatases (PP1)

Este método foi utilizado para verificar a atividade biológica das microcistinas dissolvidas. O ensaio de inibição de proteínas fosfatases por microcistinas seguiu a metodologia descrita em An & Carmichael (1994).

A atividade da PP1 foi determinada por método colorimétrico através da liberação de *p*-nitrofenol, após reação enzimática, utilizando como substrato *p*-

nitrofenol fosfato (Sigma). A PP1 (Roche) foi diluída em solução tampão Tris-HCl (40 mM, pH: 8,6), KCl (20 mM) e Mg Cl₂ (30 mM) em água nanopura.

As concentrações do padrão de microcistina-LR (Sigma) utilizadas para estabelecer a curva padrão variaram entre 0 – 10 µg.L⁻¹. As soluções padrão, o branco e as amostras foram incubadas com 1 mU.mL⁻¹ de PP1 durante 20 minutos à temperatura ambiente. A reação enzimática foi iniciada após a adição de substrato *p*-nitrofenol fosfato (40 mM). A leitura foi realizada a 405 nm em leitora de microplacas.

A curva padrão de inibição de proteína fosfatase por microcistina-LR foi obtida através de concentração de microcistina-LR em escala logarítmica versus ao percentual de atividade enzimática, obtido através dos valores de absorbância de B/B₀, onde B é o valor da absorbância da concentração de microcistina-LR e B₀ é o valor de absorbância do controle (sem microcistina).

Quantificação de íons de Fe e de Al

Para a quantificação de Fe e Al nas amostras um volume conhecido foi filtrado em filtro de fibra de vidro e o filtrado evaporado em placa aquecedora a 100°C. Durante a evaporação foi adicionado HNO₃ 65% até completa evaporação. Após esta etapa foram adicionados 15 mL de HCl 0,1M. As concentrações de Fe e Al foram determinadas através de análise em espectrofotômetro de absorção atômica – Varian, modelo AA1475.

Condutividade

A condutividade da água deionizada e da água potável da rede de distribuição foi medida através de um condutivímetro - Yellow Springs (modelo 30).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos demonstraram que para as diferentes concentrações de microcistinas testadas a quantificação foi bastante reduzida na água potável da rede de abastecimento público, nos diferentes métodos de detecção utilizados (Tabelas 1 e 3).

As análises de quantificação de ferro e os valores de condutividade demonstraram que a concentração total de íons de Fe livre na água potável da rede de distribuição era de $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ e condutividade de $69,8 \text{ }\mu\text{S}$, enquanto que na água deionizada não foi detectada a presença de íons de ferro e apresentava condutividade de $1,6 \text{ }\mu\text{S}$.

De acordo com a portaria brasileira nº 1469/00/MS, que estabelece as normas de qualidade de água para o consumo humano, a concentração máxima aceitável de Fe na água de abastecimento público é de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. A concentração elevada desse íon na água da rede pode ser atribuída à tubulação de ferro ainda utilizada em alguns municípios do Rio de Janeiro, assim como em outros estados brasileiros, além do uso constante de produtos químicos como o cloreto férrico durante o tratamento de água.

Dentre as variáveis não analisadas na água potável da rede, sabe-se que o cloro também é capaz de oxidar as moléculas de microcistinas. Segundo Nicholson *et al.* (1994) a eficiência do cloro na redução de microcistina-LR foi muito dependente do pH e do tempo de contato. Em seus experimentos verificaram que com valores de pH igual a 7,0 a remoção de microcistinas atingiu 88% depois de 22 horas de contato, enquanto que em pH igual a 5,0, a remoção foi superior a 93% em 30 minutos. Quando o valor de pH adotado foi de 9,0, a remoção da toxina foi inferior a 40% após 22 horas de contato.

Os resultados dos testes realizados com microcistinas dissolvidas em água deionizada adicionando microcistinas dissolvidas e diferentes concentrações de Fe e Al estão apresentados na Tabela 2. Estes dados evidenciam o efeito desses íons no processo de quantificação de microcistinas, concordando com os dados apresentados na Tabela 1. Entretanto, os resultados obtidos mostram que a maior

concentração de Fe testado ($1,2 \text{ mg.L}^{-1}$) reduziu a detecção de microcistinas dissolvidas ($14 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) em 32%, enquanto que, na água da rede onde foi determinada uma menor concentração de íons de Fe, foi possível verificar a perda total de quantificação dessa molécula, através dos métodos de detecção por ELISA e HPLC (Tabela 1 e 2). Provavelmente, na água da rede além dos $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de Fe livre havia outros metais, como o Al, que também podem ter interferido no processo de quantificação de microcistinas.

O íon de Al também mostrou-se um metal limitante no processo de quantificação das microcistinas, podendo-se verificar que a detecção da molécula foi inversamente proporcional a concentração desse metal (Tabela 2).

Poucos são os trabalhos que relatam o efeito de íons na molécula de microcistinas. Humble *et al.* (1997) verificaram que as microcistinas podem ser complexadas ou queladas ao Fe e/ou outros íons, uma vez que esses peptídios cíclicos possuem grupos funcionais, como os dos grupamentos carbonila (C=O) e amino (-NH-) que podem atuar como sítio de ligação destes metais com a microcistina. Segundo An & Carmichael (1994) para as microcistinas apresentarem um efeito inibitório nas PP1 é necessário a presença do grupo ácido (COOH) no ácido glutâmico e no Adda. A dupla ligação no ADDA também é considerada essencial para a atividade biológica e conseqüentemente inibição de PP1.

Yuan *et al.* (2002) verificaram a completa decomposição de microcistina-LR após 1 hora de contato com 20 mg.L^{-1} de ferrato (Fe^{+6}), um forte oxidante. Esses autores sugerem que o ferrato modificou o grupamento Adda e clivou o anel peptídico da molécula. As análises de microcistinas através da técnica de HPLC evidenciaram a perda da detecção dessa molécula no seu espectro de absorção característico. Takenaka e Tanaka (1995) ressaltaram que o cloreto férrico também interferiu na detecção de microcistinas. Estes autores trataram $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR com 100 mg.L^{-1} de cloreto férrico e observaram a redução de 25% das microcistinas em apenas 10 minutos de contato e a não detecção da molécula após 16 horas de contato. O mesmo foi verificado por Gajdek *et al.* (2001) que verificaram a decomposição de microcistina-LR através da oxidação fentoniana.

Os íons de Fe^{+3} , assim como os de Al^{+3} , na forma de cloreto férrico e sulfato de alumínio são utilizados com grande freqüência nas estações de tratamento de água brasileiras para promover a coagulação/floculação da matéria orgânica particulada que pode inclusive conter células de cianobactérias potencialmente produtoras de cianotoxinas.

Os ensaios de inibição de PP1 realizados com a adição de concentrações conhecidas de microcistinas dissolvidas na água da rede e em água deionizada mostraram a perda da atividade biológica das microcistinas solubilizadas na água da rede (Tabela 3). Estes resultados concordam com a quantificação de microcistinas pelo método de imunoenensaio do tipo ELISA, evidenciando que a composição química da água potável da rede, além de favorecer a não detecção das microcistinas, também propiciou a perda da atividade biológica dessa molécula.

A Figura 1 mostra a curva padrão de atividade relativa de PP1 utilizando diferentes concentrações do padrão de microcistina-LR. A linearidade da curva encontra-se entre 0, 62 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (17,1% de inibição da PP1) e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que apresentou inibição de 80,1% das PP1. Este intervalo de concentrações de microcistina-LR foi utilizado para calcular o percentual de inibição de PP1 pelas amostras testadas.

De acordo com a curva padrão de atividade de PP1 (Figura 1), pode-se verificar claramente que as amostras de água da rede contendo as várias concentrações de microcistinas testadas demonstraram um efeito inibidor de PP1 abaixo do limite estabelecido pela curva padrão de 17,1% de inibição (Tabela 3). Portanto, comparando essas amostras com os altos valores de inibição observados para as amostras de microcistinas solubilizadas em água deionizada, pode-se verificar nitidamente a perda da atividade biológica das microcistinas solúveis na água da rede de distribuição pública.

Frente a tais resultados, fica nítida a necessidade de outros estudos visando verificar a interferência de outros íons como: cobre, zinco, dentre outros, normalmente encontrados na água, no processo de quantificação de microcistinas, assim como verificar o efeito desses íons na atividade biológica dessa molécula e de outras cianotoxinas.

Além disso, é de fundamental importância verificar se um tratamento adicional dado a água, como o que ocorre nos centros de diálise, que normalmente apresentam um sistema de purificação que utiliza resinas de troca iônica e carvão ativado, poderia disponibilizar novamente as moléculas de microcistinas de forma biologicamente ativa, uma vez que a coluna de troca iônica tem como função a retenção de íons, podendo a estrutura química da microcistina voltar a sua estrutura original.

Assim, faz-se necessário também a realização de outros estudos que verifiquem o comportamento das microcistinas na presença de diversas concentrações de íons como Fe e Al durante as diferentes etapas do sistema de purificação de água utilizados nos centros de diálise.

4 – BIBLIOGRAFIA

An, J. & Carmichael, W.W. (1994). Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32: 1495-1507

Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O.; Molica, R.J.R.; Jockimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental health perspectives* 109 (7): 663-668.

Falconer, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.

Falconer, I.R. (1994). Healthy implications of cyanobacteria (blue-green algae) toxins: In: Toxic cyanobacteria current status of research and management. Eds. Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. Proceedings of international workshop. Adelaide – Australia.

Gajdek, P.; Lechowski, Z.; Bochinia, T.; Kepczynski (2001). Decomposition of microcystin-LR by Fenton-oxidation. *Toxicon* 39: 1575-1578.

Gibson C.E.. & Smith, R.V. (1982). Freshwater Plankton. In: The Biology of Cyanobacteria, Carr, N.G. & Whitton, B.A. (eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 463-490.

Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, I.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, E.A. Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O.; Jarvis, W.R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 36: 373-378.

- Hunter, P.R. (1992). Cyanobacteria and human health. *Journal of Medicine and Microbiology* 36: 301-302.
- Landsberg, J.H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. Stickney, R.R. (Ed). *Reviews in Fisheries Science*. (2) 10.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999) In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Routledge, London.
- Takenaka, S. & Tanaka, Y. (1995). Behavior of microcystins and its decomposition product in water treatment process. *Chemosphere* 31: 3635-3641.
- Takenaka, S. & Tanaka, Y. (1995). Decomposition of cyanobacterial microcystins by iron (III) chloride. *Chemosphere* 30: 1-8.
- Teixeira, M.G.L.; Costa, M.C.N.; Carvalho, V.L.P.; Pereira, M.S.; Hage, E. (1993). Gastroenteritis epidemical in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO* 27: (3) 244-253.
- Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Nakasawa, H.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Harada, K-I. (1994). A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon* 32 (10): 1251-1259
- Vasconcelos, V.M. (1994). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters. *Arch. Hydrobiology* 113: 1-13.
- Vasconcelos, V.M. & Araujo, F.O. (1994). Cianobactérias: Um risco para o ambiente e para a saúde humana. Instituto da Água, Ministério do Ambiente e Recursos Naturais – Portugal.

Yu, S-Z. (1994). Blue-green and liver cancer. In: Toxic cyanobacteria current status of research and management. Steffensen, D. A. & Nicholson, B.C. (Eds.). Proceedings of an International Workshop, Adelaide. March 22-26.

Yuan, B-L.; Qu, J-H.; Fu, M-L. (2002). Removal of cyanobacterial microcystin-LR by ferrate oxidation-coagulation. *Toxicon* 40: 1129-1134.

Tabela 1 – Concentração de equivalente de microcistina-LR dissolvidas em água deionizada e água potável da rede de distribuição pública através dos métodos de imunoensaio do tipo ELISA e HPLC:

Método de quantificação de microcistinas	Concentração de microcistinas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Esperada	Água deionizada	Água da rede
ELISA *	1	1	ALD
	2	2,14	0,16
	10	10	0,45
	30	30	7.06
HPLC**	15	15	ALD

* ALD - abaixo do limite de detecção do método de ELISA ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$).

** ALD - abaixo do limite de detecção do método de HPLC ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de íons de Fe e Al na detecção de $14 \mu\text{g.L}^{-1}$ de equivalente de microcistina-LR em água deionizada, através da técnica de HPLC:

	Concentração de íon (mg.L^{-1})	(%) Redução na quantificação de microcistinas
Fe	0,14	0
	0,22	0
	0,30	22
	1,20	32
Al	2	40
	4	69
	10	82

Tabela 3 – Concentração de equivalente de microcistina-LR em água deionizada e água da rede determinada através dos métodos de imunoenensaio do tipo ELISA e de inibição de proteínas fosfatases:

Concentração de microcistinas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)						
Esperada	ELISA*		Inibição de proteínas fosfatases (PP1)**			
	Água deionizada	Água da rede	Água deionizada	% inibição PP1	Água da rede	% inibição PP1
10	10,1	0,184	9,37	44,5	0,5	ALD
10	9,9	ALD*	7,94	36,7	ALD	ALD
9,5	9,42	0,914	6,76	29,1	0,91	ALD
3,5	3,68	ALD*	3,98	19,0	ALD	ALD

* ALD - abaixo do limite de detecção do método de ELISA ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$).

** ALD - abaixo do limite de detecção do método de inibição PP1 ($0,62 \mu\text{g.L}^{-1}$).

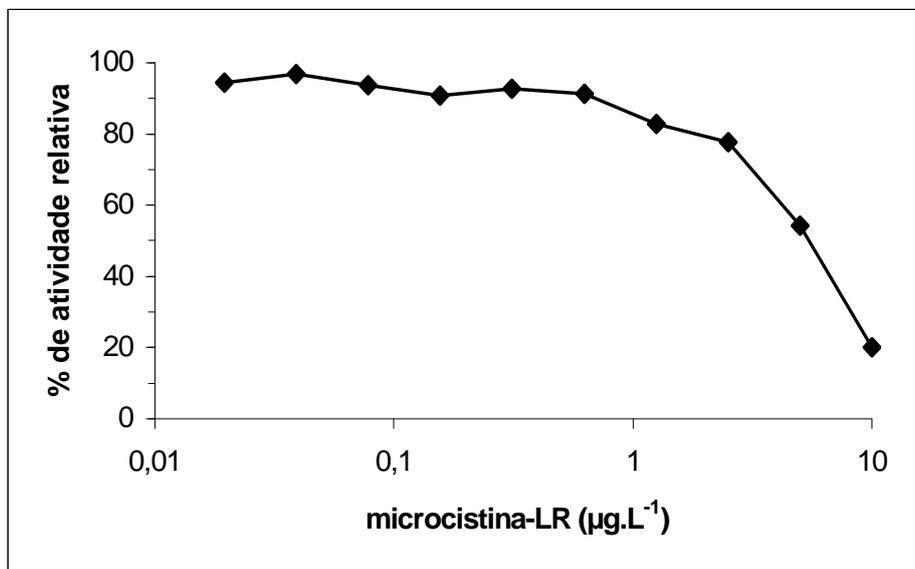


Figura 1 – Curva padrão de inibição de proteína fosfatase (PP1) utilizando diferentes concentrações de microcistina-LR.

4 - EFEITO DA ATIVIDADE BACTERIANA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO NA BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS (CIANOTOXINA)

Oliveira, A.C.P.; Gomes, A.M.A; Azevedo, S.M.F.O.

Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias - Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

anacpimentel@aol.com

Palavras chave: microcistinas, degradação, carbono orgânico dissolvido, bactérias

RESUMO

O processo de degradação das microcistinas está correlacionado a diversos fatores como: a sua concentração inicial, os microrganismos presentes, a temperatura da água, o pH e a disponibilidade de fontes de carbono orgânico, dentre outros. Este trabalho teve como objetivo verificar o processo de degradação das microcistinas em águas com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e a influência das bactérias no processo. Para tanto, um extrato de microcistinas semi-purificado foi adicionado a água da Lagoa de Jacarepaguá (RJ), previamente diluída em água deionizada para obtenção das concentrações de 28, 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD na presença de bactérias e 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD na ausência de bactérias. Durante os testes foram determinadas as concentrações de microcistinas e quantificada a comunidade bacteriana. As maiores concentrações de COD (43 e 60 mg.L⁻¹), que apresentavam 10⁷ colônias.mL⁻¹ de bactérias, favoreceram a degradação total da microcistina em 14 dias, enquanto que na condição de 28 mg.L⁻¹ com 10⁵ colônias.mL⁻¹, após 42 dias, ainda era possível detectar-se 12,8 µg.L⁻¹ de microcistinas. As maiores concentrações de COD favoreceram o crescimento bacteriano, e também nessas condições pode-se verificar uma melhor degradação das microcistinas. Em condições assépticas, o processo de degradação foi bastante lento, confirmando os resultados anteriores que mostram a importância da atividade bacteriana. Entretanto, nenhuma das bactérias isoladas durante os testes foram capazes de degradar as microcistinas. Provavelmente o meio de crescimento bacteriano utilizado não foi apropriado para isolar todas as bactérias presentes no experimento, ou outros tipos de microrganismos não identificados foram relevante no processo de degradação.

1 - INTRODUÇÃO

A capacidade de crescimento das cianobactérias nos mais diferentes ambientes é uma das características marcantes deste grupo, que apresenta estruturas e sistemas enzimáticos específicos que lhes conferem grande plasticidade adaptativa (Azevedo, 1998).

O crescimento intensificado de cianobactérias, chamado de floração ou “bloom”, é favorecido em ambientes aquáticos com elevadas concentrações de nutrientes (nitrogênio amoniacal e fósforo total), pH variando de neutro a alcalino, temperatura da água variando entre 15 e 30°C e salinidade entre 2 e 17‰ (Humphries e Lyne, 1988).

A ocorrência dessas florações vem sendo freqüentemente reportada devido ao acelerado processo de eutrofização dos ambientes aquáticos produzida principalmente por atividades humana (esgoto doméstico e agro-industrial). As florações de cianobactérias não são indesejáveis apenas por causar problemas estéticos e dificultar a utilização dessa água pelo excesso de matéria orgânica, mas também por gerar sérios riscos para população humana. A decomposição da biomassa formada durante a floração ou a aplicação de produtos químicos durante o tratamento de água contaminada com cianobactérias tóxicas têm como consequência a liberação de compostos tóxicos da célula para a água, as cianotoxinas. Os dois grupos de cianotoxinas mais conhecidos são: as neurotoxinas e as hepatotoxinas.

As cianobactérias também apresentam habilidade para minimizar a herbivoria (Reynolds, 1987). Estas células são capazes de produzir metabólitos que inibem a sua predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos e outros, consequentemente acarretando uma redução nas demais populações de microalgas, o que, por sua vez, resultará numa diminuição drástica da comunidade dos consumidores primários, com consequências em toda a cadeia alimentar do ambiente aquático (Brandão & Azevedo, 2001).

A incorporação biológica de cianotoxinas pelo zooplâncton tem sido constatada. Particularmente, populações de *Microcystis aeruginosa* produtoras de microcistinas podem afetar diretamente espécies zooplanctônicas, através do efeito

tóxico sobre o organismo, diminuindo as taxas reprodutivas e interferindo em sua alimentação (Ferrão-Filho *et al.*, 2002).

Além disso, já foi demonstrada uma rápida bioacumulação de microcistinas em peixes da lagoa de Jacarepaguá-(RJ) com florações tóxicas de cianobactérias, evidenciando uma nova rota de intoxicação humana (Magalhães *et al.*, 2001).

Os casos de intoxicações de animais e de humanos são freqüentemente causados por hepatotoxinas, principalmente pelas microcistinas, que são uma classe de heptapeptídeos cíclicos que podem provocar sérios danos no fígado por promoverem uma desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto (Runnegar & Falconer, 1986). Além disto, já é conhecida sua capacidade de inibição das proteínas fosfatases tipo 1 e 2A de células eucariontes (Yoshizawa *et al.*, 1990), sendo reconhecidas como promotoras de tumores hepáticos (Falconer, 1991).

As microcistinas são moléculas complexas e o processo de degradação se mostra mais resistente que o das neurotoxinas (Kiviranta, *et al.*, 1991). O tempo de degradação dessas hepatotoxinas no ambiente aquático é bastante variável, podendo levar de várias semanas a meses. A degradação total dessa molécula é dependente de sua concentração inicial, dos microrganismos presentes, da temperatura da água, do pH e das disponibilidades de outras fontes de carbono orgânico (Robertson *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001).

Entretanto, pouco se sabe sobre o processo de degradação das microcistinas em águas com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD). O COD origina-se principalmente da decomposição de plantas e animais aquáticos e a partir de produtos de excreção destes organismos. Os principais componentes de COD são: ácido glicólico, proteínas, carboidratos, peptídeos, aminoácidos, enzimas, substâncias voláteis, aldeídos, cetonas, aminas e outros compostos estimuladores ou inibidores de crescimento.

A população bacteriana também é considerada um fator importante no processo de degradação das microcistinas. Bourne *et al.* (1996) verificaram que microcistina-LR permaneceu ativa na coluna d'água durante 2 semanas, até a ocorrência de uma epidemia de bactérias que degradaram essa cianotoxinas, sendo

ainda detectada uma pequena concentração após 1 mês. Watanabe (1996) também verificou que microcistina-LR e -YR foram degradadas mais rapidamente em meio de cultivo com bactérias do que na água destilada.

Portanto, verificando a necessidade de mais informações sobre a persistência das microcistinas nos ambientes aquáticos, para uma tomada de decisão quanto a liberação do mesmo para recreação ou utilização como fonte de abastecimento, este estudo teve como objetivo verificar se o processo de degradação de microcistinas está, de algum modo, relacionado a diferentes concentrações de COD, além de verificar a possível degradação das microcistinas pelas bactérias isoladas durante o teste.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos de microcistinas (MCYSTs) foram obtidos a partir do cultivo da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) isolada da Lagoa de Jacarapaguá da cidade do Rio de Janeiro, que vem apresentando florações constantes de cianobactérias.

A cepa NPLJ-4 produz 4 tipos de microcistinas, das quais 80% corresponde a microcistina-LR com D-leucina. As células da cepa NPLJ-4 foram cultivadas em condições unialgais em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 citado em Gibson e Smith, 1982), sob intensidade luminosa de $55 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $23\pm 2^\circ\text{C}$, pH 8,0 e fotoperíodo de 12 horas. Ao atingir a fase exponencial de crescimento, as células foram concentradas e esse concentrado de células sofreu um processo de congelamento e descongelamento promovendo a lise celular. O concentrado de células lisadas foi centrifugado durante 20 minutos, a 6700g e o sobrenadante filtrado em filtro de fibra de vidro, para a retirada da matéria orgânica particulada.

Esse concentrado contendo MCYSTs dissolvidas foi semi-purificado de acordo com a metodologia descrita em Tsuji *et al.* (1994). O extrato semi-purificado foi utilizado nos testes para verificar a degradação das MCYSTs em meio com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD), na presença e ausência de bactérias, assim como verificar a atividade bacteriana nesta molécula.

Para a obtenção de uma água com grande concentração de COD foi realizada uma coleta de água na Lagoa de Jacarepaguá. Esta água foi filtrada em filtrador tangencial para remoção inicial das células fitoplanctônicas existentes na água. Posteriormente, a água da Lagoa de Jacarepaguá foi filtrada em filtro de fibra de vidro para a remoção de algumas células e do zooplâncton.

A água da Lagoa de Jacarepaguá filtrada foi previamente analisada quanto à concentração de COD e de MCYSTs dissolvidas.

- O efeito do COD no processo de degradação de MCYSTs na presença e ausência de bactérias

A partir da análise da concentração de COD da água da Lagoa de Jacarepaguá e do concentrado de MCYSTs no extrato, foram feitas algumas diluições dessa água mais o extrato de MCYSTs dissolvidas, com o objetivo de formar um gradiente de concentrações de COD.

As concentrações de COD utilizadas nos experimentos foram de 60, 43 e 28 mg.L⁻¹. Para a primeira concentração proposta, 1L de água da Lagoa de Jacarepaguá contendo 26 mg.L⁻¹ COD foi colocado em erlenmeyer de 2L, e a esse volume foi adicionado 300 µL do extrato de MCYSTs, obtendo-se uma concentração final de 60 mg.L⁻¹ de COD. A concentração de 43 mg.L⁻¹ foi obtida a partir de 360 mL da água da Lagoa de Jacarepaguá e 640 mL de água deionizada mais 300 µL do extrato de MCYSTs. E a última condição foi obtida adicionando o mesmo volume do extrato de MCYSTs em 1L de água deionizada.

O teste de degradação de MCYSTs foi realizado sob intensidade luminosa de 88 µE.m².s⁻¹ e temperatura de 23±2°C. Essas condições foram escolhidas por estarem o mais próximo dos valores determinados no ambiente.

Durante o teste foram retiradas alíquotas de aproximadamente 50 mL nos tempos amostrais: 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Nessas alíquotas foram analisadas as seguintes variáveis: determinação da concentração de MCYSTs dissolvidas e quantificação das bactérias presentes.

A metodologia utilizada para verificar o processo de degradação de MCYSTs em diferentes concentrações de COD sem a presença de bactérias foi a mesma do experimento realizado com bactérias. Entretanto, a água da lagoa, assim como o extrato de MCYSTs semi-purificado foram filtrados em condições assépticas em filtro de 0,22 µm. Os valores de COD testados foram de 43 e 60 mg.L⁻¹ e as variáveis analisadas foram as mesmas já citadas, nos tempos amostrais de 0, 1, 2, 4, 8, 13, 16, 20 e 31 dias.

- A atividade bacteriana no processo de degradação das MCYSTs

Este teste teve como objetivo verificar a ação das bactérias Gram negativas isoladas, nas diferentes condições experimentais, na degradação das MCYSTs. A escolha das bactérias Gram negativas se deu devido aos relatos positivos, na literatura, deste grupo para a degradação das microcistinas.

Cada cepa bacteriana Gram negativa isolada, através do plaqueamento em meio de cultura Mueller Hinton Broth solidificado em agar, foi inoculada em 20 mL solução salina 0,85% esterilizada, tendo concentração final de 10^6 células.mL⁻¹ de bactérias e 40 µg.mL⁻¹ de MCYSTs. A condição controle foi realizada adicionando-se 40 µg.mL⁻¹ de MCYSTs em 20 mL de solução salina.

O teste foi realizado a temperatura de $30 \pm 2^\circ$ C e retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos amostrais de 0, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 240 horas. O volume amostrado foi filtrado em filtro de nylon e o sobrenadante utilizado para a quantificação de MCYSTs através da técnica de HPLC.

Variáveis analisadas

Extração e quantificação de MCYSTs extracelulares

A semi-purificação das MCYSTs presentes no concentrado seguiu a metodologia proposta por Tsuji *et al.*, (1994), onde este volume foi passado em cartucho de octadesilsilano (C18), sendo o material retido eluído com 20 mL de água deionizada, metanol 20% e metanol 100%. A fração de metanol 100% foi passada em cartucho de sílica e eluída com 30 mL de metanol 100% e 20 mL de solução de TFA/água/metanol 100% (1:100:899 v/v). A última fração foi recolhida e evaporada à secura, sendo, então ressuspensa em 2 mL de metanol 50%. Esta foi filtrada em filtro de nylon e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em um aparelho Shimadzu com detector U. V./ Vis. SPD-10A, bombas LC 10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, sendo utilizada uma coluna analítica (Lickrospher 100 RP-18, 125mm x 4mm), com fase móvel de

acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e absorção a 238 nm.

O espectro de absorção de cada pico foi analisado em uma faixa de 195 à 300 nm, com auxílio de um fotodetector de diodo (SPD-M10A) Diode array (PDA), podendo-se comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma).

A quantificação das MCYSTs foi calculada através dos valores de área obtidos nos cromatogramas e uma curva padrão de microcistina-LR. O resultado final da concentração de microcistinas está expresso em equivalentes de microcistina-LR.

Este método apresenta um limite de detecção de 0,5 µg.L⁻¹.

Quantificação de COD

A concentração de COD foi determinada utilizando um volume de 25 mL da amostra, seguindo a metodologia de oxidação por combustão a alta temperatura, catalisada por platina, e posterior detecção em sensor de infra-vermelho, utilizando o aparelho Total Organic Analyzer – Shimadzu 5000.

Quantificação de bactérias

A quantificação das bactérias foi feita através do plaqueamento das amostras sobre um meio de cultura Mueller Hinton Broth solidificado e contagem do número de colônias que se desenvolveram nas placas.

Para verificar a diferenciação morfológica das bactérias foi realizada a coloração de Gram com posterior observação ao microscópio ótico. Este procedimento permitiu classificar as bactérias quanto ao tipo de Gram (positiva ou negativa) e quanto a forma (cocos ou bacilos).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra que as concentrações de 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD na presença de bactérias favoreceram a degradação mais rápida das MCYSTs quando comparadas com a condição de 28 mg.L⁻¹ de COD.

Os resultados obtidos demonstram que nas condições experimentais de 28, 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD com presença de bactérias, até o 7º dia amostral, houve uma redução de 32, 78 e 85% nas concentrações iniciais de MCYSTs, respectivamente. A partir do 14º dia amostral não foram mais detectadas MCYSTs para as maiores concentrações de COD testadas, enquanto que na condição de 28 mg.L⁻¹ de COD foi possível detectar 12,8 µg.L⁻¹ de MCYSTs no último dia amostral, o equivalente a 14% da concentração inicial (Figura 1).

As análises da quantificação bacteriana revelaram que as maiores concentrações de COD propiciaram o crescimento bacteriano mais intenso, na ordem de 10⁷ colônias.mL⁻¹, a partir do 4º dia amostral, enquanto que na concentração de 28 mg.L⁻¹ de COD pode-se verificar que o crescimento das bactérias foi na ordem de 10⁵ colônias.mL⁻¹, da primeira a última amostragem (Tabela 1).

O maior número de colônias de bactérias determinado nas concentrações de 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD provavelmente acelerou o processo de biodegradação das MCYSTs.

Cabe ressaltar que nas condições analíticas utilizadas não foi possível verificar novos sinais nos cromatogramas que pudessem ser considerados produtos de degradação das MCYSTs. Desta forma, pode-se apenas dizer que ocorreu uma redução nas concentrações dessa molécula sem aparente formação de outros produtos. O mesmo não foi verificado por Matthiensen *et al.* (2000) que detectaram o aparecimento de outros compostos tóxicos a partir da biodegradação da molécula purificada de microcistina-LR pela atividade microbiana presente na água da lagoa dos Patos.

Os resultados das análises de quantificação de MCYSTs em condições assépticas, contendo 43 e 60 mg.L⁻¹ de COD, evidenciam um lento processo de

degradação dessas moléculas, se comparado com os resultados obtidos no experimento na presença de bactérias. A não detecção das MCYSTs só foi possível após 31 dias do início do experimento (Figura 2). Estes resultados estão de acordo com o relatado por Watanabe (1996) que verificou a degradação mais rápida das microcistina-LR e -YR na presença de bactérias do que em água destilada.

É importante salientar que as concentrações iniciais de MCYSTs dissolvidas utilizadas no experimento, variando concentrações de COD em condições assépticas, foram aproximadamente 11 vezes inferiores às concentrações do experimento realizado com bactérias. Mesmo assim, a degradação dessa molécula mostrou-se bastante lenta. Esse resultado evidencia a importância da comunidade bacteriana na velocidade do processo de degradação de microcistinas.

Durante o experimento realizado na presença de bactérias foi possível isolar 17 cepas de bactérias morfologicamente distintas. Destas somente 4 cepas Gram negativas foram testadas isoladamente para se verificar a capacidade de degradação das MCYSTs. Segundo Takenaka e Watanabe, 1997 e Park *et al.* 2001, as MCYSTs são degradadas preferencialmente pelas bactérias Gram negativas.

As análises da quantificação de MCYSTs revelaram que as bactérias Gram negativas selecionadas não degradaram isoladamente as MCYSTs. A concentração de MCYSTs detectada após 10 dias foi praticamente igual à concentração inicial de $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O mesmo foi determinado para a condição controle. Os resultados indicam que as bactérias testadas não utilizaram as MCYSTs como fonte de energia.

As bactérias testadas não apresentaram o mesmo potencial para degradar microcistinas que o observado por Park *et al.* (2001). Estes autores verificaram a completa degradação de 20 mg microcistina-LR ou -RR pela bactéria Gram. negativa *Sphingomonas paucimobilis* em 6 dias. Segundo Takenaka & Watanabe (1997) bactérias do gênero *Pseudomonas* também biodegradam essa molécula.

É importante ressaltar que as bactérias testadas foram seletivas ao meio de crescimento bacteriano Müeller-Hinton utilizado. Portanto, esse meio pode não ter favorecido o crescimento de todas as bactérias presentes, importantes no processo de degradação das microcistinas.

No ambiente natural provavelmente o processo de degradação das MCYSTs poderia apresentar um outro perfil devido a presença de outros gêneros de bactérias, favorecendo a degradação dessas moléculas. Entretanto, cabe destacar que variações ambientais como concentração de nutrientes, temperatura, alcalinidade e pH, dentre outros, podem alterar consideravelmente o tempo necessário para a degradação total destas moléculas.

Além disso, não se pode deixar de considerar que outros microrganismos aquáticos como fungos e pequenos protozoários, que podem utilizar o COD como fonte de energia podem também ter um papel importante na degradação de microcistinas.

4 – BIBLIOGRAFIA:

- Azevedo, S.M.F.O. (1998). Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. *Medicina on Line*, 1: 1-22.
- Bourne, D.G.; Jones, G.J.; Blakeley, R.L.; Jones, A.; Negri, A.P.; Riddles, P. (1996) Enzymatic pathway for bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin, microcystin-LR. *Applied Environmental Microbiology*, 62:4086-4094.
- Brandão, C.C.S. & Azevedo, S.M.F.O. (2001). Cianobactérias tóxicas: Impactos na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da saúde, Funasa (Eds.). Brasília-DF, Brasil.
- Falconer, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.
- Ferrão-Filho, A.S.; Kozlowsky-Suziki, B.; Azevedo, S.M.F.O. (2002). Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology* 59: 201-208.
- Gibson C.E. & Smith, R.V. (1982). Freshwater Plankton. In: *The Biology of Cyanobacteria*. Carr, N.G. & Whitton, B.A. (Eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 463-49
- Humphries, S.E. & Lyne, V.D. (1988). Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. *Limnology Oceanography* 33 (1): 79-91.
- Kiviranta, J.K.; Sivonen, K.; Lahti, K.; Luukkainen, R.; Niemela, S.I. (1991). Production and biodegradation of cyanobacterial toxins: a laboratory study. *Arch. Hydrobiology*. 121 (3): 281-294

- Magalhães, V.F.; Soares, R.M.; Azevedo, S.M.F.O. (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (RJ, Brasil): Ecological implications and human health risk. *Toxicon*. 39, 1077-108.
- Matthiensen, A.; Metcalf, J.S.; Ferreira, A.H.F.; Yunes, J.S.; Cood, G.A. (2000). Biodegradation and biotransformation of microcistins by aquatic bacteria in estuarine waters from the Patos Lagoon, RS, Brasil. In: Sabino, M.; Rodriguez-Amaya, D.; Corrêa, B. (Eds.). X International IUPAC. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Organized by Instituto Adolfo Lutz, Guarujá, 21-25 may.
- Park, H-D.; Sasaki, Y.; Maruyama, T.; Yanagisawa, E.; Hiraishi, A., Kato, K. (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16: 337-343.
- Reinolds, C.S. (1987). Cyanobacterial water-blooms. In: J. Callow (ed.) *Advances in Botanical Research*. Academic Press., London (13) 67-143.
- Robertson, P.K.J.; Lawton, L.A.; Cornish, B.J.P.A. (1999). The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 3: 544-551.
- Runnegar, M.T.C. & Falconer, I.R. (1986). Effects of toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and action polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 4: 330-352
- Takenaka, S. & Watanabe, M.F. (1997). Microcystin-LR degradation by *pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34: 749-757.
- Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Harada, K-I. (1994). A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxin* 32 (10):1251-1259

Yoshizawa, S.; Matsuhima, R.; Watanabe, M.F.; Harada, K.; Ichihara, A.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (1990). Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal Cancer Research. Cli. Oncol.* 116: 609-614.

Watanabe, M.F. (1996). Production of Microcystins. *Toxic Microcystis*. Watanabe, M.F.; Harada, K.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Eds.). Pp. 35-56.01

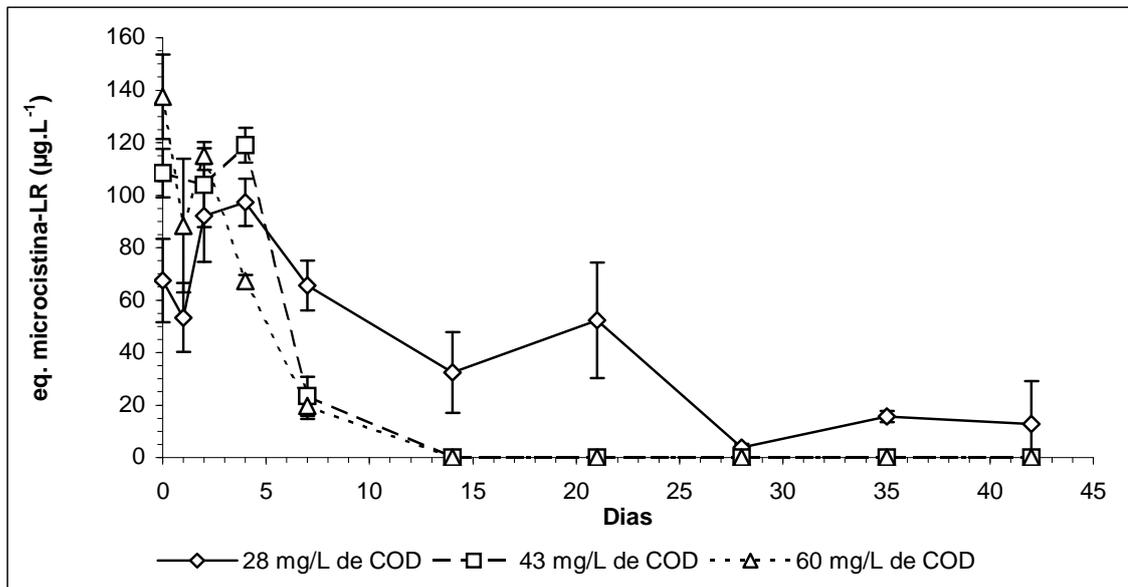


Figura 1 – Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em diferentes concentrações de COD com presença de bactérias.

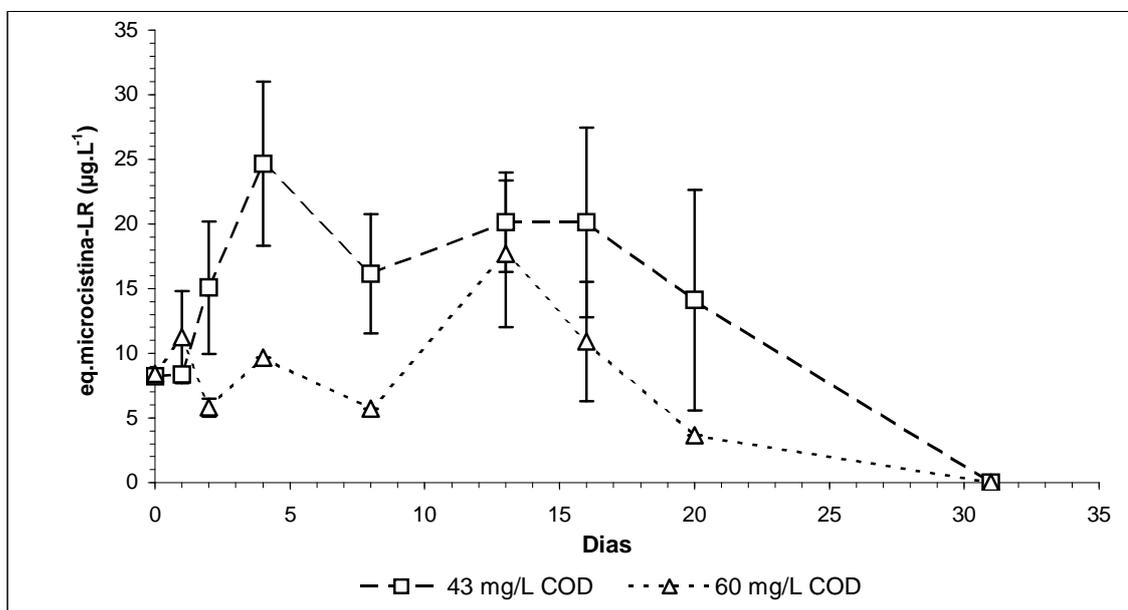


Figura 2 - Variação das concentrações de equivalente de microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em diferentes concentrações de COD em condições assépticas.

Tabela 1: Quantificação máxima das bactérias nas diferentes concentrações de COD.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	NÚMERO DE BACTÉRIAS	TIPOS DE BACTÉRIAS *
28 mg.L ⁻¹ de COD	10 ⁵ colônias.mL ⁻¹	Bacilos Gram positivos (filamentos longos).
43 mg.L ⁻¹ de COD	10 ⁷ colônias.mL ⁻¹	Bacilos Gram negativos e Bacilos Gram positivos (filamentos longos).
60 mg.L ⁻¹ de COD	10 ⁷ colônias.mL ⁻¹	Bacilos Gram negativos e Bacilos Gram positivos (filamentos longos).

* Tipos de bactérias encontradas em maior concentração entre as isoladas.

5 - REMOÇÃO DE *Microcystis aeruginosa* E MICROCISTINAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE FILTRAÇÃO LENTA

Oliveira^{*1}., A.C.P., Sá²., J.C., Brandão²., C.C.S., & Azevedo., S.M.F.O¹

1 – Universidade Federal do Rio de Janeiro – CCS – IBCCF – Laboratório de Fisiologia e Ecotoxicologia de Cianobactérias.

2 – Universidade de Brasília – Faculdade de Tecnologia – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

¹anacpimentel@aol.com

Palavras chave: *Microcystis aeruginosa*, microcistinas, remoção, filtração lenta

RESUMO

A filtração lenta em areia é um sistema de purificação de água sensível e bastante efetivo. O seu potencial de aplicação é reconhecido como uma alternativa sustentável para o tratamento de água em comunidades rurais e pequenas cidades. Neste sistema o processo de remoção das partículas em suspensão é complexo, sendo influenciado pelas características físicas e químicas do meio filtrante, da água bruta e da taxa de filtração. Este trabalho teve como objetivo avaliar o sistema de filtração lenta para a remoção de diferentes concentrações de células da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) e de microcistinas dissolvidas. Os testes foram desenvolvidos em escala piloto de pequeno porte utilizando-se duas colunas de acrílico preenchidas com areia. A água utilizada para alimentação dos filtros foi proveniente do Lago Paranoá (Brasília – DF), sendo inoculada alternadamente com células da cepa NPLJ-4 nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 células.mL⁻¹ e de microcistinas dissolvidas nas concentrações de 426, 243, 127 e 58 µg.L⁻¹. As taxas de filtração aplicadas foram de 3 e 2 m³/m².dia. A maior taxa de filtração favoreceu a remoção total de 10^5 células.mL⁻¹, no entanto, foi possível detectar-se microcistinas extracelulares na água efluente, indicando a lise das células retidas nos filtros lentos. Com a diminuição da taxa de filtração, a remoção de células em concentrações de até 10^5 células.mL⁻¹ foi de 100%, e na água efluente não foram detectadas microcistinas extracelulares nem intracelulares. Portanto, nessa condição, a filtração lenta foi capaz de produzir água potável, como é recomendado pela OMS, e estabelecido pela Portaria brasileira 1469/00/MS, que dita, como limite para não conferir riscos a saúde a concentração de 1 µg.L⁻¹ de microcistinas na água. Para a concentração de 10^6 células.mL⁻¹ na água afluenta, com taxa de 3 m³/m².dia, foi possível determinar altas concentrações de microcistinas intra e extracelulares na água efluente, no entanto, o maior tempo de contato da água afluenta com o meio filtrante (taxa de filtração de 2 m³/m².dia) favoreceu a redução desses valores. Essa taxa de filtração também favoreceu a remoção de 100% das microcistinas dissolvidas em concentrações de até 243 µg.L⁻¹.

1 – INTRODUÇÃO

A filtração lenta em areia é um dos sistemas de tratamento de água mais antigos utilizados pela humanidade. É um processo sensível e bastante efetivo, simulando exatamente o processo de purificação de água que ocorre na natureza. Esse processo é amplamente reconhecido por produzir água de boa qualidade, mostrando-se bastante efetivo para a remoção de bactérias patogênicas, vírus e cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* (Hendricks *et al.*, 1991).

No sistema de filtração lenta, o processo de remoção das partículas em suspensão é complexo, sendo influenciado pelas características físicas e químicas do meio filtrante, da água bruta e pela taxa de filtração (Di Bernando, 1980 - citado em Varesche, 1989). Entretanto, a eficiência desse sistema é atribuída principalmente ao alto grau de atividade biológica na interface água e areia, local caracterizado pela formação de um filme biológico “*schumutzdecke*” que é constituído de várias espécies microbianas, como as bactérias, algas e protozoários.

É no filme biológico que ocorre os principais processos de oxidação da matéria orgânica, sendo essa atividade reduzida gradualmente com a profundidade do leito filtrante (Costa, 1980 – citado em Veras, 1999). O tempo de detenção da água e o teor de oxigênio dissolvido no leito filtrante são duas condições básicas para que ocorra a oxidação bacteriana (Hespanhol, 1987).

A filtração lenta é reconhecida como uma alternativa sustentável para o tratamento de água em comunidades rurais e pequenas cidades. É um projeto potencialmente ao alcance dos recursos de qualquer comunidade, e as facilidades para a construção, operação e manutenção encontram-se usualmente disponíveis a nível local ou podem ser adquiridos de forma relativamente fácil se comparado a construção de uma estação de tratamento de água convencional.

Atualmente, em diversos países europeus, a filtração lenta vem sendo utilizada após o tratamento convencional devido as suas vantagens na remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. No Brasil, essa tecnologia foi bastante aplicada na década de setenta, no entanto, na década de 90 somente 7%

das estações de tratamento de água utilizam essa técnica (ASSEMAE, 1996 – citado em Sá, 2002).

Diante de tais conhecimentos, e com o crescente processo de eutrofização natural e antrópica que os mananciais brasileiros utilizados como fonte de abastecimento vêm sofrendo, propiciando o crescimento intenso de cianobactérias tóxicas, despertou-se o interesse em estudar o processo de filtração lenta para a remoção de células de cianobactérias e de suas toxinas, visto que, os procedimentos convencionais de tratamento de água como floculação, sedimentação, filtração em areia e cloração são ineficientes para a remoção total das células de cianobactérias, podendo promover a lise celular com posterior liberação das cianotoxinas para a coluna d'água, assim como para a remoção de microcistinas dissolvidas (extracelulares) (Hrudey *et al.*, 1999; Drikas *et al.*, 2001).

As microcistinas, que são peptídios hepatotóxicos, são as cianotoxinas mais freqüentemente detectadas nos ecossistemas aquáticos (Chorus e Bartram, 1999). Estas toxinas são inibidoras potentes e específicas de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A, podendo acarretar sérios danos a saúde humana através de seu efeito agudo ou crônico (Heresztyn & Nicholson, 2001).

Deste modo, as microcistinas vêm representando um desafio aos órgãos responsáveis pelo tratamento de água. Entretanto, poucos são os estudos relativos a remoção de células cianobactérias e de suas toxinas através da técnica de filtração lenta. Esses relatam uma alta eficiência do processo, como por exemplo, os trabalhos de Mouchet e Bonnelye (1998) e Melo (1998) – citado em Brandão & Azevedo, (2001) que respectivamente verificaram a remoção de 99% das microalgas da água efluente e a remoção de 98% da biomassa algal composta principalmente de células de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência do processo de filtração lenta para a remoção de células da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) em diferentes concentrações, como também verificar a remoção de diferentes concentrações de microcistinas dissolvidas.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

A eficiência da filtração lenta para a remoção de células da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) e de microcistinas dissolvidas foi medida através de um sistema de filtração em escala piloto de pequeno porte. Este sistema consistiu em: um tanque de alimentação de água bruta; um tanque intermediário de água bruta de nível constante; uma bomba peristáltica de cabeçote duplo (Easy-Load/Masterflex, modelo 7518-00); dois filtros de areia e dois reservatórios de coleta de água tratada (Figura-1).

As células da cepa NPLJ-4 e as microcistinas dissolvidas foram solubilizadas na água bruta proveniente do Lago Paranoá – Brasília-DF, em fases distintas do experimento.

Foram realizados 2 experimentos distintos: Experimento 1 e 2, nos quais os filtros operaram de forma contínua, com um intervalo de 3 meses.

2.1 – Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

A espécie *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) é caracterizada pela produção 4 tipos de microcistinas, das quais 80% da concentração total corresponde a microcistina-LR com D-Leucina. Esta cepa foi isolada da Lagoa de Jacarepaguá, situada na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro (Lat. 23^o 00' S - Long. 43^o 20' W) e foi cultivada em condições unialgais em meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 citado em Gibson e Smith, 1982) sob intensidade luminosa de 55 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de 25 \pm 2°C, pH 8,0 e fotoperíodo de 12 horas. As células da cepa NPLJ-4 ao atingirem a fase exponencial de crescimento (entre 15 e 20 dias de cultivo), foram concentradas através de filtração tangencial e posteriormente utilizadas nos experimentos.

2.2 – Microcistinas dissolvidas

Uma parte do concentrado de células da cepa NPLJ-4 sofreu um processo de congelamento e descongelamento para promover a lise celular. Esse concentrado foi filtrado em filtro de fibra de vidro, para a retirada da matéria orgânica particulada e a fração dissolvida contendo, dentre outros compostos orgânicos dissolvidos, as microcistinas (MCYSTs) foi utilizada nos testes para avaliar a eficiência da filtração lenta para a remoção dessas moléculas.

2.3 – Desenho experimental

Os filtros lentos de areia (FLAs) foram montados em colunas de acrílicos de 8,5 cm de diâmetro e 1,5 m de comprimento, sendo preenchidos 90 cm com o meio filtrante (areia) e uma camada suporte na parte inferior com 10 cm de pedregulho de granulometria fina.

A areia utilizada apresentava granulometria de 0,08 a 1,00 mm, com diâmetro efetivo de 0,34 mm e coeficiente de desuniformidade igual a 2. Previamente a utilização, essa areia foi lavada e seca em estufa a 105°C, para a remoção da matéria orgânica residual aderida aos grãos.

As colunas de acrílico parcialmente cheias de água foram preenchidas com a areia. Esse procedimento minimizou a formação de bolhas de ar nos interstícios do meio filtrante. Além disso, os filtros foram operados durante alguns dias com água limpa e fluxo ascendente para a remoção do ar do meio filtrante.

Os FLAs foram alimentados com vazões similares através de uma bomba peristáltica de cabeçote duplo. Para minimizar as variações de vazão foi utilizado um reservatório de nível constante que servia de alimentação para a bomba. Esse reservatório, por sua vez, foi alimentado por um reservatório de maior capacidade (100 L).

Os experimentos foram divididos em várias etapas. O experimento 1 constou em 5 etapas, enquanto o experimento 2 de 7 etapas (Tabelas 1 e 2).

As etapas descritas nas Tabelas 1 e 2 consistiram nos seguintes procedimentos:

Etapa A: Período de amadurecimento dos filtros, alimentando-os unicamente com a água do lago Paranoá. Nesta fase ocorreu a formação dos filmes biológicos

“*schumutzdecke*”. O amadurecimento dos filtros foi avaliado através da remoção de coliformes totais.

Etapas B e D: Os filtros foram alimentados com a água do lago contendo diferentes concentrações de células da cepa NPLJ-4. Nessas etapas foi colocado um aerador no reservatório para evitar a sedimentação das células. O objetivo foi avaliar a eficiência dos FLAs na remoção de células viáveis da cepa NPLJ-4, avaliar a possibilidade de transpasse dessas células do leito filtrante para a água efluente, como também verificar a ocorrência de lise das células retidas no leito filtrante.

Etapas C e E: Período em que os filtros voltaram a ser alimentados somente com a água do lago. O objetivo foi avaliar a possibilidade de transpasse de células do leito filtrante para o efluente e a ocorrência de lise celular no interior dos FLAs com liberação de MCYSTs dissolvidas para a água efluente.

Etapa F: Os filtros foram alimentados com diferentes concentrações do concentrado de MCYSTs dissolvido na água do lago. O objetivo dessa etapa foi avaliar a eficiência dos FLAs para a remoção de MCYSTs dissolvidas.

Etapa G: Período em que os FLAs voltaram a ser alimentados somente com a água do lago. Nessa etapa, o objetivo foi avaliar a liberação de MCYSTs dissolvidas do leito filtrante para o efluente.

De acordo com os valores comumente utilizados na prática de filtração lenta (Haarhoff & Cleasby, 1991), a taxa de filtração adotada no experimento 1 foi de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$, enquanto no experimento 2 foram utilizados dois valores de taxa de filtração: 3 e $2 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$.

Durante os experimentos 1 e 2 as variáveis analisadas na água afluenta e efluente foram as seguintes:

- coliformes totais;
- turbidez;
- clorofila *a*;
- concentração de MCYSTs nas frações particulada (intracelular) e dissolvida (extracelular);
- Quantificação da população bacteriana presente no filme biológico.

Durante a etapa A, as variáveis analisadas foram coliformes totais, turbidez e clorofila *a*.

A partir da etapa B, a frequência amostral para determinação das concentrações de coliformes totais, turbidez, clorofila *a* foram diárias tanto para a afluyente como efluente.

Os tempos amostrais determinados para a quantificação de MCYSTs na água efluente levou em consideração o tempo de detenção da água no leito filtrante. Durante as etapas de simulação de florações, MCYSTs intra e extracelulares foram quantificadas em amostras compostas retiradas nos tempos amostrais de 2, 4, 6 e 8 horas. O mesmo período amostral foi adotado durante a passagem pelos filtros de MCYSTs dissolvidas na água do lago. Nas demais etapas a amostragem foi diária.

Coliformes totais

O método de quantificação de coliformes totais foi o do número mais provável (NMP) utilizado-se kit COLILERT. Neste método o substrato cromogênio (ONPG-MUG) foi adicionado a 100 mL da água efluente, em seguida a solução foi colocada na cartela do kit e esta foi selada e mantida por 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período, a quantificação de coliformes totais foi realizada de acordo com a coloração das amostras.

Turbidez

As medidas de turbidez foram realizadas através do método Nefelométrico utilizando um Turbidímetro (HACH/2100AN).

Clorofila *a*

O procedimento adotado para determinar as concentrações de clorofila *a* foi o descrito em Loyd e Tucker (1988). Um volume conhecido da água bruta e da

água efluente dos filtros foi filtrado em filtro de fibra de vidro, e em seguida foi imerso em 10 mL de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1) e mantido em ambiente escuro durante 4 horas. Após esse intervalo de tempo, a absorvância desse extrato foi medida nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm em um espectrofotômetro (HACH/DR-4000).

População bacteriana

A quantificação da população bacteriana presente no filme biológico dos filtros foi realizada através da amostragem de massa conhecida de grãos de areia do filme biológico. Este material foi solubilizado em 3 mL de água deionizada autoclavada. Um volume conhecido dessa solução foi plaqueado sobre o meio de cultura Müeller Hinton Broth solidificado. As placas foram incubadas durante no máximo 24 horas a $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, e após esse período foi realizada a contagem do número de colônias, verificando-se os diferentes tipos morfológicos. Estas bactérias foram isoladas e a reação ao Gram identificada através do método de coloração de Gram.

Em ambos experimentos, a população bacteriana dos filmes biológicos foi quantificada de 3 em 3 dias.

Extração e quantificação de MCYSTs através da técnica de HPLC

A extração de MCYSTs intracelulares foi realizada de acordo com a metodologia citada em krishnamurthy *et al.* (1996) e das MCYSTs extracelulares seguiu a metodologia descrita por Tsuji *et al.* (1994).

A quantificação das microcistinas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em um aparelho Shimadzu com detector UV/VIS. SPD 10A, bombas LC-10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, utilizando-se uma coluna analítica (Lichrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1 mL/min e UV a 238 nm. O espectro de absorção foi analisado numa faixa de

195 a 300 nm, podendo-se comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma).

A concentração das microcistinas foi calculada através dos valores de área obtidos nos cromatogramas e uma curva padrão de microcistina-LR. O resultado final da concentração de microcistinas foi expresso em equivalentes de microcistina-LR.

Este método apresenta um limite de detecção de microcistinas de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de filtração média de 3 m³/m².dia e 2 m³/m².dia apresentam valores de tempo de detenção das células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) ou das MCYSTs dissolvidas no leito filtrante de 8 e 12 horas, respectivamente.

Os intervalos dos valores de coliformes totais, turbidez, clorofila *a* e MCYSTs intra e extracelulares determinadas na água bruta (AB) do lago Paranoá utilizada nos experimentos 1 e 2, antes da adição de células da cepa NPLJ-4 ou de MCYSTs dissolvidas estão apresentadas na Tabela 3.

O maior valor de coliformes totais determinado durante o experimento 2, ocorreu provavelmente devido uma intensa chuva que favoreceu a lixiviação das margens do lago. Para as demais variáveis, pode-se verificar faixas de valores próximos, podendo-se inferir que a água bruta utilizada nos experimentos 1 e 2 apresentava características bastante semelhantes.

3.1 – Coliformes totais

Em ambos experimentos, durante o período de amadurecimento (etapa A), pode-se verificar que os FLAs apresentaram uma melhora gradativa na remoção de coliformes totais, atingindo a eficiência máxima a partir do 16^o e 14^o dia dos experimentos 1 e 2, respectivamente (Figura 2).

Os altos valores de coliformes totais determinados na água bruta, deve-se ao fato do ponto de coleta encontrar-se próximo a uma estação de tratamento de esgoto.

Após a fase de amadurecimento (etapa A), os FLAs de ambos os experimentos apresentaram excelente capacidade de remoção de bactérias do grupo coliformes, o que é característico da filtração lenta. Entretanto, a não detecção de coliformes totais foi determinada somente durante a etapa C, do experimento 1, e E do experimento 2.

Durante a etapa F, que consistiu na filtração da água do lago com MCYSTs dissolvidas, os resultados revelaram que a remoção de coliformes foi bastante

reduzida, sendo determinados valores de 2419,2 e 565 de NMP/100 mL nos efluentes dos FLAs dos experimentos 1 e 2, respectivamente. Estes valores equivalem, em média, a eficiência de remoção de 70% e 85% dos coliformes totais presente na água bruta (Figura 2).

Portanto, pode-se verificar que as MCYSTs dissolvidas afetaram a comunidade bacteriana do filme biológico no primeiro contato (24 horas), sendo esta restabelecida nos dias posteriores.

3.2 – Turbidez

Os valores de turbidez determinados nos efluentes dos FLAs foram semelhantes no decorrer dos dois experimentos, sugerindo a confiabilidade nos dados obtidos.

No experimento 1, durante a simulação de floração de cianobactérias (etapa-B) e passagem de microcistinas dissolvidas (etapa-F) foram determinados os maiores valores de turbidez na água afluyente e efluente, evidenciando a ocorrência de transpasse de células dos FLAs para a água efluente (Figura 3). Este resultado foi confirmado no experimento 2 com taxa de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$, evidenciando a reprodutibilidade do sistema.

Durante a etapa F de ambos os experimentos, observou-se que a adição de MCYSTs dissolvidas na água afluyente contribuiu para o aumento da turbidez da água afluyente, possivelmente em consequência de resíduos no concentrado de MCYSTs dissolvidas, e na água efluente do experimento 1, indicando ineficiência do sistema para a remoção total dos compostos orgânicos particulados.

Com a aplicação da taxa de filtração de $2 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$, pode-se verificar uma menor concentração de material particulado na água efluente dos FLAs, indicando que o maior tempo de detenção favoreceu uma redução do transpasse de células do leito filtrante para a água efluente (Figura 3 - Exp.2).

3.3 - Clorofila a

As maiores concentrações de clorofila a foram detectadas durante a etapa B, com taxa de filtração de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$, quando a água afluenta apresentava concentração de $10^6 \text{ células.mL}^{-1}$, equivalente a 252 e $221 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila a para os experimentos 1 e 2, respectivamente. Durante a etapa C, pode-se observar no dia seguinte ao pico de $10^6 \text{ células.mL}^{-1}$, a ocorrência de transpasse de células do filtro para a água efluente. Este fato foi confirmado em ambos os experimentos, pelas concentrações de clorofila a na água efluente, comprovando a presença de células (Figura-4).

O transpasse de células da cepa NPLJ-4 ocorreu de forma contínua até 6^o dia da etapa C para o experimento 1 e 4^o dia para o experimento 2. Após esses períodos, os FLAs retornaram aos níveis de remoção observados durante a etapa A.

Com a taxa de filtração de $2 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$, as concentrações de clorofila a na água efluente foram bastante reduzidas (Figura 4).

Estes resultados evidenciam mais uma vez que a menor taxa de filtração favoreceu a remoção de células da cepa NPLJ-4. Não sendo possível detectar clorofila a na água efluente, ficando evidente a não ocorrência de transpasse de células do leito filtrante para a água efluente.

3.4 – População bacteriana no biofilme

Em ambos os experimentos, no primeiro dia da etapa B, a população bacteriana encontrava-se na ordem de $10^4 \text{ colônias.mL}^{-1}$, podendo-se verificar um aumento crescente na comunidade microbiana do filme biológico “*schmutzdecke*” durante a passagem da água do lago contendo células da cepa NPLJ-4.

Nos dois filtros do experimento 1, foi verificado o crescimento de 7 tipos de bactérias com características morfológicas diferentes, além da presença de fungos e actinomicetos. As bactérias foram isoladas e identificadas como pertencentes ao grupo das Gram negativas.

O mesmo comportamento foi verificado nos filtros do experimento 2, que além de apresentar as bactérias, fungos e actinomicetos encontrados no experimento 1, apresentou também mais outros 5 tipos de bactérias, sendo 3 Gram negativas e 2 Gram positivas.

Na última quinzena dos experimentos 1 e 2, a comunidade bacteriana encontrava-se na ordem de 10^6 colônias.mL⁻¹. Nesta fase dos experimentos pode-se também verificar a presença de alguns tipos de microcrustáceos na camada de água acima do filme biológico.

De acordo com dados da literatura, as bactérias Gram negativas são as que apresentam maior capacidade de degradação das microcistinas. Park *et al.* (2001) verificaram a degradação total de 20 mg.L⁻¹ de microcistina-RR e -LR pela bactéria Gram negativa *Sphingomonas paucimobilis*, na concentração de 10^6 colônias.mL⁻¹, num período de 6 dias, sendo verificado que essa bactéria utilizou a molécula de microcistina como fonte de carbono. Bactérias do gênero *Pseudomonas* também degradam microcistina-LR (Takenaka e Watanabe,1997).

A população bacteriana pode influenciar no tempo de degradação de microcistinas. Jones *et al.* (1994) observaram que o processo de degradação de microcistina-LR dissolvida na água do rio Murrumbidgee foi de 100% em 8 dias, enquanto que em condições assépticas o processo de degradação foi de apenas 10% em 14 dias.

Cabe ressaltar que a quantificação microbiana realizada durante os experimentos foi feita utilizando-se apenas um tipo de meio de crescimento que é seletivo para alguns gêneros de bactérias. Portanto outros tipos de microrganismos relevantes para a degradação das microcistinas poderiam estar presentes no filme biológico, mas não foram selecionados.

3.5 - Remoção de células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4)

Os resultados do experimento 1 evidenciaram que o sistema de filtração lenta foi bastante eficiente para a remoção de células da cepa NPLJ-4, quando a concentração de células na água efluente foi de 10^5 células.mL⁻¹ (Figura 5 – Exp.1 e

Tabela 4). Entretanto, foi possível detectar-se MCYSTs extracelulares na água efluente, indicando que as células retidas no leito filtrante foram lisadas e, conseqüentemente, ocorreu a liberação de MCYSTs. As análises quantitativas dessa molécula na fração dissolvida da água efluente revelaram concentrações variando de 2,4 a 15,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 5 – Exp.2). Portanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, esta água apresenta-se imprópria para consumo humano. Este órgão recomenda como limite máximo de microcistinas na água potável a concentração de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para não conferir riscos a saúde.

Para a remoção da concentração de 10^6 células.mL⁻¹ foi possível verificar claramente uma redução na capacidade de remoção destas células pelo sistema (Figura 5 - Exp.1). A água efluente passou a apresentar as maiores concentrações de MCYSTs intracelulares e extracelulares detectadas durante a etapa de simulação de floração, 45,3 e 71,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente (Figura 5). Esse resultado demonstra a ineficiência da filtração lenta para a remoção de altas concentrações de células utilizando especificamente a taxa de filtração de 3 m³/m².dia.

Durante a etapa C do referido experimento, onde foi passado através dos FLAs somente a água do lago, pode-se ainda verificar o transpasse de células do leito filtrante para o efluente durante aproximadamente 5 dias (Figura 5 – Exp.1-A). Nesse mesmo período, também observou-se uma redução nas concentrações de MCYSTs extracelulares (Figura 5 - Exp.1-B). Porém, no último dia dessa etapa, quando as concentrações de MCYSTs intracelulares no efluente estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado, ainda foram detectadas 2,4 e 4,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCYSTs extracelulares respectivamente para os FLA-1 e FLA-2. Estes resultados indicam que a população bacteriana não foi capaz de oxidar essa molécula.

Os fatores que podem ter favorecido esse comportamento são a alta concentração de células, conseqüentemente de MCYSTs e/ou a necessidade de maior tempo de detenção da água contaminada com células no leito filtrante.

Os resultados obtidos no experimento 2, aplicando a taxa de filtração de 3 m³/m².dia, apresentaram tendência bastante semelhante com o do experimento 1 (Figura 6 – Exp.2-A) . No entanto, cabe ressaltar que o FLA-2 mostrou-se menos eficiente para a remoção das células que o observado para o FLA-1, durante as

etapas de simulação de floração. Essa diferença entre os FLAs pode ser devido a condição operacional em resposta ao grau de maturação e/ou da comunidade bacteriana presente. Apesar das análises quantitativas da comunidade microbiana não terem evidenciado essa situação, a seletividade do meio de crescimento bacteriano deve ser considerada.

A taxa de filtração de $2 \text{ m}^3/\text{m}^2$.dia mostrou-se mais efetiva para a remoção de células da cepa NPLJ-4, demonstrando que o maior tempo de detenção dessas células no leito filtrante propiciou melhor eficiência do sistema de filtração lenta (Figura 6). Para a remoção de 10^4 e 10^5 células.mL⁻¹, equivalente a 16,1 e 71,33 µg.L⁻¹ de MCYSTs intracelulares, pode-se verificar remoção de 100% das células da cepa NPLJ-4, ou seja, na água efluente não foi possível detectar MCYSTs intra nem extracelulares através do método utilizado (Tabela 4). Portanto, de acordo com a recomendação da OMS, e o estabelecido pela Portaria 1469/00/MS, esta água apresenta potabilidade, podendo ser liberada para a população.

Com essa menor taxa de filtração, o transpasse de células da água afluente contendo 10^6 células.mL⁻¹ para o efluente foi bastante reduzido em comparação ao determinado nos experimentos aplicando-se taxa de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2$.dia. Em média, a taxa de filtração de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2$.dia apresentou remoção de 70,1%, enquanto que a de $2 \text{ m}^3/\text{m}^2$.dia a remoção foi de 86,7% das células da cepa NPLJ-4 (Figura 6 – Exp.2-A, Tabela 4).

Os nossos resultados estão de acordo com os de Grutzmacher *et al.* (2002) que verificaram a completa remoção de células de *Planktothrix agardhii* contendo 40 µg.L⁻¹ de MCYSTs dissolvidas através da filtração lenta com 18 horas de detenção das células no leito filtrante.

Dentre outros fatores, a morfologia da célula da cianobactéria a ser removida deve ser considerada no sistema. Cabe relatar que as células da cepa NPLJ-4, por estarem a longo tempo em cultivo, perderam a mucilagem que favorece a formação de colônias, deixando-as na forma unicelular. Provavelmente, esta condição favoreceu o transpasse de células, no entanto, a remoção de cepas oriundas do ambiente natural pode apresentar resultados mais satisfatórios devido a formação de colônias.

3.6 - Remoção de microcistinas dissolvidas

As concentrações de MCYSTs dissolvidas utilizadas em cada etapa F foram bastante distintas. As concentrações utilizadas no experimento 2 foram mais próximas das normalmente encontrada nos corpos d'água com florações de cianobactérias (Chorus e Bartram, 1999). No entanto, há um relato na literatura de detecção de $1800 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas após o tratamento de água contendo *M. aeruginosa* com algicida (Lathi, 1997).

No primeiro dia da etapa F do experimento 1, o percentual de remoção das MCYSTs dissolvidas foi em média de apenas 33,7% para a concentração de $426 \mu\text{g.L}^{-1}$ na água afluyente. No segundo dia, para essa mesma concentração de MCYSTs dissolvida, o sistema mostrou-se consideravelmente mais efetivo, apresentando eficiência de 96% de remoção dessas moléculas. Este resultado pode ser um indicativo de que parte das bactérias formadoras dos filmes biológicos (*Schumutzdecke*) levaram algumas horas até iniciarem o processo de oxidação das microcistinas (Figura 7 –Exp.1).

As concentrações de $243 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 7 - Exp. 1), 127 e $58 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 7 - Ex. 2) de MCYSTs dissolvidas foram totalmente removidas através da filtração lenta, evidenciando que o processo de oxidação dessa molécula foi bastante intenso e eficaz para essas concentrações. Durante a etapa de monitoramento (G), os resultados das análises de quantificação de MCYSTs dissolvidas indicaram que não ocorreu liberação dessa molécula para a água efluente.

A partir desses resultados, pode-se inferir que a filtração lenta nas condições testadas é efetiva para a remoção de até $243 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MCYSTs dissolvidas, apresentando 100% de remoção dessas moléculas. Portanto, deixando a água dentro do padrão de potabilidade para microcistinas.

Contudo, a aplicação desse sistema em grande escala merece considerações. Grutzmacher *et al.* (2002) verificaram que o sistema de filtração lenta não foi eficiente para a remoção completa de $5,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MCYSTs dissolvidas obtidas do cultivo de *Planktothrix agardhii*. Esses autores sugerem que as condições ambientais como: temperatura, intensidade luminosa, fontes de nutrientes e os tipos de

microrganismos formadores do filme biológico contribuem efetivamente para a eficiência dos mesmos.

4 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam o sistema de filtração lenta como uma boa alternativa para o tratamento de água contendo células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) em concentrações na ordem de até 10^5 células.mL⁻¹, assim como para a remoção de concentrações de MCYSTs dissolvidas de até 243 µg.L⁻¹.

Este sistema também pode ser empregado como uma etapa complementar ao sistema de tratamento de água convencional, que se mostra inadequado para a remoção de MCYSTs dissolvidas.

Portanto, sugerimos a realização de outros estudos visando ampliar os conhecimentos obtidos utilizando florações cianobactérias tóxicas provenientes do ambiente natural e verificando a capacidade do sistema para a remoção de diversos gêneros de cianobactérias e de suas cianotoxinas.

5 – BIBLIOGRAFIA

- Brandão, C.C.S. & Azevedo, S.M.F.O. (2001). Cianobactérias tóxicas: Impactos na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da saúde, Funasa (Eds.). Brasília-DF, Brasil.
- chorus
- Drikas, M.; Chow, C.W.K.; House, J.; Burch, M.D. (2001). Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *Journal of American Water Works Association*, 93 (2), 100-111.
- Gibson C.E. & Smith, R.V. (1982). Freshwater Plankton. In: *The Biology of Cyanobacteria*, Carr, N.G. & Whitton, B.A. (Eds). Botanical Monographs, Vol. 19, Blackwell Scientific Publications, London, 463-490.
- Grutzmacher, G.; Bottcher, G.; Chorus, I.; Bartel., H. (2002). Removal of microcystins by slow sand filtration. *Toxicol* 17: 386-394.
- Haarhoff, J. & Cleasby, J.L. (1991). Biological and physical mechanisms in slow sand filtration. Longsdon, G.S. (Ed.). *Slow Sand Filtration*. ASCE, New York, EUA.
- Hendricks, D.W.; Asce, F.; Bellamy, W.D.; Asce, M. (1991). Microorganism removals by slow sand filtration. Longsdon G.S. (Ed.) *Slow Sand Filtration*. ASCE, EUA.
- Heresztyn, T. & Nicholson, B.C. (2001). A colorimetric protein phosphatase inhibition assay for the determination of cyanobacterial peptide hepatotoxins based on the dephosphorylation of phosphovitin by recombinant protein phosphatase 1. *Environmental Toxicology* 16: 242-252.
- Hespanhol, I. (1987). Filtração lenta. Azevedo Netto, J.M. (Ed.) *Técnicas de abastecimento de água*, vol. 2 CETESB, São Paulo.

- Hrudey, S.; Burrch, M.; Drikas, M.; Ross, G. Remedial measures. In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rovtledge, London, 275-312.
- Jones, G.J.; Bourne, D.G.; Blakeley, R.L.; Doelle, H. (1994). Degradation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Natural toxins* 2: 228-235.
- Krishnamurthy, T.; Carmichael, W.W.; Sarver, E.W. (1996). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria blue-green algae. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 24(9) 865-873.
- Lahti, K. (1997). Cyanobacterial hepatotoxins and drinking water supplies – aspects of monitoring and potential health risks. Monographs of Boreal Environment Research. Finnish environment institute, Finland.
- Loyd, S.W. & Tucker, C.S. (1988). Comparasion of three solvent systems for extraction of chlorophyll a from fish pond phytoplankton communities. World Aquaculture Society, USA.
- Mouchet, P. & Bonnélye, V. (1998). Solving algae problems: Frech expertise and world-wide applications. *Journal Water SRT – Aqua* 47 (3): 125-141.
- Park, H-D.; Sasaki, Y.; Maruyama, T.; Yanagisawa, E.; Hiraishi, A.; Kato, K. (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ Toxicol* 16: 337-343.

Sá, J.C (2002). Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina pelo processo de filtração lenta. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília.

Takenaka, S. & Watanabe, M.F. (1997). Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34: 749-757.

Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Harada, K-I. (1994). A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxin* 32 (10):1251-1259.

Veras, L.R.V. (1999). Tratamento de água superficial por meio de diferentes alternativas da tecnologia de filtração em múltiplas etapas. Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo, Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, SP, Brasil, 246p.

Varesche, M.B.A. (1989). Estudo sobre a interferência de algas no sistema de filtração lenta em areia. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, São Carlos, SP, Brasil, 417p.

Tabela 1 – Características do experimento 1, com taxa de filtração de 3 m³/m².dia, durante as distintas etapas.

Etapas	Duração (dias)	Concentração
A	16	Água do lago Paranoá
B	3	1º dia – 10 ⁵ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		2º dia – 10 ⁶ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		3º dia – 10 ⁵ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
C	7	Água do lago Paranoá
F	3	1º dia – 426 µg.L ⁻¹ MCYSTs dissolvidas
		2º dia – 426 µg.L ⁻¹ MCYSTs dissolvidas
		3º dia – 243 µg.L ⁻¹ MCYSTs dissolvidas
G	4	Água do lago Paranoá

Tabela 2 – Características do experimento 2, com taxa de filtração de 3 m³/m².dia (etapas A, B, C, F e G) e 2 m³/m².dia (etapas D e E).

Etapas	Duração (dias)	Concentração
A	14	Água do lago Paranoá
B	3	1º dia – 10 ⁴ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		2º dia – 10 ⁵ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		3º dia – 10 ⁶ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
C	8	Água do lago Paranoá
D	3	1º dia – 10 ⁴ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		2º dia – 10 ⁵ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
		3º dia – 10 ⁶ células.mL ⁻¹ <i>M. aeruginosa</i>
E	8	Água do lago Paranoá
F	2	1º dia – 58 µg.L ⁻¹ MCYSTs dissolvidas
		2º dia – 127 µg.L ⁻¹ MCYSTs dissolvidas
G	7	Água do lago Paranoá

Tabela 3 – Faixas de valores de coliformes totais, turbidez, clorofila *a* e MCYSTs na água afluyente dos filtros sem adição de células de *M. aeruginosa* e de MCYSTs dissolvidas.

Variáveis	Experimento 1	Experimento 2
Coliformes totais (NMP/100 mL)	1733 – 12400	428 – 21143
Turbidez (UTN)	2 – 52	1.4 – 56
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1,32 – 252,9	2,1 – 221,8
MCYSTs intracelulares ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0	0
MCYSTs extracelulares ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0	0

Tabela 4 – Remoção de MCYSTs intracelulares durante as etapas de simulação de floração de cianobactérias dos experimentos 1 e 2.

Taxa de Filtração		Condição Operacional (células.mL^{-1})	Remoção de MCYSTs intracelulares (%)	
			FLA -1	FLA – 2
Experimento 1	3 $\text{m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$	10^5	98,9	99,8
		10^6	86,3	88,7
		10^5	74,5	74,8
Experimento 2	3 $\text{m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$	10^4	100	100
		10^5	99,5	99,1
		10^6	75,2	65
	2 $\text{m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$	10^4	100	100
		10^5	100	100
		10^6	82,2	91,3

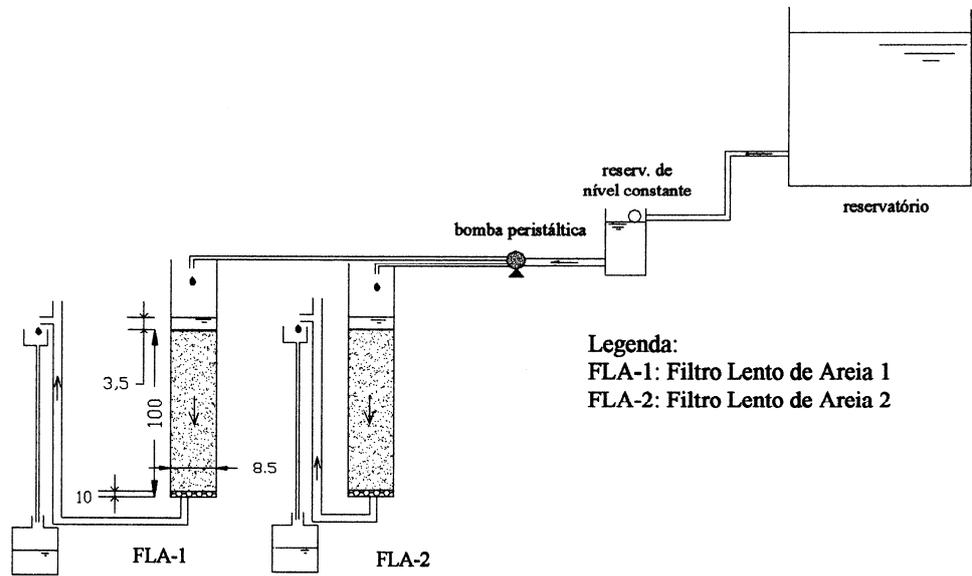


Figura 1 – Configuração da instalação piloto dos experimentos 1 e 2 (cotas em cm; sem escala)

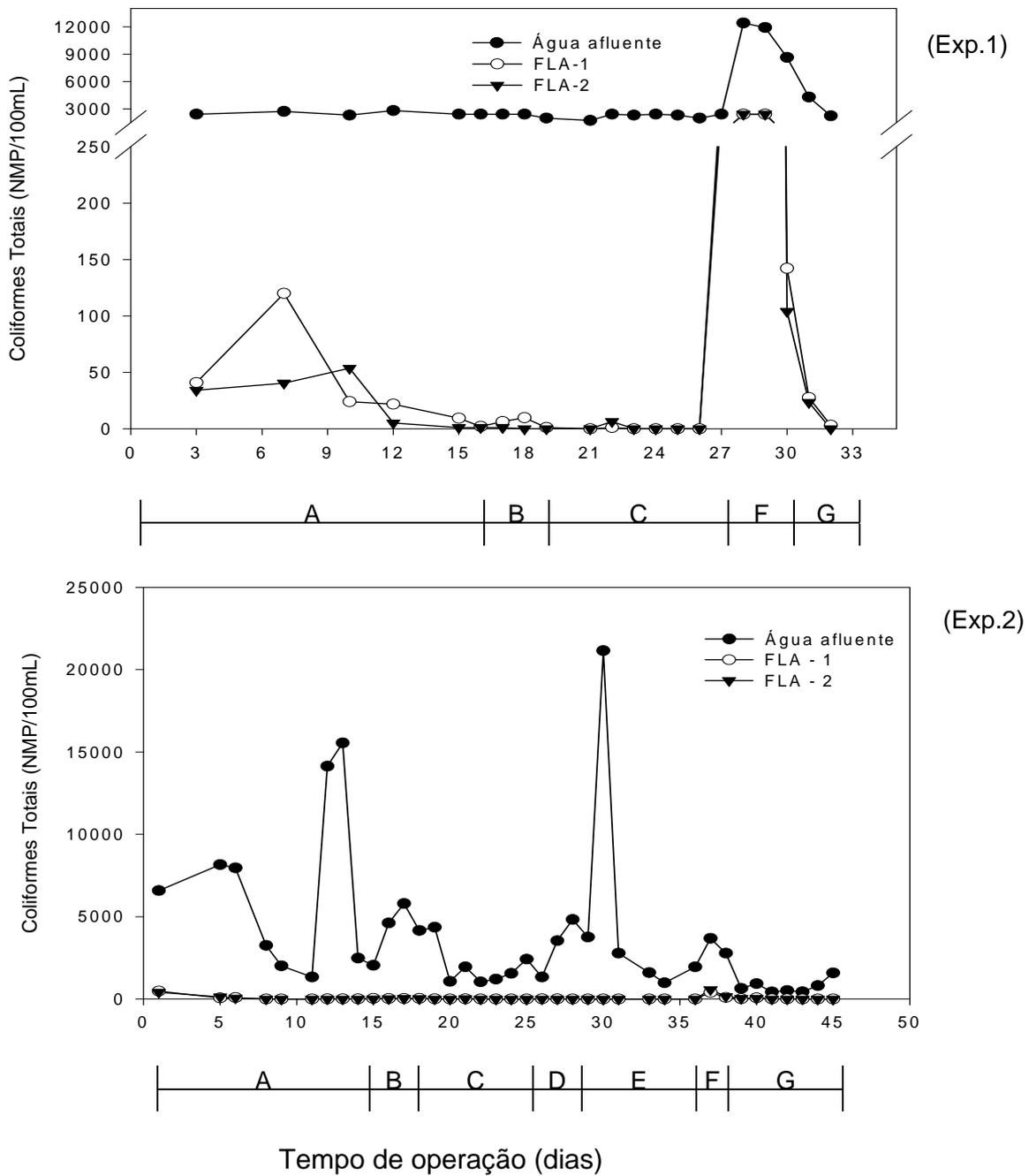


Figura 2 –Valores de coliformes totais na água afluyente e efluente aos filtros lentos (FLA-1 e FLA-2). Taxa de filtração: Experimento 1: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (todas as etapas), Experimento 2: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (etapas A, B, C, F, G) e $2 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (etapas D e E).

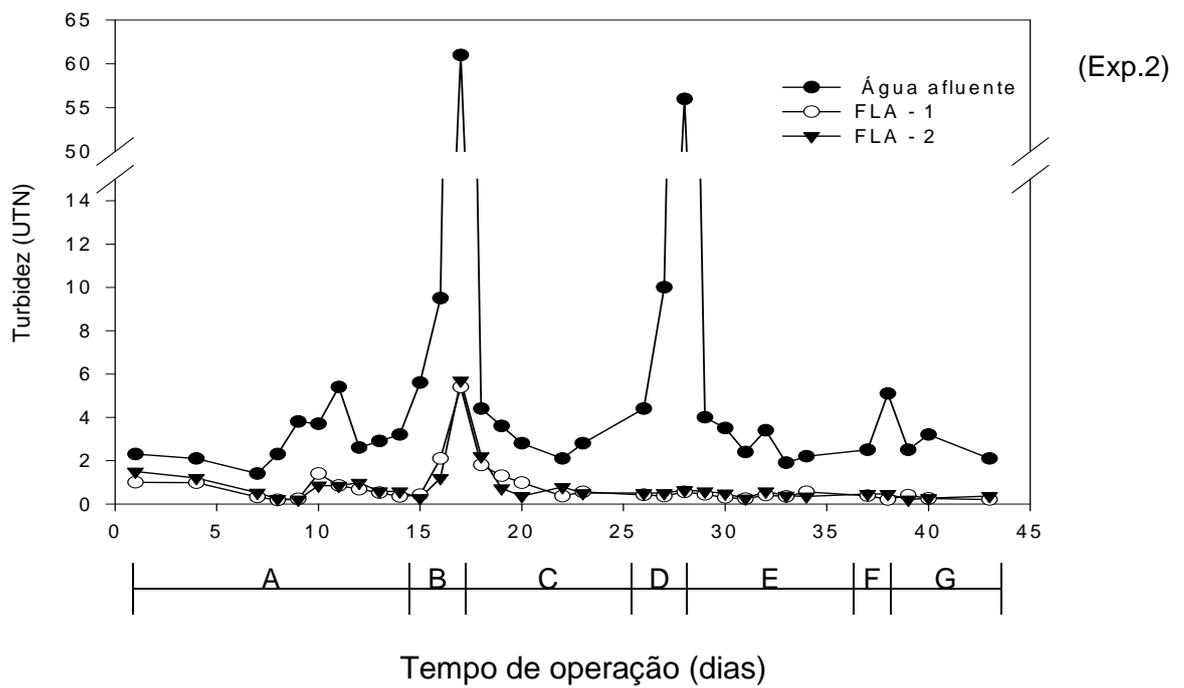
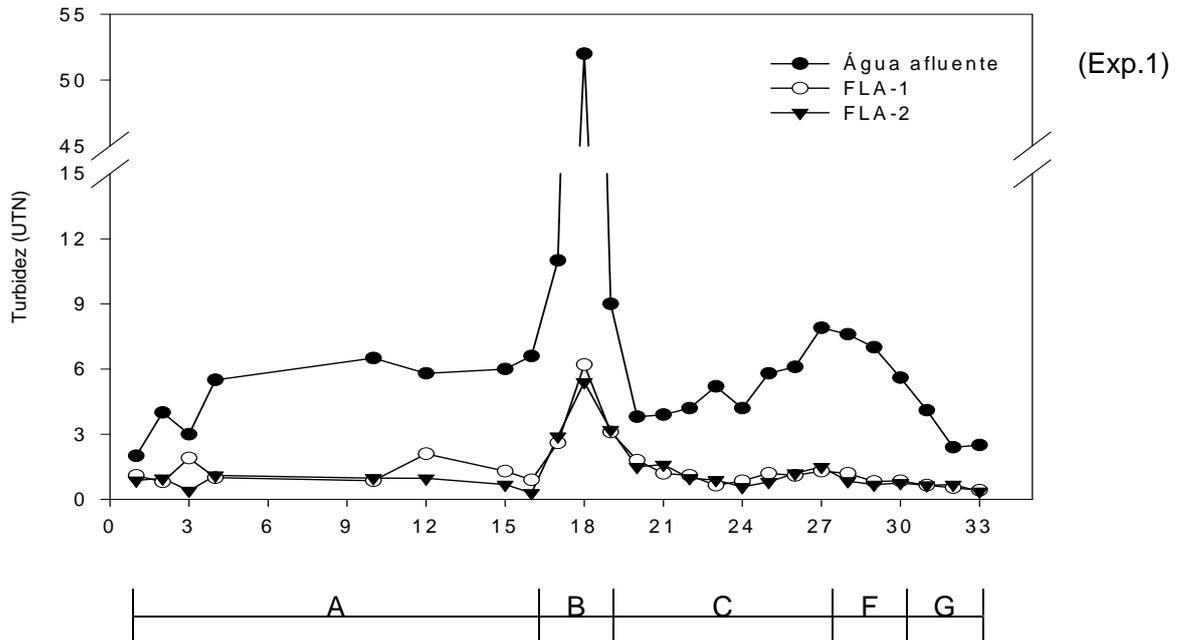


Figura 3 –Valores de turbidez na água afluente e efluente aos filtros lentos. Taxa de filtração: Experimento 1: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (todas as etapas), Experimento 2: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (etapas A,B,C,F,G) e $2\text{m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$ (etapas D e E).

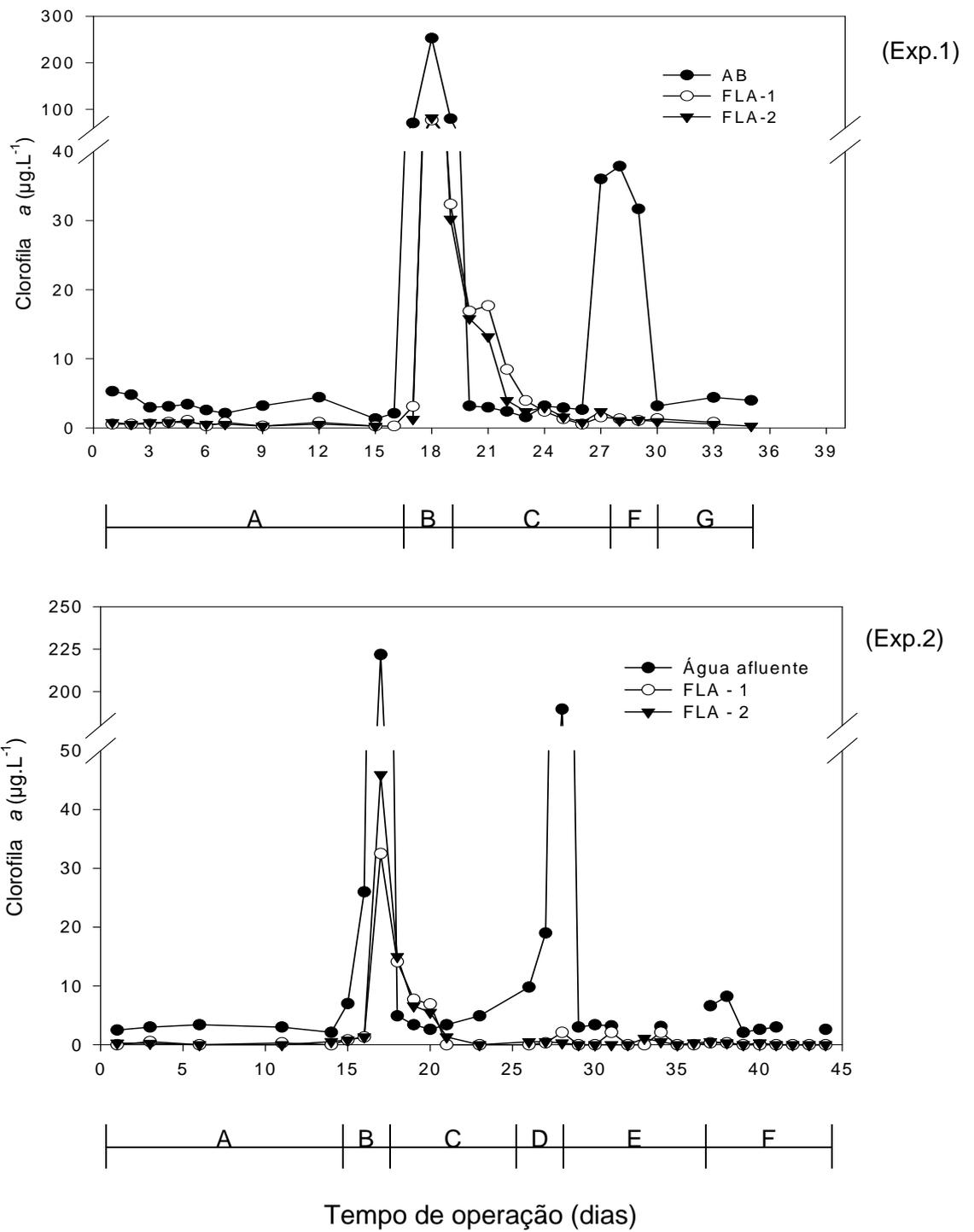


Figura 4 – Concentração de clorofila a na água afluyente e efluente aos filtros lentos. Taxa de filtração: Experimento 1: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{dia}$ (todas as etapas), Experimento 2: $3 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{dia}$ (etapas A,B,C,F,G) e $2 \text{ m}^3/\text{m}^2\cdot\text{dia}$ (etapas D e E).

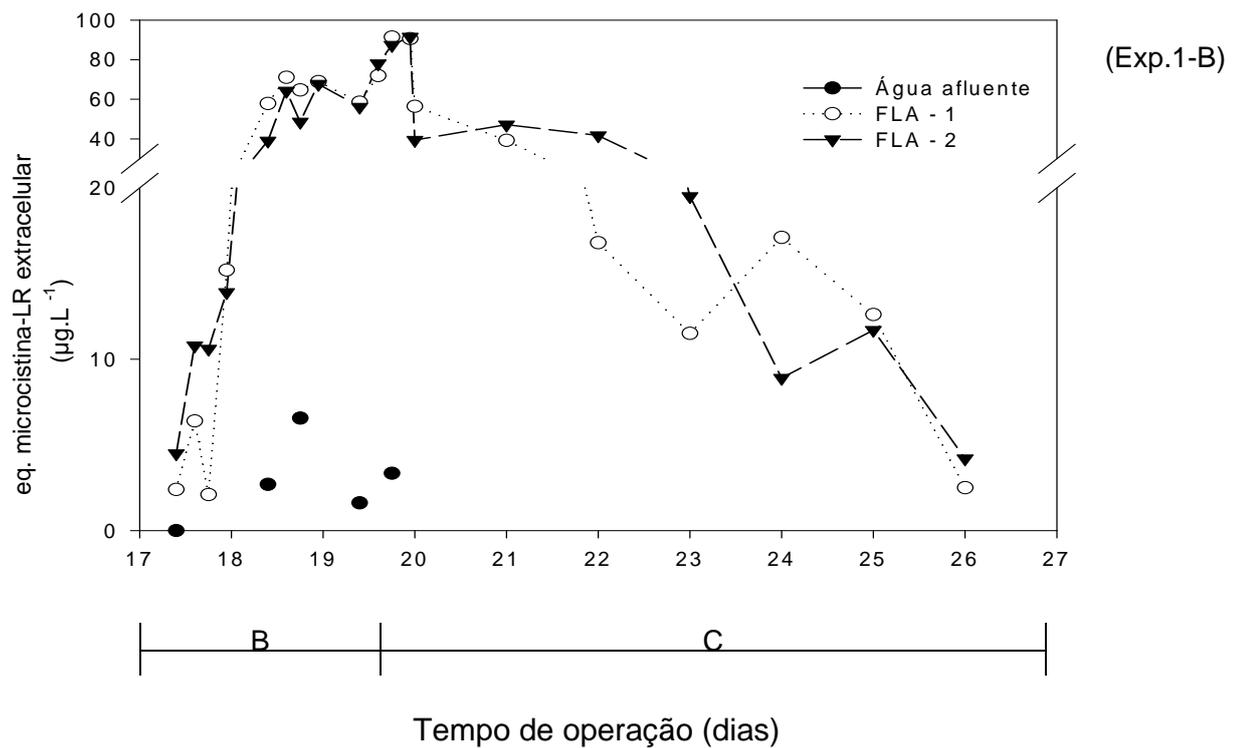
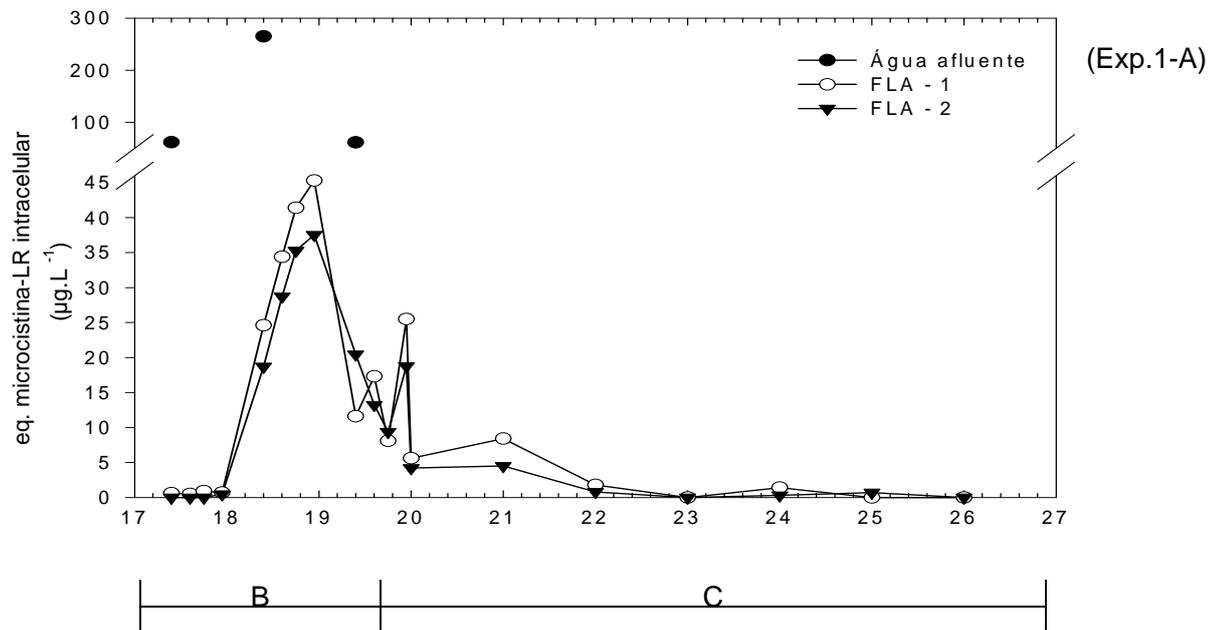


Figura 5 – Experimento 1: Concentração de equivalente de microcistina-LR intracelular (A) e extracelular (B) na água afluente e efluente aos filtros lentos durante as etapas B e C com taxa de filtração de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2.\text{dia}$.

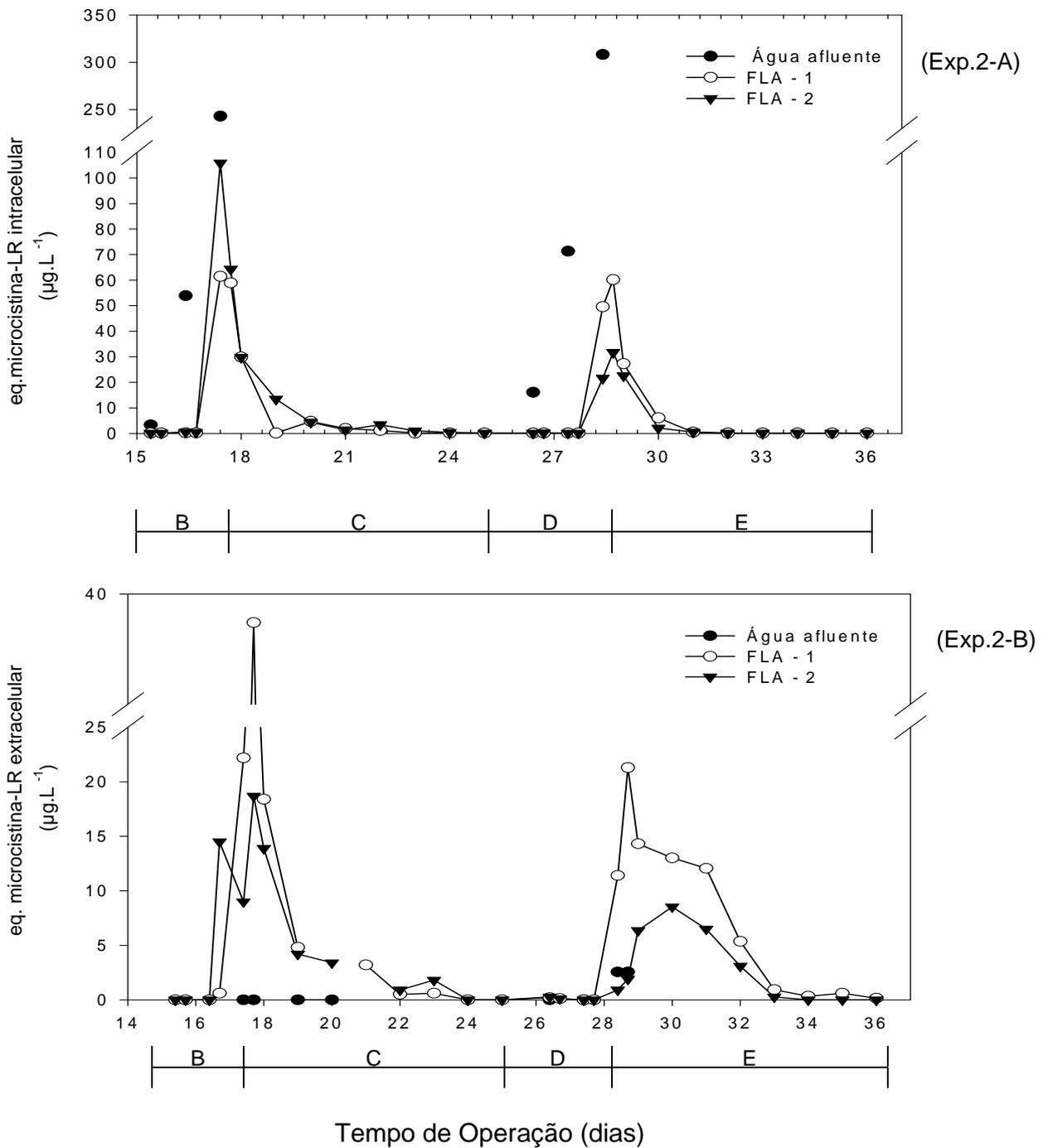


Figura 6 – Experimento 2: Concentração de equivalente de microcistina-LR intracelular (A) e extracelular (B) na água afluente e efluente aos filtros lentos durante as etapas B e C com taxa de filtração de 3 m³/m².dia e etapas D e E com taxa de filtração de 2 m³/m².dia.

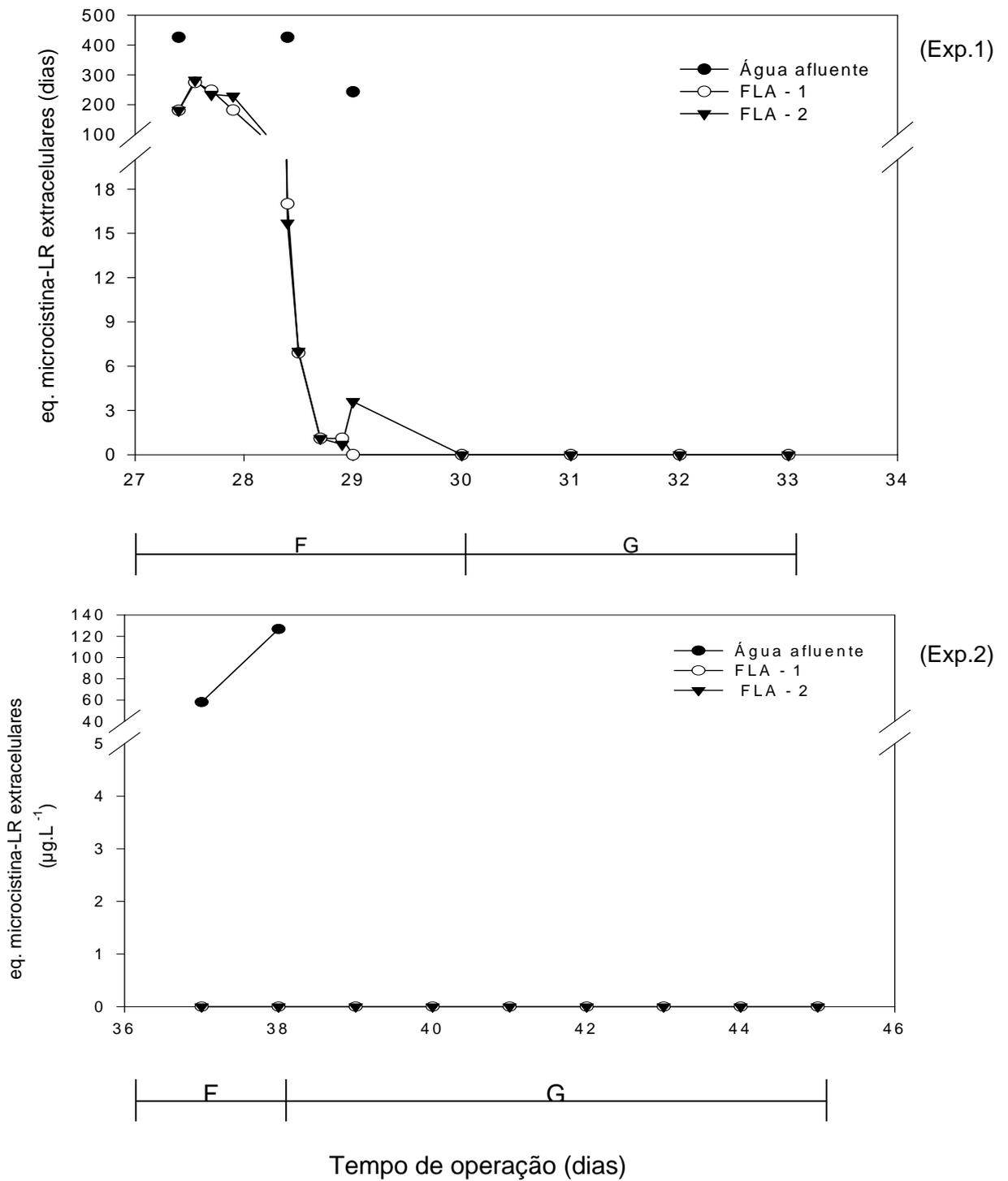


Figura 7 – Experimento 1 e Experimento 2: Concentração de equivalente de microcistina-LR extracelular na água afluyente e efluyente aos filtros lentos durante as etapas F e G com taxa de filtração de $3 \text{ m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{dia}$.

6 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DE MICROCISTINAS POR DIFERENTES TIPOS DE CARVÃO ATIVADO GRANULAR UTILIZADOS EM SISTEMA DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA DE CENTROS DE DIÁLISE

Oliveira, A.C.P.¹ & Azevedo, S. M.F.O.

Universidade Federal do Rio de Janeiro – CCS – IBCCF - Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Rio de Janeiro, Brasil.

¹ anacpimentel@aol.com

Palavras chave: microcistinas, adsorção, carvão ativado granular, tratamento dialítico

RESUMO

Diferentes tipos de carvão ativado granular (CAG), utilizados em sistemas de purificação de água em centros de diálise brasileiros, foram analisados em escala piloto para determinar a eficiência do processo de adsorção de microcistinas dissolvidas. Os tipos de CAGs mais utilizados nesses sistemas são os de origem vegetal (CA1 e CA2) e o mineral (CA3). Além disso, testou-se também o carvão de origem animal (CA4 e CA5) que encontra-se disponível no mercado nacional. Os tipos CA1 e CA3 apresentaram resultados insatisfatórios para a remoção de 1, 10 e 18,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas, deixando a água tratada com resíduos dessa toxina, impossibilitando o uso dessa água no tratamento dialítico ou na fabricação de injetáveis. Os CA1 e CA2 diferem apenas quanto ao tempo de uso, o CA2 que já havia sido utilizado para a filtração de água por 40 dias, apresentou perda de 29% em relação ao CA1 (novo) na capacidade de adsorção. O CAG de origem animal foi o carvão que apresentou os melhores resultados para a adsorção de microcistinas. Entretanto, 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas também não foi totalmente adsorvida pelo CA5, evidenciando a ineficiência desse processo para garantir a remoção completa destas moléculas. Nos testes de saturação, pode-se verificar que o carvão ativado de origem vegetal foi o que apresentou maior perda na capacidade de adsorção de 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas, enquanto que, o carvão de origem animal não apresentou sinais de saturação. Os resultados do teste de cinética de adsorção confirmaram os dados mencionados. O CA5 apresentou remoção de 100% de 1,29 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas, com tempo de contato de 360 minutos, enquanto que para os CA1 e CA2 foi determinada remoção de 77% e 82%, respectivamente. A concentração de 12 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas também favoreceu a perda da capacidade de adsorção de todos os tipos de CAGs avaliados, evidenciando que a capacidade de adsorção desta molécula está relacionada a origem do CAG, ao tempo de contato e a concentração de microcistinas

1 - INTRODUÇÃO

As microcistinas são produzidas por vários gêneros de cianobactérias que vêm ocorrendo com grande frequência em corpos d'água utilizados como fonte de abastecimento público, devido ao crescente processo de eutroficação antrópica. Estas toxinas são reconhecidas como inibidoras potentes e específicas de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A e atuam como promotoras de tumores hepáticos (Falconer,1998). Esta molécula é quimicamente estável e em águas naturais o processo de biodegradação pode iniciar-se entre 3 dias a 3 semanas, dependendo da comunidade microbiana (Chorus e Bartram,1999).

Os procedimentos convencionais de tratamento de água como floculação, sedimentação, filtração em areia e cloração não são eficientes para a remoção completa de células de cianobactérias sem promover a lise celular com posterior liberação das cianotoxinas para a coluna d'água, assim como para a remoção de microcistinas dissolvidas (Hrudey *et al.*, 1999; Drikas *et al.*, 2001).

O uso de carvão ativado tem se mostrado apenas parcialmente efetivo na remoção de microcistinas da água tratada (Donati *et al.*, 1994; Lambert *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1998). Em testes de escala-piloto foi verificada a remoção de 90% da concentração de 30 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas utilizando carvão ativado granular (Bernazeu, 1994). Entretanto Lambert *et al.* (1996) verificaram que o processo de tratamento convencional da água, combinado com o carvão ativado, removeu apenas 80% de microcistinas, tendo-se uma concentração residual de 0,1-0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na água tratada.

As propriedades de adsorção do carvão ativado estão relacionadas a fatores como: estrutura interna, volume e distribuição dos poros, química de superfície, modo de ativação, tempo de contato com o adsorvato e índice de iodo e fenol, que permitem uma informação específica, mas não deve ser utilizada como um parâmetro único de efetividade na capacidade de adsorção de microcistinas (Mohamed *et al.*, 1998; Hoek *et al.*, 1999).

O tipo de estrutura dos poros também interfere na eficiência de adsorção. O carvão ativado de origem vegetal (casca de côco) apresenta estrutura cilíndrica, enquanto os de origem mineral apresentam estrutura cônica. Comparando carvões

desses dois tipos, com o mesmo volume de poros, verificou-se que a estrutura cônica favorecia a maior eficiência na adsorção de moléculas grandes e pequenas, enquanto a estrutura cilíndrica muitas vezes não se apresentou efetiva devido a obstrução da entrada do poro com moléculas maiores ou partículas coloidais (Masschelein, 1992).

Hart *et al.* (1998) ressaltaram que a capacidade de adsorção do carvão ativado em pó está diretamente relacionada com a origem e dose aplicada, podendo-se verificar em experimentos que dosagens superiores a 20 mg.L^{-1} são necessárias para atingir remoções maiores que 85% das microcistinas. As dosagens usualmente aplicadas nas estações de tratamento de água são de 5 a 20 mg.L^{-1} . Assim, o carvão ativado em pó provavelmente contribuirá para a remoção dessa cianotoxina, mas dificilmente promoverá sua remoção completa.

Donati *et al.* (1994) verificaram que o carvão ativado em pó produzido a partir da madeira foi mais efetivo na remoção de microcistina-LR, ao passo que o de origem de casca de côco foi menos adsorvente, evidenciando que a adsorção de microcistinas é dependente do volume de mesoporos e não de microporos do carvão ativado.

A concentração de matéria orgânica dissolvida também é um fator que interfere na capacidade de adsorção de microcistinas pelo carvão ativado. Bruchet *et al.* (1998) verificaram que, em teste realizado com águas naturais contendo entre 5 a $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carbono orgânico, contaminadas artificialmente com microcistina dissolvida, a capacidade de adsorção do carvão ativado granular foi de aproximadamente 90% até $12.000 \text{ volumes/m}^3$ de água tratada. A partir desse volume, a eficiência de remoção de microcistinas caiu para aproximadamente 63%. Essa redução foi atribuída a saturação do carvão pela matéria orgânica dissolvida presente na água.

Vários agravos a saúde humana têm sido atribuídos a presença de cianobactérias ou de cianotoxina na água potável. O caso mais grave de intoxicação humana por microcistinas ocorreu no Brasil, em 1996, onde vários pacientes em tratamento de hemodiálise apresentaram sintomas típicos de hepatotoxicoses, acarretando a morte de mais de 60 pessoas. Este passou a ser o primeiro relato

confirmado de morte humana decorrente de intoxicação por cianotoxinas. Foi detectada a presença de microcistinas no sangue e no fígado das pessoas expostas, assim como no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica de hemodiálise (Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001).

Baseado em estudos de toxicidade oral, Falconer *et al.* (1994) estabeleceram como limite máximo de microcistinas em água para consumo humano a concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo este valor adotado pela Organização Mundial da Saúde em seu 'Guideline for Drinking Water Quality' - WHO (1998) e também inserido na Portaria de potabilidade da água nº 1469/00 do Ministério da Saúde do Brasil. No entanto, a água utilizada para a fabricação de injetáveis e em centros de diálise não deve apresentar microcistinas mesmo em baixas concentrações, pois há riscos de intoxicações crônicas em pacientes hemodializados.

Deste modo, o tratamento da água e a rotina de desinfecção dos componentes do sistema de purificação de água para hemodiálise são de extrema importância. A eficiência do sistema de purificação de água, que consiste em filtros de areia, resina de troca iônica, carvão ativado granular e osmose reversa dependerá da capacidade do sistema e da natureza da água a ser tratada (Ismail *et al.* 1996).

Pacientes urêmicos, em tratamento por hemodiálise, são expostos a volumes de água de aproximadamente 1560 litros por mês. Portanto, se a água não for corretamente tratada vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos serão transferidos para os pacientes, levando ao aparecimento de efeitos adversos, as vezes letais. Silva *et al.* (1996) citam um estudo que analisou a qualidade da água de 19 centros de diálise do estado de São Paulo (Brasil) durante 1 ano, constatando a ineficiência de alguns sistemas de purificação de água para a remoção de alumínio e fluor.

As normas de qualidade de água para hemodiálise mais seguidas são as da Comunidade Européia e da AAMI (Association for Advancement of Medical Instrumentation), que estabeleceram como concentração máxima aceitável de contaminantes tóxicos na água usada na hemodiálise, a redução de 1/10 do sugerido pela legislação para a água potável. No entanto, estas normas não fazem nenhuma menção quanto a concentração de microcistinas na água utilizada para hemodiálise.

Nos últimos anos vêm ocorrendo um aumento constante na frequência de florações de cianobactérias produtoras de microcistinas e, conseqüentemente, essas hepatotoxinas também têm sido detectadas na água tratada.

Frente a tais conhecimentos e acreditando que a qualidade de água é uma condição fundamental no tratamento dialítico, este trabalho visou corroborar com subsídios para uma melhora da qualidade de água oferecida aos pacientes hemodializados. Para tanto, foi analisada a capacidade de adsorção de microcistinas por diferentes tipos de carvão ativado granular utilizados em sistemas de purificação de água nos centros de diálise brasileiros.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

A eficiência do processo de adsorção de microcistinas foi testada utilizando-se 4 tipos diferentes de carvão ativado granular (CAG) disponíveis no mercado nacional, descritos na Tabela 1.

À partir das especificações de um filtro de carvão ativado utilizado em sistema de purificação de água para hemodiálise do Centro de diálise do Hospital Clementino Fraga Filho - UFRJ (RJ-Brasil), foram feitas simulações em escala piloto-bancada, estabelecendo-se condições similares entre os filtros do sistema de purificação de água e o de bancada.

Microcistinas dissolvidas

As microcistinas dissolvidas foram obtidas a partir de cultivos unialgais da espécie *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4). Essa cepa é caracterizada por produzir 4 tipos de microcistinas, 80% da concentração total destas corresponde a microcistina-LR com D-leucina. As células ao atingirem a fase exponencial de crescimento foram concentradas e sofreram um processo de congelamento e descongelamento, favorecendo a lise celular. Esse concentrado de células lisadas foi filtrado em filtro de fibra de vidro para a retirada da matéria orgânica particulada e as microcistinas utilizadas nos testes de adsorção.

Teste 1: Adsorção de microcistinas

Este teste teve como objetivo verificar a capacidade de adsorção de microcistinas dissolvidas pelo CAG através da passagem de 1L de solução, em água deionizada, contendo $18,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas, através de filtros de bancada preenchidos com os diferentes tipos de CAGs, conforme descrito abaixo:

- CA1 = CAG vegetal de casca de côco (novo)
- CA2 = CAG vegetal de casca de côco (utilizado durante 8 semanas no Centro de diálise)

- CA3 = CAG mineral (novo)
- CA4 = CAG animal de osso de boi (novo – mesh = 2,36x0,7 mm)
- CA5 = CAG animal de osso de boi (novo – mesh = 0,83x0,3 mm)

Todos os tipos de CAG analisados encontram-se disponíveis comercialmente. No entanto, somente os tipos CA1 (vegetal) e CA3 (mineral) são normalmente utilizados nos sistemas de purificação de água dos centros de diálise brasileiros.

O volume total filtrado (passado através do filtro de CAG de bancada – 1L) foi analisado quanto a presença de microcistinas na fração dissolvida seguindo a metodologia descrita por Tsuji *et al.* (1994).

Cada condição experimental foi realizada em triplicata.

Quantificação de microcistinas através da técnica de HPLC

A quantificação das microcistina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um aparelho Shimadzu com detector UV/VIS. SPD 10A, bombas LC-10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, utilizando-se uma coluna analítica (Lickrospher 100 RP-18, 125 mm x 4 mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20 nm, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e absorção a 238 nm. O espectro de absorção foi analisado numa faixa de 195 a 300 nm, podendo-se comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma).

A concentração das microcistinas foi calculada através dos valores de área obtidos nos cromatogramas e uma curva padrão de microcistina-LR. O resultado final da concentração de microcistinas está expresso em equivalentes de microcistina-LR.

Este método apresenta um limite de detecção de 0,5 µg.L⁻¹ de microcistinas.

Teste 2: Saturação de microcistinas

Para verificar o efeito de saturação (perda na capacidade de adsorção) dos CAGs por microcistinas foram montados filtros de bancada seguindo as especificações já citadas. Os diferentes tipos de CAG testados foram:

- CA1 = CAG vegetal de casca de côco (novo)
- CA3 = CAG mineral (novo)
- CA5 = CAG animal de osso de boi (novo – mesh = 0,83x0,3 mm)

As concentrações de microcistinas utilizadas foram de 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para cada uma das concentrações de microcistinas dissolvidas testadas foi tomado o seguinte procedimento: uma solução em água deionizada contendo microcistinas foi passada através dos filtros de carvão e as concentrações de microcistinas quantificadas na água filtrada (coletada após a passagem pelo filtro de CAG). Os volumes amostrados da água filtrada foram de: 0,12; 0,25; 0,5; 1; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 8,75; 11,25 e 13,75 litros. O volume total de água filtrada (13,75 L) corresponde a 11 dias de utilização do filtro de carvão ativado do sistema de purificação de água tomado como modelo.

A quantificação de microcistinas na água filtrada foi determinada através do método de imunoenensaio do tipo ELISA.

Cada condição experimental foi analisada em triplicata.

Quantificação de microcistinas através da técnica de imunoenensaio do tipo ELISA

A quantificação das microcistinas através da técnica de imunoenensaio do tipo ELISA foi realizada utilizando-se “kits” específicos para microcistinas (Envirologix Inc.[®]), com pelo menos 3 repetições por amostra.

Este método apresenta um limite de detecção de 0,16 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Teste 3: Cinética de adsorção de microcistinas

Adsorventes:

Os tipos de CAG testados foram: CA1, CA3 e CA5, especificados no teste 1. A massa de cada um dos adsorventes utilizada foi de 100 mg.L^{-1} em água deionizada.

Adsorvato:

As concentrações de microcistinas dissolvidas utilizadas foram de 1,29 e $12 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Visando verificar a cinética de adsorção de microcistinas, 1 litro de solução, em água deionizada, contendo microcistinas dissolvidas e o CAG foram colocados nos frascos de acrílico de um jarreste, a temperatura ambiente, pH neutro e rotação de aproximadamente 220 rpm. Os tempos de contato estabelecidos foram de: 1, 5, 10, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos. Após os tempos estabelecidos as concentrações de microcistinas adsorvidas foram determinadas através da técnica de imunoenensaio do tipo ELISA, descrita no teste 2.

Análise estatística

A capacidade de adsorção de microcistinas dos diferentes tipos de CA, nos três testes realizados, foram comparadas utilizando-se ANOVA e o teste-t para amostras independentes com nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste 1: Adsorção de microcistinas

A capacidade de adsorção dos diferentes tipos de CAGs para a remoção de $18,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas variou significativamente (Tabela 3).

Os CA1 (vegetal) e CA3 (mineral), normalmente utilizados nos sistemas de purificação de água de centros de diálise brasileiros, apresentaram resultados insatisfatórios para a adsorção total de $18,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas, fato evidenciado pelas concentrações residuais de microcistinas na água filtrada de 3,8 e $1,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Tabela 3).

O CAG vegetal CA1 e CA2 apresentaram valores de adsorção de microcistinas estatisticamente diferentes. O CA1 apresentou um percentual de adsorção 29,2% maior que a determinada para o CA2. Como já enfatizamos, a diferença entre os CAGs CA1 e CA2 consiste apenas no tempo de uso. O CA2 foi previamente utilizado durante 40 dias em um sistema de purificação de água de um centro de diálise, tendo ainda sido retrolavado após o uso diário de 10 horas. Este resultado concorda com o de Hoek *et al.* (1999) que relatam que a capacidade de adsorção do CAG está relacionada com o tempo de uso, verificando uma redução de 25% na capacidade de adsorção do CAG após 4 ciclos de reativação.

A capacidade de adsorção determinada para os tipos de CAG vegetal e mineral foi semelhante aos dados de Carmichael *et al.* (2001) que verificaram a ineficiência do sistema de purificação de água de uma clínica de hemodiálise brasileira (Caruaru-PE) para a remoção de microcistinas na água tratada, a dose estimada de microcistinas presente na água utilizada para o tratamento dialítico foi de $19,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Os tipos de CAG-animal CA4 e CA5, que diferem apenas no tamanho das partículas (mesh), foram os que apresentaram os melhores resultados para a adsorção de microcistinas dissolvidas, 96,9 e 100% respectivamente, deixando a água filtrada em condições de potabilidade, de acordo com a recomendação da OMS e o estabelecido pela Portaria 1469/00/MS do Brasil. Entretanto, a água não ficou

isenta de microcistinas, e portanto, não é recomendada a sua utilização em centros de hemodiálise.

Os melhores resultados da capacidade de adsorção apresentados pelos CAGs CA3, CA4 e CA5 podem ser atribuídos a relação entre o tamanho do adsorvato (1000 daltons) e o tamanho e distribuição dos mesoporos do carvão (38-600 Å). Entretanto, é importante ressaltar que o percentual de 100% de adsorção de microcistinas apresentado pelo CAG CA5 foi determinado através da quantificação dessa molécula, utilizando a técnica de HPLC, que apresenta limite de detecção de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Como já mencionado, os principais fatores que afetam a eficiência do processo de adsorção de microcistinas são a estrutura interna do carvão, distribuição e volume dos poros, origem do material, química de superfície e modo de ativação (Mohamed *et al.*, 1998; Fuerhacker *et al.*, 2001). E segundo Summers e Roberts (1988) para a melhor adsorção é necessário que o volume do poro do adsorvente seja aproximadamente 1,5 vezes maior que o tamanho do adsorvato.

O tempo de contato do adsorvente com o adsorvato também é considerado um fator importante no processo de adsorção. Em nossos testes, pode-se verificar que a diferença na capacidade de adsorção de microcistinas dos CA1 e CA2 não deve ser atribuída ao tempo de contato, ficando evidente a perda da capacidade de adsorção de microcistinas dissolvidas do carvão vegetal com o tempo de uso (Tabela 3).

Nos centros de hemodiálise brasileiros, o tempo de uso do carvão ativado segue a recomendação do fabricante, entretanto, é de responsabilidade do diretor clínico do serviço de diálise a qualidade da água utilizada no tratamento dialítico (Portaria nº 82/00/MS). Portanto, é recomendado que o chefe do serviço de diálise mantenha contato constante com a companhia de abastecimento público, tomando ciência das condições físico-químicas e microbiológicas da água potável a ser utilizada no tratamento de hemodiálise.

Teste 2: Saturação de microcistinas

Os dados apresentados na Figura 1-A e -B evidenciam que os CAGs CA1(vegetal) e CA3 (mineral) não apresentaram adsorção total para a remoção de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas em água deionizada. O CA3 apresentou na primeira amostragem (0,12 L) a adsorção de apenas 85% da concentração inicial de microcistinas e após a passagem do volume total (13,75 L) este percentual de adsorção permaneceu o mesmo, indicando que não ocorreu saturação desse CAG. O mesmo não foi observado para o CA1 que apresentou uma pequena redução na capacidade de adsorção ao longo do teste (Tabela 5).

O CA5 foi o que mostrou o melhor percentual de adsorção de microcistinas dissolvidas. Em todos os volumes amostrados, as concentrações de microcistinas determinadas na água filtrada estavam abaixo do limite de detecção do método de imunoenensaio do tipo Elisa ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 1-B). Todavia, essas concentrações não são consideradas nulas para microcistinas como o observado na condição controle. Portanto, as concentrações de microcistinas na água filtrada nos diferentes tipos de carvão, nesta condição experimental, indicam que a água filtrada nos filtros de origem vegetal, mineral e animal deve ser considerada imprópria para o uso no tratamento dialítico e na fabricação de injetáveis devido as concentrações residuais de microcistinas de 0,37; 0,22 e $> 0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

O teste de saturação utilizando a concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas demonstrou que o CA5 foi o que apresentou melhor capacidade de adsorção (98,1%) (Figura 2-A e -B). Entretanto, a concentração de microcistinas nos diferentes volumes amostrados teve como média $0,22 \mu\text{g.L}^{-1}$, indicando a incapacidade desse CAG para remoção completa de microcistinas. O tratamento estatístico realizado com as médias das concentrações de microcistinas do primeiro volume amostrado (0,12L) e da última amostragem (13,75L) mostrou que não houve uma variação significativa na capacidade de adsorção de microcistinas, evidenciando que não ocorreu saturação do CA5, mas a adsorção de microcistinas não foi total, inviabilizando a utilização dessa água nos centros de diálise (Tabela 5).

A água filtrada no CA1 foi a que apresentou as maiores concentrações de microcistinas. Em todos os volumes amostrados foram detectadas concentrações de microcistinas acima de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo no último volume amostrado detectada a concentração de $4,33 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas. Os resultados do tratamento estatístico dado as médias das concentrações de microcistinas na água tratada do CA1 do primeiro e último volume amostrados, evidenciaram a saturação desse carvão pelo concentrado de microcistinas (Tabela 5).

O carvão ativado de origem mineral (CA3) também não apresentou remoção efetiva de microcistinas para garantir a utilização da água em tratamento dialítico, mas sua capacidade de adsorção foi estatisticamente superior a determinada para o carvão de origem vegetal (Figura 2-A e-B, Tabela 5)

Cabe ressaltar que todos os testes foram realizados em água deionizada, sendo 100% da matéria orgânica disponível na solução, oriunda do extrato das células da espécie *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) que contém além das microcistinas dissolvidas, pigmentos fotossintéticos, carboidratos, proteínas e etc.

As Figuras 1 e 2 evidenciam que os percentuais de adsorção de microcistinas para as concentrações de 1 e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas não apresentaram diferenças significativas em seus valores percentuais, para os mesmos tipos de carvão ativado. Entretanto, as concentrações absolutas de microcistinas ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água tratada são estatisticamente diferentes (tabela 5).

Teste 3: Cinética de adsorção de microcistinas

As concentrações de $1,29$ e $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas adsorvidas por unidade de massa de carvão ativado granular (100 mg) estão apresentadas, respectivamente na Figura 3-A e -B. Os resultados demonstram que as concentrações de microcistinas testadas não foram rapidamente adsorvidas.

O processo de adsorção de $1,29 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas pelo CA5 de origem animal mostrou-se mais dependente do tempo de contato que o verificado para os demais tipos de CAGs (Figura 3-A). Entretanto, após 360 horas de contato, o percentual de remoção de microcistinas foi de aproximadamente 100%, enquanto os

tipos de origem vegetal e animal apresentaram remoção de 77% e 82%, respectivamente (Tabela 4).

Este resultado está de acordo com os determinados nos testes de saturação, onde foi verificada variações significativas na capacidade de adsorção de microcistinas pelos diferentes tipos de CAG (Tabela 4).

A tendência da cinética verificada para a adsorção de $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas foi bastante semelhante a determinada para a concentração de $1,29 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém os percentuais máximos de adsorção foram significativamente inferiores ao determinado no teste utilizando $1,29 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas (Figura 3-B e Tabela 4).

Portanto, fica evidente que a capacidade de adsorção do carvão ativado granular está diretamente relacionada com a origem do carvão, ao tempo de contato e a concentração de microcistinas.

Frente aos dados obtidos fica evidente a necessidade de avaliação periódica do sistema de purificação de água pelos centros de diálise quanto a capacidade de remoção de microcistinas.

Entretanto, acredita-se que a eficiência do processo de remoção dessa molécula pode ser aprimorada adotando-se condições adequadas como a escolha do tipo de CAG, maior tempo de detenção do adsorvato com o CAG e limitação no tempo de uso.

A prática de sistema de purificação de água com dois filtros de CAG também é uma condição que deve ser considerada na capacitação do sistema para a remoção total de microcistinas dissolvidas, viabilizando o sistema para a produção de água utilizada em centro de diálise.

4 – BIBLIOGRAFIA

Bernazeu, F. (1994). Can microcystins enter drinking water distribution systems. Toxic cyanobacteria, current status of research and management. D.A. Steffensen and B.C. Nicholson (Eds.). Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, American Water Works Association Research Foundadtion, Australia Centre for Water Quality Research, Centre for Water Research Belgium, 115-118.

Bruchet , A.; Bernazeu, F.; Baudin, I.; Pieronne, P. (1998). Algal toxins in surface waters: analysis and treatment. *Water Supply* 16 (1/2): 619-623.

Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O.; Molica, R.J.R.; Jockimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109 (7): 663-668.

Chorus, I. & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rovtledge, London.

Donati, C.; Drikas, M.; Hayes, R.; Newcombe, G. (1994). Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Research* 28 (8): 1735-1742.

Drikas, M., Chow, C.W.K., House, J., Burch, M.D. (2001). Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *Journal American Water Works Association*, 100-111.

Falconer, I.R. (1998). Algal toxins and human health. *The Handbook of Environmental Chemistry* 5: 53-82

- Falconer, I.R. (1994). Healthy implications of cyanobacteria (blue-green algae) toxins: In: Toxic cyanobacteria current status of research and management. Eds. Steffensen, D.A. & Nicholson, B.C. Proceedings of international workshop. Adelaide – Australia.
- Fuerhacker, M.; Durauer, A.; Jungbauer, A. (2001). Adsorption isotherms of 17 β -estradiol on granular activated carbon (GAC). *Chemosphere* 44: 1573-1579.
- Hart, J., Fawell, J.K., Croll, B. (1998). Algal toxins in surface waters: origins and removal during drinking water treatment processes. *Water Supply* 16: 611-623.
- Hoek, J.P.; Hofman, J.A.M.H.; Graveland, A. (1999). The use of biological activated carbon filtration for the removal of natural organic matter and organic micropollutants from water. *Water Science Technology* 40 (9) : 257-264.
- Hrudey, S.; Burrch, M.; Drikas, M.; Ross, G. Remedial measures. In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rovtledge, London, 275-312.
- Ismail, N.; Becker, B.N.; Halkim, R.M.; (1996). Water treatment for hemodialysis. *Am. Journal Nephrology* 16: 60-72.
- Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, I.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, E.A. Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O.; Jarvis, W.R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 38: 373-378.

Lambert, T.W., Holmes, C.F.B., Hrudehy, S.E. (1996). Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30: 1411-1422.

Masschelein, W. J. (1992). *Unit process in drinking water treatment*, Marcel Dekker (Ed.), Nova Iorque, EUA.

Mohamed, Z.A.; Carmichael, W.W.; El-Sharouny, H.M. (1998). Activated carbon removal efficiency of microcystins in an aqueous cell extract of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria tenuis* strains isolated from Egyptian freshwaters. *Environmental Toxicology* 14: 197-201.

Mouchet, P.; Bonnélye (1998). Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *Journal Water SRT – Aqua* 47 (3): 125-141.

Silva, A.M.M.; Martins, C.T.B.; Ferraboli, R.; Jorgetti, V.; Junior, J.E.R. (1996). Revisão/Atualização em diálise: Água para Hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 18 (2): 180-188.

Summers e Roberts -1988

Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Shimada, T.; Harada, K-I. (1994). A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxin* 32 (10):1251-1259.

Guidelines for drinking-water quality. 2nd (volume 3). Ed. World Health Organization, Geneva-Suíça, 238p.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos diferentes tipos de carvão ativado granular (CAG) utilizados:

Especificações	CA-Vegetal	CA-Mineral	CA-Animal	
	(casca côco) CA1 e CA2	(*) CA3	(osso de boi) CA4	CA5
Cinzas (%)	10	*	82-85	82-85
Umidade (%)	10	*	5	5
pH	Alcalino	*	9,0	9,0
Iodo (mg I ₂ /g CA)	Min. 900	*	200	200
Dureza (%)	Min. 90	*		
Tamanho do poro	Microporos	Mesoporos	Mesoporos	Mesoporos
Modo ativação	800-900°C	*	675°C	675°C
Tamanho da partícula Mesh (mm)	5-0,5 3,33-0,7 2,36-0,41 0,8-0,3	1,65-0,42	2,36-0,7	0,83-0,3

* - dados não disponibilizados pelo fabricante/fornecedor.

Tabela 2 - Dados físicos dos filtros de carvão ativado granular (CAG) do centro de diálise e de bancada:

Dados	Filtro de CAG Centro de diálise	Filtro de CAG Bancada
Diâmetro	40,64 cm	2,5 cm
Altura	121,92 cm	10,7 cm
Espaço preenchido de CA	56,92 cm	4,5 cm
Uso diário	10 horas	10 minutos
Tempo de contato (min.)	2,21 minutos	0,17 minutos
Vazão	33,33 L/min	0.126 L/min

Tabela 3 - Variáveis analisadas durante o teste de adsorção de 18,2 µg.L⁻¹ de equivalente de microcistina-LR, pelos diferentes tipos de carvão ativado granular (CAG):

Dados	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5
Concentração inicial microcistinas (µg.L ⁻¹)	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2
Concentração final microcistinas (µg.L ⁻¹)	3,8	9,06	1,3	0,57	ALD
% de adsorção de microcistinas	79,1 *	49,9 *	92,7 *	96,9	100
% de adsorção de cloro livre e total (mg.L ⁻¹)	100	100	100	100	100
Vazão (mL /min.)	149,5	82,7	146,5	70	76
Tempo de contato (minutos)	0,15	0,27	0,15	0,32	0,29

ALD – abaixo do limite de detecção da técnica de HPLC (0,5 µg.L⁻¹)

* - estatisticamente diferentes (p > 0,05)

Tabela 4 – Capacidade máxima de adsorção de 1,29 e 12 µg.L⁻¹ de equivalente de microcistina-LR (µg.L⁻¹) por 100 mg de carvão ativado granular (CAG) de diferentes origens.

CAG (100 mg)	Concentração de microcistinas					
	1,29 µg.L ⁻¹			12 µg.L ⁻¹		
	Tempo de contato (min.)	Máximo de adsorção (µg.L ⁻¹)	% remoção	Tempo de contato (min.)	Máximo de adsorção (µg.L ⁻¹)	% remoção
Vegetal (CA1)	360	1,0	77	360	8,5	71
Mineral (CA3)	240	1,0	82*	360	8,1	68*
Animal (CA5)	360	1,2	100*	360	8,1	67*

* estatisticamente diferentes (p > 0,05)

Tabela 5 - Tratamento estatístico dado as médias das concentrações de equivalente microcistina-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) determinadas na primeira (0,12 L) e última (13,75 L) amostragens do experimento de saturação realizado com as concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e com os diferentes tipos de carvão ativado.

Tipo de carvão	Concentração de eq. microcistina-LR			
	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$		10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	
	0,12 litros	13,75 litros	0,12 litros	13,75 litros
Vegetal (CA1)	0.223	0.367	1.758 *	4.331 *
Mineral (CA3)	0.187	0.217	0.778 *	1.773 *
Animal (CA5)	ALD	ALD	0.183	0.244

ALD – abaixo do limite de detecção da técnica de Imunoensaio do tipo ELISA ($0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$).

* - estatisticamente diferentes ($p > 0,05$)

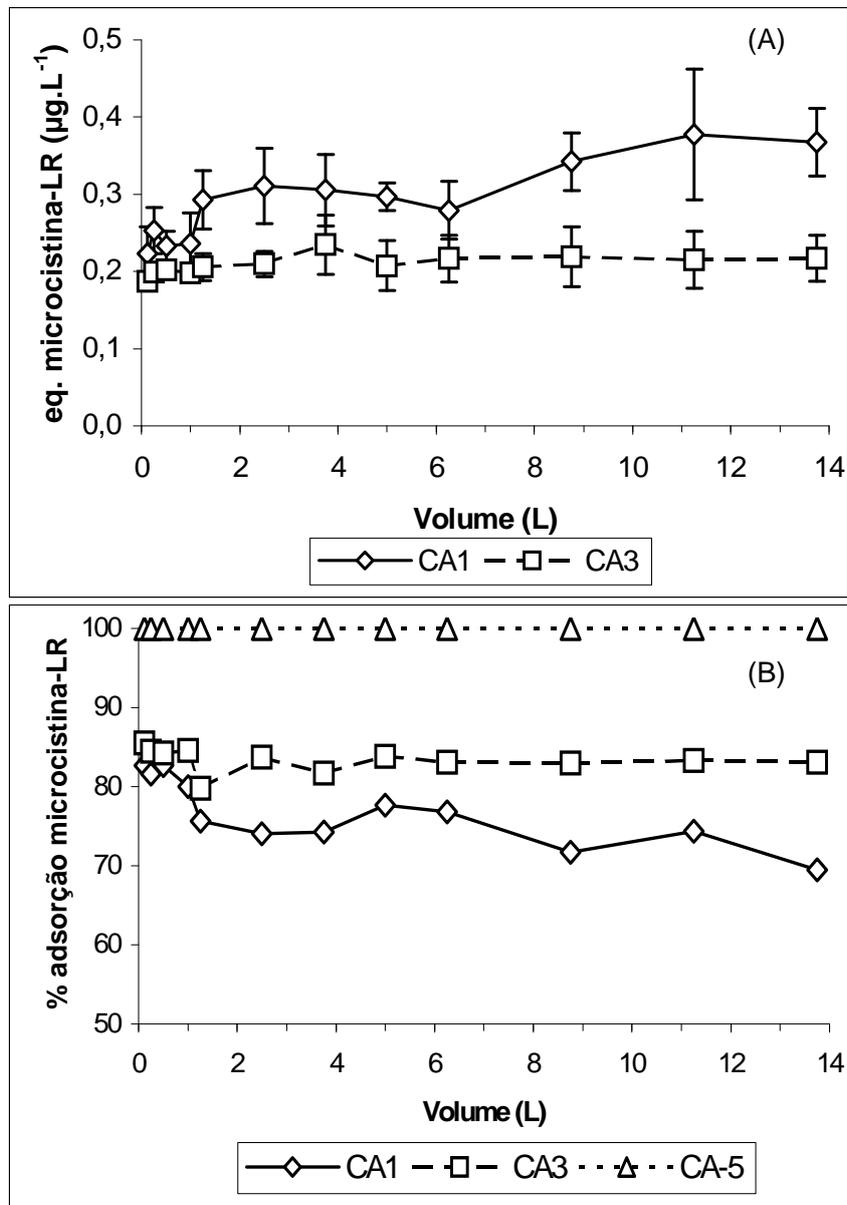


Figura 1 – Experimento de Saturação: (A) Concentração de equivalente de microcistina-LR na água filtrada, após a passagem de solução contendo $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos diferentes tipos de CAG. (B) Percentual de adsorção de equivalente de microcistina-LR.

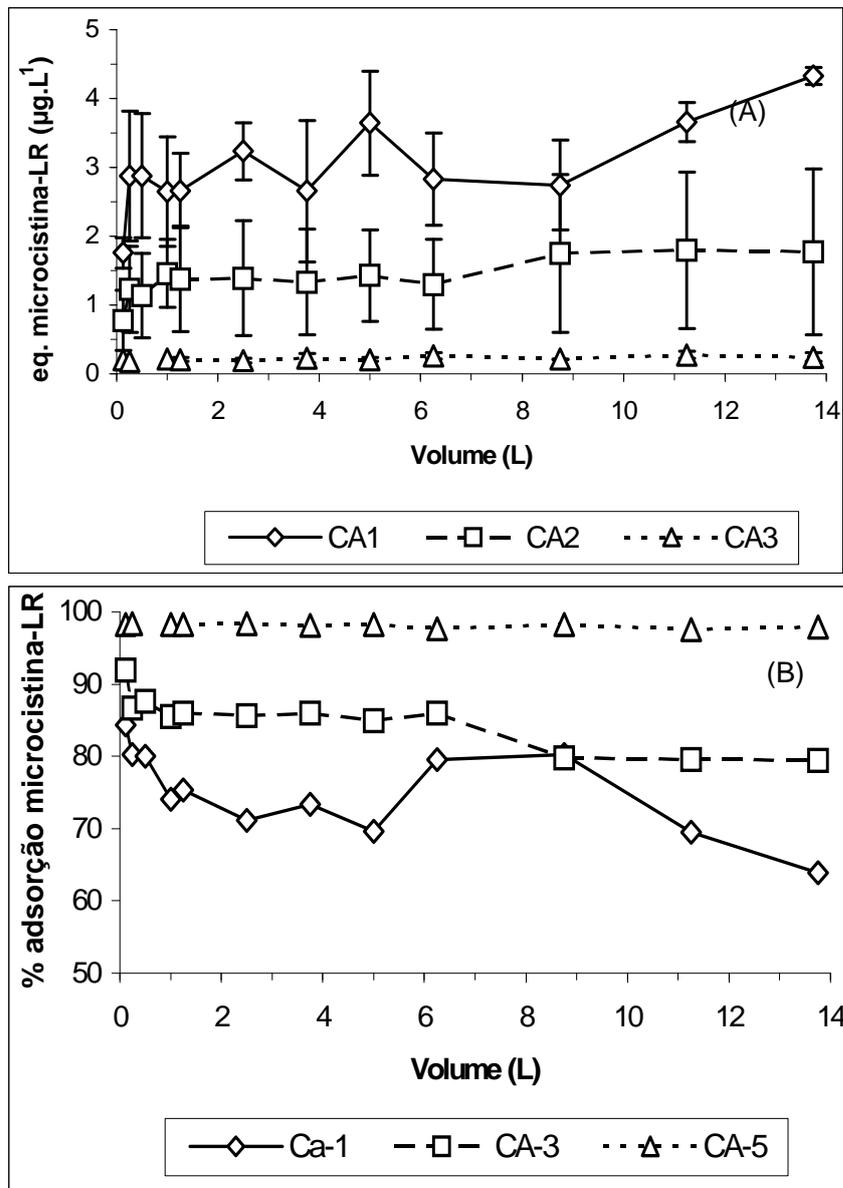


Figura 2 – Experimento de Saturação: (A) Concentração de equivalente de microcistina-LR na água filtrada, após a passagem de solução contendo $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos diferentes tipos de CAG. (B) Percentual de adsorção de equivalente de microcistina-LR.

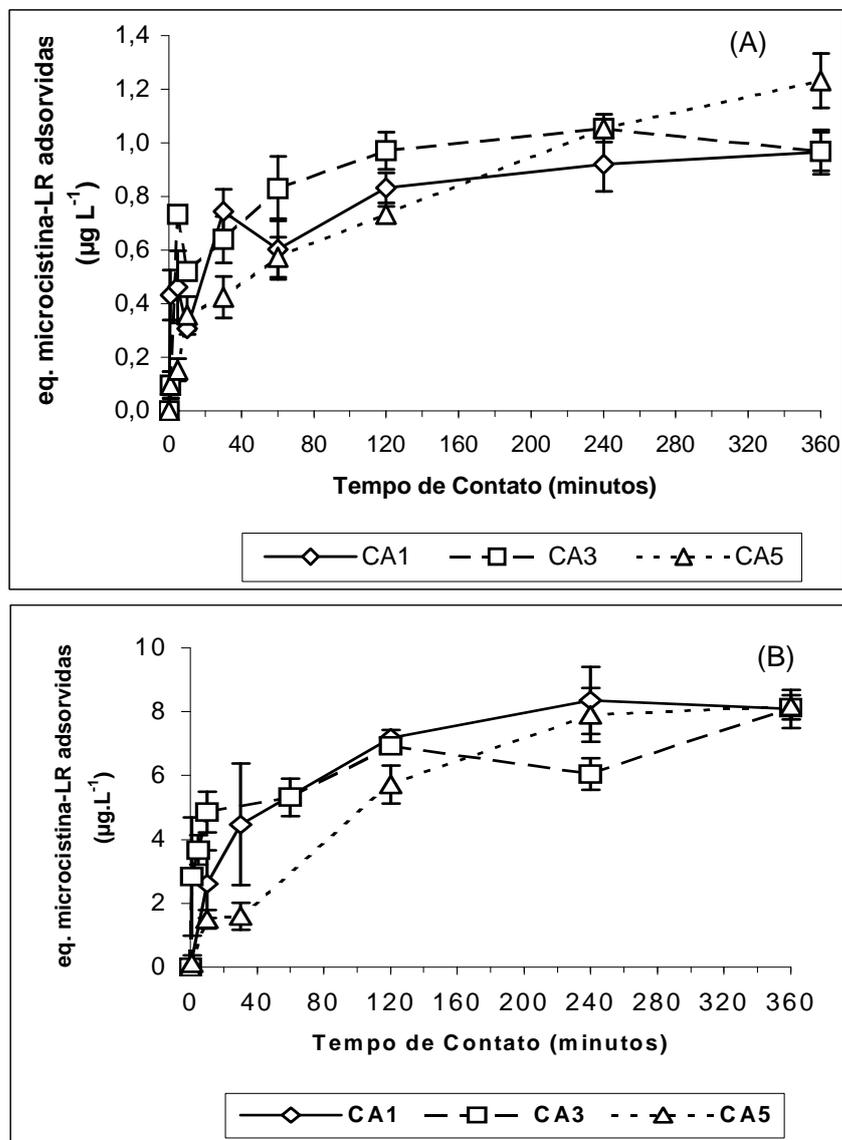


Figura 3 - Cinética de adsorção de equivalente de microcistina-LR adsorvidas pelos diferentes tipos de carvão ativado granular.

Adsorvato: (A) $1,29 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas (B) $12 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas

Adsorvente: 100 mg de carvão ativado granular.

7 - DISCUSSÃO FINAL

Os resultados deste estudo evidenciaram que o processo de degradação das microcistinas ocorre de forma extremamente lenta em condições ácida e neutra. O mesmo foi verificado para variação de temperatura de 12°C a 30°C. Portanto, nessas condições, as microcistinas podem permanecer biologicamente ativas por um período de aproximadamente 2 meses. Entretanto, o tempo de permanência dessa molécula ativa na água irá depender de um conjunto de variáveis ambientais, cabendo ressaltar a importância da comunidade bacteriana presente.

A utilização de flocculantes no tratamento da água, como cloreto férrico e sulfato de alumínio, promoveu a lise das células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4), mesmo nas menores doses aplicadas (3,5 e 5 mg.L⁻¹, respectivamente). Assim, a aplicação de produtos químicos em mananciais contendo cianobactérias potencialmente produtoras de cianotoxinas deve ser preferencialmente realizada quando a densidade celular for baixa e, conseqüentemente, o potencial de liberação de toxinas para o meio extracelular será reduzido.

A dosagem do flocculante considerada ótima para a remoção de células de cianobactérias será sempre dependente da concentração total de matéria orgânica presente na água, assim como o tipo de célula a ser removida. Portanto, fica evidente a necessidade de um monitoramento constante da comunidade fitoplanctônica e das características físicas e químicas da água pelos responsáveis pelo tratamento da água a fim de estabelecer os procedimentos mais apropriados.

A qualidade da água mostrou-se uma condição limitante para a detecção de microcistinas dissolvidas. Águas com alta condutividade (69,8 µS) e concentração de Fe (0,45 mg.L⁻¹) reduziram, significativamente, a quantificação dessa molécula bem como a sua atividade biológica. Este fato provavelmente ocorreu devido a possíveis processos de quelação e/ou complexação de íons metálicos, presentes nesta água, às moléculas de microcistinas dissolvidas, modificando a sua estrutura. Contudo, a realização de outros estudos se fazem necessários para a compreensão dessa reação.

Além disso, esse aspecto pode ser preocupante por levar a uma subestimação da real concentração de microcistinas dissolvidas que poderiam ter sua atividade

biológica restabelecida através de um tratamento adicional, como por exemplo a utilização de carvão ativado e resinas de troca iônica, que é prática comum nos centros de diálise.

Por outro lado, ficou evidente que águas com alta concentração de carbono orgânico dissolvido (43 e 60 mg.L⁻¹ COD) favoreceram a degradação das microcistinas. Esta condição favoreceu o crescimento bacteriano, ficando nítida a influência da comunidade bacteriana na biodegradação das microcistinas.

Os experimentos para verificar o processo de remoção das células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4) e de microcistinas dissolvidas através do processo de filtração lenta em areia e de adsorção por carvão ativado granular, apresentaram resultados relevantes.

O processo de filtração lenta mostrou-se efetivo para a remoção completa de células da cepa NPLJ-4 em concentrações de até 10⁵ células.mL⁻¹, com a taxa de filtração de 3 m³/m².dia. Essa densidade celular de cianobactérias caracteriza a presença de floração. Entretanto, microcistinas dissolvidas foram detectadas na água efluente em concentrações acima do limite de 1µg.L⁻¹ recomendado pela OMS e estabelecido pela Portaria 1469/00/MS do Brasil, para a água potável não conferir risco a saúde.

Com a redução da taxa de filtração (2 m³/m².dia) passou-se a não detectar microcistinas dissolvidas na água efluente, podendo esta ser utilizada como água potável. O maior tempo de detenção das células no leito filtrante favoreceu consideravelmente o processo de oxidação bacteriana das microcistinas, sendo a molécula biodegradada.

O sistema de filtração lenta também mostrou-se eficiente para a produção de água potável quando a água afluenta apresentava concentrações de 243, 126 e 58 µg.L⁻¹ de microcistinas dissolvidas. Portanto, a utilização desse sistema de tratamento de água é indicada para regiões de baixa densidade populacional, como o nordeste do Brasil, que apresenta alguns casos de contaminação da água tratada com microcistinas.

É importante ressaltar que esses resultados foram obtidos em escala piloto de pequeno porte. A aplicação desse sistema em grande escala merece considerações

devido às condições ambientais como: temperatura, intensidade luminosa, fontes de nutrientes e os tipos de microrganismos formadores do filme biológico, contribuirão efetivamente para a eficiência dos filtros biológicos.

Quanto aos testes realizados para verificar a capacidade de adsorção de microcistinas por diferentes tipos de carvão ativado (CAG), normalmente utilizados nos sistemas de purificação de água de centros de diálise, pode-se constatar a ineficiência desses CAGs para a remoção completa dessa molécula.

Os tipos de CAG mais utilizados nesses sistemas são os de origem vegetal e mineral que apresentaram resultados bastante insatisfatórios para a remoção de 1, 10 e 18,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas em água deionizada, levando-se em consideração que a água utilizada na fabricação de injetáveis e no tratamento dialítico deve apresentar concentração nula de microcistinas, devido ao risco potencial de intoxicação crônica.

O CAG testado de origem animal (osso de boi) apresentou resultados mais satisfatórios para a remoção de microcistinas. Porém, também não foi eficiente para produzir água isenta de microcistinas e portanto apropriada para uso em hemodiálise.

Os resultados dos testes para verificar a saturação dos diferentes tipos de carvão ativado por concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas dissolvidas evidenciaram que o CAG vegetal, o mais utilizado nos centros de diálise brasileiros, foi o que apresentou a menor capacidade de adsorver essa molécula.

Não foi observada saturação no CAG de origem animal. Entretanto, mesmo mostrando resultados bastante significantes para a remoção dessas moléculas, a água filtrada não foi considerada própria para utilização nos centros de diálise.

8 - CONSIDERAÇÃO FINAL

Os resultados obtidos nos diferentes trabalhos apresentados evidenciaram que os processos de degradação e remoção de microcistinas são bastante complexos e lentos, demonstrando claramente a necessidade de mais estudos multidisciplinares para que os problemas decorrentes da presença dessas toxinas em nossos ambientes aquáticos possam ser efetivamente minimizados.

9 - CONCLUSÕES

- 1 - O processo de degradação de microcistinas não foi efetivamente diferenciado nas condições ácida e neutra, sendo a condição mais ácida (pH 3,0) a que mais favoreceu a degradação dessas moléculas.
- 2 – A variação de temperatura também não foi determinante para a degradação de microcistinas. A degradação destas moléculas foi mais pronunciada na temperatura mais alta testada (30°C).
- 3 – FeCl_3 e $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ mostraram-se eficientes para promover a floculação das células de *M. aeruginosa* (cepa NPLJ-4), e mesmo as menores concentrações aplicadas (3,5 e 5 mg.L^{-1} , respectivamente) promoveram a lise celular. Porém, não foram detectadas microcistinas extracelulares na fração dissolvida dos diferentes tratamentos, através da técnica analítica de HPLC.
- 4 – A água da rede de distribuição pública, que apresentava alta condutividade (68,9 $\mu\text{S.cm}^{-1}$) e concentração de Fe (0,45 mg.L^{-1}), favoreceu a não detecção de microcistinas dissolvidas através das técnicas de HPLC, ELISA e inibição de PP1.

- 5 – A água da rede também favoreceu a perda da atividade biológica das microcistinas dissolvidas. Consideramos que possíveis processos de quelação e/ou complexação de íons às moléculas de microcistinas dissolvidas promoveram modificações estruturais, interferindo na detecção das mesmas através dos métodos analíticos utilizados.
- 6 – A degradação das microcistinas foi mais intensa em condições com alta concentração de carbono orgânico dissolvido (43 e 60 mg.L⁻¹), o que favoreceu o crescimento bacteriano mais intenso e consequente biodegradação das microcistinas.
- 7 – O tratamento por filtração lenta apresentou ótimos resultados para a remoção de células da cepa NPLJ-4 em concentrações de até 10⁵ células.mL⁻¹, com taxa de filtração de 2 m³/m².dia. Nessa condição, a água tratada apresentou as características recomendadas pela OMS e estabelecidas pela Portaria brasileira 1469/00, que limita a concentração de 1 µg.L⁻¹ de microcistinas na água potável para não conferir risco à saúde.
- 8 - A filtração lenta também foi capaz de remover totalmente concentrações de microcistinas dissolvidas de até 242 µg.L⁻¹, com taxa de filtração de 3 m³/m².dia. Portanto, nesta condição, a água tratada apresentou-se dentro do padrão de potabilidade.
- 9 – Nas condições testadas, os diferentes tipos de carvão ativado granular (vegetal, mineral e animal) não foram capazes de remover a concentração mínima testada de 1 µg.L⁻¹ de microcistinas dissolvidas. Portanto, a água filtrada não foi considerada própria para o uso no tratamento dialítico e produção de injetáveis, devido aos riscos potenciais de intoxicação crônica.

10 - BIBLIOGRAFIA

- Azevedo, S.M.F.O. (1998). Toxinas de Cianobactérias: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. *Medicina on Line*, 1: 1-22.
- Bourne, D.G.; Jones, G.J.; Blakeley, R.L.; Jones, A.; Negri, A.P.; Riddles, P. (1996) Enzymatic pathway for bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin, microcystin-LR. *Applied Environmental Microbiology*, 62:4086-4094.
- Brandão, C.C.S. & Azevedo, S.M.F.O. (2001). Cianobactérias tóxicas: Impactos na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da Saúde, Funasa (Eds.). Brasília-DF, Brasil.
- Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites – The Cyanotoxins. *Journal Applied Bacteriology* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 270: 78-86.
- Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O.; Molica, R.J.R.; Jockimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* 109 (7): 663-668.
- Clayssens, S.; Francois, A; Chedeville, A ; Lavoinne, A (1995). Microcystin-LR induced na inhibition of protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Journal Biochemistry* 306: 693-696.
- Drikas, M.; Chow, C.W.K.; House, J.; Burch, M.D. (2001). Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. *Journal of American Water Works Association*, 93 (2), 100-111.

Falconer, I.R. & Buckey, T.H. (1989). Tumor promotion by *Microcystis* sp., a blue-green alga occurring in water supplies. *Journal Medicine Australia*, 150-351.

Fogg, G.E. & Thake, B. (1987). *Algae cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin (Ed.), third Edition

Gleason, F.K. & Wood, J.M. (1987). Secondary metabolism in the cyanobacteria. *The Cyanobacteria*. Fay, P. & Van Bealen, C. (Eds.). Elsevier Science Publishers, New York.

Harada, K-I.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M.; Kondo, F. (1996). Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* 34 (1): 73-84.

Hendricks, D.W.; Asce, F.; Bellamy, W.D.; Asce, M. (1991). Microorganism removals by slow sand filtration. Longsdon G.S. (ed.) *Slow sand filtration*. ASCE, E.U.A., 101-121.

Hrudey, S.; Burch, M.; Drikas, M.; Ross, G. Remedial measures. In: Chorus, I. & Bartram, J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. World Health Organization, E & FN Spon, Rovtledge, London, 275-312.

Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; An, I.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.M.; Antunes, E.A.; Melo Filho, D.A.; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.T.; Azevedo, S.M.F.O.; Jarvis, W.R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 36: 373-378.

Jones, G.J.; Bourne, D.G.; Blakeley, R.L.; Doelle, H. (1994). Degradation of 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 recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 28 (4): 871-876.
- Jones, G.; Minatol, W.; Craig, K.; Naylor, R. (1993). Removal of low level cyanobacterial peptide toxins from drinking water using powdered and granular activated carbon and chlorination. Result of laboratory and pilot plant studies. In: *Proceedings of the Australian Water and Wastewater Association 15th Federal Convention, Gold Cost, Australia.*
- Keijola, J.; Sivonen, K.; Luukkainen, R.; Lahti, K.; Niemela, S.I. (1991). Production and biodegradation of cyanobacterial toxins: a laboratory study. *Arch Hydrobiology*, 121: 381-294.
- Kenefick, S.L.; Hrudey, S.E.; Peterson, H.G.; Prepas, E.E. (1992). Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Symposium on Health – related Water Microbiology.*
- Lambert, T.W.; Holmes, C.F.B.; Hrudey, S.E. (1996). Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30: 1411-1422.
- Landsberg, J.H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Stickney, R.R. (Ed). Reviews in Fisheries Science. (2) 10.*
- Mouchet, P. & Bonnelye, V. (1998). Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *Journal Water SRT – Aqua* 47 (3): 125-141.

- Oliveira, A.C.P.; Soares, R.M.; Costa, S.M.; Azevedo, S.M.F.O. (1998). Ocorrência de cianotoxinas em reservatórios públicos do Brasil. 5^o Ecotox – Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 1^o Coban – Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. Anais: Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. 05-08 de outubro – Itajaí – SC.
- Park, H-D.; Sasaki, Y.; Maruyama, T.; Yanagisawa, E.; Hiraishi, A., Kato, K. (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology* 16: 337-343.
- Sá, J.C (2002). Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina pelo processo de filtração lenta. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied Environmental Microbiology* 56 (9): 2658-2666.
- Sivonen, K. & Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. & Bartram, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization, E & FN Spon, Rottledge, London, 41-111.
- Takenaka, S. & Watanabe, M.F. (1997). Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34: 749-757.
- Tsuji, K.; Watanuki, T.; Kondo, F.; Watanabe, M.F.; Suzuki, S.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Uchia, H.; Harada, K. (1995). Stability of microcystins from cyanobacteria. II – Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 33 (12): 1619-1631.

Watanabe, M.F. (1996). Production of microcystins. Toxic Microcystins. Watanabe, M.F.; Harada, K.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Eds.).

Watanabe, M.F.; Harada, K-I.; Matsuura, K.; Oishi, S.; Watanabe, Y.; Suzuki, M. (1989). Hepatopeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. *Toxicon Assess.* 4: 487-497

Whitton, B.A. & Potts, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria. The Ecology of Cyanobacteria. Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. London.

Yu, S-Z. (1994). Bluen-green algae and liver cancer. Toxic cyanobacteria current status of research and manegement. Steffesen, D.A. & nicholsos, B.C. (eds.). Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, march 22-26.