

**ALLAN AMORIM SANTOS**

**DINÂMICA DA MICROCISTINA-LR NA LAGOA DE  
JACAREPAGUÁ (RJ): ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E  
BIOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOFÍSICA).

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

**2016**

**ALLAN AMORIM SANTOS**

**DINÂMICA DA MICROCISTINA-LR NA LAGOA DE  
JACAREPAGUÁ (RJ): ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E  
BIOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOFÍSICA).

**Orientação: Dra. Valéria Freitas de Magalhães**

**Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Allan Amorim

Dinâmica da microcistina-LR na lagoa de Jacarepaguá (RJ): Aspectos físicos, químicos e biológicos/ SANTOS, Allan Amorim. Rio de Janeiro, 2016

100 p.: il.

Dissertação de Mestrado– Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2016.

Orientadoras: Valéria Freitas de Magalhães  
Ana Beatriz Furlanetto Pacheco

1.Microcistina 2.Biodisponibilidade 3.Adsorção 4.Biodegradação

I.Valéria Freitas de Magalhães, Ana Beatriz Furlanetto Pacheco II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III Título

## AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos são direcionados a todas as pessoas que fazem parte da minha vida pessoal e as que me auxiliam nessa caminhada acadêmica.

Primeiramente devo agradecer a Deus, minha família, meus pais (Sandra e Mário) e minha irmã (Érica) por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, afirmando que sem vocês os obstáculos ficariam maiores. Eu amo vocês.

Agradeço às minhas tias, minha afilhada e minhas avós, principalmente vó Maria, por todo apoio e suporte ao longo do tempo.

À minha namorada Caroline que está sempre comigo nos momentos bons (que se tornam maiores e melhores ao seu lado) e nos momentos ruins (que se tornam menores e mais amenos). Te amo!

Agradeço às minhas orientadoras Valéria e Bia por todo apoio, paciência e ensinamento ao longo desses dois anos, começando um projeto do zero que originou essa dissertação de mestrado. Sem vocês seria mais difícil.

Agradeço a todos os colegas e amigos do laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias por todos os momentos de descontração e conversas que sempre nos fazem pensar de uma forma diferente e melhor, do que fazer e como fazer. Obrigado Luciane e Ricardo pela ajuda na parte analítica.

Agradeço à professora Sandra por me acolher e permitir a realização do trabalho no laboratório, além de todos os ensinamentos transmitidos e momentos de conversa.

Agradeço a todos os professores da banca (Olaf, Ednildo e Carlos Augusto) por aceitarem fazer parte da mesma, contribuindo com muitos ensinamentos e críticas positivas. Agradeço a prof<sup>a</sup> Susana Frases por fazer parte da revisão e pela paciência. Agradeço ao prof<sup>o</sup> Caio Rachid pela disponibilidade e auxílio nas análises de bioinformática.

Aos órgãos de fomento, principalmente a CAPES pela bolsa de mestrado, ao CNPq e à FAPERJ pelo suporte financeiro nos projetos aprovados. Muito obrigado a todos!

## RESUMO

SANTOS, Allan Amorim – Dinâmica da microcistina-LR na lagoa de Jacarepaguá (RJ): Aspectos Físicos, Químicos e Biológicos – Rio de Janeiro (2016). Dissertação (Mestrado em Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2016

Microcistinas (MCs) são cianotoxinas produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias em ambientes aquáticos. É um heptapeptídeo cíclico e tóxico para diversos organismos. Mais de 90 variantes de MC são descritas, sendo a –LR (leucina-arginina) uma das mais tóxicas. Na lagoa de Jacarepaguá (Rio de Janeiro), as cianobactérias são abundantes e reportadas desde 1996 produzindo MCs. A dinâmica dessa molécula no ambiente aquático consiste na bioacumulação em organismos, adsorção a partículas do sedimento e biodegradação por microrganismos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de alguns fatores como pH, temperatura atmosférica e aeração, sobre a sua dinâmica nos compartimentos da lagoa de Jacarepaguá. Além disso, avaliamos a biodegradação da MC por consórcios microbianos da água e do sedimento, caracterizando-os quanto à sua composição bacteriana por metagenômica. Experimentos com duração de 7 dias foram realizados para avaliar tanto o processo de adsorção como a atividade de biodegradação. Os parâmetros analisados não foram capazes de causar o retorno da toxina pré-existente no sedimento para a coluna d'água. Também foi avaliada a adsorção após a adição de uma concentração conhecida da toxina. Condições ácidas ocasionaram uma imediata diminuição da mesma na coluna d'água, possivelmente atribuída à adsorção. O aquecimento a 45 °C acarretou na diminuição total da toxina na água ao longo dos 7 dias, o que não ocorreu a 25 °C. A aeração na interface água/sedimento causou uma diminuição intensa já no quarto dia, sendo completa ao longo dos 7 dias, o que não ocorreu sem aeração. Então, os efeitos avaliados podem aumentar a capacidade de adsorção da MC ao sedimento. Porém, tratamentos do sedimento com azida sódica (antimicrobiano) e água estéril demonstraram que o mesmo após procedimentos de manipulação foi capaz de biodegradar a toxina e, portanto, este processo ocorreu simultâneo à adsorção. Nos experimentos de biodegradação pelos consórcios microbianos (<0,45µm diâmetro) da água e do sedimento, a MC foi eliminada ao longo de 7 dias. Consórcios de microrganismos <0,22 µm (nanobactérias) também foram evidenciados e capazes de biodegradar a MC-LR. A caracterização da comunidade bacteriana da água e do sedimento por metagenômica demonstrou diferentes composições entre esses compartimentos. Filos como *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foram os mais abundantes na água, ao contrário da água intersticial do sedimento onde o filo candidato a divisão *OP3* foi o mais abundante. Já no sedimento bruto, que abrange uma comunidade mais completa, os filios predominantes foram *Chloroflexi*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*. Além disso, foi observada a presença de muitos gêneros já descritos na literatura capazes de biodegradar a MC-LR, sugerindo possíveis participantes do processo de biodegradação nos compartimentos da lagoa de Jacarepaguá, o que não invalida a participação de outros microrganismos de um modo geral através de uma atividade compartilhada.

Palavras chave: Microcistinas. Biodisponibilidade. Adsorção. Biodegradação

## ABSTRACT

Microcystins (MCs) are cyanotoxins produced by different genera of cyanobacteria in aquatic environments. It's a cyclic heptapeptide and toxic to many organisms. Over 90 MCs variants are described, with the -LR (MC-LR) one of the most toxic. In the Jacarepagua lagoon (RJ), cyanobacteria are abundant and reported since 1996 producing MCs. The dynamics of this molecule in the aquatic environment consists to bioaccumulate in organisms, adsorption to sediment particles and biodegradation. This study aimed to evaluate the influence of some factors such pH, atmospheric temperature and aeration, on the dynamics in the compartments of Jacarepagua Lagoon. In addition, we evaluated the biodegradation of MC by microbial assemblages of water and sediment, characterizing them as to their bacterial composition by metagenomics. Experiments with duration of 7 days were conducted to assess both the adsorption and biodegradation activity. The parameters analyzed were not able to cause the return of pre-existing toxins in the sediment to the water. Adsorption was also evaluated upon addition of a known concentration of the toxin. Acidify conditions caused an immediate reduction of the same in the water column, possibly attributed to the adsorption. Heating at 45 °C leads to reduction in the total of the toxin into the water over the 7 days, which did not occur at 25 °C. Aeration in the water / sediment interface caused a intense decrease in the fourth day, and overall throughout the 7 days, which was not without aeration. Then, the effects evaluated may increase the adsorption capacity of the MC to sediment. However, sediment treatment with sodium azide (antimicrobial) and sterile water showed that even after handling procedures was able to degrade the toxin and thus this process has occurred simultaneously for adsorption. In biodegradation experiments by microbial assemblage (0,45 µm diameter) of water and sediment, MC was eliminated over 7 days. Microbial assemblages <0,22 µm (nanobacteria) were also evidenced and able to biodegrade the MC-LR. The characterization of water and sediment bacterial community by metagenomics showed different compositions between these compartments. Phylum Actinobacteria and Proteobacteria as were the most abundant in water, unlike interstitial water where the candidate division OP3 was the most abundant. In the raw sediment, which covers a more general community, the predominant were Chloroflexi, Proteobacteria and Firmicutes. Furthermore, it was observed of many genera described in the literature capable of biodegrading MC-LR, suggesting possible participants in the biodegradation process in the compartments of the Jacarepagua lagoon, which does not invalidate the participation of other microorganisms in general through a shared activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Reportagem do jornal “O Dia” destacando a ocorrência de uma floração de cianobactérias na lagoa de Jacarepaguá (RJ).	16
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular geral das MCs.	22
<b>Figura 3:</b> Sequência da síntese de MC-LR com a participação de enzimas específicas.	24
<b>Figura 4:</b> Esquema representando um capilar sinuoidal de um hepatócito normal e após exposição à MCs.	26
<b>Figura 5:</b> Imagem de satélite da Lagoa de Jacarepaguá (RJ).	38
<b>Figura 6:</b> Organização do experimento de aeração no laboratório.	42
<b>Figura 7:</b> Região V4 amplificada a partir do gene 16S rDNA.	47
<b>Figura 8:</b> Comparação entre as concentrações adicionadas da MC-LR (“ <i>spike</i> ”) com os tempos T0 em diferentes pHs.	52
<b>Figura 9:</b> Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em pH 3,0, 5,0 e 8,0.	54
<b>Figura 10:</b> Comparação entre as concentrações adicionadas da MC-LR com os tempos T0 em diferentes temperaturas.	56
<b>Figura 11:</b> Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em temperaturas de 25 °C e 45 °C.	57
<b>Figura 12:</b> Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em condições sem aeração e com aeração.	59
<b>Figura 13:</b> Análise do perfil de adsorção de MC-LR ao sedimento em ensaios controle realizados na interface sedimento-água.	61
<b>Figura 14:</b> Biodegradação da MC-LR ao longo de 7 dias por microrganismos recuperados da água intersticial do sedimento (A) e da água (B) da lagoa de Jacarepaguá.	65
<b>Figura 15:</b> Controle de biodegradação de MC-LR a partir da água intersticial do sedimento e da água da lagoa de Jacarepaguá autoclavadas.	66
<b>Figura 16:</b> Biodegradação de MC-LR a partir da água intersticial do sedimento e da água da lagoa de Jacarepaguá na presença de tetraciclina.	67
<b>Figura 17:</b> Controle de biodegradação da MC-LR a partir das amostras recuperadas tanto da água intersticial do sedimento como da água, filtradas em 0,22 µm e 0,025 µm.	70

- Figura 18:** Visualização de bactérias por microscopia ótica de fluorescência. 72
- Figura 19:** Proporção de sequências classificadas e não classificadas obtidas através da metagenômica a partir da amostra de sedimento bruto (SED) em relação aos diferentes níveis taxonômicos com base na busca por similaridade ao banco de dados SILVA. 74
- Figura 20:** Proporção de sequências classificadas e não classificadas quanto ao nível de Filo obtidas da água da lagoa (H<sub>2</sub>O), do sedimento bruto (SED) e da água intersticial do sedimento obtida em setembro e dezembro (Ag.Int.SED.set/dez) através da metagenômica. 75
- Figura 21:** Comparação entre a composição taxonômica (filo) das comunidades bacterianas recuperadas do sedimento (SED), da água intersticial do sedimento de setembro e dezembro (Ag.Int.SED.set/dez) e da água da lagoa de Jacarepaguá. 77



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação taxonômica do filo <i>Cyanobacteria</i> .	18
<b>Tabela 2:</b> Classificação das cianotoxinas quanto à estrutura molecular, alvo em mamíferos e gêneros produtores.	20
<b>Tabela 3:</b> Valores de DL50 da MC-LR em camundongos.	29
<b>Tabela 4:</b> Gradiente das fases A e B para estabilização da coluna no equipamento LC-MS/MS.	37
<b>Tabela 5:</b> Variação dos parâmetros analisados na coluna d'água.	49
<b>Tabela 6:</b> Eficiência de adsorção da MC-LR no sedimento.	57
<b>Tabela 7:</b> Eficiência de adsorção e/ou biodegradação da MC-LR no sedimento.	63
<b>Tabela 8:</b> Comparação da taxa de biodegradação de cada tempo amostral dos experimentos em relação ao T0.	69
<b>Tabela 9:</b> Identificação de gêneros bacterianos já descritos na literatura como biodegradadores da MC-LR e que estão presentes na lagoa de Jacarepaguá.	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADDA: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico

Ag.Int.SED.set: Água intersticial do sedimento (recuperada em setembro)

Ag.Int.SED.dez: Água intersticial do sedimento (recuperada em dezembro)

ANOVA: Análise de variância

DAD: Detector de arranjo de díodo (do inglês *Diodo array detector*)

DAPI: 4',6'-Diamino-2-Fenilindol (do inglês *4',6'-diamidino-2-phenylindol*)

D-GLU: D-glutamina

D-MeAsp: D-Metil Asparagina

EPM: Erro padrão da média

ERO: Espécie reativa de oxigênio

GF/F: Filtro de fibra de vidro

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IARC: Agência Internacional para pesquisa sobre o câncer (do inglês *Internation Agency for Research on Cancer*)

INEA: Instituto Estadual do Ambiente

IPCC: Painel Intergovernamental sobre mudanças climáticas (do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*)

kb: kilobase

Kow: Coeficiente de partição octanol-água

LC-MS/MS: Cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas

LETC: Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias

LOAEL: Menor dose com efeito adverso observado

LPS: Lipopolissacarídeo

MC: Microcistina

MC-LR: Microcistina leucina-arginina

*mcy*: Genes que codificam proteínas para a síntese da microcistina

Mdha: Metil dehidroalanina

*mlr*: Genes que codificam para enzimas de biodegradação da microcistina

NRPS: Enzimas peptídeo sintase não-ribossômica

NOAEL: Nível de efeito adverso não observado

OATP: Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos

OMS: Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

ORF: Fase de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frame*)

ORP: Potencial de Oxirredução (do inglês *Oxi Reduction Potential*)

OTU: Unidade operacional taxonômica (do inglês *Operation Taxonomic Unit*)

pb: pares de bases

PET: polietileno tereftalato

pH: potencial hidrogeniônico

PKS: Policetídeo sintase

SED: sedimento bruto

SPE: Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

STX: Saxitoxina

SUE: Suécia

TDI: Ingestão diária tolerável (do inglês *Tolerable Daily Intake*)

TFA: Ácido trifluoroacético

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	13
<b>1.1 CIANOBACTÉRIAS</b> .....	16
<b>1.2 CIANOTOXINAS</b> .....	19
<b>1.3 MICROCISTINAS (MCs)</b> .....	21
1.3.1 SÍNTESE DA MICROCISTINA.....	23
1.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITOS EM MAMÍFEROS.....	25
1.3.3 LEGISLAÇÃO E LIMITES TOXICOLÓGICOS .....	27
1.3.4 BIODISPONIBILIDADE NO AMBIENTE: .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3. OBJETIVOS:</b> .....	35
<b>3.1 OBJETIVO GERAL:</b> .....	35
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS:</b> .....	36
<b>4.1 CULTIVO DE <i>Microcystis panniformes</i> (cepa MIRS-04), EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MICROCISTINA-LR (MC-LR)</b> .....	36
<b>4.2 COLETAS DO SEDIMENTO E DA ÁGUA NA LAGOA DE JACAREPAGUÁ (RJ)</b> 38	
<b>4.3 PROCESSAMENTO DA ÁGUA E DO SEDIMENTO PARA TESTES DE BIODEGRADAÇÃO E ADSORÇÃO DE MC</b> .....	39
<b>4.3.1 PREPARO DO SEDIMENTO E DA ÁGUA PARA O TESTE DE BIODEGRADAÇÃO</b> .....	39
<b>4.3.2 PREPARO DO SEDIMENTO E DA ÁGUA PARA OS TESTES DE DINÂMICA DA MC-LR</b> .....	40
<b>4.4 EXPERIMENTOS PARA AVALIAR A RELAÇÃO ENTRE ADSORÇÃO AO SEDIMENTO E BIODISPONIBILIDADE DE MC-LR NA COLUNA D'ÁGUA</b> .....	40
<b>4.4.1 EFEITO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)</b> .....	41
<b>4.4.2 EFEITO DA AERAÇÃO</b> .....	41
<b>4.4.3 EFEITO DA TEMPERATURA</b> .....	42
<b>4.5 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO</b> .....	42
<b>4.5.1 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA</b> .....	43
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	44
<b>4.7 MÉTODOS MOLECULARES (METAGENÔMICA)</b> .....	44
<b>4.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA e PREPARAÇÃO PARA O SEQUENCIAMENTO</b> .....	45
<b>4.7.2 SEQUENCIAMENTO (ILLUMINA MiSEQ)</b> .....	47

<b>4.7.3 ANÁLISE PÓS SEQUENCIAMENTO</b> .....	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:</b> .....	49
<b>5.1 MC-LR PRODUZIDA</b> .....	49
<b>5.2 MEDIDAS DE CAMPO DA LAGOA DE JACAREPAGUÁ</b> .....	49
<b>5.3 RELAÇÃO ENTRE ADSORÇÃO AO SEDIMENTO E BIODISPONIBILIDADE DA MC-LR NA COLUNA D'ÁGUA</b> .....	51
5.3.1 AVALIAÇÃO DO PH .....	52
5.3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA .....	55
5.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AERAÇÃO.....	58
<b>5.4 EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO</b> .....	64
<b>5.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA (METAGENÔMICA)</b> .....	73
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	85
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	87
APÊNDICE .....	100

## 1. INTRODUÇÃO:

A vasta comunidade microbiana existente no planeta tem um grande impacto na manutenção das características ambientais, tanto através da sua participação em ciclos biogeoquímicos (ciclo do carbono, ciclo do nitrogênio, por exemplo) pela reciclagem de produtos de origem antrópica bem como da própria natureza, através dos processos de biotransformação e biodegradação. Além disso, muitos microrganismos são benéficos para a saúde humana (através da microbiota intestinal, participando de diferentes processos como digestão e absorção), para a indústria (farmacêutica, para a produção de medicamentos, e alimentícia para produtos probióticos) e para a produção agrícola (através do controle de pragas mediado por uma proteína específica de *Bacillus thuringiensis*, por exemplo (ENDO e NISHIITSUTSUJI-UWO, 1980; FIUZA *et al.*, 1996). Isso se deve às características fisiológicas intrínsecas dos microrganismos ou por poderem ser manipulados de diferentes formas, facilitando sua aplicação e obtenção de muitos produtos de interesse biotecnológico.

Não obstante, o mundo microbiano pode ocasionar danos para muitos seres vivos, inclusive para o homem, devido a infecções, intoxicações e toxinfecções, que podem levar o indivíduo à morte (APHA, 2000). Dentre tais efeitos nocivos inclui-se a produção de toxinas por microalgas que pode ocasionar impacto ambiental desestruturando ecossistemas, com implicações para a saúde pública.

Em relação às microalgas, as cianobactérias são os principais microrganismos responsáveis pela produção e liberação de diversas toxinas em ambientes aquáticos. Essa produção pode ser potencializada e intensificada devido ao crescimento celular exarcebado em ambientes aquáticos. Tal fenômeno, conhecido como floração (*'bloom'*), é favorecido pelo processo de eutrofização (YOO *et al.*, 1995; PAERL e OTTEN, 2013), que consiste num aumento da concentração de nutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) em um nível que excede a capacidade de assimilação do sistema em determinado corpo d'água (REYNOLDS, 1987; 2006). A eutrofização pode ser de ocorrência natural, em sucessão temporal de acordo com diferentes aspectos ambientais ou de origem antrópica, fato que vem aumentando ao longo dos últimos anos devido à urbanização acelerada, o que acarreta na intensa liberação de efluentes diretamente nos ambientes aquáticos (sem prévio tratamento). Tais efluentes, muitas vezes tóxicos para certos organismos, podem ser

de origem doméstica, industrial ou agrícola, e podem conter fertilizantes e produtos químicos em geral, elevando o aporte de nutrientes na água.

Diferentes ambientes aquáticos, desde o marinho até os de água doce, podem sofrer influências do fenômeno de floração, ocasionando consequências danosas aos organismos aquáticos, devido ao aumento da concentração de células de cianobactérias e a decomposição do fitoplâncton por bactérias heterotróficas, resultando em uma consequente diminuição do teor de oxigênio dissolvido no ambiente (PAERL e OTTEN, 2013). Além disso, o aumento da turbidez e a diminuição da transparência da água podem prejudicar o desenvolvimento de macrófitas, gerando uma interferência direta na cadeia alimentar com possível diminuição da diversidade ecológica (PAERL, 2008).

A presença de cianotoxinas (como são conhecidas as toxinas sintetizadas por cianobactérias) é a principal preocupação relacionada ao aparecimento de florações nos ambientes aquáticos. Não se sabe ao certo a função biológica dessas moléculas para os organismos produtores. Entretanto, quando em contato direto com mamíferos através da inalação, ingestão, contato dérmico e consequente absorção, possuem ações específicas em tecidos alvos ocasionando diferentes problemas, desde irritações cutâneas até graves inflamações causadas por exposições agudas ou crônicas e, dependendo da dose e via de exposição, podem levar ao óbito inclusive o ser humano (CARMICHAEL, 1992 e 1994; JOCHIMSEN *et al.*, 1998; RAO *et al.*, 2002; BECKER *et al.*, 2008).

Além do processo de eutrofização favorecer as florações e dominância de cianobactérias, com consequente produção de cianotoxinas, uma outra vertente chama a atenção como potencial agravante para este fenômeno, que são as mudanças climáticas globais previstas para ocorrer ao longo do século XXI, de acordo com o Painel Climático Intergovernamental (IPCC: “*Intergovernmental Panel on Climate Change*”). Os últimos relatórios acerca desse cenário apontam que inúmeras mudanças, como aumento de temperatura atmosférica com consequente aumento da temperatura dos oceanos, além da acidificação de corpos d’água, ocorrerão devido à intensa liberação de gases do efeito estufa, como por exemplo o gás carbônico (CO<sub>2</sub>), que deve ultrapassar valores de 400 ppm na atmosfera (IPCC, 2014). Sabendo-se que as cianobactérias são seres primitivos que sobreviveram e se adaptaram a mudanças de escala geológica onde os limites de CO<sub>2</sub> eram cerca de 10 vezes maiores que os valores atuais e, as condições climáticas sofreram intensas variações no decorrer das eras (BLANK e SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010), estima-se

que esses microrganismos não sofrerão diminuição da viabilidade com tais cenários e panoramas. Porém, não se sabe a influência que certos fatores ambientais poderão ter em relação à dinâmica das cianotoxinas no ambiente.

Nas últimas décadas houve um aumento progressivo nos registros de florações de cianobactérias no Brasil e no mundo, tanto pelas cepas tóxicas como pelas não tóxicas. Florações já foram encontradas em regiões consideradas inóspitas como a Antártica, demonstrando a enorme versatilidade adaptativa desses microrganismos (HITZFELD *et al.*, 2000; PAERL e OTTEN, 2013). Na cidade do Rio de Janeiro, florações de cianobactérias ocorrem no complexo lagunar de Jacarepaguá, altamente poluído e eutrofizado, que abrange as lagoas de Jacarepaguá, Camorim, Tijuca e Marapendi. Desde 1996 as ocorrências vêm sendo estudadas pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC da Universidade Federal do Rio de Janeiro), evidenciando a presença majoritária de microcistinas nesse ambiente (MAGALHÃES e AZEVEDO, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2001; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2009). Inclusive tais fenômenos já foram, e ainda são, noticiados por reportagens feitas pela mídia jornalística (**Figura 1**).

Dentre as cianotoxinas, as microcistinas (MCs) são as principais reportadas em florações tóxicas (WHO, 2003; O'NEIL *et al.*, 2012; DITTMAN *et al.*, 2013). São objetos de estudos em muitos países, com objetivos distintos seja em relação à caracterização da molécula, ao seu modo de ação ou sua dinâmica no ambiente aquático. Muitos trabalhos já evidenciaram o processo de bioacumulação das MCs em diferentes organismos (WILLIAMS *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2001 e 2003), o processo de adsorção às partículas de sedimento (MORRIS *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2008, WU *et al.*, 2011; WÖRMER *et al.*, 2011), além do processo de biodegradação por microrganismos presentes no próprio ambiente, na interface sedimento/água (JONES *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2008; NYBOM *et al.*, 2012; MOU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016).



## Algas tingem lagoas da Barra

Cianobactérias se multiplicam com o calor e o esgoto lançado sem tratamento nas águas

DIEGO VALDEVINO

Rio - A 587 dias do início dos Jogos Olímpicos do Rio, as lagoas localizadas na Bacia Hidrográfica da Baixada de Jacarepaguá, que margeiam o Parque Olímpico e da Vila dos Atletas, continuam agonizando com a poluição. Agora elas estão repletas de cianobactérias — microalgas — da espécie *Microcystis aeruginosa*, que são tóxicas. As águas do complexo lagunar na região ficaram tingidas de verde, por causa do micro-organismo, num cenário desolador.

Levada pela corrente, a mancha verde avança pelo Quebra-mar e está chegando à Praia da Barra. “A situação se repete todo ano, principalmente no verão. As altas temperaturas favorecem a proliferação destas microalgas, no esgoto in natura que escorre para o sistema lagunar da Barra. Mas a situação piorou este ano”, comentou o biólogo Mário Moscatelli.



Reportagem: Diego Valdevino - Jornal O Dia - Foto: Mário Moscatelli

**Figura 1:** Reportagem do jornal “O Dia” destacando a ocorrência de uma floração de cianobactérias na lagoa de Jacarepaguá (RJ) (por Diego Valdevino, 2014).

### 1.1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são microrganismos procariotos fotossintetizantes, com ampla diversidade genotípica e fenotípica que lhes confere grande plasticidade adaptativa, podendo estar presentes em diferentes ambientes, principalmente os aquáticos (marinhos, estuarinos e de água doce) e até mesmo os terrestres, como solos por exemplo, onde desempenham funções importantes relacionadas à ciclagem de nutrientes e a manutenção do ecossistema (AZEVEDO, 1998).

O crescimento exacerbado de cianobactérias gerando as características florações em diferentes ambientes ao redor do mundo pode ser explicado por muitos fatores, sendo um deles a capacidade de tolerar variações ambientais. Estima-se que esses microrganismos estão na Terra há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, a partir de evidências fósseis (SCHOPF e WALTER, 1982; SCHOPF, 2000), e que tenham sido os responsáveis pela liberação de oxigênio na atmosfera a partir de seu metabolismo fotoautotrófico associado aos fotossistemas do tipo I e II (CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989; CARMICHAEL, 1994), além de muitas espécies possuírem a capacidade de fixar nitrogênio em larga escala (CAREY *et al.*, 2012).

Estruturalmente, as cianobactérias apresentam diferentes características adaptativas que garantem sua sobrevivência e vantagem sobre outros organismos no meio ambiente (YOO *et al.*, 1995). Possuem membranas lipoprotéicas no citoplasma, chamadas de tilacóides, onde se situam diferentes pigmentos fotossintetizantes como a clorofila (tipos *-a* e *-b*) e os carotenóides, além de diferentes pigmentos acessórios como ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina, que conferem um espectro de coloração que varia entre o azul-verde e que caracteriza o termo “cianobactéria”. Em algumas espécies há células diferenciadas como os heterocitos, que têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) e os acinetos, especializados no acúmulo de substâncias de reserva metabólica (“amido cianobacteriano”) que permitem a sobrevivência em condições desfavoráveis, inclusive na ausência de luz. Além disso, possuem estruturas especializadas, os aerótopos (vacúolos gasosos presentes no conteúdo citoplasmático) que permitem a flutuabilidade pela zona fótica da coluna d’água para otimizar a fotossíntese (WALSBY, 1994; PADISÁK, 2004). Apresentam estruturas externas à parede celular que recobrem totalmente ou parcialmente o microrganismo, feitas de polissacarídeos secretados, caracterizando uma mucilagem associada fracamente às células através de uma bainha fibrosa que adere fortemente às células entre si sob formatos de colônia ou filamentos, protegendo-as contra a dessecação e ação de antibacterianos (DREWS & WECKESSER, 1982; HOICZYK, 1998; WHITTON e POTTS, 2000).

Morfologicamente, as cianobactérias são um grupo bastante diverso e apresentam-se em diferentes estruturas desde unicelular até a forma colonial e multicelular filamentosa. Embora não formem estruturas de locomoção como os flagelos, algumas espécies têm a capacidade de movimentar-se através de um deslizamento proporcionado pela liberação de mucilagem, ou pela ação de composições especiais, como pili tipo 4 e algumas semelhantes a cílios (MAGAR & PEDLEY, 2005).

A classificação taxonômica destes microrganismos está em constante aprimoramento e modificação. Atualmente, *Cyanobacteria* é considerado um filo dentro do domínio Bacteria (CASTENHOLZ, 2001). Na **Tabela 1** está representada a classificação das cianobactérias segundo o Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica (adaptado de MARQUES, 2006).

**Tabela 1:** Classificação taxonômica do filo *Cyanobacteria*.

	<b>ORDEM</b>	<b>GÊNEROS</b>
Subseção I	<i>Chroococcales</i>	<i>Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeotheca, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis</i>
Subseção II	<i>Pleurocapsales</i>	
	<i>Subgrupo I</i>	<i>Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus</i>
	<i>Subgrupo II</i>	<i>Chroococciopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa, Hyella, Sorentia</i>
Subseção III	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Leptolyngbya, Microcoleus, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudoanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i>
Subseção IV	<i>Nostocales</i>	
	<i>Subgrupo I</i>	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cyndrospermopsis, Nodularia, Nostoc, Scytonema</i>
	<i>Subgrupo II</i>	<i>Calothrix, Rivularia, Tolypothrix</i>
Subseção V	<i>Stigonematales</i>	<i>Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Lyngariella</i>

Como citado anteriormente, um grave problema ambiental e de saúde pública associado às cianobactérias é o crescimento intenso, conhecido como florações, documentadas de forma crescente no mundo. Um aspecto importante em relação a este fenômeno é a decomposição das

células por bactérias heterotróficas, resultando na depleção de oxigênio do meio aquático com consequente impacto no ecossistema, acarretando por exemplo na mortandade de peixes (PAERL e OTTEN, 2013).

Porém o principal aspecto ameaçador em relação as florações se dá por conta da presença de cepas tóxicas, produtoras de toxinas danosas a mamíferos e diferentes organismos, que podem atravessar cadeias alimentares e chegar até o homem. Tal fato representa um sério problema de saúde pública quando se trata de sistemas de abastecimento público (CHORUS e BARTRAM, 1999). Os principais gêneros de cianobactérias causadores de florações tóxicas que habitam diferentes ambientes ao redor do mundo são: *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix* e *Aphanizomenon* (PAERL, 2008). No Brasil destaca-se a presença constante de cepas tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborski* e *Microcystis aeruginosa* em regiões tropicais e subtropicais, sendo a microcistina (produzida por cepas de *Microcystis sp.*) a toxina mais frequentemente encontrada (SANT'ANNA *et al.*, 2008; DORR *et al.*, 2010).

## 1.2 CIANOTOXINAS

As cianotoxinas produzidas por cepas tóxicas de cianobactérias são metabólitos secundários, não sendo essenciais à sobrevivência dos microrganismos produtores, e que não se tem conhecimento ao certo sobre o motivo de sua produção e/ou função biológica para os mesmos (CHORUS e BARTRAM, 1999). Especula-se que estas funcionem em alguns casos como um mecanismo de defesa frente a organismos predatórios (anti-herbivoria), confirmam vantagem competitiva por interferir com o metabolismo de outras espécies (alelopatia), funcionem como moléculas do tipo sideróforo (captação de nutrientes) e compostos do *quorum sensing* (sinalização química), além de atuar na proteção da célula produtora contra a fotoxidação (metabolismo de estresse) (UTKILEN e GJOLME, 1995; SEDMARK e ELERSEK., 2005; LEFLAIVE e TENHAGE, 2007; FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI., 2011; PHELAN e DOWNING., 2011).

Muitas florações produzem diferentes tipos de toxinas que são consideradas endotoxinas, pelo fato de serem pouco secretadas pelas células em sua maioria. Estas toxinas podem ser classificadas em relação ao sítio de toxicidade em mamíferos, como: neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatototoxinas (CODD, 1984; PILOTTO *et al.*, 2004). Além disso, essas substâncias tóxicas

podem ser classificadas também quanto a sua estrutura molecular em peptídeos cíclicos, alcaloides ou lipopolissacarídeos (LPS). Cianotoxinas podem ser produzidas por certas linhagens de diferentes gêneros de cianobactérias (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Classificação das cianotoxinas quanto à estrutura molecular, alvo em mamíferos e gêneros produtores. (Fonte: modificado de CHORUS e BARTRAM, 1999).

<b>GRUPO DA TOXINA</b>	<b>AÇÃO EM MAMÍFEROS</b>	<b>GÊNEROS DE CIANOACTÉRIAS</b>
<b>PEPTÍDEO CÍCLICO</b>		
Microcistinas	Fígado (tropismo clássico), além de outros órgãos como rim, pulmão e coração	<i>Dolichospermum (Anabaena), Anabaenopsis, Aphanocapsa, Arthrospira, Hapalosiphon, Microcystis, Nostoc, Planktothrix, Radiocystis, Snowella, Woronichinia</i>
Nodularina	Fígado	<i>Nodularia</i>
<b>ALCALÓIDES</b>		
Anatoxina-a Homoanatoxina-a	Nervo Simpático	<i>Dolichospermum (Anabaena), Aphanizomenon, Arthrospira, Cylindrospermum, Microcystis, Planktothrix, Phormidium, Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a(S)	Nervo Simpático	<i>Dolichospermum (Anabaena)</i>
Aplisiotoxina Debromoaplisiotoxina	Pele, trato gastrointestinal	<i>Planktothrix, Lyngbya, Schizothrix</i>
Cilindrospermopsina	Órgãos múltiplos (fígado, rim, baço, trato gastrointestinal, coração, pele, timo)	<i>Dolichospermum (Anabaena), Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Raphidiopsis, Umezakia</i>
Saxitoxina	Nervo axônico	<i>Dolichospermum (Anabaena), Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Lyngbya, Planktothrix</i>
<b>LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)</b>	Irritante, afetando diferentes tecidos expostos	Todos citados

As toxinas mais frequentemente encontradas nas florações de cianobactérias são as da família dos peptídeos cíclicos, como as microcistinas (MCs) e nodularinas (ambas hepatotoxinas) (CHORUS e BARTRAM, 1999; O'NEIL *et al.*, 2012; DITTMAN *et al.*, 2012). Por conseguinte, as MCs estão presentes na maioria dos casos de florações pelo Brasil e pelo mundo. Assim, esta toxina tornou-se objeto de estudos em muitos países, com objetivos distintos tanto para um melhor conhecimento e caracterização da molécula, como para seu modo de ação em outros organismos e para a remoção em ambientes contaminados, que implicam num grande perigo para os seres vivos de um modo geral.

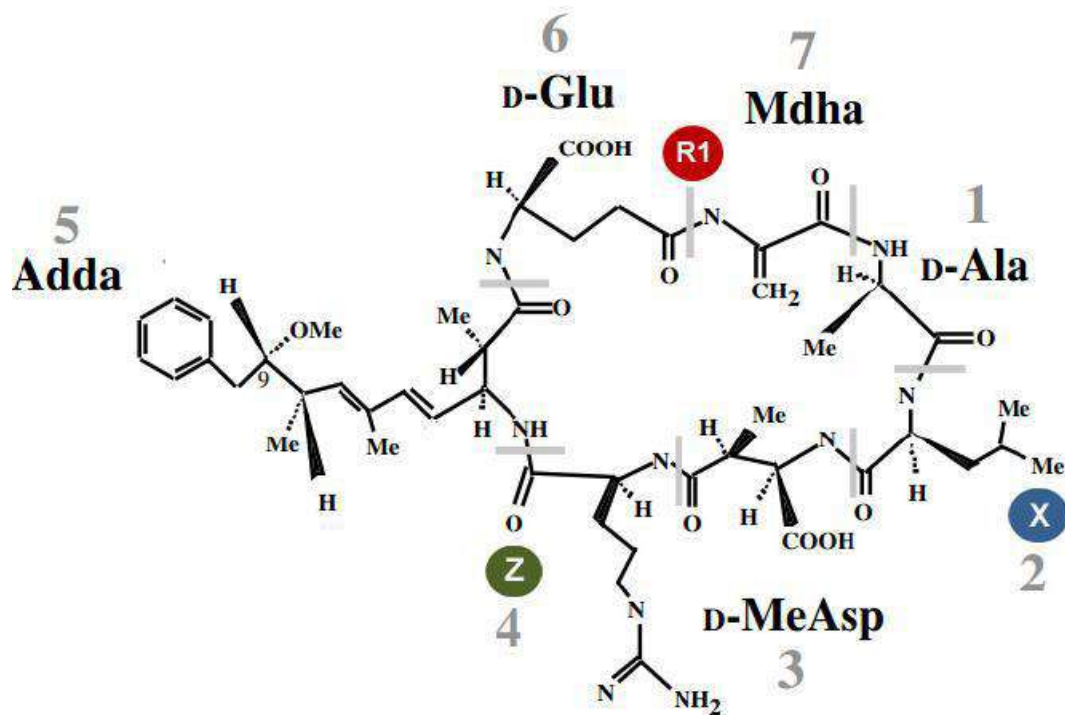
### 1.3 MICROCISTINAS (MCs)

As microcistinas são estruturalmente peptídeos cíclicos compostos por sete aminoácidos. São produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias como, por exemplo, *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) e *Nostoc* (**Tabela 2**) (CHORUS e BARTRAM, 1999; DITTMAN *et al.*, 2013).

A estrutura química geral dessa toxina (**Figura 2**) consiste em um heptapeptídeo cíclico (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-DGlu-Mdha) com aminoácidos específicos (**D-MeAsp**: D-metilaspargina, **ADDA**: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico e **Mdha**: N-metildehidroalanina) e dois L-aminoácidos variáveis nas posições X e Y. Além da diversidade de L-aminoácidos nas posições variáveis outras variações foram reportadas nos aminoácidos restantes, como desmetilação dos componentes das posições 3 e 7, por exemplo. Tais modificações geram os mais de 90 tipos de variantes dessa molécula já reportados (BOTES *et al.*, 1984; DAWSON *et al.*, 1998; CHORUS e BARTRAM, 1999; TILLET *et al.*, 2000; DIETRICH e HOEGER, 2005; WELKER *et al.*, 2008; DITTMAN *et al.*, 2013).

São moléculas com baixa estabilidade em ambientes naturais com histórico de florações de cianobactérias, principalmente devido a biodegradação por microrganismos (RAPALA *et al.*, 1994; MOU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014), podem sofrer o processo de fotodegradação (WHO, 1999) e ter a desestruturação molecular aumentada devido a presença de pigmentos fotossintéticos que acarretam na isomerização de uma dupla ligação na cadeia do aminoácido específico ADDA (TSUJI *et al.*, 1994). Em contrapartida são resistentes a oxidação química em diferentes valores de pH na faixa de 1 a 9, com um potencial de degradação lenta ao longo do tempo em uma temperatura na faixa de 40 °C para os valores de pH abaixo de 1 e acima de 9 (HARADA *et al.*, 1996b; RAO

*et al.*, 2002). Além disso resistem a elevadas temperaturas e até mesmo ao processo de fervura da água, sugerindo assim que o cozimento de animais aquáticos para consumo não é capaz de remover a toxina bioacumulada nos mesmos (ZHANG *et al.*, 2010a).



**Figura 2:** Estrutura molecular geral das MCs. Consiste num heptapeptídeo cíclico, com 5 aminoácidos “constantes” e específicos (números: 1, 3, 5, 6 e 7) e 2 L-aminoácidos variáveis (números 2 e 4, X e Z respectivamente). Diferentes modificações estruturais tanto nas posições X e Y, a partir da incorporação de diferentes L-aminoácidos, como no radical R1 e no restante da cadeia (a partir de metilações, por exemplo) caracterizam as variantes das toxinas. Fonte: CHORUS e BARTRAM, 1999.

As MCs são moléculas anfipáticas contendo grupamentos polares e apolares, tornando-as solúveis em água em uma concentração de 1 g L<sup>-1</sup> (RIVASSEAU *et al.*, 1998). Além disso, alguns estudos já mostraram que o aminoácido ADDA é crucial para interação com seu alvo biológico em mamíferos, no caso as proteínas fosfatases do tipo 1 e 2A, sendo bastante importante para sua toxicidade (BARFORD e KELLER, 1994; GOLDBERG *et al.*, 1995).

A microcistina LR (MC-LR) é a variante mais frequentemente reportada em florações de cianobactérias em diversos corpos d’água pelo mundo (UENO *et al.*, 1996), sendo caracterizada

pela presença dos L-aminoácidos leucina (L) e arginina (R), respectivamente nas posições X e Z de acordo com a **Figura 2**. Há muitos anos esta variante vem sendo associada a diversos casos de intoxicação (CARMICHAEL, 1992; FAWELL *et al.*, 1999).

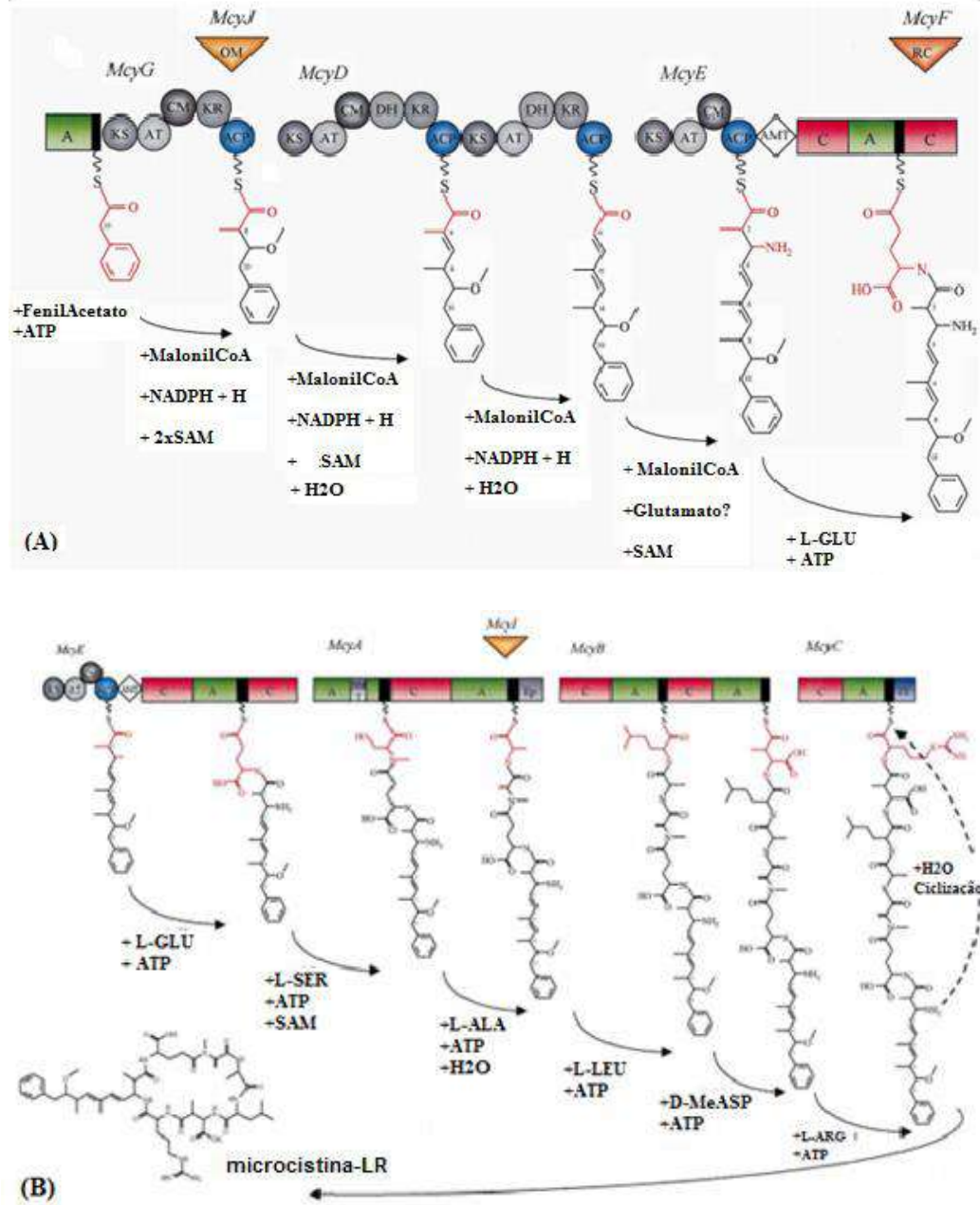
### 1.3.1 SÍNTESE DA MICROCISTINA

As MCs são sintetizadas pela célula por um conjunto de enzimas que fazem parte de um sistema híbrido - peptídeo sintetase não ribossomal/policetídeo sintase (NRPS/PKS) (MOORE *et al.*, 1991; DITTMANN *et al.*, 2013). Essas enzimas formam um complexo multifuncional (não ribossomal) organizado em grupos coordenados de sítios enzimáticos chamados de módulos, sendo cada módulo responsável por um ciclo de elongação de policetídeos ou polipeptídeos, que juntos determinarão a estrutura do produto (MARAHIEL *et al.*, 1997; CANE *et al.*, 1998; VON DÖHREN *et al.*, 1999).

Como originalmente descrito por Tillett e colaboradores (2000), em uma cepa de *Microcystis aeruginosa*, um cluster gênico de 55 kb formado por 10 ORFs (“*Open Reading Frame*” – regiões de DNA codificante) denominadas *mcyA, B, C, D, E, F, G, H, I e J*, dá origem às enzimas de síntese de MCs. Foi observado que qualquer disfunção ou rompimento gênico dentro do conjunto *mcy* inativa a produção de MCs. A transcrição do cluster de genes *mcy* ocorre na forma de dois operons denominados *mcyA-C* e *mcyD-J*, através de um promotor central bidirecional entre os genes *mcyA* e *mcyD* (KAEBERNICK, 2002).

A **Figura 3** mostra um modelo para a síntese de MC-LR incluindo as etapas e enzimas envolvidas na montagem da toxina e os consequentes produtos intermediários formados que são utilizados na montagem do peptídeo final. As enzimas *McyG, D e E* são as principais responsáveis pela formação do grupamento ADDA-D-ácido glutâmico, e as enzimas *McyA, B e C* estão envolvidas na incorporação dos outros aminoácidos. *McyF* codificaria uma enzima racemase envolvida na formação de D-glutamato (NISHIZAWA, ASAYAMA e SHIRAI, 2001). Além disso, *McyH* seria um transportador do tipo ABC envolvido no transporte da toxina para o meio extracelular. *McyI* apresenta similaridade a D-3-fosfoglicerato desidrogenase, e *McyJ* faria a metilação do precursor do ADDA (TILLET *et al.*, 2000; DITTMANN *et al.*, 2013).





**Figura 3:** Sequência da síntese de MC-LR com a participação de enzimas específicas (em formato de círculo, losango e retângulo). Em (a) verifica-se a formação da ‘primeira porção’ da toxina, o aminoácido incomum ADDA-D-ácido glutâmico. Em (b) verifica-se a incorporação do restante dos aminoácidos e consequente elongação da estrutura molecular para a formação da MC-LR. Legenda: KS -  $\beta$  ketoacil sintase; AT - acetiltransferase; ACP - proteína transportadora de acil; KR - ketoacil redutase; DH-Dehidratase; CM - C-metiltransferase; OM - O-metiltransferase; A - adenilação aminoacil; C - condensação; NM - N-metiltransferase; AMT - aminotransferase; RC - racemase; O motivo de metilação do NRPS é mostrado em preto (adaptado de TILLET *et al.*, 2000).

### 1.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITOS EM MAMÍFEROS

Existem hoje diferentes mecanismos de ação elucidados para as MCs em mamíferos, seja através de uma exposição de forma aguda ou de forma crônica, geralmente relacionados a dosagens letais ou sub-letais.

As MCs são potentes hepatotoxinas sendo o fígado, inicialmente, o órgão mais sensível. Tal fato ocorre, pois, a toxina entra na célula hepática via um sistema de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP – “*Organic anion transporting polypeptides*”) que são expressos em diversas células de diferentes tecidos do organismo humano e de mamíferos em geral (RUNNEGAR *et al.*, 1995a; FISCHER *et al.*, 2005; BOARU *et al.*, 2006). Alguns estudos *in vitro* mostraram que proteínas transportadoras específicas como OATP1B1, OATP1B3 e OATP1A2 são necessárias para a entrada da toxina nas células (FISCHER *et al.*, 2005; EVERS e CHU, 2008)

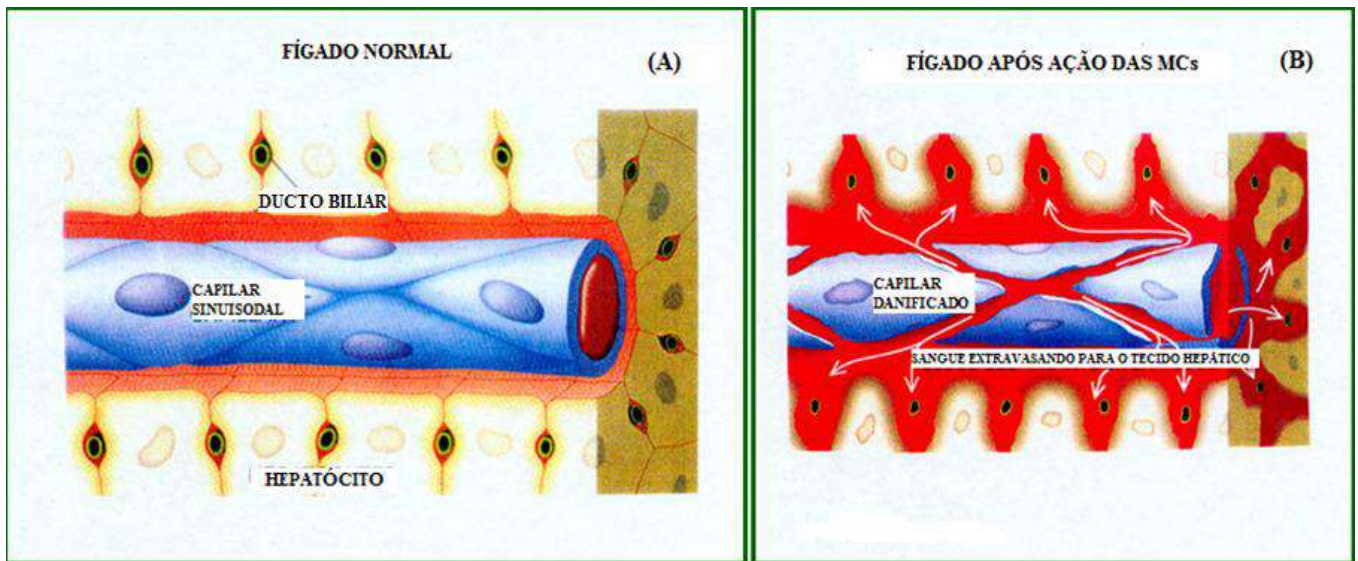
O que caracteriza a ação biomolecular em mamíferos relacionada ao clássico efeito hepatotóxico é o tropismo hepático da toxina e a inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A através da ligação da MC a resíduos de serina/treonina nestas enzimas (YOSHIZAWA *et al.*, 1990). A partir disso ocorre a hiperfosforilação de alvos subcelulares, como proteínas específicas e associadas ao citoesqueleto, ocasionando a desestruturação do mesmo, com perda do formato celular original e de sua estrutura parenquimal (ERIKSSON *et al.*, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1991, 1992; FALCONER e YEUNG 1992).

Além disso, outro efeito da toxina é aumentar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) com conseqüente estresse oxidativo (DING *et al.*, 1998), podendo ser observada peroxidação lipídica, por exemplo (FALCONER e HUMPAGE, 1995; ANDRINOLO *et al.*, 2008; SEDAN *et al.*, 2010). Alguns estudos já evidenciaram que algumas EROs, geradas a partir da exposição a MC-LR, podem inibir enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e catalase (DAWSON, 1998; CHORUS e BARTRAM 1999; DING *et al.*, 2001; VAN APELDOORN *et al.*, 2007).

Assim como intoxicações em geral, os efeitos da exposição a MC-LR podem variar de acordo com a dose, a via de exposição e o organismo submetido a tal condição, seja experimental ou acidental.

Em relação à intoxicação aguda (exposição única a dosagem elevada) e letal (testada em camundongo e já observada em humanos) o principal efeito é uma intensa hemorragia intra-

hepática com conseqüente necrose tecidual e falência do órgão, contribuindo para um choque hipovolêmico levando o indivíduo à morte (CARMICHAEL, 1994; CARMICHAEL *et al.*, 1997; ITO *et al.*, 1997). A **Figura 4** mostra a representação de um capilar sinusoidal de um hepatócito antes e após a exposição à MC, com extravasamento sanguíneo e conseqüente hipovolemia.



**Figura 4:** Esquema representa um capilar sinusoidal de um hepatócito normal (A) e após exposição à MCs (B), demonstrando o extravasamento sanguíneo com conseqüente hipovolemia (adaptado de Carmichael, 1994)

Já em relação à intoxicação crônica (exposições contínuas com baixas doses), considerada subletal, diversos estudos relataram uma grande variedade de danos hepáticos, como perda da vacuolização citosólica, necrose celular, fibrose, apoptose e promoção de tumores (ITO *et al.*, 1997; GUZMAN e SOLTER, 1999; ANDRINOLO *et al.*, 2008). Com isso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC – “*International Agency for Research on Cancer*”) avaliou a MC classificando-a como potencial carcinógeno humano (LANKOFF e CARMICHAEL, 2006).

Apesar de ser considerada inicialmente uma hepatotóxina, MC-LR já foi apontada como causadora de diferentes alterações em outros órgãos, por exemplo, apoptose de células do trato gastrointestinal (MORENO *et al.*, 2003; BOTHA *et al.*, 2004), onde a atividade apoptótica é intensificada pela expressão de proteínas Bax e Bid após exposição à toxina (ZEGURA *et al.*, 2004, CHEN *et al.*, 2005; WENG *et al.*, 2007). A função renal é afetada, possivelmente a partir de lesões glomerulares (NOBRE *et al.*, 2001) e por diferentes alterações bioquímicas, histológicas e

fisiológicas (LOWE *et al.*, 2012). Alguns estudos já evidenciaram também diferentes alterações no pulmão dependendo da via de exposição, seja intraperitoneal (como feito nas pesquisas citadas acima) ou nasal (FALCONER *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2007).

Diversos casos de intoxicação animal já foram relatados ao redor do mundo após a utilização da água para consumo (CHORUS e BARTRAM, 1999). Porém, nunca houve confirmação de óbitos de humanos a partir da ingestão de água contaminada devido à dificuldade da obtenção de dados e associação da sintomatologia com a toxina específica. No entanto, existem outras vias de exposição às cianotoxinas que podem levar à letalidade (AZEVEDO *et al.*, 2002). O caso de intoxicação de humanos mais conhecido ocorreu na cidade de Caruaru (PE) no ano de 1996, onde diversos pacientes em tratamento de hemodiálise apresentaram distúrbios visuais, náuseas, vômitos e fraqueza muscular após as sessões da terapia. Consequentemente, cerca de 50 deles foram a óbito com insuficiência hepática aguda, sendo associada à presença não só de MC-LR, mas também das variantes –YR (tirosina-arginina) e –AR (alanina-arginina), que foram encontradas na água e nos sistemas de tratamento da mesma, bem como no tecido hepático e no soro dos pacientes. Além disso, também foi detectada a presença de cilindrospermopsina (uma outra cianotoxina) no carvão e na resina do sistema de tratamento de água interno da clínica, porém de acordo com os sintomas dos pacientes e com estudos patológicos em animais com estas duas toxinas, concluiu-se que a MC foi a responsável pela morte dos indivíduos a partir da exposição intravenosa (JOACHIMSEN *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002).

### 1.3.3 LEGISLAÇÃO E LIMITES TOXICOLÓGICOS

Há mais de duas décadas a preocupação frente à exposição as MCs vem crescendo de forma global. Tal fato se reflete em uma legislação específica visando o controle da qualidade da água quanto a diferentes moléculas prejudiciais ao homem, inclusive outras cianotoxinas. O Brasil foi o primeiro país a formular uma portaria dedicada no Ministério da Saúde, a portaria nº 1.469 de 29 de dezembro de 2000 (BRASIL, 2000), atual 2914/2011, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, padrão de potabilidade, entre outros. Tal portaria estabeleceu o mesmo valor de referência de concentração de MC-LR e equivalentes em água de abastecimento proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  a partir de um TDI (“*Tolerable Daily Intake*”), que se refere

ao limite aceitável para uma substância ingerida por dia, de  $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$  de massa corpórea. Esse valor foi estipulado a partir de um NOAEL (“*No observed adverse effect level*”) que avalia a dose máxima que não ocasiona efeitos adversos, no caso de  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ , observado em camundongos (FAWELL *et al.*, 1999; CHORUS e BARTRAM, 1999).

Atualmente, vigora a portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2012), referente a normatização da qualidade da água para consumo humano. Esta portaria recomenda, além da análise de MCs, a análise da ciantotoxina neurotóxica saxitoxina (STX), quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células por mL, com um limite máximo permitido de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (somatório de variantes de MCs encontradas) e  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (equivalentes de STX), respectivamente. Além disso, caso seja detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de cilindrospermopsina no ponto de captação de água para monitoramento, a mesma deve ser analisada com um limite máximo permitido de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os limites toxicológicos podem assumir diferentes valores em ensaios de ecotoxicidade, de acordo com a espécie analisada, a dose e a via administrada. Sedan e colaboradores (2015) verificaram em camundongos *Swiss* alguns efeitos adversos não só em células do fígado, mas também em células do intestino, com doses contínuas e intermitentes de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , através de uma exposição oral prolongada no período de 1 mês o que corresponderia supostamente a  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  em 1 dia. Isso representa um valor menor do que Fawell e colaboradores (1999) apresentaram para o NOAEL, de  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  em relação a danos hepáticos, que está em vigor e é aceito para legislação até hoje, derivado da exposição oral realizada em camundongos.

Em relação a estudos de toxicidade aguda, a DL50 (dose na qual 50% dos indivíduos expostos vão a óbito) varia de 40 a  $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$  em diferentes estudos (**Tabela 3**). Essa diferença pode ser explicada pelas diferentes vias de administração e a espécie animal utilizada. Segundo Fawell e colaboradores (1999), a administração por via oral de MC-LR apresenta uma toxicidade de 30 até 100 vezes menor do que a administração por via intraperitoneal. Na pesquisa citada, a DL50 ficou entre 50 a  $158 \mu\text{g kg}^{-1}$  para uma determinada espécie de camundongos (CD-1(ICR)BR-VAF/PLUS) injetada intraperitonealmente, e cerca de  $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$  através da ingestão oral. Já Guzman e Solter (1999) evidenciaram quadros de necrose hepática a partir de uma infusão intraperitoneal com doses de 32 e  $48 \mu\text{g kg}^{-1}$  por dia (LOAEL– ‘*Low observed adverse effect level*’), ou seja, a menor concentração que causa um efeito adverso, de  $32 \mu\text{g kg}^{-1}$ , sendo que uma dose de  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$  por dia não apresentou efeitos adversos.

A susceptibilidade das diferentes espécies testadas em uma abordagem toxicológica é algo extremamente importante para definir o modelo animal que será utilizado. Além disso, outro fator importante é a idade do indivíduo que pode influenciar na curva dose-resposta, uma vez que animais mais velhos apresentam uma maior sensibilidade a MC-LR, possivelmente devido a menor capacidade de detoxificação (ITO *et al.*, 1997a; RAO *et al.*, 2005; DIAS, 2009) dificultando a eliminação da molécula.

**Tabela 3:** Valores de DL50 da MC-LR em camundongos de diferentes pesquisas de acordo com a via de exposição (modificado de DIAS, 2009).

VIAS DE EXPOSIÇÃO	LD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	REFERÊNCIA
Oral	5000	Yoshida <i>et al.</i> (1997)
Intraperitoneal (i.p)	50 (Valor aceito para LD <sub>50</sub> , i.p, em camundongos)	Chen <i>et al.</i> (2006)
	43	Gupta <i>et al.</i> (2003)
	65	Yoshida <i>et al.</i> (1997)
	65	Robinson <i>et al.</i> (1989)
Intratraqueal	100	Ito <i>et al.</i> (2001)

#### 1.3.4 BIODISPONIBILIDADE NO AMBIENTE:

Alguns fatores físicos, químicos e biológicos estão envolvidos no destino das MCs nos ambientes aquáticos, definindo uma relação de persistência, degradação e transporte ao longo de diferentes ambientes e cadeias tróficas. A princípio, tal dinâmica e a quantidade de MC dependem da densidade populacional de seus produtores. Porém, é bastante difícil observar esta toxina dissolvida na coluna d'água, já que a maior parte acumula-se em organismos ou acaba se adsorvendo a partículas sólidas em suspensão de diferentes origens e se depositando no fundo (sedimentação) (MORRIS *et al.*, 2000; WÖRMER *et al.*, 2011). Por fim, MCs também podem ser alvo de biodegradação por bactérias do sedimento e da água (CHEN *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016). Como essas moléculas são estáveis e bastante resistentes a alguns fatores

físico-químicos como temperatura, pH e algumas proteases comuns (CHEN *et al.*, 2008; DZIGA *et al.*, 2013), apresentam diferentes destinos em relação a sua dinâmica ambiental.

As MCs podem ser bioacumuladas em vertebrados e invertebrados aquáticos, como citado anteriormente. Diversos estudos têm evidenciado bioacumulação em diferentes órgãos desses organismos, como por exemplo, no tecido muscular de peixes (MAGALHÃES *et al.*, 2001 e 2003; XIE *et al.*, 2005; ZIMBA *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2008), que servem como fonte de alimento a humanos, ou no fígado e hepatopâncreas de crustáceos (WILLIAMS *et al.*, 1997). Tais organismos aquáticos capazes de acumular não só MCs, mas outras cianotoxinas, se mostram mais tolerantes a essas substâncias que podem ser bioacumuladas ao longo de seus ciclos de vida (ILS, 2000).

Em relação à biodegradação, muitos estudos têm sugerido ao longo dos anos que microrganismos como bactérias (JONES *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1996; SAITO *et al.*, 2003) e fungos (JIA *et al.* 2011) pertencentes ou não ao próprio ambiente aquático (água/sedimento) contaminado por MCs, são capazes de realizar tal função. Rapala e colaboradores (1994) já haviam notado que a diminuição de MCs da coluna d'água era mais elevada em ambientes com histórico de florações tóxicas de cianobactérias, seja pela adsorção ao sedimento ou pela biodegradação através de bactérias. A partir da década de 90, com programas ecológicos de despoluição, muitos estudos surgiram em busca de microrganismos capazes de realizar esse processo de biorremediação. Diferentes gêneros de bactérias pertencentes à família *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas*, *Sphingocinella* e *Sphingopyxis*, por exemplo) foram os primeiros a serem relatados como capazes de promover a degradação de MCs a partir de amostras de água e sedimentos de lagos (JONES *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1996 e 2001; SAITO *et al.*, 2003; OKANO *et al.*, 2009; MOU *et al.*, 2013).

A primeira evidência de biodegradação de MCs foi relatada por Jones *et al.*, (1994) para MC-LR através do isolamento de bactérias do ambiente aquático natural que foram capazes de degradar aproximadamente  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  da toxina em um período de 8 dias. Estudos posteriores classificaram a estirpe isolada como sendo pertencente ao gênero *Sphingomonas* (estirpe ACM 3962) e elucidaram pela primeira vez uma via enzimática de degradação, na qual foram identificadas pelo menos três enzimas intracelulares. Tais enzimas foram responsáveis por quebrar a estrutura completa da MC-LR em um heptapeptídeo linear (quebra da estrutura cíclica), tetrapeptídeo linear e aminoácidos menores, principalmente o ADDA, em uma cadeia sequencial de degradação. Posteriormente,

mostrou-se que tais enzimas eram codificadas por um grupo de genes em um operon conhecidos como *mlr*, sob as formas de *mlrA*, *B*, *C* e *D* (BOURNE *et al.*, 1996 e 2001).

Microrganismos bem diversos já foram apontados como capazes de degradar MCs, desde bactérias encontradas no mar, como *Burkholderia sp.* (LEMES *et al.*, 2008) e bactérias probióticas, como *Lactobacillus rhamnosus* (NYBOM *et al.*, 2012), até fungos, como *Trichapitum abietinum* (JIA *et al.*, 2011).

Em estudos recentes, foi observado uma maior eficiência da biodegradação ao longo do tempo por consórcios microbianos nativos dos ambientes aquáticos que têm histórico de exposições à toxina (MOU *et al.* 2013., SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016) do que pela atividade enzimática de linhagens isoladas. Além disso, foi verificado através da metagenômica os microrganismos de uma comunidade envolvida no processo de biodegradação e foi observado o aumento da quantidade de genes envolvidos no metabolismo e destoxificação de xenobióticos (como os que codificam as enzimas citocromo oxidase P450 e glutathione S transferase) após a exposição dessa comunidade à MC-LR, o que sugere pela primeira vez em procariotos a presença de tais genes com a possível participação dessas enzimas no processo de biotransformação da molécula (MOU *et al.*, 2013).

Os estudos de metagenômica com conseqüente diversidade taxonômica e fisiológica das comunidades microbianas abriram caminho para complementar a relação dos microrganismos e da ecologia do ambiente, adotando uma abordagem independente de cultivo, em contraste com a introduzida historicamente por Anthony Leeuwenhoek, Robert Koch, Louis Pasteur e Alexander Fleming que concentraram esforços em isolar microrganismos patogênicos ou relacionados a determinadas doenças, além dos capazes de sintetizar antimicrobianos, o que permitiu um enorme avanço na medicina. Contudo, embora as promissoras técnicas independentes de cultivo tenham a capacidade de explorar o mundo microbiano de forma nunca pesquisada anteriormente, e estejam em destaque na microbiologia, requerem bastante atenção quanto à interpretação dos resultados gerados pelas etapas de sequenciamento a fim de caracterizar comunidades microbianas, seja quanto à taxonomia ou potencial metabólico, de modo que se obtenha o máximo de informações possíveis.

Em relação à adsorção, a porção hidrofóbica da toxina, o aminoácido ADDA, contribui para uma interação covalente com grupos funcionais de sedimento orgânico, principalmente nas partículas mais finas de argila por exemplo, e também pode estar relacionada à interação



eletrostática (MORRIS *et al.*, 2000; GRÜTZMACHER *et al.*, 2010; KLITZKE *et al.*, 2010). A rápida adsorção a essas partículas altera a biodisponibilidade da toxina na coluna d'água (LIU *et al.*, 2008., CHEN *et al.*, 2010), permanecendo depositada no sedimento de fundo, onde por efeito de algum fator físico (como ventos em ambientes rasos) ou biológico (alimentação de animais bentônicos) pode ser transportada para outras regiões e acabar entrando novamente na cadeia alimentar (MORRIS *et al.*, 2000).

De acordo com o IPCC, os ambientes aquáticos sofrerão diferentes impactos devido a muitos fatores que serão alterados com o panorama das mudanças climáticas, como o aumento de temperatura devido à emissão de gases do efeito estufa (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O, por exemplo), diminuição do pH devido à intensa liberação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) na atmosfera com consequente absorção marinha resultando na formação de ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), recorrentes deslocamentos de massas de ar que implicam em variações de correntes marítimas (IPCC, 2014). A partir dessas mudanças poderão ocorrer diversas alterações no próprio ecossistema local, desde a microbiota até organismos superiores.

Tais efeitos não necessariamente influenciarão na viabilidade das cianobactérias, uma vez que estes organismos já sofreram com diferentes variações ambientais ao longo das eras. Alguns estudos inclusive já foram realizados na tentativa de compreender os mecanismos evolutivos de adaptação de cianobactérias frente a alterações de fatores ambientais, tais como temperatura, intensidade de luz, concentração de nitrogênio, carbono e fósforo (PAERL e OTTEN, 2013; MOWE *et al.*, 2014; 2015), salinidade e teor de oxigênio (ROLFE. *et al.*, 1978; CARNEIRO *et al.*, 2011, 2013) assim como o efeito destas variáveis ambientais sobre a produção de toxinas.

Mas pouco se sabe a respeito da dinâmica de cianotoxinas no ambiente e a consequente relação com os efeitos das variações ambientais, uma vez que alguns estudos avaliaram apenas a capacidade adsorptiva destas ao sedimento, principalmente MCs (MILLER *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2011), e o seu possível destino no corpo d'água. Porém não foram encontrados estudos que tenham observado a influência de fatores físicos e químicos (como temperatura, pH, aeração, potencial redox, por exemplo) na biodisponibilidade de cianotoxinas após o processo de sedimentação que ocorre em ambientes aquáticos. Estes fatores podem fazer com que MCs permaneçam mais tempo biodisponíveis ou até mesmo retornem para a coluna d'água, além de poderem entrar na cadeia alimentar, chegando ao ser humano de forma direta (consumo de água) ou indireta (consumo de animais contaminados) (MORRIS *et al.*, 2000).

Logo, conhecer a dinâmica dessa toxina no ambiente aquático é importante não apenas tendo como foco sistemas de abastecimento mas também quanto ao seu efeito sobre a diversidade ecológica.

## 2. JUSTIFICATIVA

A partir do exposto acima, sugerimos que a dinâmica das MCs estará sujeita a alterações devido a interferência de fatores físicos, químicos e biológicos, sob efeito das mudanças climáticas. Não se sabe até onde a influência de parâmetros como pH, temperatura e aeração podem acarretar na adsorção/dessorção da toxina no sedimento, além destes fatores poderem influir na capacidade de microrganismos biodegradar essa molécula na interface sedimento/água. Assim, pretendemos analisar o efeito de alguns desses fatores em relação à biodisponibilidade da MC-LR, visando um maior conhecimento de sua dinâmica e propondo uma melhor forma de lidar com possíveis consequências relativas à exposição à MCs, e até mesmo evitá-la após um fenômeno de floração de cianobactérias.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Investigar a dinâmica da MC-LR considerando os efeitos de fatores físicos, químicos e biológicos nos compartimentos (água e sedimento) da lagoa de Jacarepaguá na cidade do Rio de Janeiro.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Estimar a capacidade de adsorção de MC-LR no sedimento e seu possível retorno para a coluna d'água por influência do pH, da temperatura e da aeração.
- Avaliar a biodegradação de MC-LR por microrganismos presentes na água e no sedimento da lagoa de Jacarepaguá (RJ).
- Analisar através da metagenômica a composição da comunidade bacteriana da lagoa de Jacarepaguá envolvida no processo de degradação de MC-LR.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS:

##### 4.1 CULTIVO DE *Microcystis panniformes* (cepa MIRS-04), EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MICROCISTINA-LR (MC-LR)

Para realizar todos os experimentos foi realizada a produção e purificação da MC-LR, feita a partir do cultivo de uma cepa tóxica de *Microcystis panniformes* (MIRS-04) isolada do reservatório de Samuel (Rondônia – RO, Brasil) e mantida no banco de linhagens de cianobactérias do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da UFRJ. Sendo assim, a partir de um inóculo inicial da linhagem, o cultivo teve início em um pequeno volume com repiques sequenciais em volumes crescentes até se manter estável num ‘mariotte’ de 8 L. O meio de cultura utilizado foi o meio definido de sais ASM-1 estéril com o pH inicial de 8,0 (GORHAM *et al.*, 1964). O cultivo foi mantido sob aeração contínua (obtida com auxílio de bomba de ar comprimido), fotoperíodo de 12 horas (com intensidade luminosa de 100  $\mu\text{moles f\acute{o}tons. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e temperatura aproximada de 24 °C.

Após 8 dias, a cultura foi recolhida e centrifugada (2717 g por 10 minutos a 4 °C). O ‘pellet’ de células foi coletado e liofilizado (liofilizador Labconco®). Em seguida, tendo como base o protocolo descrito por Krishnamurty *et al.*, (1986), 300 mg da biomassa resultante foram ressuspensos em 30 mL de metanol:butanol:H<sub>2</sub>O (20:5:75 v/v) e agitados por 1 hora, passando por um processo de irradiação por ultrassom por 5 minutos através de um disruptor de células analógico (modo pulsado – Sonifier Branson® 450 - 400 W), para facilitar o rompimento celular e consequentemente o extravasamento da toxina. Logo em seguida o extrato foi centrifugado (2147 g por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante coletado. O processo foi repetido mais duas vezes. Todos os sobrenadantes resultantes foram combinados para a purificação da MC-LR.

A amostra resultante foi pré-purificada passando por um cartucho Strata X (Phenomenex®) previamente condicionado com 20 mL de metanol 100%, seguido de 20 mL de água ultrapura (MilliQ). Após estas etapas a amostra foi aplicada diretamente no cartucho para que ocorresse interação da toxina com a matriz (C18). Em seguida foram aplicados 20 mL de água ultrapura (MilliQ) seguidos de 20 mL de metanol 20%, sendo todo volume descartado em local apropriado. Após estas etapas o material foi eluído com 30 mL de solução metanol 100% + TFA 0,1% (ácido trifluoroacético) (TSUJI *et al.*, 1994), na qual a toxina encontra-se solúvel. A fração recolhida foi

seca no evaporador de nitrogênio em fluxo brando, concentrada, e ressuspensa em 5 mL de metanol grau HPLC, sendo finalmente filtrada em filtro de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  para purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – “*High Performance Liquid Chromatography*”) e posterior quantificação por LC-MS/MS, seguindo o protocolo estabelecido por SPOOF *et al.*, 2003.

As amostras foram purificadas por HPLC no equipamento modelo Prominence (Shimadzu<sup>®</sup>), com detector de arranjo de diodos e coletor de frações. O processo e a consequente separação cromatográfica ocorreram a partir de 2 fases de solventes: fase A com 20 mM de acetato de amônio (em pH 5,0) e fase B com acetonitrila grau HPLC, em modo isocrático na proporção 72:28 com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. A coluna cromatográfica utilizada foi uma semi-preparativa C18, 250 x 4.6 mm x 10  $\mu\text{m}$ , fabricante *Kromasil*<sup>®</sup> - SUE. Os picos característicos de MC-LR e com espectros característicos de absorção no detector de arranjo de diodos (DAD – “*diode array detector*”) foram coletados manualmente a partir do tempo de retenção específico para análise, e reunidos em uma única amostra de volume conhecido, sendo posteriormente submetida a uma extração de fase sólida (SPE – “*solid phase extraction*”) (semelhante ao protocolo de pré-purificação citado anteriormente para a coluna C18) para a retirada de sais provenientes da fase móvel.

A confirmação e quantificação obtida pela relação m/z da MC foi feita no equipamento LC/MS-MS API 3200 Q-trap (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) em fase estacionária com coluna Kinetex 2,6 $\mu$  C18 100A (50 x 2,10mm) e fase móvel em gradiente (**Tabela 4**), sendo a fase A constituída de 5 mM de acetato de amônio em água + 0,1% de ácido fórmico, e a fase B constituída de 5 mM de acetato de amônio em acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. O volume de injeção de cada amostra foi de 10  $\mu\text{L}$ . Logo, obtivemos a confirmação da variante de MC-LR, onde o limite de quantificação foi de 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o limite de detecção de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela 4:** Gradiente das fases A e B para estabilização da coluna no equipamento LC-MS/MS

Tempo total (min)	Fluxo ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	Fase A (%)	Fase B (%)
0.00	450	85	15
2.00	450	85	15
6.00	450	65	35
10.00	450	15	85
15.00	450	85	15
18.00	450	85	15

## 4.2 COLETAS DO SEDIMENTO E DA ÁGUA NA LAGOA DE JACAREPAGUÁ (RJ)

Foram realizadas coletas tanto da água, como do sedimento, em regiões próximas à margem da lagoa em pontos específicos, onde o fenômeno de floração de cianobactérias é evidente (**Figura 5**).



**Figura 5:** Imagem de satélite da Lagoa de Jacarepaguá (RJ). É destacado à esquerda em um círculo vermelho o ponto de coleta aproximado ( $22^{\circ}59'00.4''S$  /  $43^{\circ}24'36.2''W$ ), tanto da água como do sedimento. É possível observar o fenômeno de floração de cianobactérias através da coloração verde.  
Fonte: Google Earth 2016

A água da lagoa foi coletada na superfície da coluna d'água e acondicionada em garrafas PET previamente lavadas. Já o sedimento de fundo foi coletado com auxílio da draga de Ekman e acondicionado em recipientes plásticos próprios para coleta. O material foi levado imediatamente para o laboratório.

Alguns parâmetros físico-químicos (como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, profundidade e salinidade) foram medidos na coluna d'água, na camada mais superficial e mais profunda, através de uma sonda multiparamétrica (YSI® 6-Series 6600 V2-4).

### **4.3 PROCESSAMENTO DA ÁGUA E DO SEDIMENTO PARA TESTES DE BIODEGRADAÇÃO E ADSORÇÃO DE MC**

No laboratório, a água e o sedimento receberam tratamentos diferentes de acordo com os testes realizados, seja de biodegradação ou do efeito de parâmetros físicos e químicos para avaliar a dinâmica da toxina.

#### **4.3.1 PREPARO DO SEDIMENTO E DA ÁGUA PARA O TESTE DE BIODEGRADAÇÃO**

A água coletada foi filtrada inicialmente com filtros de fibra de vidro (GF/F, Whatman<sup>®</sup>) com poros de 0,7 µm para retirar a maior quantidade de sólidos em suspensão que poderiam interferir na análise, sendo filtrada posteriormente em filtros de 0,45 µm e 0,22 µm. Os filtrados de 0,45 µm foram utilizados no teste de biodegradação, onde se espera abranger uma ampla faixa de microrganismos e diminuir a interferência de partículas argilosas. Já os filtrados de 0,22 µm foram usados como controle nos testes, onde se espera eliminar os microrganismos.

Quanto ao sedimento da lagoa, um volume de cerca de 30 mL contendo tanto sedimento como sua água intersticial foi inicialmente agitado em 'vortex' por 10 minutos e em seguida centrifugado a baixa velocidade para separar o sedimento sólido da porção líquida (3354 g por 5 minutos à 10° C). Recolheu-se o sobrenadante na tentativa de recuperar parte dos microrganismos que fazem parte desse compartimento, separando das partículas sólidas maiores que ficaram na porção precipitada. Em seguida, o sobrenadante obtido foi filtrado também em filtros de fibra de vidro (Whatman<sup>®</sup> - GF/F) assim como descrito acima para a água da lagoa, visando retirar sólidos em suspensão. Este primeiro filtrado foi então passado em filtros de poros de 0,45 µm (Acetato de Celulose - Sartorius<sup>®</sup>) e o líquido recuperado, contendo microrganismos, foi utilizado nos testes de biodegradação. Uma parte deste líquido foi em seguida filtrado em poro de 0,22 µm (Acetato de Celulose - Sartorius<sup>®</sup>) e depois em 0,025 µm, esperando-se eliminar microrganismos, e foi usada como controle nos testes de biodegradação.



### **4.3.2 PREPARO DO SEDIMENTO E DA ÁGUA PARA OS TESTES DE DINÂMICA DA MC-LR**

Cerca de 2 L da água da lagoa foram filtrados em poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Acetato de Celulose - Sartorius<sup>®</sup>) e congelados para evitar processos de degradação de componentes nativos e contaminação externa, sendo então utilizados posteriormente nos testes de dinâmica de MC no sedimento.

Já o sedimento bruto da lagoa foi congelado, liofilizado e peneirado (peneiras com poro de 0,5 – 1,5 mm) para posteriormente ser acondicionado como sedimento de fundo nos frascos amostrais e realização dos experimentos de dinâmica de MC.

### **4.4 EXPERIMENTOS PARA AVALIAR A RELAÇÃO ENTRE ADSORÇÃO AO SEDIMENTO E BIODISPONIBILIDADE DE MC-LR NA COLUNA D'ÁGUA**

Todos os experimentos para avaliar o efeito de fatores físicos e químicos sobre a adsorção de MC-LR ao sedimento foram realizados da seguinte forma:

- (i) Triplicatas;
- (ii) 2 g de sedimento seco (obtido de acordo com o item 4.3.2);
- (iii) Adição de água da lagoa (obtida segundo o item 4.3.2) variando na faixa de 15-25 mL de acordo com o teste específico;
- (iv) Adição de uma concentração conhecida de MC-LR (“*spike*”), variando na faixa de 8 a 14  $\text{ng mL}^{-1}$  de acordo com o teste específico;
- (v) Controle sem adição de MC-LR;
- (vi) Amostragens realizadas em diferentes tempos 0h, 1 dia, 4 dias e 7 dias.

Em cada tempo amostral um volume de 1 mL da suspensão foi filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , congelado, para posteriormente ser analisado por espectrometria de massas (LC-MS/MS) visando quantificar MC-LR.

Além disso, foram realizados experimentos controle adicionais com o sedimento e a água da lagoa para avaliar os processos de adsorção e biodegradação. Para testar o processo de adsorção na

ausência de biodegradação, esses compartimentos foram tratados com azida sódica a 0,05%, um potente inibidor microbiano. E para avaliar uma possível biodegradação por parte de microrganismos que conseguiram sobreviver após a estocagem, o congelamento e liofilização do sedimento, o mesmo testado na presença de água ultrapura (MilliQ) ou de água da lagoa esterilizada por fervura.

#### **4.4.1 EFEITO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)**

Foi realizado um experimento para testar 3 valores de pH: pH 3,0 (sugerindo uma condição extrema e hipotética quando se trata de mudanças climáticas, mas possível com a liberação de efluentes químicos/farmacêuticos na lagoa), pH 5,0 (condição possível atualmente visto que a lagoa de Jacarepaguá já apresentou variações de pH entre 5,5 a 10,0 de acordo com Gomes *et al.*, 2011), e pH 8,0 (valor médio de pH encontrado na lagoa de Jacarepaguá ao longo do ano (Gomes *et al.*, 2011). A condição controle deste experimento foi incubação em pH próximo de 8, temperatura de 25 °C e sem aeração.

Foram utilizadas soluções de HCl e NaOH (concentração de 5M e 3M, respectivamente) para ajustar o pH da água aos valores desejados. Ao final do experimento (dia 7) o pH foi medido em todos os casos para observar possíveis variações em relação aos valores iniciais.

#### **4.4.2 EFEITO DA AERAÇÃO**

Avaliamos o efeito da aeração sobre a disponibilidade da toxina na coluna d'água, mimetizando deslocamentos de ar e correntes que interfiram na suspensão de sedimento superficial, como por exemplo nos casos de ciclones extra-tropicais e até mesmo para fins de dragagem. Para tal, foi testado o efeito da aeração produzida por um compressor de ar “Mini Vigo-Ar” (**Figura 6**).

A condição controle deste experimento foi incubação em pH próximo de 8, temperatura de 25 °C e sem aeração.



**Figura 6:** Organização do experimento de aeração no laboratório (A) e compressor de ar utilizado no mesmo (B).

#### 4.4.3 EFEITO DA TEMPERATURA

Foi avaliada a possível interferência do aumento da temperatura na adsorção e disponibilidade da toxina na interface sedimento/água. A lagoa de Jacarepaguá apresenta uma intensa variação anual na temperatura da água, que vai desde 18 °C até 32 °C (GOMES *et al.*, 2011).

Em um cenário de aumento da temperatura atmosférica, com conseqüente aumento da temperatura aquática, os valores de 45 °C (aquecimento atmosférico, uma vez que na região de Jacarepaguá a temperatura atinge valores de 40 °C segundo o CPTEC/INPE) e 25 °C (controle da temperatura média na lagoa de Jacarepaguá) foram testados e mantidos de forma constante ao longo dos 7 dias. Logo, a condição controle deste experimento foi feita com incubação em pH 8, temperatura de 25 °C e sem aeração.

#### 4.5 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADAÇÃO

Os experimentos de biodegradação foram realizados a partir dos “consórcios” microbianos nativos recuperados do sedimento e da água da lagoa, obtidos de acordo com o item 4.2.1, sem qualquer tipo prévio de isolamento. Utilizou-se tanto para o sedimento como para a água uma suspensão filtrada em poro de 0,45 µm, na tentativa de eliminar o maior número possível de interferentes (como algum material particulado, por exemplo) que pudessem comprometer a

análise, a integridade e a disponibilidade da MC. Também foram utilizadas as frações filtradas em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , como controle do processo de biodegradação, onde espera-se que sejam eliminados os microrganismos.

Todas as amostras foram incubadas com uma concentração inicial conhecida (“*spike*”) da MC-LR purificada e quantificada como descrito no item 4.3. Sendo assim, os testes contendo a fração filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  foram acompanhados dos seguintes controles:

(i) Adição de tetraciclina (um antibiótico bacteriostático de amplo espectro que bloqueia a ligação entre o RNA-transportador e RNA mensageiro da subunidade 30S do complexo ribossômico), na tentativa de avaliar uma possível inibição do metabolismo bacteriano com consequente inibição e/ou diminuição da biodegradação;

(ii) Autoclavação das frações filtradas (da água do sedimento) na tentativa de eliminar os microrganismos e a consequente biodegradação;

Os experimentos foram realizados em triplicata, incubados durante 7 dias a 25 °C sem aeração e com o pH correspondente ao da água da lagoa no momento da coleta (próximo de 8). As amostragens foram feitas em 4 tempos diferentes: 0 horas (instantaneamente após a adição da MC-LR), 1 dia, 4 dias e 7 dias. No momento de cada amostragem, um volume de 1 mL de todas as unidades experimentais (incluindo as réplicas) foi filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , congelado, para posteriormente ser analisado por espectrometria de massas (LC-MS/MS), com o objetivo de dosar a toxina.

#### **4.5.1 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Aproximadamente 500 mL da água da lagoa foi filtrado em poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 500 mL foi filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . As soluções resultantes foram centrifugadas a 3354 g por 5 minutos à 10 °C, com o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensão em 2 mL de água MilliQ, na tentativa de concentrar ao máximo os microrganismos presentes neste compartimento. Em seguida, o volume obtido foi corado com DAPI (“*4',6'-diamidino-2-phenylindole*”), um marcador de DNA a uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup> (estoque) diluído 1:5000 diretamente nos filtrados da água, que ficou

incubado em temperatura ambiente por 5 minutos aproximadamente. Posteriormente foi visualizado no microscópio Axioplan (Zeiss®).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão representados nos gráficos através da média das réplicas (n=3), com a variação do erro padrão da média (EPM). Em relação à análise estatística, os testes de biodegradação foram verificados a partir da análise de variância (ANOVA) com o teste de tendência e linearidade *a posteriori* e as diferenças entre todos os tempos amostrais nos testes de adsorção foram avaliadas também pela análise de variância (ANOVA) com teste de Bonferroni *a posteriori*. Em ambas, as diferenças foram consideradas significativas considerando um valor de  $p < 0,05$ .

#### 4.7 MÉTODOS MOLECULARES (METAGENÔMICA)

Para o estudo molecular sobre a composição da comunidade bacteriana da lagoa de Jacarepaguá, através de metagenômica, foram utilizadas quatro amostras coletadas em três datas diferentes (setembro e dezembro de 2014 e janeiro de 2015). O DNA foi extraído a partir destas amostras, como detalhado abaixo:

Coleta de setembro de 2014:

i) A partir da água da lagoa, foi realizada uma primeira etapa de filtração em poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Este volume foi em seguida filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , onde os microrganismos foram retidos, como descrito no item 4.1. O DNA foi extraído das células retidas no filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (que será identificada como H<sub>2</sub>Oset);

ii) A partir da água intersticial do sedimento, foi realizada uma primeira etapa de filtração em poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Este volume foi em seguida filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , onde os microrganismos foram retidos, como descrito no item 4.1. O DNA foi extraído das células retidas no filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (que será identificada como Ag,Int.SED.set).

Coleta de dezembro de 2014:

iii) A partir da água intersticial do sedimento, foi realizada uma primeira etapa de filtração em poro 0,45  $\mu\text{m}$ . Este volume foi em seguida filtrado em poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , onde os microrganismos foram retidos, como descrito no item 4.1. O DNA foi extraído das células retidas no filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (que será identificada como Ag.Int.SED.dez).

Coleta de janeiro de 2015:

iv) DNA extraído diretamente do sedimento “bruto”, após ser liofilizado (que será identificada como SED).

#### **4.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA, AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA e PREPARAÇÃO PARA O SEQUENCIAMENTO**

A extração do DNA foi feita a partir dos filtros e do sedimento bruto (das 4 amostras citadas acima) com o kit comercial *FastDNA<sup>TM</sup> Spin* para solo, seguindo instruções do fabricante (MPBio<sup>®</sup>). Após a extração, o DNA foi quantificado em fluorímetro Qubit (*Termo Fisher<sup>®</sup> Scientific*) com o kit *Qubit dsDNA BR Assay (Molecular Probes, Life Technologies<sup>®</sup>)*. Foram preparadas soluções de DNA em água ultrapura estéril na concentração de 2 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para o processo posterior de amplificação.

A partir desta etapa foi realizado o protocolo para o sequenciamento do DNA a partir de bibliotecas de amplificação da região do gene codificante do 16S rRNA (16S rDNA) de identificação da comunidade bacteriana (descrita neste item).

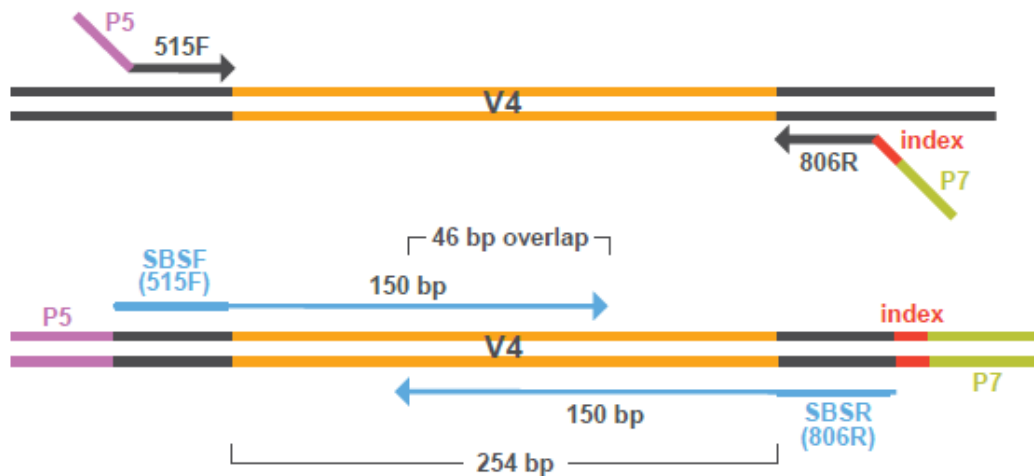
Logo, para análise do 16S rDNA foi feita a amplificação da região variável V4 pela reação de PCR (“*polymerase chain reaction*”), a partir de iniciadores específicos (F515: 5’ – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA – 3’ / R806: 5’ – GGACTACHVGGGTWTCTAAT – 3’) descritos por CAPORASO *et al.*, 2011, com a enzima *HiFi HotStart (KAPA<sup>®</sup> Biosystems)*, uma DNA polimerase de elevada fidelidade (cerca de 100 vezes maior que a Taq Polimerase) e alta processividade, com uma baixa taxa de erro (1 erro a cada  $3,6 \times 10^6$  nucleotídeos incorporados). Os ciclos de amplificação a partir do termociclador foram realizados na seguinte ordem: desnaturação

à 95 °C por 3 minutos, 25 ciclos repetidos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos) e 72 °C por 5 minutos para a etapa de extensão. Todo procedimento foi feito de acordo com o protocolo ‘‘16S Library Preparation Workflow’’ (Illumina® MiSeq).

Os primeiros produtos amplificados foram purificados com ‘beads’ magnéticas do kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter®) e um suporte magnético correspondente. Tal procedimento consiste numa interação eletromagnética entre as ‘beads’ e o DNA. Após etapas de lavagem, a eluição do DNA ocorre por adição da solução TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

Uma segunda etapa de amplificação (**Figura 7**) foi realizada para incorporar um conjunto de índices nas extremidades dos amplicons, para identificar cada amostra no processo posterior de sequenciamento, da seguinte forma:

- i) Índices N502+N701 - H<sub>2</sub>Oset
- ii) Índices N502+N702 – Ag.Int.SED.set
- iii) Índices N502+N703 – SED
- iv) Índices N502+N704 – Ag.Int.SED.dez



**Figura 7:** Região V4 amplificada a partir do gene 16S rDNA. Foram utilizados os iniciadores específicos 515F/806R, o que gerou um produto de cerca de 300 pb. Após a amplificação de V4, seguiu-se uma segunda etapa de PCR para incorporar as sequências índices e os adaptadores para o sequenciamento (P5 e P7). O sequenciamento foi feito no modo “*pair-end*” a partir de ambas as extremidades dos fragmentos gerando produtos de cerca de 150 pb que se sobrepõem em um trecho de 46 pb (retirado de *Application Note: Sequencing – Illumina*<sup>®</sup>).

Os ciclos característicos da PCR nesta etapa foram: desnaturação à 95 °C por 3 minutos, 8 ciclos repetidos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos) e 72 °C por 5 minutos para a etapa de extensão.

Posteriormente foi feita uma nova etapa de purificação dos amplicons finais, de acordo com o procedimento citado acima, a qualidade das amostras foi validada analisando seu tamanho de fragmento no equipamento *Bioanalyzer 2100 (Agilent)* usando o kit *High Sensitivity DNA (Agilent<sup>®</sup>Technologies)* (vide **Anexo 1**).

Em seguida foi feita a quantificação das bibliotecas utilizando PCR quantitativo no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems<sup>®</sup>)* com o kit *KAPA Library Quantification*.

#### 4.7.2 SEQUENCIAMENTO (ILLUMINA MiSEQ)

As bibliotecas do 16S rDNA da região V4 foram diluídas 1:50 e reunidas em um *pool* contendo 2 nM de cada amostra. Este *pool* foi desnaturado e diluído, além de receber como controle



o DNA do fago PhiX (*Illumina*<sup>®</sup>), tendo assim uma concentração final das bibliotecas para sequenciamento de 8 pM.

Essas bibliotecas foram aplicadas no kit de sequenciamento *MiSeq Reagent kit v2* (150 pb x2) seguindo orientações do fabricante (*Illumina*<sup>®</sup>).

### 4.7.3 ANÁLISE PÓS SEQUENCIAMENTO

Os arquivos obtidos foram os de formato *.fastq*. Esses arquivos correspondiam a cada amostra sequenciada. Como o sequenciamento foi do tipo ‘*pair-end*’ para cada amostra foram gerados dois tipos de arquivos, R1 e R2. A caracterização da comunidade microbiana e atribuição taxonômica das sequências foram realizadas por análises computacionais utilizando o software Mothur para as sequências do 16S rRNA.

Para as análises do 16S rRNA as sequências brutas obtidas pelo sequenciamento (formato *.fastq*) foram processadas através do software Mothur v.1.36.1 (SCHLOSS *et al.*, 2009). O tamanho esperado das sequências foi de 290 pb onde, inicialmente, as leituras provenientes de cada uma das extremidades obtidas (R1 e R2) através do sequenciamento do tipo “*pair-end*”, foram unidas para a formação dos *contigs* tendo como base a região de sobreposição de 46 pares de bases entre as duas leituras (Figura 7). Então, para eliminar possíveis erros do sequenciamento, todas as sequências que não conseguiram cumprir com qualquer um dos critérios a seguir foram excluídas: qualidade média igual ou maior do que 30, comprimento de 290 pares de bases, ausência de ambiguidades, ausência de nucleotídeos incorporados incorretamente nos *primers* e/ou *barcodes* e retirada de quimeras detectadas através do software Uchime (Edgar *et al.*, 2011). As sequências restantes de alta qualidade foram então alinhadas usando o banco de dados de referência SILVA (Quast *et al.*, 2013), e em seguida montadas para obter uma completa sobreposição.

O arquivo de alinhamento resultante foi usado como entrada para a construção da matriz de distância e para o agrupamento das sequências em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), com um corte de 3% de dissimilaridade. As amostras foram então normalizadas randomicamente para o mesmo número de sequências. O padrão de OTUs de cada amostra foi utilizado para verificar a diversidade da comunidade bacteriana e consequente estimativa de riqueza. Para a atribuição taxonômica, as sequências do gene do 16S rRNA foram classificadas usando o banco de dados de referência SILVA (Quast *et al.*, 2013). Esta análise foi realizada em colaboração com o Dr. Caio Rachid do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1 MC-LR PRODUZIDA

De acordo com a metodologia empregada para a produção da toxina (item 4.1), ao todo foram produzidos cerca de 529,4  $\mu\text{g}$  que foram diluídos em 20 mL totais de metanol 100%, o que representou um valor satisfatório uma vez que, para a realização dos experimentos, foi utilizada em média uma concentração de 10  $\text{ng mL}^{-1}$  variando conforme os diferentes testes.

### 5.2 MEDIDAS DE CAMPO DA LAGOA DE JACAREPAGUÁ

Nas diferentes coletas realizadas ao longo deste trabalho foram analisados alguns parâmetros físico-químicos que variaram na coluna d'água da lagoa, tanto na região superficial como de fundo (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Variação dos parâmetros analisados na coluna d'água de acordo com as coletas realizadas.

PARÂMETROS	COLUNA D'ÁGUA	
	SUPERFICIAL	FUNDO
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24,5-28,2	22,8-26,0
pH	8,4-8,7	6,6-7,7
O <sub>2</sub> dissolvido (%)	30,0-60,0	20,0
Salinidade (ppt)	4,13-4,47	4,65-5,00
Profundidade (m)	0,5-0,8	3,1-5,6
Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	7,48-7,53	7,60
ORP* (mV)	-65	-120

\*ORP: potencial de oxirredução “*oxireduction potential*”

Apesar das coletas terem sido realizadas em apenas duas datas diferentes em pontos próximos, podemos observar variações nos valores dos parâmetros analisados semelhantes aos observados também por Gomes (2011) em sua tese de doutorado, como uma lagoa oligohalina, ou seja, de baixa salinidade comparada à outras lagoas do complexo lagunar de Jacarepaguá. Assim, neste caso há pouca troca de água com o mar, o que aumenta seu tempo de residência, levando ao acúmulo de nutrientes e favorecendo florações de cianobactérias nesse ambiente caracterizado como salobro de classe I (CONAMA 257/2005 – Ministério do Meio Ambiente).

Outro fator importante é a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido que reflete as condições da água, que auxiliam na detecção de impactos ambientais como eutrofização e poluição ambiental de determinado ecossistema (BRANCO, 1991; CARMOUZE, 1994), além de ser um parâmetro extremamente importante na ecologia do ambiente para a respiração da maioria dos organismos pertencentes. Assim, de acordo com os dados da **Tabela 5**, nas regiões mais superficiais, foram encontradas concentrações ideais para a vida aquática, provavelmente devido a produtividade primária intensa das microalgas presentes. Porém, com o aumento da profundidade foi possível observar uma intensa diminuição da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido, fato relatado também por outros estudos (SAMPAIO, 2008; GOMES, 2011) onde tal parâmetro alternou na coluna d'água em diferentes épocas do ano e de acordo com a biomassa do fitoplâncton. Nas regiões mais profundas a condição menos oxigenada é bastante pertinente, chegando a condição anóxica, de acordo com análises feitas pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA - boletim nº 2 de março de 2015 e nº 11 de dezembro de 2015) principalmente pela quantidade de matéria orgânica, em processo de degradação, proveniente de efluentes sanitários por exemplo, o que é comum neste ambiente. Tal fato demonstra muitas vezes, como no caso da lagoa de Jacarepaguá, uma intensa degradação ambiental, relacionada à decomposição da matéria orgânica liberada no corpo d'água em decorrência de atividades antrópicas por exemplo.

Além disso, parâmetros como temperatura e pH se mostraram bastante favoráveis para as florações de cianobactérias, com temperaturas elevadas e condições alcalinas, que aliados à característica eutrofização da lagoa (FERNANDES, 1991; DOMINGOS, 2001; GOMES, 2011) estabelecem uma situação ótima para o desenvolvimento e manutenção das mesmas (BOUVY *et al*, 1999; HUSZAR *et al*, 2000). De acordo com os valores dos parâmetros analisados e com o levantamento desses parâmetros a partir de estudos anteriores foi possível estabelecer valores de pH e temperatura a serem testados nos ensaios a seguir com o objetivo de avaliar o comportamento da MC-LR presente no sedimento da lagoa de Jacarepaguá e sua dinâmica na coluna d'água. Além disso, foram avaliadas as condições de deslocamento de ar, que varia de direção, predominando o vento sudoeste e as brisas marinhas e continentais (MARQUES, 1984), o que favorece a ressuspensão das partículas do sedimento por se tratar de uma lagoa relativamente rasa.

### 5.3 RELAÇÃO ENTRE ADSORÇÃO AO SEDIMENTO E BIODISPONIBILIDADE DA MC-LR NA COLUNA D'ÁGUA

Sabe-se que as MCs presentes no ambiente aquático estão sujeitas a processos de adsorção e sedimentação (MORRIS *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011, WÖRMER *et al.*, 2011), além da biocumulação (WILLIAMS *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2001 e 2003) e biodegradação (JONES *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2008; NYBOM *et al.*, 2012; MOU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016).

A princípio, com base no panorama previsto pelo IPCC e pelas situações pelas quais o planeta está passando em relação às mudanças climáticas, como aumento de temperatura, deslocamento de massas de ar e acidificação dos corpos d'água, por exemplo, elaboramos ensaios para avaliarmos em escala laboratorial possíveis efeitos desses fatores sobre a dinâmica da MC-LR presente no sedimento e seu retorno para a coluna d'água.

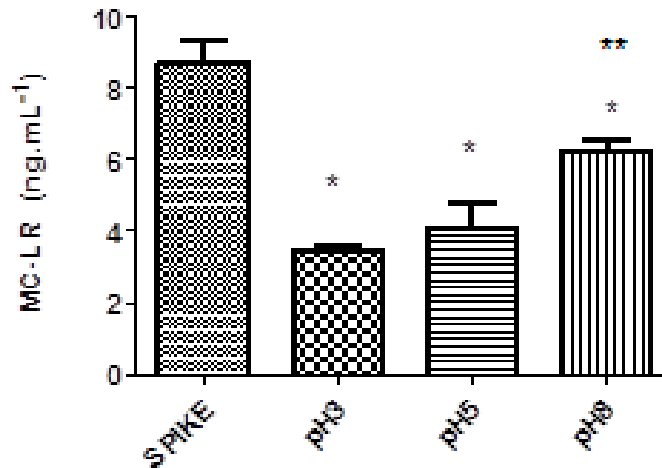
Além da adição de uma concentração conhecida da toxina (“*spike*”) para cada teste, no intuito de avaliar tal dinâmica, inicialmente o efeito de todos os parâmetros físico-químicos (aeração, pH e temperatura) também foram analisados em ensaios sem a adição da toxina, apenas com a MC-LR nativa adsorvida ao sedimento (dados não mostrados). Foi comprovado previamente a presença de MC-LR no sedimento da lagoa a partir de extrações realizadas para outras análises do laboratório que evidenciaram concentrações de cerca de  $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$  de sedimento.

A alteração dos parâmetros físico-químicos em ensaios, contendo apenas a MC pré-existente e adsorvida naturalmente ao sedimento, não resultaram no retorno da mesma para a coluna d'água. Isso nos mostra que a capacidade de adsorção da toxina às partículas do sedimento se dá possivelmente por interações hidrofóbicas, que é um dos principais motivos que dificultam uma posterior dessorção de compostos químicos orgânicos adsorvidos em solos e sedimentos (DICKINSON, MAKI e BRUNGS, 1987), sendo possível fazê-la apenas por intermédio de extrações químicas. A liberação das MCs em determinado corpo d'água (após a senescência das florações, por exemplo) pode favorecer esses tipos de interação possivelmente devido ao aminoácido hidrofóbico ADDA, como citado anteriormente, fazendo uma forte interação com o sedimento, tornando-o um “reservatório” de MCs. Neste compartimento microrganismos atuarão no processo de biodegradação, seja através do metabolismo aeróbico (CHEN *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016), ou possivelmente pelo metabolismo anaeróbico em condições anóxicas (CHEN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2015). Assim, parâmetros como temperatura, pH e aeração não

foram capazes de fazer a toxina previamente já adsorvida ao sedimento retornar para a coluna d'água. Porém o comportamento da MC-LR, recém adicionada a coluna d'água, em relação a dinâmica de adsorção seja através da aceleração do processo ou do seu possível retorno para água, será discutido a seguir.

### 5.3.1 AVALIAÇÃO DO PH

A partir dos valores de pHs testados (3,0, 5,0 e 8,0) pudemos observar de acordo com a **Figura 8**, uma queda significativa da concentração da toxina na água imediatamente no T0 após a adição do *spike* de concentração conhecida, em todos os casos. Tal queda, que evidencia uma adsorção imediata, se mostrou mais evidente no pH 3,0, com cerca de 60% adsorvido, em relação ao pH 5,0, com cerca de 49%, e ao pH 8,0 com cerca de 28%. A adsorção de MC-LR ao sedimento em pH 8,0 foi significativamente menor do que em pH 3,0. Tal fato também foi visto por LIU *et al.*, 2008 e WU *et al.*, 2011, onde o pH mais ácido foi mais favorável à adsorção ao sedimento tanto da MC-LR como de outras variantes (MC-LW, por exemplo, que tem a estrutura química bastante similar a -LR), ao contrário de um pH mais alcalino.



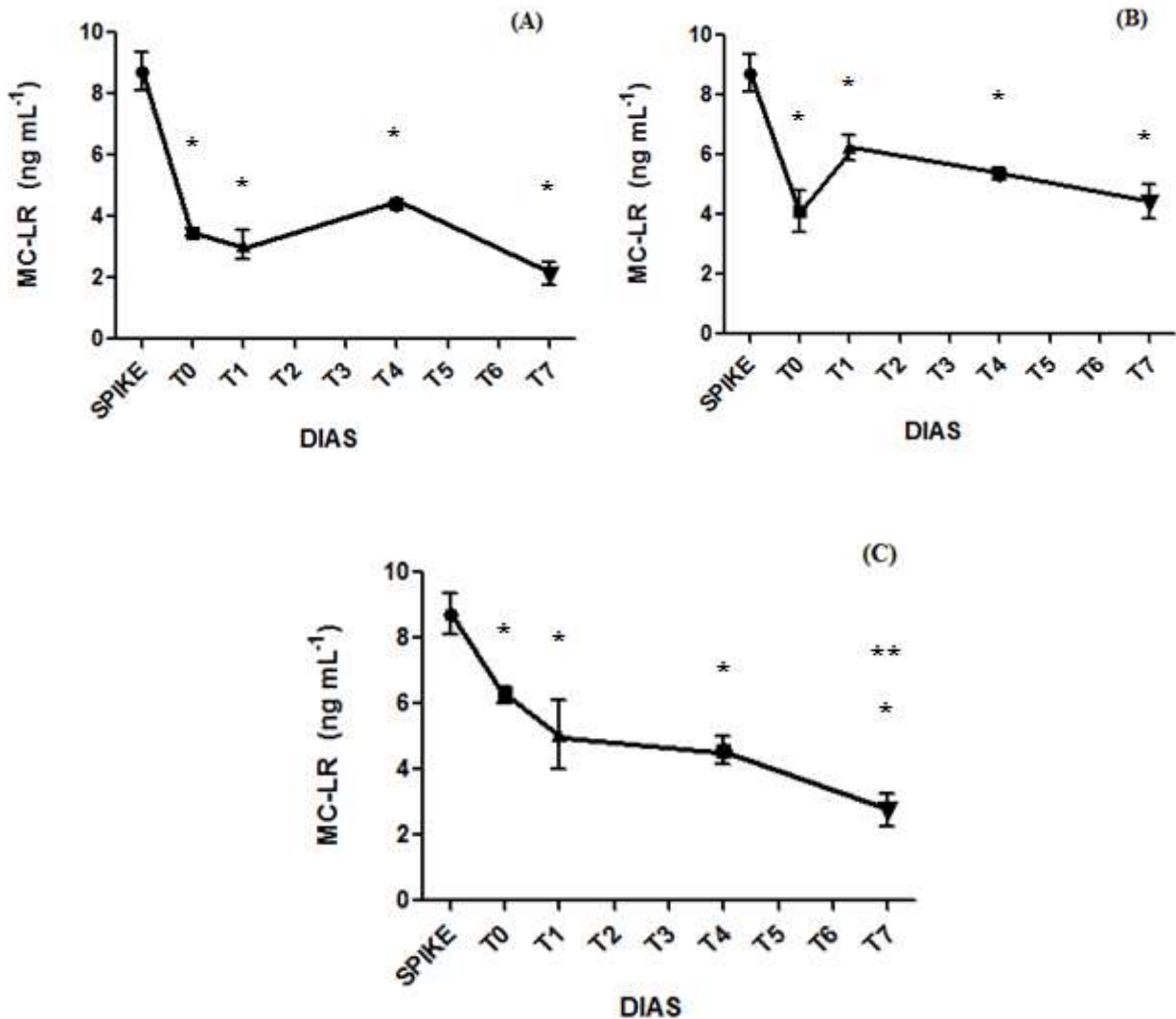
**Figura 8:** Comparação entre a concentração adicionada da MC-LR (*“spike”*) na coluna d'água com os tempos T0 (amostragem feita logo após a adição do *spike* e consequente sedimentação das partículas em suspensão) em diferentes pHs. As diferenças estatísticas foram admitidas com  $p < 0,05$  de acordo com ANOVA (*“post test”* de Bonferroni) da seguinte forma: \* diferença entre o pH e o *spike*; \*\* diferença em relação ao pH 3; não houve diferença entre pH 8,0 e pH 5,0. (n=3)

Segundo LIU *et al.*, (2008), a baixa interação imediata da MC-LR com o sedimento em pH alcalino pode ser devido a alterações físico-químicas da molécula, como a diminuição da sua hidrofobicidade por exemplo. É sabido que há uma correlação positiva entre o coeficiente de partição octanol-água (Kow, que avalia a característica hidrofóbica de determinada substância química) e a adsorção de compostos orgânicos do sedimento e do solo, por exemplo (KARICKHOFF *et al.*, 1979; MACKAY, 1982). Existe uma correlação negativa entre pH e hidrofobicidade da MC-LR (GERT-JAN DE MAAGD *et al.*, 1999), que segundo os autores, foi consistente para diferentes valores de pH. Isso pode ser explicado pela estrutura química dessa molécula que contém regiões ionizáveis como D-GLU, D-MeAsp e L-Arg que podem ser protonadas e desprotonadas tornando-a carregada positiva ou negativamente, de acordo com as alterações do pH (RUDOLPH-BOÈHNER *et al.*, 1994) influenciando na interação com as cargas negativas do sedimento.

Por conseguinte, a massa da toxina a ser adsorvida, o teor de matéria orgânica, a saturação dos sítios de interação do sedimento, além do tipo e tamanho de partículas que compõem esse compartimento podem influenciar no processo de adsorção. Além disso, os processos de adsorção podem ser bem avaliados pelos coeficientes de isothermas Linear e de Freundlich (STUMM *et al.*, 1992). A obtenção desses coeficientes não foi possível devido à baixa concentração de toxina utilizada em comparação ao que já está adsorvido ao sedimento (como citado anteriormente) inviabilizando o balanço de massas.

Por outro lado, nessas condições de pH em relação ao T0 não foi observado qualquer retorno da MC-LR já adsorvida ao sedimento para a água, já que em nenhum caso houve aumento na concentração da toxina na água.

Podemos observar também a variação do processo de adsorção da MC-LR ao sedimento nos diferentes valores de pH ao longo do tempo até 7 dias (**Figura 9**). Neste período não foi evidenciado o retorno da toxina do sedimento para a coluna d'água, apenas uma tendência no pH 5,0 em relação ao T1, mas sem significado estatístico.



**Figura 9:** Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em pH 3 (A), 5 (B) e 8 (C). As concentrações estão relacionadas com a toxina remanescente na coluna d'água e as diferenças estatísticas foram admitidas com  $p < 0,05$  de acordo com ANOVA ("post test" de Bonferroni) da seguinte forma: \* diferença entre o T específico (dia) e o spike; \*\* diferença em relação ao T0. (n=3)

Tanto em pH 3,0 como em pH 5,0, houve diminuição da concentração de MC-LR nos tempos testados (exceto T1 em pH 5,0) em relação ao spike, porém não houve uma diminuição constante em T1, T4 e T7 em relação ao T0, sugerindo que apenas a adsorção inicial contribuiu para a redução da concentração da MC-LR na coluna d'água, processo o qual não se intensificou ao longo do tempo. Isso confirma que a adsorção ocorre inicialmente, logo após a alteração do pH. Os valores de pH inicialmente alterados (pH 3,0 e 5,0), em relação ao ambiente natural (pH médio da água da

lagoa na faixa de 7,8), foram tamponando naturalmente no sistema ao longo dos dias e após sete dias o valor do pH em todos os casos estava mais próximo de 8,0. Já o pH 8,0 levou a uma diminuição constante da concentração da toxina ao longo do tempo, chegando aos menores valores no tempo final, e foi o único caso em que a concentração de MC-LR ao fim de 7 dias foi significativamente menor do que no T0. Em contraste, no pH 3,0 e no pH 5,0 essa queda acentuada ocorreu já no T0. Sendo o pH 8,0 o mais próximo das condições reais da lagoa, isso evidencia o potencial de adsorção do sedimento que pode levar a essa constante diminuição da toxina na coluna d'água.

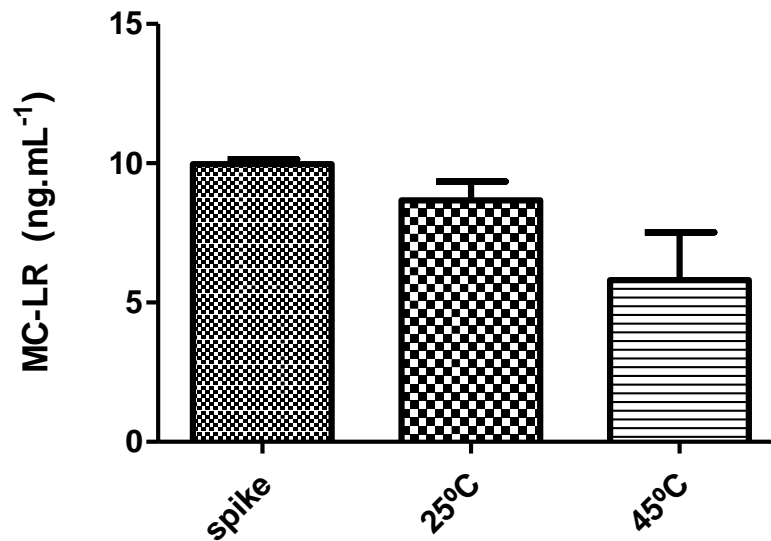
A princípio, é possível imaginar que no cenário de uma acidificação drástica da lagoa de Jacarepaguá a MC-LR não retornaria para a coluna d'água, ao contrário de alguns componentes orgânicos e metais que são capazes de sofrerem o processo de dessorção do sedimento (DICKISON, MAKI e BRUNGS, 1987). Em contrapartida, foi observado um aumento da adsorção imediata MC-LR em valores de pH mais ácidos em relação ao pH médio da lagoa, o que intensificaria o processo de estocagem da toxina no sedimento e acarretaria numa difícil retirada apenas com a variação do pH. Logo, seria necessária a extração ou oxidação química em laboratório que leve a uma reação exotérmica para a retirada da toxina do sedimento.

### 5.3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA

Em relação ao efeito da temperatura atmosférica sobre a disponibilidade da MC-LR no ambiente aquático, foi testado o aumento de 45 °C em relação aos 25 °C de média da temperatura daquela região. Com o aumento da temperatura atmosférica para 45 °C a temperatura da água ficou próxima de 38 °C. Segundo GOMES (2011), a temperatura da água da lagoa de Jacarepaguá já chegou a cerca de 30 °C de acordo com os períodos mais quentes do ano.

A adsorção imediata da toxina ao sedimento sob efeito da temperatura, foi comparada pela concentração da toxina no T0 em relação ao *spike* (**Figura 10**).





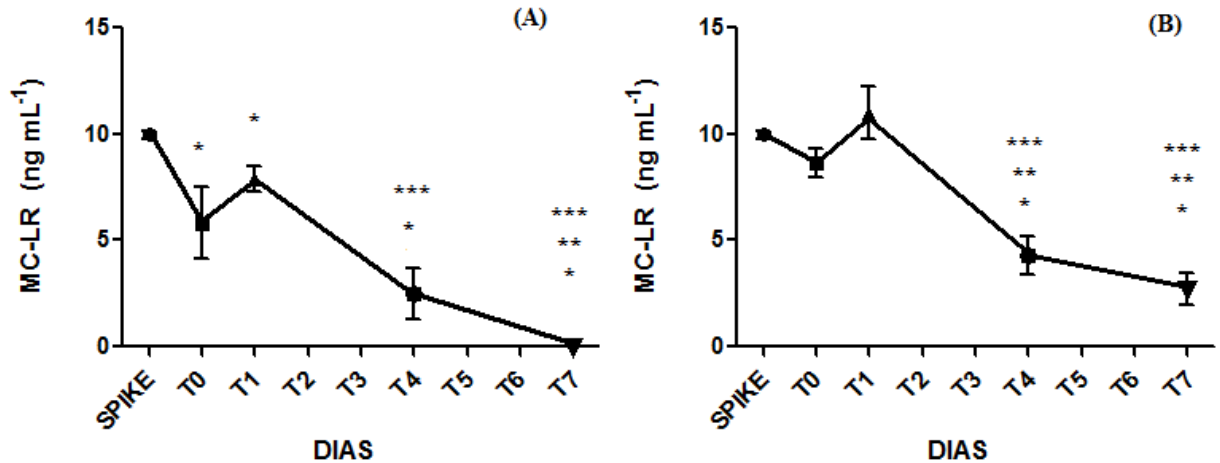
**Figura 10:** Comparação entre as concentrações do *spike* da MC-LR com os tempos T0 (amostragem feita logo após a adição da toxina (*spike*) e consequente sedimentação das partículas em suspensão) em diferentes temperaturas. Não houve diferença estatística entre os valores.

Assim, o aumento da temperatura acarretou em uma diminuição da concentração da toxina na coluna d'água mais acentuada do que a 25 °C, logo no T0, embora isso não tenha representado uma diferença estatística. A porcentagem de adsorção da MC-LR ao sedimento no T0 em 45 °C foi cerca de 42%, e em 25 °C foi cerca de 13%. Porém não houve uma diferença significativa nas temperaturas testadas.

Esse fato sugere uma maior adsorção da molécula ao sedimento em 45 °C em relação à temperatura controle, apesar de não haver diferença estatística.

Já em relação a avaliação do efeito do aumento da temperatura ao longo do tempo foi possível observar de acordo com a **Figura 11** uma diminuição mais acentuada da concentração da toxina na coluna d'água comparada a temperatura controle. No T7, em relação a temperatura de 45 °C a porcentagem de MC-LR adsorvida foi 100%, ao passo que na temperatura de 25 °C foi cerca de 70%, em comparação ao T0. Em ambas as temperaturas a concentração de MC-LR na água foi decrescendo gradativamente ao longo de 7 dias. O resultado de adsorção de MC-LR na temperatura controle foi bastante semelhante em relação ao do teste em pH 8,0 (**Figura 9 e Tabela 6**), o que

era esperado, já que as condições experimentais foram similares (temperatura 25 °C e pH de 8,0, aproximadamente).



**Figura 11:** Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em temperaturas de 45 °C (A) e 25 °C (B). As concentrações estão relacionadas com a toxina remanescente na coluna d’água e as diferenças estatísticas foram admitidas com  $p < 0,05$  de acordo com ANOVA (“*post test*” de Bonferroni) da seguinte forma: \* diferença entre o T específico (dia) e o *spike*; \*\* diferença em relação ao T0; \*\*\* diferença em relação ao T1. (n=3).

**Tabela 6:** Eficiência de adsorção da MC-LR no sedimento.

Experimentos	Adsorção (%)			
	Spike => T0	T0 => T1	T0 => T4	T0 => T7
pH 3	60% (*)	11%	0%	39%
pH 5	49% (*)	0%	0%	0%
pH 8	28% (*)	19%	27%	56% (*)
Temperatura. 25 °C	13%	0%	50% (*)	69% (*)
Temperatura. 45 °C	42%	0%	57%	100% (*)
Sem aeração	0%	22% (*)	44% (*)	44% (*)
Aeração	12% (*)	62% (*)	92% (*)	100% (*)

(\*): diminuição da concentração de MC-LR com diferença estatística

Segundo WU *et al.*, (2011), a variação no grau de entalpia ( $\Delta H$ ) encontrada em sua pesquisa indica que a adsorção compreende dois diferentes processos, um endotérmico em sedimentos que possuem elevada quantidade de matéria orgânica e o outro exotérmico, em sedimentos com baixa

quantidade matéria orgânica. Assim, o aumento de temperatura favoreceu uma maior capacidade de adsorção no primeiro processo.

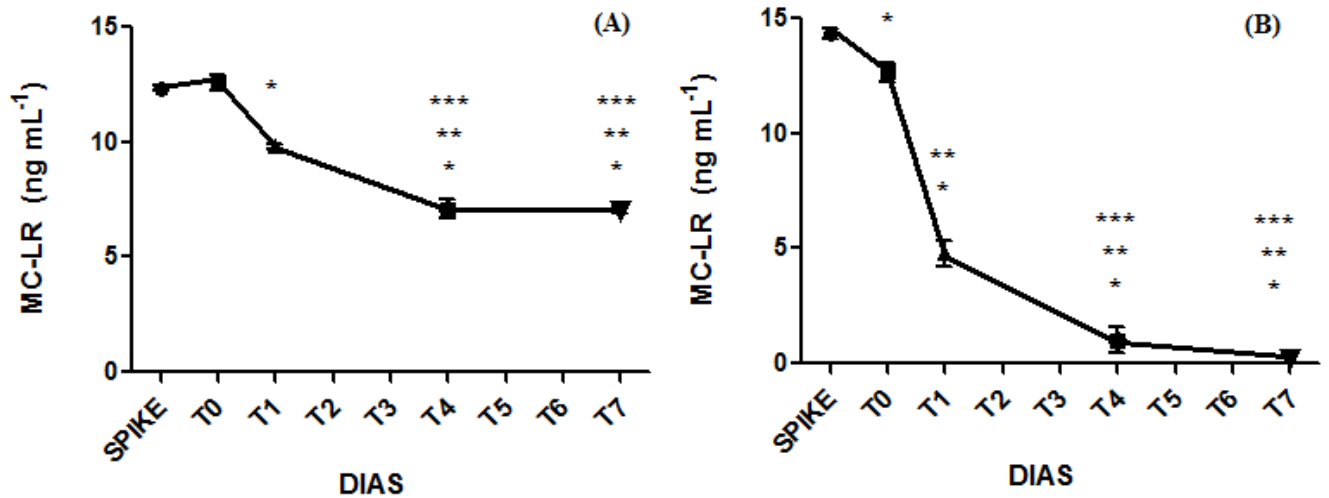
É sabido que a lagoa de Jacarepaguá possui alto nível de matéria orgânica chegando a 26% no sedimento superficial em determinados pontos geográficos de acordo CYPRIANO (2009), o que estaria de acordo com os achados de WU *et al.*, 2011, já que com o aumento da quantidade de matéria orgânica há uma maior interação com a MC-LR, resultando numa reação endotérmica em que a temperatura favorece o processo. Porém mais experimentos seriam necessários para compreender melhor essa relação do grau de entalpia e entropia que podem mediar o processo de interação de MC e sedimento a partir do aumento da temperatura.

A partir do exposto acima foi possível observar ainda que o aumento da temperatura também não foi capaz de retornar a MC-LR para a coluna d'água a partir do sedimento, assim como a acidificação. Pelo contrário, foi observado um efeito de maior diminuição da concentração e consequente adsorção da toxina ao longo dos 7 dias.

### 5.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AERAÇÃO

No caso deste experimento não foi possível obter a comparação entre as concentrações de MC-LR do *spike* com os T0 dos ensaios já que as concentrações dos dois *spikes* foram diferentes.

Porém, de acordo com a **Figura 12**, é possível observar que a aeração já provoca uma redução significativa em relação ao controle (sem aeração) logo no T0. Tal comportamento se repete ao longo dos 7 dias, onde a aeração se mostrou bastante efetiva na remoção da toxina da coluna d'água, que foi quase que total já no T4 (cerca de 92%) e foi de 100% no T7. Já na condição controle a concentração da toxina não se reduziu a zero ao longo dos 7 dias. Assim como observado na acidificação e no aumento de temperatura, a aeração também não acarretou no retorno da toxina para a água, resultando ao contrário, no aumento do potencial de adsorção ao sedimento.



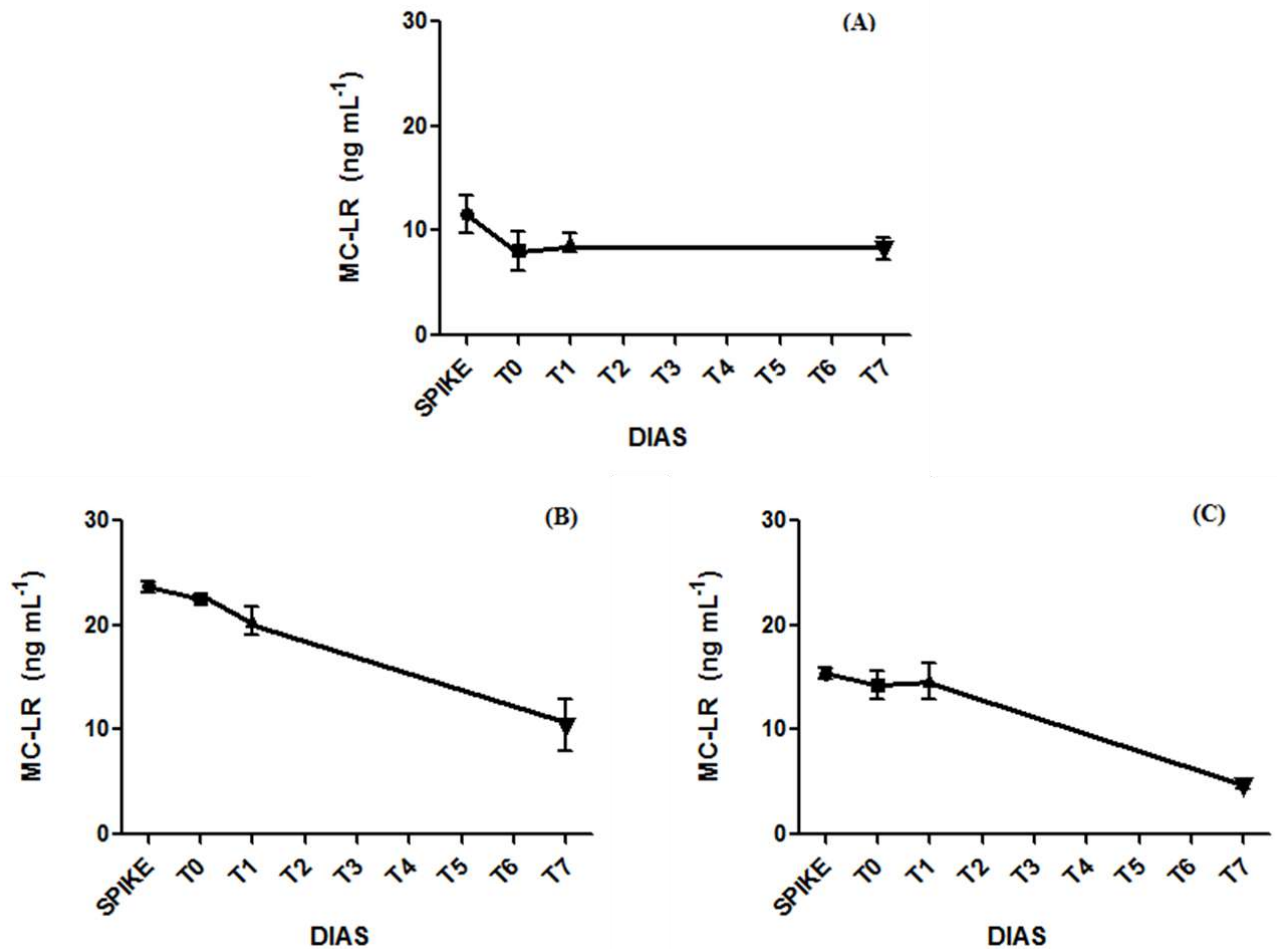
**Figura 12:** Análise do perfil de adsorção da MC-LR ao sedimento em condições sem aeração (A) e com aeração (B). As concentrações estão relacionadas com a toxina remanescente na coluna d'água e as diferenças estatísticas foram admitidas com  $p < 0,05$  de acordo com ANOVA (“*post test*” de Bonferroni) da seguinte forma: \* diferença entre o T específico (dia) e o spike; \*\* diferença em relação ao T0; \*\*\* diferença em relação ao T1. (n=3)

A explicação para o fato de a aeração ter favorecido a adsorção da MC-LR está relacionada à interação da toxina conforme o tipo de partículas disponíveis ou sua quantidade, que aumenta a capacidade de interação física e/ou química (LIU *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011; MAGSHOUDI *et al.*, 2015). Em um processo de aeração, como foi observado na realização do experimento, muitas partículas principalmente as mais finas e mais leves da camada superficial do sedimento, foram ressuspensas para a coluna d'água, disponibilizando assim mais sítios de interação e possibilitando uma maior superfície de contato.

Essa maior eficiência de adsorção da MC-LR ao sedimento mediante aos possíveis processos de acidificação, aumento de temperatura e aeração (além do processo natural de sedimentação) poderia ter como consequência o transporte e entrada da toxina na cadeia alimentar, e em maior quantidade (MORRIS *et al.*, 2000) via organismos bentônicos, o que seria seguido de predação e assim a toxina atingiria níveis tróficos superiores, até chegar ao homem. Por outro lado, a possibilidade de remediação da toxina pela adsorção e consequente sedimentação é algo bastante viável, desde que mais estudos sejam realizados afim de garantir uma maior segurança em relação a disponibilidade da molécula, evitando assim contato futuro com outros organismos.

Foram realizados alguns controles do processo de “adsorção” em relação aos resultados obtidos acima. Optamos por não utilizar como controle o sedimento autoclavado pois, embora um estudo tenha confirmado que não houve adsorção de MCs às partículas do sedimento após o mesmo ter sido autoclavado em comparação ao não autoclavado (GRÜTZMACHER *et al.*, 2010), esse processo influencia na capacidade de adsorção por causar alterações nas partículas do sedimento (TREVORS *et al.*, 1996). Sendo assim, optamos por adicionar azida sódica, que não influencia nas propriedades físicas do sedimento, importantes para a adsorção (MILLER *et al.*, 2001).

Nos resultados mostrados anteriormente a adsorção da MC-LR foi medida com base na diminuição da sua concentração em ensaios contendo sedimento da lagoa (previamente armazenado, congelado e liofilizado para os experimentos) e água da lagoa (filtrada em 0,22 µm). Esperava-se que esses tratamentos da água e do sedimento tivessem eliminado os microrganismos. Porém, um fato bastante interessante foi observado nesse trabalho em relação aos controles dos ensaios de adsorção da MC-LR realizados na interface sedimento/água. Em um desses controles tanto o sedimento (previamente congelado e liofilizado) como a água (filtrada em 0,22 µm) foram tratados com azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), utilizada comumente como um potente inibidor microbiano, que elimina o metabolismo procariótico. O que se pôde observar neste teste (**Figura 13a**), foi uma tendência inicial de adsorção, ainda que não estatisticamente significativa. Assim, estando eliminada qualquer possibilidade de biodegradação (devido a ação da azida sódica) pode-se atribuir esta discreta diminuição na concentração de MC à adsorção apenas. Em outros testes de controle foram adicionadas ao sedimento, previamente congelado e liofilizado), uma quantidade conhecida de água ultrapura e água da lagoa esterilizada (**Figura 13b e c**), com o intuito de revelar apenas a eventual capacidade de adsorção ou degradação da MC-LR pelo sedimento na ausência da água da lagoa. Curiosamente, nestes casos ao contrário do observado com azida, foi possível observar a redução de cerca de 56% (água ultrapura) e 69% (água estéril) da concentração de MC-LR após 7 dias, o que sugere que microrganismos ainda viáveis no sedimento foram capazes de degradar a toxina na coluna d’água.



**Figura 13:** Análise do perfil de adsorção de MC-LR ao sedimento em ensaios controle realizados na interface sedimento-água. Em (A) ensaio com adição de azida sódica ao sedimento e à água da lagoa filtrada em 0,22  $\mu\text{m}$ , em (B) sedimento adicionado de água ultrapura (MilliQ) e em (C) sedimento adicionado de água estéril fervida a 100 °C. As concentrações no gráfico estão relacionadas com a toxina remanescente na coluna d'água e em relação a análise estatística, no experimento da azida não houve qualquer diferença apesar da tendência inicial que seria resultante do processo de adsorção imediato, ao passo que no experimento da água ultrapura e esterilizada o resultado apresentou uma diferença significativa ao longo dos 7 dias pela ANOVA seguida do “*post test*” de tendência e linearidade com um  $p < 0,05$ .

Tais resultados indicam que apesar dos tratamentos do sedimento, este manteve capacidade de biodegradação. Portanto, o processo de biodegradação teria ocorrido simultaneamente ao processo de adsorção nos ensaios apresentados até aqui, assim como visto por LI *et al.*, 2016 e SONG *et al.*, 2014. Logo, os resultados anteriores em relação aos efeitos dos

parâmetros de pH, temperatura e aeração devem ser interpretados sob um outro ponto de vista levando em consideração a presença de biodegradação nessas condições. Em relação a diminuição da concentração de MC-LR evidenciado entre o *spike* e o T0 não se pode descartar, uma vez que os microrganismos provavelmente não são capazes de metabolizar uma molécula orgânica dentro de pouquíssimos minutos, o processo típico de interações físicas e químicas com as partículas do sedimento, como citado anteriormente. Além disso poderia haver a presença de enzimas dissolvidas na coluna d'água capazes de modificar a própria molécula, além de outras substâncias químicas que possam interferir com a estrutura da MC-LR, alterando assim suas características originais o que impossibilitaria a quantificação por LC-MS/MS.

Isso pode ser verificado na **Figura 9**, por exemplo, onde podemos perceber que no pH 3,0 e no pH 5,0 a queda da concentração da toxina na coluna d'água ocorreu apenas no tempo inicial, se mantendo estável ao longo dos 7 dias, ao contrário do pH 8,0 em que se observou inicialmente uma concentração maior de MC-LR (evidenciando uma capacidade de adsorção de MC-LR menor) mas que sofreu uma queda ao longo dos 7 dias, chegando aos mesmos valores finais encontrados nos outros dois pHs. Isso reforça a ideia de biodegradação, já que em pH 8,0 os microrganismos estariam no pH similar ao do ambiente, ótimo para realizar suas atividades metabólicas. Porém, tal fato não inviabiliza a existência de organismos tolerantes a pHs mais baixos, mas que não são capazes de degradar a MC-LR nestas condições.

Como dito anteriormente, nos resultados dos ensaios de temperatura, apesar do ajuste para 45 °C ter sido feito em relação a temperatura atmosférica, a da água ficou próxima de 38 °C. Este aumento da temperatura poderia ter favorecido o metabolismo de muitos microrganismos, especialmente as bactérias tornando-as mais ativas, resultando então na melhor eficiência do processo de biodegradação e consequente diminuição da toxina na coluna d'água como visto na **Figura 11**. Muitos estudos de biodegradação da MC-LR apenas avaliam o processo em temperatura ambiente (cerca de 25°C) (MOU *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016) que também é bastante efetivo (**Figura 11**).

Já em relação a aeração foi possível visualizar a completa eliminação da toxina na coluna d'água ao longo dos 7 dias, em comparação com o experimento sem aeração. Levando em conta a presença de microrganismos nestas condições, isso pode ter ocorrido pelo aumento da concentração de oxigênio dissolvido que favoreceu o metabolismo de microrganismos aeróbicos capazes de degradar a molécula. Tal fato não inviabiliza o metabolismo de microrganismos aneróbicos no

processo de biodegradação da MC-LR, como dito anteriormente, principalmente quando o sedimento se encontra anóxico na lagoa de Jacarepaguá em momentos específicos (INEA, julho 2013, março e dezembro de 2015).

Na **Tabela 7** observamos a eficiência da eliminação da MC-LR pelo processo de adsorção e/ou biodegradação que pode ocorrer por intermédio do sedimento da lagoa de Jacarepaguá. O T0 significa o quanto foi adsorvido imediatamente em relação ao *spike* de MC-LR adicionado em cada experimento, e os tempos posteriores foram avaliados em relação ao T0, sugerindo os possíveis efeitos da adsorção e majoritariamente da biodegradação ao longo do tempo. Resultados com valores 0% (pH e temperatura) indicam que não houve adsorção/biodegradação em relação ao T0, sugerindo um possível retorno da toxina para a coluna d'água, o que de fato não foi comprovado pelos testes estatísticos e, portanto, estes testes precisarão ser repetidos para uma análise mais precisa.

**Tabela 7:** Eficiência de adsorção e/ou biodegradação da MC-LR no sedimento

Experimentos	Adsorção/Biodegradação (%)			
	<i>Spike</i> → T0	T0 → T1	T0 → T4	T0 → T7
pH 3	60% (*)	11%	0%	39%
pH 5	49% (*)	0%	0%	0%
pH 8	28% (*)	19%	27%	56% (*)
Temperatura. 25°C	13%	0%	50% (*)	69% (*)
Temperatura. 45°C	42%	0%	57%	100% (*)
Sem aeração	0%	22% (*)	44% (*)	44% (*)
Aeração	12% (*)	62% (*)	92% (*)	100% (*)
Azida sódica	30%	0%	N/R	0%
Água Ultrapura	4,4%	9,5%	N/R	54% (*)
Água estéril	7%	0%	N/R	67% (*)



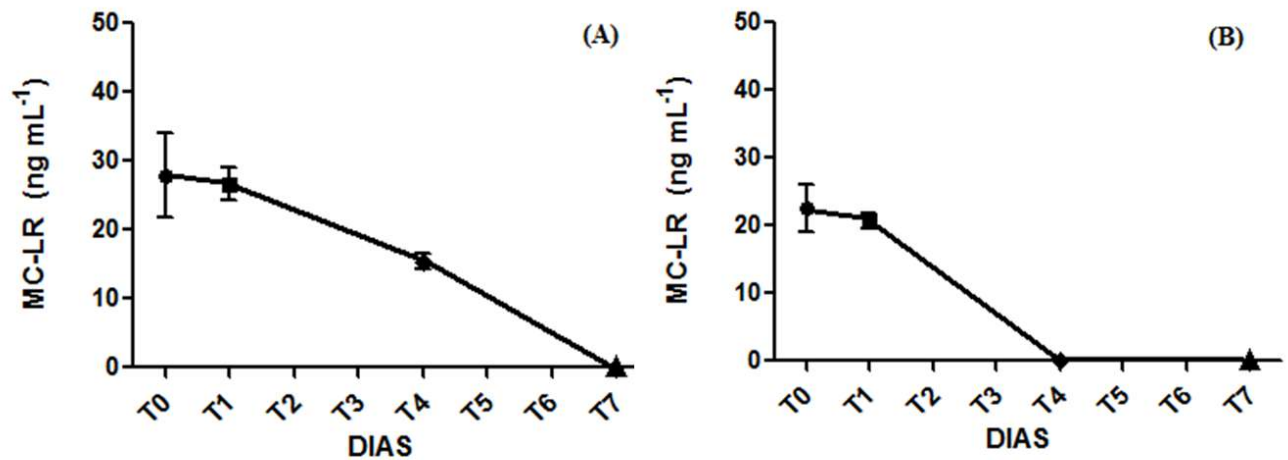
(\*) diminuição da concentração de MC-LR com diferença estatística N/R: não realizado

É possível observar de acordo com a **Tabela 7** que os experimentos pH 8,0, temperatura 25 °C e sem aeração (que foram feitos em condições muito parecidas) se mostraram bastante semelhantes ao longo do tempo, com uma redução gradual da concentração da MC-LR entre 44 e 69% ao final de 7 dias. Quando comparada a influência da acidificação, a redução da concentração da MC-LR não foi eficiente como em pH 8,0 ao final de 7 dias. Já o aumento da temperatura e a aeração causaram maior diminuição da concentração da MC-LR na coluna d'água e indicam uma possível biodegradação da toxina a partir do T1 nestes casos. Logo, os parâmetros analisados, além de não influenciarem significativamente no retorno da toxina para a coluna d'água, podem ter favorecido o processo de biodegradação pelos microrganismos ainda viáveis no sedimento ao longo do tempo.

#### **5.4 EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO**

Nos resultados apresentados neste item, os ensaios foram elaborados com o objetivo de evidenciar o processo de biodegradação de MC-LR a partir de consórcios microbianos recuperados da água e consórcios microbianos recuperados do sedimento da lagoa de Jacarepaguá.

Nestes ensaios o processo de biodegradação da MC-LR foi avaliado a partir de suspensões microbianas recuperadas tanto da água intersticial sedimento como da água (coluna d'água), analisando separadamente a influência dos consórcios de cada compartimento na dinâmica da toxina. Em continuidade aos resultados obtidos na monografia (SANTOS, 2014), onde não foi observada degradação de MC-LR por cepas isoladas da lagoa, os consórcios microbianos com representantes de tamanhos menores que 0,45 µm tanto do sedimento como da água foram testados. Os microrganismos de ambos os compartimentos se mostraram bastante efetivos no processo de biodegradação ao longo de 7 dias, sendo que os microrganismos recuperados da água degradaram mais rapidamente a toxina comparado aos do sedimento (**Figura 14**).

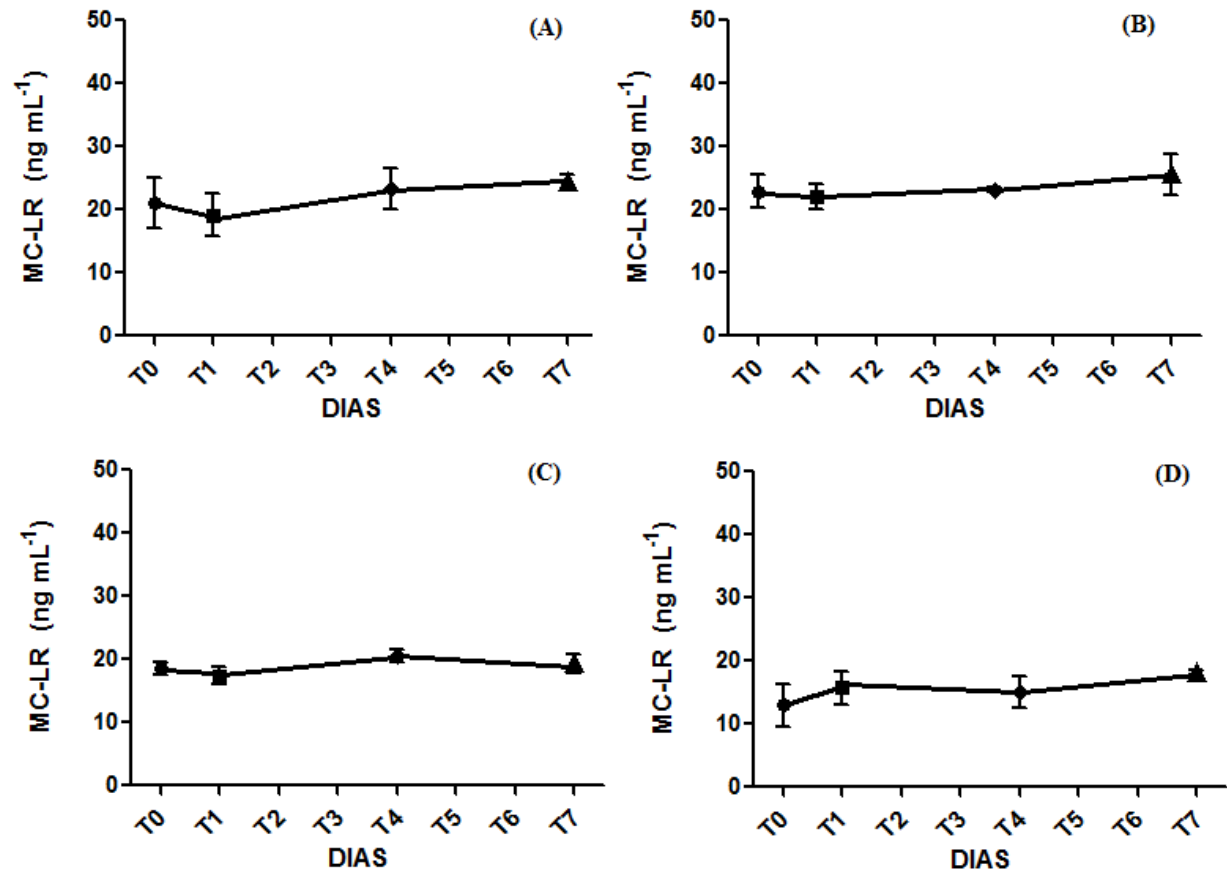


**Figura 14:** Biodegradação da MC-LR ao longo de 7 dias por microrganismos recuperados da água intersticial do sedimento (A) e da água (B) da lagoa de Jacarepaguá. Utilizou-se suspensão filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  da água da lagoa ou da água intersticial do sedimento da lagoa. O processo de biodegradação mostrou-se significativo ao longo dos 7 dias através da ANOVA com o teste de tendência e linearidade *a posteriori*, com um  $p < 0,05$ ).

A biodegradação observada pode ser explicada devido a um contato prévio e contínuo destes microrganismos com a MC, liberada após a senescência de florações de cianobactérias produtoras. Assim, possíveis microrganismos recuperados estariam metabolicamente ativos, caracterizando numa possível adaptação em que os mesmos podem interagir a partir de ações enzimáticas compartilhadas (DZIGA *et al.*, 2013; MOU *et al.*, 2013), o que não restringe a atividade a determinado microrganismo especificamente. Apesar de muitos estudos já terem verificado o processo de biodegradação por microrganismos isolados (JONES *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1996; SAITO *et al.*, 2003; ISHII *et al.*, 2004; LEMES *et al.*, 2008; JIA *et al.*, 2011; NYBOM *et al.*, 2012) isso não ocorreu no nosso caso em tentativas anteriores com linhagens isoladas da lagoa de Jacarepaguá (SANTOS, 2014). Assim, os resultados corroboram com o que foi visto por MOU *et al.*, (2013), no qual os consórcios microbianos são bastante ativos e presentes no processo de biodegradação da MC-LR e talvez sejam mais efetivos, em comparação a uma linhagem isolada, para processos de biorremediação “*in situ*”.

Em relação aos controles estabelecidos para os experimentos de biodegradação, quando a suspensão da água e da água intersticial do sedimento foram filtradas em 0,45  $\mu\text{m}$  e em 0,22  $\mu\text{m}$  e conseqüentemente autoclavadas, não apresentaram qualquer atividade biodegradadora ao longo

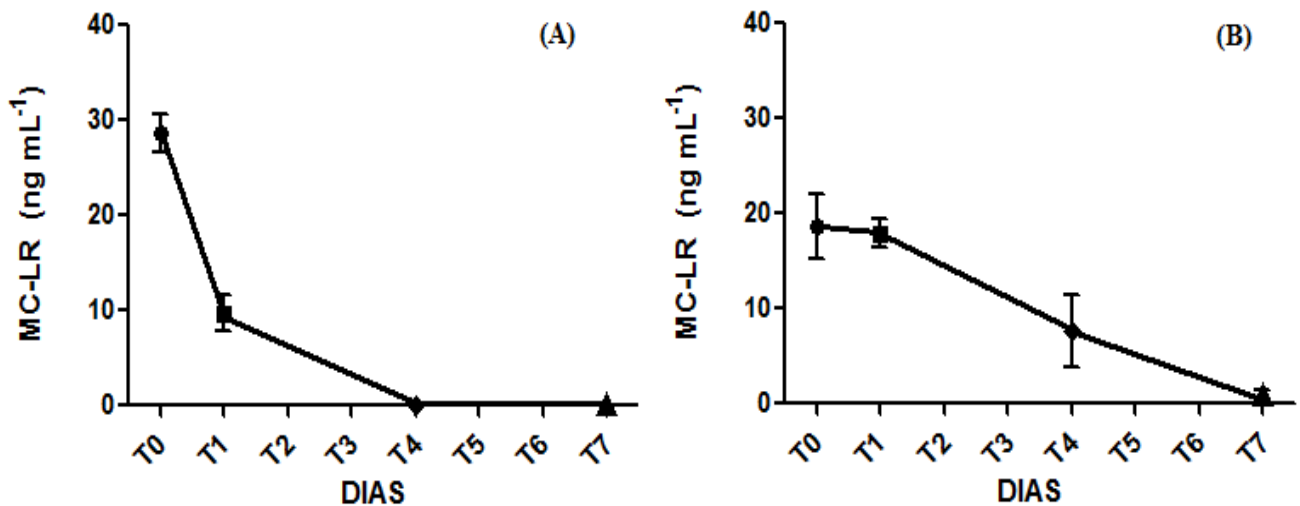
dos 7 dias (**Figura 15**), excluindo a possibilidade de qualquer efeito de adsorção da MC (seja na parede dos frascos ou em prováveis partículas sólidas em suspensão), fotodegradação ou contaminação.



**Figura 15:** Controle de biodegradação de MC-LR a partir da água intersticial do sedimento e da água da lagoa de Jacarepaguá autoclavadas. As suspensões recuperadas a partir da água intersticial do sedimento filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  (A) e 0,22  $\mu\text{m}$  (B) e da água filtrada em 0,45  $\mu\text{m}$  (C) e 0,22  $\mu\text{m}$  (D), foram autoclavadas e os resultados não tiveram diferença estatística ao longo dos 7 dias segundo ANOVA com o teste de tendência e linearidade *a posteriori*, com um  $p < 0,05$ ).

Outro controle realizado no intuito de eliminar a biodegradação foi a adição da tetraciclina, um antibiótico bacteriostático de amplo espectro que inibe a síntese proteica bacteriana através de uma ligação reversível à subunidade 30S do ribossomo, impedindo a ligação entre o aminoacil-tRNA e o complexo ribossômico, essencial para a síntese peptídica (MURRAY, ROSENTHAL e

PFALLER *et al.*, 2009). Esperava-se que o antibiótico agisse diminuindo o potencial de biodegradação, porém surpreendentemente foi observado o contrário. Na água intersticial do sedimento da lagoa os microrganismos foram capazes de degradar a MC-LR mais rapidamente do que nos ensaios anteriores sem antibiótico, e na água o perfil de biodegradação mudou, mas a biodegradação da MC-LR ainda assim foi total (**Figura 16**, comparado com **Figura 14**).



**Figura 16:** Biodegradação de MC-LR a partir da água intersticial do sedimento e da água da lagoa de Jacarepaguá na presença de tetraciclina. A comunidade microbiana foi recuperada da água intersticial sedimento (A) e da água (B) da lagoa e foi adicionada tetraciclina ( $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A concentração inicial da toxina adicionada não foi a mesma para ambos. Houve diferença significativa ao longo dos 7 dias pela ANOVA com o teste de tendência e linearidade *a posteriori*, com um  $p < 0,05$ .

Sendo assim, na presença de tetraciclina o consórcio recuperado a partir da água intersticial sedimento degradou a toxina em um tempo menor (degradação total já no T4), em relação ao consórcio da água. Cabe ressaltar que, uma vez que a tetraciclina é um antibiótico próprio para bactérias para a maioria dos tratamentos na qual é administrada, não se descarta a seleção de outros microrganismos como fungos ou até mesmo bactérias resistentes, e que podem ser exclusivas de determinados ambientes, facilitando e intensificando o processo de biodegradação. Possivelmente houve também uma seleção entre os microrganismos da água (já que continuaram metabolicamente ativos), mas que foram menos efetivos no processo de biodegradação, tendo sido evidenciada a degradação total apenas no T7. Os mecanismos de resistência a antibióticos já foram bem estudados

(podendo ser provenientes de genes presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos) e consistem na diminuição da penetração do antibiótico no interior da célula, no efluxo ativo da molécula para fora da célula, além de modificações enzimáticas (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2009).

A tetraciclina é eficiente para bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo comumente administrada em pacientes com infecções por *Chamydia*, *Mycoplasma* e *Rickettsia*. Segundo ZHANG *et al.*, (2016) em trabalho recente, o índice de diversidade de Shannon-Wiener diminui com o aumento da exposição à tetraciclina em ambiente de lodo ativado, porém indivíduos do filo *Actinobacteria* foram selecionados positivamente acarretando em um aumento significativo (que já era evidente antes da exposição ao antibiótico) a partir de adições contínuas da molécula. Algumas linhagens específicas deste filo já foram isoladas e verificadas para a biodegradação da MC-LR, como as da ordem *Corynebacteriales* e *Micrococcales* (MANAGE *et al.*, 2009; RAMANI *et al.*, 2012).

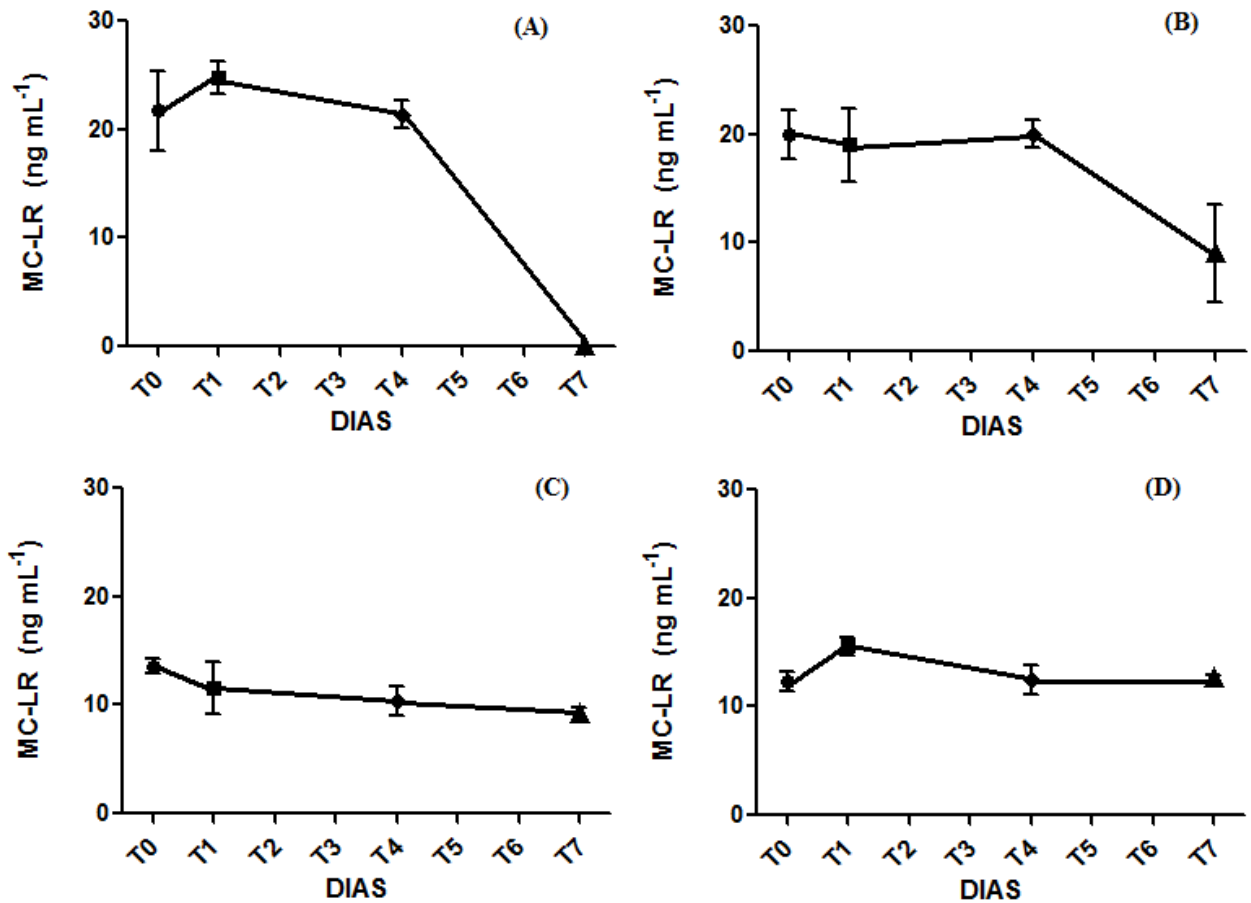
Portanto, os resultados nos mostram que existem microrganismos capazes de biodegradar a MC-LR e que são resistentes a uma classe específica de antibióticos, no caso, a tetraciclina, o que pode ser algo bastante pertinente uma vez que a lagoa de Jacarepaguá recebe efluentes de diferentes origens, incluindo farmacêuticos e hospitalares.

A partir desse resultado, seria possível cogitar uma interação molecular entre tetraciclina e a MC-LR, o que levaria à impossibilidade da toxina ser quantificada pelo tempo de retenção específico e característico no LC-MS/MS. Isso também resultaria na redução da concentração da toxina remanescente na coluna d'água ao longo dos 7 dias, o que dificultaria nossa interpretação em relação ao processo de biodegradação. Porém, caso essa interação molecular ocorresse a toxina sumiria numa mesma concentração ou numa mesma tendência em ambos os casos, o que de fato não foi observado, uma vez que no experimento com consórcio do sedimento a mesma some no T4 enquanto que em relação ao consórcio da água ela diminui cerca de 59% neste tempo (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** Comparação da taxa de biodegradação de cada tempo amostral dos experimentos em relação ao T0. Quando preenchido com 0% há uma indicação de que não houve biodegradação ao longo dos 7 dias segundo o teste estatístico ANOVA com o teste de tendência e linearidade *a posteriori*.

Experimentos	Taxa de biodegradação (%)		
	T0 →T1	T0 →T4	T0 →T7
Sedimento 0,45 µm	4,5%	45%	100%
Água 0,45 µm	9%	100%	100%
Sedimento autoclavada 0,45 µm	0%	0%	0%
Água autoclavada 0,45 µm	0%	0%	0%
Sedimento autoclavado 0,22 µm	0%	0%	0%
Água autoclavada 0,22 µm	0%	0%	0%
Sedimento + Antibiótico	66%	100%	100%
Água + Antibiótico	4%	59%	88%
Sedimento 0,22 µm	0%	0%	100%
Água 0,22 µm	0%	0%	32%

Outro controle com resultado peculiar foi o ensaio em que se testou a biodegradação usando suspensões filtradas em poros de 0,22 µm de diâmetro. Esses filtros são utilizados em muitas pesquisas como uma condição que bloqueia a passagem de bactérias. Porém, nesse estudo, as suspensões recuperadas, tanto do sedimento como da água, a partir do usual processo de filtração em 0,22 µm foram capazes de biodegradar a MC-LR ao longo do tempo (**Figura 17A e B**).



**Figura 17:** Controles de biodegradação da MC-LR a partir das amostras recuperadas tanto da água intersticial do sedimento como da água, filtradas em 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,025  $\mu\text{m}$ . Em (A) e (B) o processo de biodegradação foi observado ao longo de 7 dias para os microrganismos recuperados e filtrados em 0,22  $\mu\text{m}$  do sedimento e da água respectivamente apresentando diferença significativa pela ANOVA com teste de tendência e linearidade *a posteriori*, com um  $p < 0,05$ . Em (C) e (D) o processo de biodegradação não foi observado ao longo dos 7 dias a partir dos filtrados em 0,025  $\mu\text{m}$  do sedimento e da água, respectivamente, assumindo a condição controle dos experimentos e da comunidade microbiana.

É evidente que o processo de diminuição da concentração da MC-LR na coluna d'água, possivelmente pelo processo de biodegradação, foi maior na suspensão recuperada do sedimento, a qual eliminou a toxina totalmente no T7, em relação a suspensão recuperada da água. Porém em ambos os ensaios foi possível verificar que a tendência de redução da MC-LR se manteve semelhante até o T4 (sem qualquer diminuição da toxina em relação ao T0) e começou a diminuir apenas entre esse tempo e o T7, o que sugere um metabolismo lento do consórcio participante,

porém bastante efetivo, principalmente do sedimento (**Tabela 8**). Em contrapartida, não foi evidenciada qualquer diminuição da concentração da toxina em relação a utilização dos filtrados, tanto da água como do sedimento, em filtros de poro de 0,025  $\mu\text{m}$  de diâmetro (**Figura 17C e D**).

Esses resultados sugerem a existência de microrganismos (possivelmente bactérias) menores que 0,22  $\mu\text{m}$ , metabolicamente ativos na lagoa de Jacarepaguá, embora alguns autores sejam contrários a essa possibilidade (MANILOFF *et al.*, 1997) baseados nos requisitos mínimos de tamanho de um organismo vivo para ter um conjunto intracelular de sistemas biologicamente ativos como genoma, ribossomos e proteínas por exemplo, porém existem outras opiniões acerca do assunto. No entanto, o processo não foi observado com os filtrados em 0,025  $\mu\text{m}$ , uma vez que não se têm registros de formas vegetativas ou de resistência a partir dessa faixa de tamanho, corroborando com a inexistência de metabolismo microbiano ativo e que seja capaz de biodegradar a toxina (**Figura 17C e D**)

Alguns autores estudam microrganismos compreendidos entre 50 nm e 400 nm que estão presentes no solo são conhecidos como nanobactérias, ultramicrobacterias e “*dwarfbacterias*” (KAJANDER e CLIFTCIOGLU, 1998; FOLK, 1999; SOINA *et al.*, 2012). Esses microrganismos também poderiam ser formas de resistência devido a condições nutricionais limitantes do meio ou condições de estresse, o que levaria à diminuição do tamanho da bactéria (VELIMIROV *et al.*, 2001). Assim, o metabolismo e/ou crescimento desses microrganismos poderiam ser estimulados pela presença da MC-LR como fonte energética e nutricional.

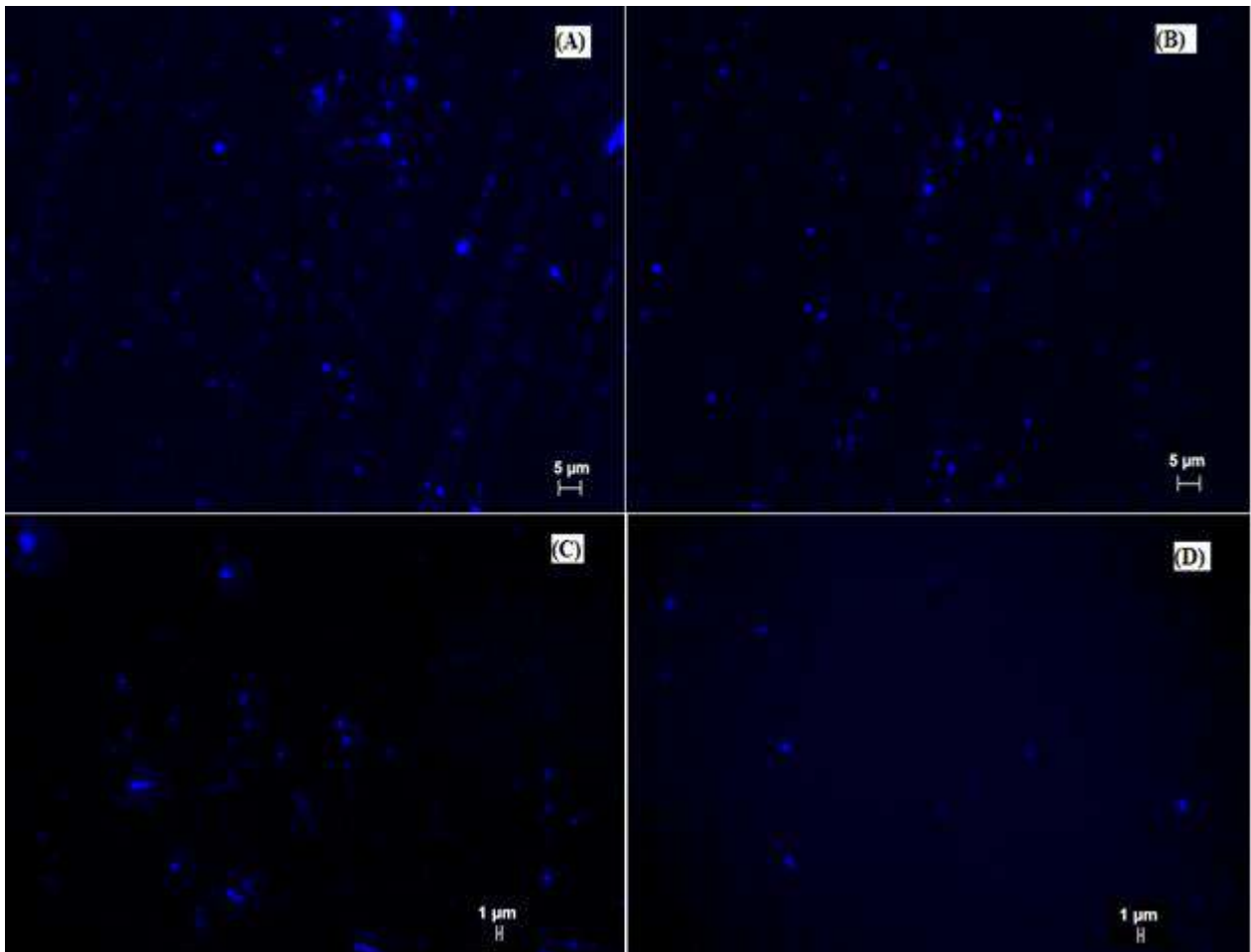
Nanobactérias também são conhecidas pelas nanopartículas calcificantes (KAJANDER e CLIFTCIOGLU, 1998), pelo fato de produzirem uma forma de mineral cristalizado em sua estrutura externa, sendo relacionadas com diferentes condições patológicas humanas, nos rins, na cavidade oral, nas glândulas salivares, dentre outros problemas (YAGHOBEE *et al.*, 2015).

Um estudo baseado em análise filogenética possibilitou classificar sequências de determinada comunidade obtidas no mar mediterrâneo (recuperada a partir de um filtrado em 0,22  $\mu\text{m}$ ) de acordo com as classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (HALLER *et al.*, 2000). Outro estudo caracterizou sequências extraídas do sedimento de fundo de águas subterrâneas classificando-as como sendo pertencentes aos filos candidatos a divisão OD1 e OP11 (MIYOSHI, IWATSUKI e NAGANUMA, 2005). Por conseguinte, alguns estudos relacionaram estes microrganismos isolados com o gênero



*Sphingomonas sp.* (SCHUT *et al.*, 1993; FEGATELLA e CAVICCHIOLI, 2000), que foi o primeiro a ser descrito para a biodegradação de MC-LR.

Isso nos motivou a avaliar em forma preliminar a possível presença de nanobactérias na água da lagoa de Jacarepaguá. Para tal essas suspensões filtradas em 0,22  $\mu\text{m}$  foram concentradas e coradas com DAPI (“4',6'-diamidino-2-phenylindole”) para visualização em microscopia ótica de fluorescência (**Figura 18**).



**Figura 18:** Visualização de bactérias por microscopia ótica de fluorescência. Bactérias foram marcadas com DAPI evidenciando microrganismos da água da lagoa de Jacarepaguá menores que 0,45  $\mu\text{m}$  (A e B), e as possíveis nanobactérias compreendidas abaixo de 0,22  $\mu\text{m}$  (C e D). Imagem obtida diretamente do microscópio de fluorescência (Zeiss® Axioplan)

A **Figura 18** mostra essas possíveis nanobactérias presentes na suspensão filtrada da água em 0,22  $\mu\text{m}$  onde alguns pontos fluorescentes bem pequenos são bastante indicativos.

Será preciso realizar novos experimentos a partir de diferentes coletas em diferentes épocas do ano para avaliar a presença desses tipos de microrganismos na lagoa de Jacarepaguá, uma vez que a biodegradação da toxina pelos consórcios recuperados nessa faixa de tamanho teve diferentes resultados (não mostrados aqui), entre degradação completa, e baixa degradação, de acordo com a amostra obtida em coletas realizadas sob verão intenso (no qual foi evidente o processo de biodegradação) e o inverno chuvoso (no qual o processo de biodegradação não foi bem relatado).

Além disso, deve-se considerar, portanto, que os resultados de biodegradação obtidos pelo consórcio recuperado da água (filtrada em 0,22  $\mu\text{m}$ ) podem influenciar também a interpretação dos resultados de “adsorção”. Isso porque nos ensaios referentes utilizou-se água da lagoa filtrada em 0,22  $\mu\text{m}$  e assim a possível presença de bactérias menores poderia influenciar nos resultados dos parâmetros de pH, temperatura e aeração, contribuindo com a biodegradação.

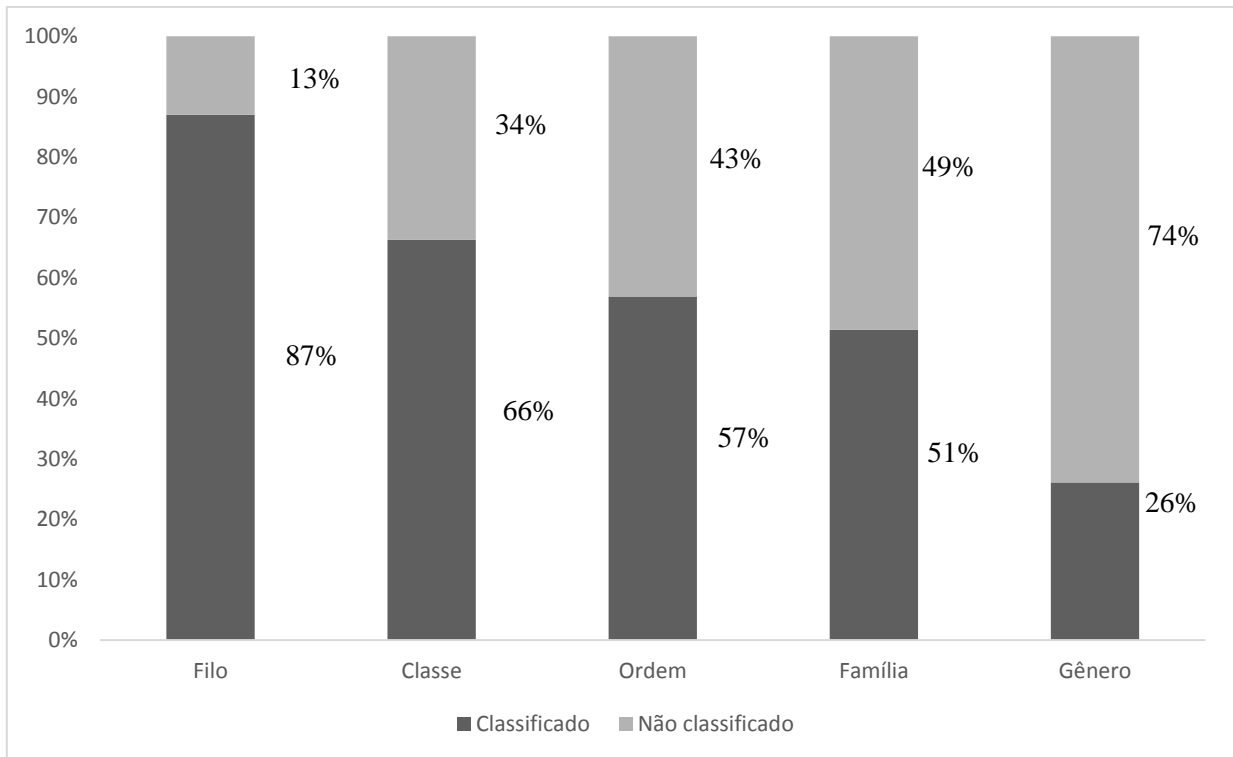
#### 5.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA (METAGENÔMICA)

Com o intuito de caracterizar as bactérias presentes no sedimento e na água da lagoa que pudessem contribuir para a degradação da MC-LR, realizamos a caracterização desses microrganismos através da abordagem de metagenômica. Foram analisadas amostras de água da lagoa e de água intersticial recuperada do sedimento a partir de coletas realizadas em setembro e dezembro de 2014, além disso foi analisada a comunidade extraída diretamente do sedimento bruto. Em todos os casos, comprovou-se que o material coletado tinha capacidade de degradar MC-LR. Portanto foi possível comparar a composição das comunidades bacterianas em duas datas e nos diversos compartimentos estudados.

Para esta caracterização foi sequenciada a região hipervariável v4 do gene 16S rRNA que já é considerada uma sequência suficiente para a classificação taxonômica de uma comunidade microbiana a partir de níveis superiores, principalmente filo (LIU *et al.*, 2007).

Do total de sequências geradas, cerca de 316 mil para cada amostra foram selecionadas após as etapas de verificação de qualidade e a partir destas foi possível caracterizar as comunidades bacterianas com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA. Os dados foram adequados para identificação em nível de Filo. Já para níveis taxonômicos mais baixos, muitas sequências não puderam ser classificadas com base nas informações do banco de dados pesquisado, SILVA (Quast

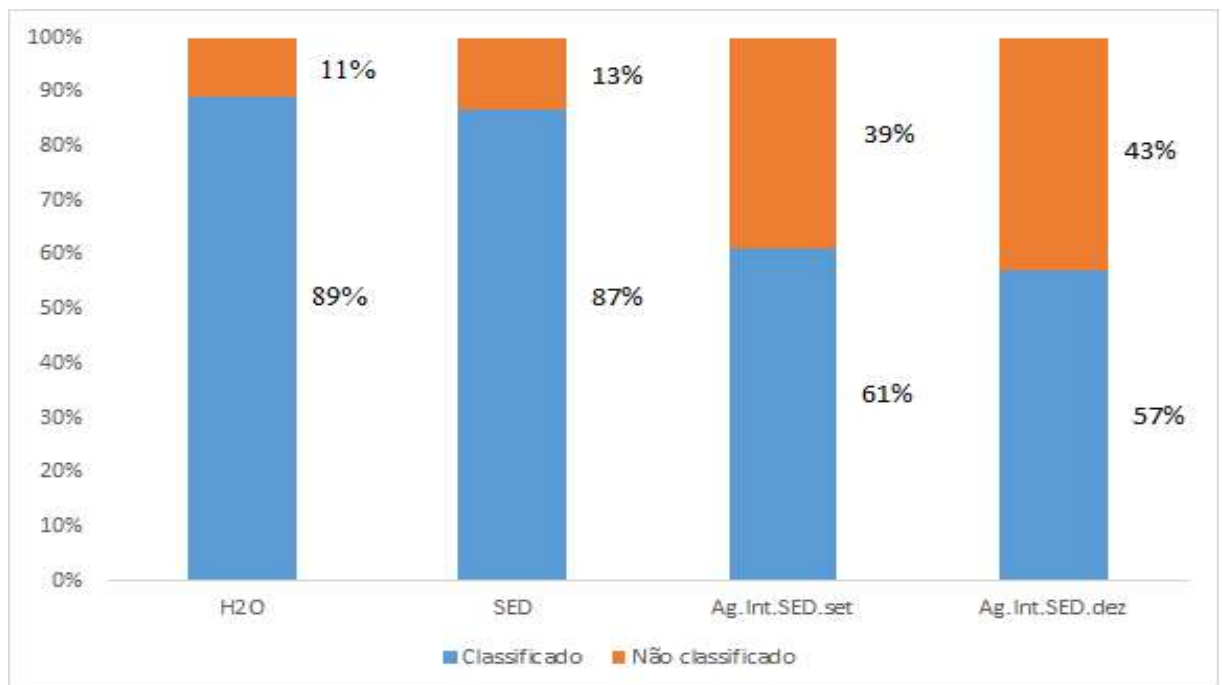
*et al.*, 2013), usado nesse estudo. A **Figura 19** mostra um resultado representativo destas tentativas de identificação, com a diferença entre as proporções de sequências não classificadas e classificadas na amostra do sedimento bruto (o que caracterizaria a comunidade em sua forma mais ampla) em relação aos níveis de filo, classe, ordem família e gênero. Visando uma maior recuperação de identificações, foi escolhida a caracterização de Filo para ser explorada entre as OTUs resultantes e a consequente identificação de acordo com o banco de dados citado. Este quadro já nos indica um grande desconhecimento sobre a composição taxonômica de comunidades microbianas em ambientes naturais, como no sedimento de lagoas costeiras, que se forem exploradas podem resultar em descobertas e caracterização de inúmeros microrganismos, além de poder auxiliar em estudos de bioprospecção de atividades metabólicas de potencial biotecnológico.



**Figura 19:** Proporção de sequências classificadas e não classificadas obtidas através da metagenômica a partir da amostra de sedimento bruto (SED) em relação aos diferentes níveis taxonômicos com base na busca por similaridade ao banco de dados SILVA. Todas as amostras tiveram sequências amplificadas da região v4 do gene 16S rRNA.

Estima-se que apenas cerca de 1% dos microrganismos possam ser cultivados em meios de cultura devido às condições seletivas que os mesmos oferecem para as estirpes (TORSVIK *et al.*, 1990 e 2002), fato esse que resulta na dificuldade de se identificar linhagens e caracterizar os respectivos genomas, tornando muitas sequências de DNA (encontradas principalmente nos estudos de metagenômica) incapazes de serem classificadas taxonomicamente de forma mais precisa, como mostra a **Figura 19**.

Considerando a classificação em filos, a amostra de sedimento bruto (que representa uma comunidade microbiana mais abrangente e representativa do ambiente) e a amostra de água da lagoa tiveram uma grande proporção de sequências classificadas (cerca de 90%), sugerindo uma maior similaridade das sequências recuperadas com marcadores de 16S rDNA de bactérias já caracterizadas e depositadas no banco de dados (**Figura 20**).



**Figura 20:** Proporção de sequências classificadas e não classificadas quanto ao nível de Filo obtidas da água da lagoa (H2O), do sedimento bruto (SED) e da água intersticial do sedimento obtida em setembro e dezembro (Ag.Int.SED.set/dez) através da metagenômica. Todas as amostras obtidas da lagoa de Jacarepaguá continham microrganismos capazes de biodegradar MC-LR.

Já a suspensão recuperada da água intersticial do sedimento tanto de dezembro como de setembro, contendo comunidades microbianas capazes de biodegradar MC-LR, tiveram uma proporção bastante similar de sequências bacterianas classificadas e não classificadas (cerca de 60%-40%, respectivamente), e porém um percentual menor de classificadas em comparação ao sedimento bruto e água (citados acima) o que poderia ser justificado pela seleção de microrganismos compreendidos em uma faixa de tamanho entre 0,45-0,22  $\mu\text{m}$  durante o processo de recuperação da água intersticial do sedimento.

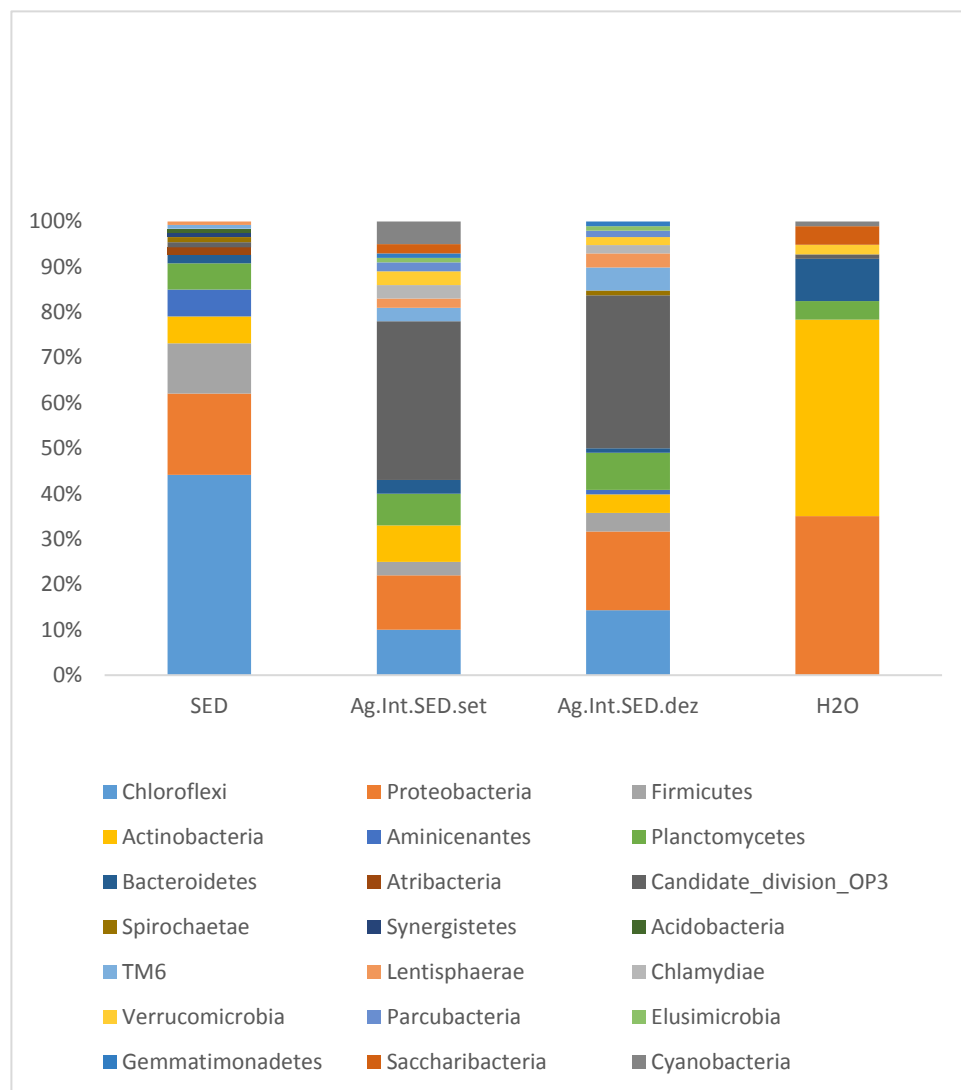
Logo, toda análise e caracterização da composição das comunidades bacterianas das amostras apresentada a seguir foi baseada apenas considerando as sequências classificadas, excluindo assim as não classificadas.

Ao todo foram identificados cerca de 45 filós (compartilhados ou não) nas quatro amostras analisadas, demonstrando a enorme diversidade de bactérias presentes nos compartimentos da lagoa de Jacarepaguá. Já era de se esperar tal diversidade da comunidade bacteriana em um ambiente que recebe diferentes tipos de efluentes, sendo que de forma similar já foi estimada a existência de mais de quatro mil genomas de procariotos em apenas 1 g de solo com elevada quantidade de nutrientes (TORSVIK *et al.*, 1990). Para facilitar a análise comparativa entre as amostras quanto às comunidades bacterianas recuperadas da lagoa, uma vez que muitos dos filós encontrados eram minoritários, optamos por representar somente os filós bacterianos mais abundantes (acima de 1%) (**Figura 21**).

Podemos notar que o perfil das suspensões recuperadas da água intersticial do sedimento, independente da época da coleta realizada (setembro e dezembro de 2014), foram semelhantes, mostrando os seguintes filós mais abundantes: *OP3* (candidato a divisão) com cerca de 30%, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* com cerca de 10%, e *Planctomycetes* e *Actinobacteria* com cerca de 5%. Tal semelhança sugere um equilíbrio da microbiota associada ao sedimento em diferentes épocas, porém seria necessário realizar mais coletas ao longo de diferentes períodos, representando diferentes condições climáticas, para confirmar este dado.

Comparando a composição bacteriana das comunidades recuperadas da água intersticial do sedimento e da água da lagoa (**Figura 21**), ambas contemplando tamanhos entre 0,45-0,22  $\mu\text{m}$ , podemos observar uma grande diferença entre elas, mostrando que as características intrínsecas de cada compartimento são essenciais para delimitar a composição e o perfil dos microrganismos presentes.

A diversidade bacteriana pode ser influenciada por diferentes fatores que irão selecionar linhagens aptas a habitar determinados ambientes, impactando na distribuição espacial e na estrutura das comunidades (FUHRMAN e AZAM, 1980; POMMIER *et al.*, 2007; SCHAUER *et al.*, 2009). Além disso, o pequeno tamanho das bactérias, sua associação a partículas ou matéria orgânica em suspensão na água, podem influenciar na sua dispersão, variando entre locais muito próximos até grandes distâncias. Tal dispersão é uma característica fundamental de organismos cosmopolitas, os quais se apresentam como mais abundantes das comunidades (NEMERGUT *et al.*, 2011).



**Figura 21:** Comparação entre a composição taxonômica (filo) das comunidades bacterianas recuperadas do sedimento (SED), da água intersticial do sedimento de setembro e dezembro

(Ag.Int.SED.set e dez) e da água da lagoa de Jacarepaguá (H<sub>2</sub>O). As comunidades referentes às amostras Ag.Int.SED.set, Ag.Int.SED.dez e H<sub>2</sub>O compreendem bactérias com tamanho entre 0,45 µm e 0,22 µm, e representantes no processo de biodegradação da MC-LR.

Neste estudo podemos perceber dentre os filos mais abundantes identificados na amostra de água da lagoa, estão *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, sendo encontrados nas proporções de 35% e 45% respectivamente. Este dado corrobora os dados de Newton *et al.*, (2011) que verificaram a partir da análise de sequências de genes do 16S rRNA depositadas em bancos de dados retiradas de 69 artigos, que ambos os filos são os mais abundantes em ambientes tanto de água doce como marinhos em diferentes regiões do mundo. A maior proporção de sequências de bactérias conhecidas e organismos já isolados pertencem a estes filos podendo corresponder a cerca de 90% do total. O filo *Proteobacteria* é considerado o mais diversificado dentre as bactérias, através de seus representantes isolados e classificados de acordo com as características do genoma e do aparato bioquímico, com extremas variações morfológicas e metabólicas, sendo dividido em 5 grandes classes mais conhecidas (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*) e classes ainda em processo de classificação. Representantes deste filo também foram encontrados no sedimento bruto (**Figura 21**) e incluem bactérias patogênicas (dentre as entéricas da classe *Gammaproteobacteria*, por exemplo) e as responsáveis pela ciclagem de elementos como nitrogênio e enxofre - pertencentes as classes *Alphaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, respectivamente (NUSSLEIN e TIEDJE, 1999).

Já o filo *Actinobacteria*, ficou bastante representado na água e foi menos abundante na água intersticial do sedimento, muito possivelmente devido à diminuição da concentração de oxigênio neste último (ALLGAIER e GROSSART, 2006; TAIPALE, JONES, TIROLA, 2009). *Actinobacteria*, abrange as bactérias gram-positivas de morfologia filamentosa, e são conhecidas como ‘tipicamente ambientais’ por degradarem matéria orgânica. De fato, o aumento de concentração de matéria orgânica é uma das consequências do intenso aporte fluvial na lagoa de Jacarepaguá, principalmente do rio Arroio Pavuna, devido à poluição (FERNANDES, 1991). Além disso, seu representante patogênico mais importante pertence ao gênero *Mycobacterium* (que inclui os agentes etiológicos da tuberculose e hanseníase), que foi encontrado nos compartimentos da lagoa de Jacarepaguá.

Uma grande diferença foi observada entre a composição das comunidades recuperadas do sedimento bruto e da água intersticial do sedimento (**Figura 21**). Essas diferenças podem ser

explicadas por inúmeros fatores, como diferenças de temperatura, pH mais ácido e um ambiente mais reduzido (**Tabela 5**) selecionando indivíduos bastantes distintos residentes do sedimento bruto (**Figura 21**).

Também no sedimento bruto, assim como na água da lagoa, podemos observar a presença dos filios *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, muito abundantes em ambientes aquáticos e que sugerem a possível participação de seus representantes no processo de biodegradação, uma vez que esse fenômeno foi observado nos consórcios recuperados de ambos os compartimentos. Além disso há uma presença expressiva do filo *Chloroflexi*, metabolicamente diverso, que abrange bactérias verde não-sulfurosas fotossintetizantes e quimiotróficos (aeróbios e anaeróbios), bem como bactérias capazes de utilizar compostos orgânicos halogenados na respiração anaeróbica (MADIGAN *et al.*, 2016), evidenciando um possível papel na biorremediação de poluentes deste tipo na lagoa de Jacarepaguá.

Dentre os organismos deste filo *Chloroflexi*, mais representados no sedimento bruto do que nas suspensões recuperadas da água intersticial do sedimento (cerca de 45% de acordo com a **Figura 21**), temos a presença expressiva de duas subdivisões das classes *Anaerolineae* e *Dehalococcoidia*, (dados não mostrados) que são considerados responsáveis pelo metabolismo anaeróbico dos compostos halogenados (MADIGAN *et al.*, 2016). Os componentes do filo *OP3*, conhecidos cientificamente e provisoriamente como *Omnitrophica* fazem parte dos recém descobertos microrganismos não cultiváveis, de tamanho pequeno em comparação a outras bactérias (cerca de 400 nm de diâmetro) (BROWN *et al.*, 2015) o que justifica a sua abundância na suspensão recuperada da água intersticial do sedimento, que contemplou a faixa de bactérias entre 0,45-0,22  $\mu\text{m}$ . O filo *OP3* ainda é candidato a divisão (assim como muitos) por não ter representante isolado em cultivo cujo genoma fosse conhecido e também não se conhece suas características metabólicas, apesar de diversas sequências já terem sido encontradas em ambientes aquáticos de diferentes locais (HARRIS *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2015). No sedimento bruto, evidenciamos que o filo *OP3* é muito pouco representado em comparação às suspensões recuperadas da água intersticial (**Figura 21**), possivelmente devido ao tipo de interação que as bactérias têm com as partículas presentes no sedimento. Após o processamento desse sedimento para recuperar microrganismos da água intersticial (homogeneização, centrifugação e filtração, por exemplo) pode ter havido algum tipo de seleção, acarretando nessa diferença de composição. Já o filo *Chloroflexi* se mostrou mais abundante no sedimento bruto, o que pode reforçar a condição de



baixa quantidade de oxigênio na qual o sedimento se encontra, favorecendo os microrganismos anaeróbios/anaeróbios facultativos, como citado anteriormente. Tal explicação também se aplica à presença do filo *Firmicutes*, onde bactérias da classe *Clostridia* (que possui representantes patogênicos bastante encontrados no sedimento, como os do gênero *Clostridium*, e que são anaeróbios estritos - causadores do tétano e botulismo) e também da classe *Bacillales* (anaeróbios facultativos) são formadoras de endósporos e comuns nos ambientes de solo/sedimento (MADINGAN *et al.*, 2016).

Também procuramos no conjunto de sequências recuperadas a presença de bactérias já descritas como degradadoras da toxina ao redor do mundo. A **Tabela 9** mostra uma relação da identificação taxonômica de gêneros já reportados em estudos anteriores como capazes de biodegradar as MCs e que foram encontrados nas amostras sequenciadas do nosso estudo. De fato, estes representantes estão presentes nas suspensões recuperadas tanto da água como do sedimento, o que confirma a existência de linhagens bacterianas metabolicamente capazes de eliminar a MC-LR constantemente liberada na lagoa de Jacarepaguá. Vale ressaltar que a atividade de biodegradação foi avaliada pela ação de consórcios microbianos, o que não invalida o compartilhamento de funções através de vias enzimáticas distintas entre os participantes do processo, o que dificultaria ainda mais o isolamento de uma linhagem específica deste ambiente capaz de degradar a toxina. Estes dados também não inviabilizam a presença de outros tipos de microrganismos (dentre bactérias de gêneros distintos até arquea, fungos e protozoários) não cultiváveis, também capazes de degradar a toxina e que podem participar do processo de biodegradação.

De acordo com LI *et al.*, (2016) os organismos representantes do filo *Proteobacteria* são, possivelmente, os mais influentes no processo de biodegradação da MC, uma vez que em um ensaio de degradação de toxina, após 7 dias de exposição a participação do mesmo aumentou quase três vezes em relação a sua proporção inicial no tempo zero de exposição. No presente estudo não pudemos realizar essa abordagem de caracterizar a alteração da composição da comunidade bacteriana antes e após a exposição à toxina para avaliarmos seu perfil de seleção, mas observamos a presença deste filo em grande quantidade tanto na água quanto no sedimento, e ambos os compartimentos tiveram contato prévio com a toxina após a liberação celular proveniente das constantes florações encontradas nesse ambiente. Planejamos dar continuidade e observar esse

fenômeno de alternância da comunidade bacteriana dos compartimentos da lagoa após exposição a MC-LR.

**Tabela 9:** Identificação de gêneros bacterianos já descritos na literatura como biodegradadores da MC-LR e que estão presentes na lagoa de Jacarepaguá. \*Ag.int.Sed (significa água intersticial recuperada do sedimento, em setembro e dezembro).

Gênero de bactérias	Nº Sequências encontradas				Referências
	Ág.Int.SED.set	Ág.Int.SED.dez	SED	H <sub>2</sub> O	
<i>Rhodococcus</i>	5	9	16	0	Manage <i>et al.</i> , 2009
<i>Microbacterium</i>	9	9	16	1	Ramani <i>et al.</i> , 2012
<i>Burkholderia</i>	56	7	3	9	Lemes <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus</i>	7	20	578	3	Alamri, 2010
<i>Ralstonia</i>	956	91	18	145	Yan <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas</i>	458	17	1	4	Takenaka e Watanabe, 1997
<i>Novosphingobium</i>	15	35	5	18	Jiang <i>et al.</i> , 2011
<i>Sphingomonas</i>	5	7	2	16	Jones <i>et al.</i> , 1994; Bourne <i>et al.</i> , 1996; Saito <i>et al.</i> , 2003; Saitou <i>et al.</i> , 2003; Ishii <i>et al.</i> , 2004; Valeria <i>et al.</i> , 2006
<i>Acinetobacter</i>	288	1	1	9	Li e Pan, 2014
<i>Paenibacillus</i>	12	38	250	3	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Methylothermobacter</i>	382	18	6	8448	Mankiewicz-Boczek <i>et al.</i> , 2015
<i>Methylobacillus</i>	12	1	1	249	Hu, Yang e Zhou, 2009

Vale ressaltar que inúmeros microrganismos isolados em diferentes locais do mundo capazes de biodegradar essa molécula, e que foram encontrados na lagoa de Jacarepaguá pertencem ao filo *Proteobacteria*, inclusive as primeiras linhagens de bactérias capazes de degradar são pertencentes à família *Sphingomonadaceae* (JONES *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1996). Esses microrganismos também foram evidenciados posteriormente em outros estudos (SAITOU *et al.*, 2003; ISHII *et al.*, 2004; OKANO *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2011). De modo geral, indivíduos pertencentes a esta família, principalmente o gênero *Sphingomonas* são amplamente distribuídos em ambientes

aquáticos e terrestres, têm metabolismo aeróbico e são conhecidos pela habilidade em metabolizar uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo os aromáticos decorrentes de contaminação ambiental (MADIGAN *et al.*, 2016). Nas amostras respectivas da lagoa de Jacarepaguá esses indivíduos foram pouco encontrados em número de sequências similares ao banco de dados, o que não invalida sua possível participação da biodegradação da MC-LR.

## 6. CONCLUSÕES

- Alterações no pH, na temperatura atmosférica e aeração não foram capazes de dessorver (e conseqüentemente retornar para a coluna d'água) a MC-LR presente no sedimento coletado da lagoa de Jacarepaguá.
  
- A MC-LR foi rapidamente adsorvida ao sedimento quando existe uma maior aeração do meio e um menor pH, já o aumento da temperatura atmosférica resultou em uma tendência de adsorção maior do que o controle, porém não foi significativo.
  
- Os resultados dos controles do sedimento com azida sódica, com água ultrapura e com água estéril sugerem que o processo de adsorção da MC-LR é imediato e acontece simultaneamente ao processo de biodegradação, que seria majoritário ao longo do tempo.
  
- Os consórcios microbianos recuperados tanto da água como da água intersticial do sedimento da lagoa de Jacarepaguá foram capazes de biodegradar a MC-LR ao longo de 7 dias.
  
- Os consórcios microbianos, recuperados tanto da água como da água intersticial do sedimento, tratados com o antibiótico tetraciclina, potencializaram o processo de biodegradação da MC-LR ao longo de 7 dias, sugerindo uma seleção positiva de microrganismos participantes do processo de biodegradação.
  
- Suspensões recuperadas da água intersticial do sedimento e da água da lagoa filtradas em 0,22  $\mu\text{m}$  foram capazes de biodegradar MC-LR ao longo de 7 dias, sugerindo a presença de microrganismos menores que 0,22  $\mu\text{m}$ , conhecidos como nanobactérias, nos compartimentos da lagoa de Jacarepaguá.

- Através da metagenômica foi possível observar uma diferença da composição da comunidade bacteriana recuperada da água intersticial do sedimento e da água, participante do processo de biodegradação da MC-LR.
- A composição das comunidades bacterianas recuperadas da água intersticial do sedimento nos meses de setembro e dezembro de 2014, capazes de biodegradar MC-LR foi bastante semelhante, o que sugere uma estabilidade desta comunidade no sedimento.
  
- Através da metagenômica foi possível observar a presença de bactérias (tanto na água intersticial do sedimento como na água), já descritas pela literatura como capazes de biodegradar MC-LR. Alguns dos gêneros encontrados foram: *Burkholderia*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingomonas* e *Methylothermobacter*.
  
- O processo de adsorção mediante alterações como acidificação do pH, aumento da temperatura e aeração, simultâneo ao processo de biodegradação podem ser uma forma segura de limitar a disponibilidade da MC no ambiente aquático, porém mais estudos precisam ser feitos para avaliar o potencial ecotoxicológico dos produtos gerados após o processo de biodegradação.

## 7. PERSPECTIVAS

Pretendemos aprofundar o conhecimento do processo de biodegradação das MC-LR por microrganismos nativos da lagoa de Jacarepaguá estigir incluindo os seguintes pontos:

**7.1** - Verificar se a disponibilidade de MC-LR afeta a composição da comunidade microbiana recuperada da lagoa de Jacarepaguá (água e sedimento). Para tal, consórcios microbianos serão recuperados da lagoa, em seus respectivos compartimentos, e mantidos na presença ou ausência de MC-LR por período de tempo necessário para degradação completa. Em seguida, verificaremos por metagenômica se ocorre diferença da composição da comunidade microbiana que possivelmente será selecionada e/ou eliminada após a exposição à MC-LR.

- Verificar se a exposição continuada à MC-LR afeta a capacidade de degradação da comunidade microbiana recuperada da lagoa de Jacarepaguá (água e sedimento). Testar se ocorre adaptação metabólica da comunidade microbiana quando exposta à presença contínua de MC-LR, a partir de adições continuadas da toxina (ao fim de cada ciclo de degradação total) a consórcios microbianos recuperados da lagoa. Ao longo do tempo, em cada amostragem será analisada a eficiência da biodegradação, com o objetivo de avaliar se a degradação será cada vez mais eficaz em resposta às exposições a toxina (adaptação metabólica e/ou dependência energética), menos eficaz (toxicidade) ou se manterá com uma resposta constante (adaptação).

- Avaliar a capacidade de biodegradação da MC-LR por um consórcio microbiano recuperado de um ambiente aquático sem prévia exposição a florações de cianobactérias, no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ), onde espera-se que não haja seleção favorável de microrganismos capazes de degradar a toxina. Nesses consórcios seriam testados os efeitos de adição contínua de MC-LR, comparando a capacidade de adaptação e eficiência do processo de biodegradação com um consórcio já adaptado, como o da lagoa de Jacarepaguá.

- Verificar o efeito da sazonalidade na composição da comunidade microbiana capaz de degradar MC-LR, e na capacidade/eficiência do processo de biodegradação. Resultados prévios mostraram perfis distintos de degradação (mais ou menos eficiente ao longo de 7 dias) a partir de consórcios microbianos recuperados da água e do sedimento da lagoa, conforme a época das coletas (verão, inverno, intensidade de precipitação). A variação sazonal pode influenciar a composição da comunidade microbiana e conseqüentemente a atividade de biodegradação. Por isso, testes de biodegradação de MCYST-LR serão realizados com comunidades microbianas recuperadas dos

compartimentos da lagoa a partir de um número maior de coletas, abrangendo a variação sazonal, com o intuito de avaliar a possível variação da ocorrência da biodegradação e se a comunidade capaz de degradar MC se mantém inalterada ou varia em sua composição, isto é, se a atividade metabólica de degradação pode ser derivada de uma composição taxonômica distinta.

**7.2.** Confirmar se nanobactérias estão presentes na microbiota da lagoa de Jacarepaguá e se são capazes de degradar MC-LR. Resultados prévios indicaram que a fração de água da lagoa e fração recuperada do sedimento, de tamanho menor que 0,22  $\mu\text{m}$ , foi capaz de degradar a toxina. Pretendemos confirmar este resultado com um número maior de testes usando consórcios recuperados da lagoa em diferentes épocas. Caso haja degradação pretendemos caracterizar morfológicamente (microscopia eletrônica) e geneticamente (metagenômica) as nanobactérias possivelmente envolvidas.

**7.3.** Verificar a degradação de MC-LR mimetizando uma condição real do ambiente aquático em relação a uma floração tóxica de cianobactéria com consequente liberação da toxina. Até o momento foram realizados experimentos de degradação com uma concentração de microcistina ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) muito abaixo da encontrada em uma floração de cianobactérias produtoras, devido a limitações na obtenção da toxina purificada em laboratório. Além disso, os testes foram realizados apenas com a toxina pura, visto que no ambiente, após a morte celular, muitos outros compostos são liberados o que poderá acarretar em uma seletividade por parte dos microrganismos. Logo, avaliar a capacidade de degradação da toxina proveniente de um cultivo de *Microcystis*, mimetizando uma condição real do ambiente aquático, pretendemos testar a capacidade/taxa de biodegradação pelo consórcio microbiano recuperado dos compartimentos da lagoa, em comparação ao processo já estudado com a toxina pura.

**7.4.** Testar o potencial tóxico dos produtos de degradação gerados pelo consórcio microbiano, uma vez que os diferentes efeitos tóxicos da MC-LR já foram observados em organismos aquáticos, mamíferos e até no homem. Logo, é necessário avaliar se os produtos gerados a partir da biodegradação também teriam um potencial tóxico, o que comprometeria o uso desta abordagem como uma forma de remediação. Assim, serão realizados bioensaios usando produtos de degradação da MC-LR por microrganismos da água. Serão testados os efeitos de toxicidade aguda (morte e imobilidade) sobre um representante da comunidade zooplanctônica (*Daphnia*).

## 8. REFERÊNCIAS

- ALAMRI, S.A. (2010). Biodegradation of microcystin by a new *Bacillus* sp. Isolated from Saudi fresh water lake. *Afr.J.Biotechnol.* 9:6552–6559.
- ALLGAIER, M., e GROSSART, H. P. (2006). Diversity and seasonal dynamics of Actinobacteria populations in four lakes in northeastern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3489–3497
- ANDRINOLO, D.; SEDAN, D.; TELESE, L.; AURA, C.; MASERA, S.; GIANUZZI, L.; MARRA, C.A. & ALANIZ, M.J.T. (2008). Hepatic recovery after damage produced by sub-chronic intoxication with the cyanotoxin microcystin-LR. *Toxicon.* 51: 457-467.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2000). *Control of Communicable Diseases Manual*. J. Chin, Editor. Washington, DC. 624 pp
- AZEVEDO, S.M.F.O. (1998). Toxinas de Cianobacterias: causas e consequências para a saúde pública. *Medicina on line.* 1(3):1-22
- AZEVEDO S. M., CARMICHAEL W. W., JOCHIMSEN E. M. et al. (2002) Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181–182, 441–6;
- BARFORD, D. e KELLER, J. (1994). Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR. *J.Mol.Biol.* 235, 763-766
- BECKER, L.C., CARMICHAEL, W., KIRKPATRICK, B., WILLIAMS, C., IRVIN, M., ZHOU, Y., JOHNSON, T.B., NIERENBERG, K., HILL, V.R., KIESZAK, S.M., CHENG, Y.S. (2008). Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Mar. Drugs* 6, 389–406
- BOARU, D. A., DRAGOS, N., SCHIRMER, K. (2006): Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology*, 218(2):134 – 148.
- BOTES, D. P., TUINMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, J. (1984): The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1:2311–2318;
- BOTHA, N, VAN DE VENTER, M., DOWNING, T. G., et al. (2004). The effect of i.p.ly administered microcystin-LR on the gastrointestinal tract of Balb/c mice. *Toxicon*, 43(3): 251-254.
- BOURNE, D. G., JONES G. J., BLAKELEY R. L., JONES A., NEGRI A. P. & RIDDLES P. (1996) Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial Cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4086–4094.
- BOURNE, D. G., RIDDLES P., JONES G. J., SMITH W. & BLAKELEY R. L. (2001) Characterization of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environ. Toxicol.* 16:523–34
- BLANK, C.E e SÁNCHEZ-BARACALDO, P. (2010). Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria – A key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology.* 8:1–23.
- BRASIL (2004). Portaria n° 518, 25 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do BRASIL, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. 70 p.



- BRASIL (2012). Ministério da Saúde. Portaria n. 2.914 de 4 de Janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1epagina=43edata=04/01/2012>.
- BROWN, C. T; HUG, L. A, THOMAS, I. S; SHARON, I., CASTELLE, C. D; SINGH, A; WILKINS, M. J; WRIGHTON, K. C; WILLIAMS, K. H; BANFIELD, H. F. (2015). Unusual Biology Across a Group Comprising More than 15% of domain Bacteria. *Nature*, 523, 2008-2011.
- BOUVY, M., MOLICA, R., OLIVEIRA, S., MARINHO, M., BEKER, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquat. Microb. Ecol.*, 20:285-297.
- BURATTI, F. M., SCARDALA, S., FUNARI, E., AND TESTAI, E. 2011. Human glutathione transferases catalyzing the conjugation of the hepatotoxin microcystin-LR. *Chem. Res. in Toxicol.* 24(6): 926-933.
- CANE, D.E., WALSH, C.T. & KHOSLA, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations and mutations. *Science* 282:63-68
- CAREY, C.C., IBELINGS, B.W., HOFFMANN, E.P., HAMILTON, D.P., BROOKES, J.D. (2012). Ecophysiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Wat. Res.* 46, 1394-1407
- CARNEIRO, R. L., ALÍPIO, A. C. N., BISCH, P. M., AZEVEDO, S. M. F. O., e PACHECO., A. B. F. (2011). The inhibitory effect of calcium on *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) metabolism. *Br. J of Microb SBM* 42: 1547–1559.
- CARNEIRO, R. L., PACHECO., A. B. F., AZEVEDO, S. M. F. O. (2013). Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Mar. drugs Multidisc. Digit. Publ. Inst.* 11: 2949–2963.
- CARMICHAEL, W. W. (1992) Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445–59.
- CARMICHAEL, W.W (1994). The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 270(1): 78-86.
- CARMICHAEL, W.W. e AN, J.S. (1997): The cyanotoxins. *Adv Bot Res*, 27, 221-212
- CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M., AN, J.S., MOLICA, R.J., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K (2001). Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109:663–668.
- CARMOUZE, J. P. (1994). O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo - Editora Edgard Blücher – FAPESP. p.253
- CASTENHOLZ, R.W. e WATERBURY, J.B. (1989) In: J.T. STALEY, M.P. BRYANT, N. PFENNING and J.G. HOLT [Eds] *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, Williams & Wilkins, Baltimore, 1710-1727
- CASTENHOLZ, R.W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. P. 473-600. In: Boone, D.R. e Castenholz, R.W. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. The Archae and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, Volume One*. Springer-Verlag, New York, 721p.
- CHEN, T., SHEN, P., ZHANG, J. (2005). Effects of microcystin-LR on patterns of iNOS and cytokine mRNA expression in macrophages in vitro. *Envir. Toxicol.* 20(1): 85-91.
- CHEN, Y-M., LEE, T-H., LEE, S-J., HUANG, H-B., HUANG, R., CHOU, H-N. (2006). Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins. *Toxicon.* 47(7):742-746.

- CHEN, W., LI, L., GAN, N., SONG, L. (2006). Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments. *Environ. Pollut.* 143(2):241-246.
- CHEN, W.; SONG, L.; PENG, L.; WAN, N.; ZHANG, X. and GAN, N. (2008). Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions. *Wat.Res* 42:763 – 773
- CHEN, X., YANG, X., YANG, L., XIAO, B., WU, X., WANG, J., WAN, H. (2010). An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Wat.Res.* 44(6):1884-1892.
- CODD, G.A. (1984). Toxins of freshwater cyanobacteria. *Microbiol. Sci.* 1(2): 48-52.
- CHORUS, I., BARTRAM, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E and FN Spon, London and New York; 2ed.
- CYPRIANO, E.F. (2009). Distribuição espacial de mercúrio nos sedimentos do complexo lagunar da baixada de Jacarepaguá (RJ). Monografia apresentada ao Departamento de Oceanografia e Hidrologia (Instituto de Geociências – UERJ) para a obtenção d bacharelado em Oceografia. p.96
- DAWSON, R. (1998): The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36(7):953 – 962.
- DEBLOIS, C. P., GIANI, A., AND BIRD, D. F. (2011). Experimental model of microcystin accumulation in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed subchronically to a toxic bloom of *Microcystis* sp. *Aqua. Toxicol*; 103: 63-70.
- DIAS, E., ANDRADEA, M., ALVERCA, E., PEREIRA, P., BATOREU, M. C. C., JORDAN, B. P., SILVA, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *M. aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*. 53(2):487-495
- DICKSON, K.I., MAKI, A.W., BRUNGS, W.A. (1987). Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems. SETAC publications series. Publication sponsored by the Soc. of Environ. Toxicol. and Chem. 1<sup>st</sup> edition. Pergamon Press
- DIETRICH, D. AND HOEGER, S. (2005). Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 203: 273-289
- DING, W. X., SHEN, H. M., SHEN, Y. (1998)a. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Persp.* 106(7): 409-413.
- DING, W. X., SHEN, H. M., ZHU, H. G., AND ONG, C. N. ONG. (1998)b. Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ.Res.* 78(1): 12- 18.
- DING, W. X., SHEN, H. M. and ONG, C. N. (2001). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *J. of Toxicol and Environ Health, Part A*, 64(6): 507-519.
- DITTMANN, E., NEILAN, B.A., ERHARD, M., VON DOËHREN, H. & BOËRNER, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.* 26:779-787.
- DITTMANN, E., FEWER, D.P., NEILAN, B.A. (2013). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:23–43

- DREWS, G. e WECKESSER, J. (1982). Function, structure, and composition of cell wall and external layers. In: Carr, N.G, WHITTO, B.A, ed. *The Biology of Cyanobacteria*. Oxford: Blackw. Scient. Publicat. 333-357
- DZIGA, D., WASYLEWSKI, M., WLADYKA, B., NYBOM, S., MERILUOTO, J. (2013). Microbial degradation of microcystins. *Chem.Res.Toxicol.* 26:841–852.
- EDGAR, R. C., HAAS, B. J., CLEMENTE, J. C., QUINCE, C., & KNIGHT, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 2 (16):2194–2200
- ENDO, Y. & NISHITSUTSUJI-UWO, J. (1980). Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathological Changes in the Silkworm Midgut. *J. of Inverteb. Pathol.* 36:90-103.
- ERIKSSON, J. E., GRONBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J.P. & MERILUOTO, J.A.O. (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 60-66.
- EVERS, R. e CHU, X.Y. (2008). Role of the Murine Organic Anion-Transporting Polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in Drug Disposition and Hepatotoxicity. *Molec.Pharma.* 74(2):309– 311.
- FALCONER, I. R. e YEUNG, D.S. (1992): Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chemico-Bio Interact.*, 81(2):181-196.
- FALCONER, I. R., HUMPAGE, A.R. (1995): Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. *Internat. J. of Environ Res. and Pub Health*, 2(1):43–50.
- FAWELL, J. K., MITCHELL, R. E., EVERETT, D. J., AND HILL, R. E. (1999). The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse. *Hum. & Exp. Toxicol.* 18(3): 162-167.
- FEGATELLA, F. e CAVICCHIOLI, R. (2000). Physiological responses to starvation in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. *Appl Environ Microbiol* 66(5):2037-2044.
- FERNANDES, H. R. S. M (1991). Abordagem Geoquímica no estudo da poluição por metais pesados nos sistemas fluvial e lagunar da Baixada de Jacarepaguá–RJ. Tese (Mestrado em Geoquímica) – Departamento de Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, Niterói. Pp.122.
- FERRÃO-FILHO, A.S., DOMINGOS, P., AZEVEDO, S.M.F.O.(2002). Influences of a *Microcystis aeruginosa* Kützing bloom on zooplankton populations in Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro - Brazil). *Limnologica*, 32:295-308.
- FERRÃO-FILHO, A.D, KOZLOWSKY-SUZUKI, B., (2011). Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs* 9, 2729–72
- FISCHER, W., ALTHEIMER, S., CATTORI, V., MEIER, P., DIETRICH, D., HAGENBUCH, B. (2005): Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxic and App Pharm*, 203(3):257 – 263.
- FIUZA, L. M., NIELSEN-LEROUX, C., GOZE, E., FRUTOS, R., CHARLES, J.F. (1996). Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1544-1549.
- FOLK, R.L (1999). Nannobacteria and the Precipitation of Carbonate in Unusual Environments, *Sediment. Geol.* 126:47–55.
- FUHRMAN, J. A. e AZAM, F. (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of british columbia, antarctica, and california. *Appl Environ Microbiol.* 39(6):1085-1095.

- FUNARI, E. AND TESTAI, E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 38: 97-125
- GEHRINGER, M. M. 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. *FEBS Letters*, 557(1-3): 1-8.
- GERT-JAN DE MAAGD, P., HENDRIKS, A., SEINEN, W., e SIJM, D. T. H. M. (1999). pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Wat. Res.* 33:677–680.
- GOLDBERG J, HUANG H.B, KWON Y.G, GREENGARD P, NAIRN A.C, and KURIYAN J. (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376, 745-753
- GOMES, A.M.A., OLIVEIRA, A.C.P., AZEVEDO, S.M.F.O. (2009). Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de microcistinas (cianotoxina). *Oecol. Brasil.* 13:402-412.
- GOMES, A.M.A. (2011). Estudo fisiológico de cianobactérias formadoras de florações na lagoa de Jacarepaguá (RJ). Tese de doutorado submetida ao IBCCF (UFRJ) – p.143
- GUZMAN, R. E., SOLTER, P. F., 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal Microcystin LR exposure. *Toxicol Path.* 27: 582–588.
- GRÜTZMACHER, G., WESSEL, G., KLITZKE, S., CHORUS, I., (2010). Microcystin elimination during sediment contact. *Environ. Sci. Technol.* 44 (2): 657-662.
- HALLER, C.M., RÖLEKE, S., VYBIRAL, D., WITTE, A., VELIMIROV, B. (2000). Investigation of 0.2 µm Filterable Bacteria from Western Mediterranean Sea Using a Molecular Approach: Dominance of Potential Starvation Forms, *FEMS Microbiol. Ecol.* 31:153–161.
- HARADA, K.I, TSUJI, K., WATANABE, M.F., KONDO, F. (1996b). Stability of microcystins from cyanobacteria-effect of pH and temperature. *Phycologia* 35:83–88
- HARRIS, J. K., KELLEY, S. T. & PACE, N. R.(2004). New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 845–849
- HITZFELD BC, HOEGER SJ, DIETRICH DR. (2000). Cyanobacterial Toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environm. Health. Persp.* 108 Suppl 1:113-122.
- HOICZYK, E. (1998). Structural and Biochemical Analysis of the Sheath of *Phormidium uncinatum*. *J. of Bacteriol.* 180(15): 3923–3932.
- HU, L. B., YANG, J. D., ZHOU, W. (2009). Isolation of a *Methylobacillus* sp. That degrades of microcystin toxins associated with cyanobacteria. *New Biotechnol.* 26:205–211.
- HUSZAR, V. L. M., SILVA, L. H. S., MARINHO, M., DOMINGOS, P., SANT' ANNA, C. L. (2000). Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia.* 424: 67-77.
- ILS (INTEGRATED LABORATORY SYSTEMS). 2000. *Cylindrospermopsin: Review of Toxicological Literature.* Prepared by Integrated Laboratory Systems, for National Toxicology Program, NIEHS, EPA. pp. 37.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC) (2014). *Climate Change 2014. Mitigation of Climate Change.* Disponível em: [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc\\_wg3\\_ar5\\_full.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/wg3/ipcc_wg3_ar5_full.pdf)
- ISHII, H., NISHIJIMA, M., ABE, T., (2004). Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a Gram-negative aerobic bacterium. *Wat. Res.* 38:2667-2676.

- ITO, E.; KONDO, F.; TERAOKA, K. & HARADA, K.-I. (1997). Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon*, 35: 231-239.
- JIA, Y., DU, J., SONG, F., ZHAO, G., and TIAN, X. (2011) A fungus capable of degrading microcystin-LR in the algal culture of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 987–996.
- JIANG, Y. G., SHAO, J. H., WU, X. Q., XU, Y., LI, R. H. (2011). Active and silent members in the mlr gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 322:108–114.
- JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W.W.; AN, J., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E., ANTUNES, M.B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T.M., BARRETO, V.S.T., AZEVEDO, S.M., JARVIS, W.R. (1998). Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England J. of Med.* 338(13):873–878;.
- JONES, G. J., BOURNE, D. G., BLAKELEY, R. L., DOELLE, H. (1994) Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2:228– 35
- KAEBERNICK, M. (2002) Multiple alternative transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *App. and Environ. Microbiol Washington.* 68:449-455.
- KAJANDER, E.O. e CIFTCIOGLU, N. (1998). Nanobacteria—An Alternative Mechanism for Pathogenic Intra and Extracellular Calcification and Stone Formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 8274–8279.
- KARICKHOFF, S. W., BROWN, D. S., e SCOTT, T. A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural water sediments. *Wat. Res.* 13:241–248.
- KLITZKE, S., APELT, S., WEILER, C., FASTNER, J., CHORUS, I.(2010). Retention and degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in sediments - the role of sediment preconditioning and DOM composition. *Toxicon* 55: 999–1007.
- KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H.; OKUMURA, M.; ISHIKAWA, N.; HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; MURATA, H. & SUZUKI, M. (1992). Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. in Toxicol.* 5:591-596.
- LANKOFF, A. e CARMICHAEL, W.W. (2006). Genotoxicity and carcinogenicity of cyanobacterial toxins. pp. 145-172. In: Luc Vershaeve (Ed.), *Topical Issues in Applied Microbiology and Biotechnology*. Research Signpost, Kerala, India. 172p
- LEFLAIVE, J., TEN-HAGE, L., (2007). Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52:199–214.
- LEMES, G.A.F., KERSANACH, R., PINTO, L.S., DELLAGOSTIN, O.A., YUNES, J.S., MATTHIENSEN, A. (2008). Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. From a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotox and Environ. Safety.* 69(3):358-365.
- LI, H. e PAN, G. (2014). Enhanced and continued degradation of microcystin using microorganisms obtained through natural media. *J. Microbiol. Methods* 96:73–80.
- LI, J., LI, J., SHI, G., MEI, Z., WANG, R., LI, D. (2016). Discerning biodegradation and adsorption of microcystin-LR in a shallow semi-enclosed bay and bacterial community shifts in response to associated process. *Ecotox and Environ. Safety.* 132:123-131.

- LIU, H. Y., HUAN, H. L., WANG, Y. W., LI, J. H., ZHOU, Y. M. (2007). Molecular identification of a microcystin degrading bacteria strain S3 and its biodegradation of microcystin. *Acta. Sci. Circum.* 27:1145–1150.
- LIU, Z., LOZUPONE, C., HAMADY, M., BUSHMAN, F.D., KNIGHT, R (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucl. Acids Res.* 35:18.
- LIU, G., QIAN, Y., DAI, S., FENG, N. (2008). Adsorption of microcystin-LR and -LW on suspended particulate matter (SPM) at different pH. *Wat., Air, Soil Pollut.* 192, (1-4):67-76.
- LOWE, J., SOUZA-MENEZES, J., FREIRE, D.S., MATTOS, L.J., CASTIGLIONE, R.C., BARBOSA, C.M.L.; SANTIAGO, L., FERRÃO, F.M., CARDOSO, L.H.D., da SILVA, R.T., VIEIRA-BEIRAL, H.J., VIEYRA, A., MORALES, M.M., AZEVEDO, S.M.F.O., SOARES, R.M. (2012). Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. *Toxicon.* 59(6):601-609.
- LU, H., S. CHOUDHURI, S., OGURA, K., CSANAKY, I.L., LEI, X., CHENG, X., SONG, P.Z., KLAASSEN, C.D. (2008) Characterization of Organic Anion Transporting Polypeptide 1b2-null Mice: Essential Role in Hepatic Uptake/Toxicity of Phalloidin and Microcystin-LR. *Toxic. Sci.*, 103(1):35–45.
- MACKAY, D. (1982). Correlation of bioconcentration factors. *Environmental Science & Technology*, 16, 274–278.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCLKEY, D.H; STAHL, D.A. (2016). *Microbiologia de Brock*. 14. ed., Porto Alegre: Artmed. 1160 p
- MAGALHÃES, V.F., SOARES, R.M. & AZEVEDO, S.M.F.O (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39(7), 1007-1085
- MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O. and AZEVEDO, S.M.F.O. (2003). Microcystins (Cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42:89-295
- MAGALHÃES, V.F. e AZEVEDO, S.M.F.O. (1998). Ecological implications of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in the Jacarepaguá Lagoon, Brazil. In B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández, T. Wyatt (Eds.), *Harmful Algae* (pp. 26-28)
- MAGAR, V. e PEDELEY, T. J. (2005). Average nutrient uptake by a self-propelled unsteady squirmer. *J of F. Mech* 539: 93–112.
- MAGSHOUDI, E., PRÉVOST, M., VO DUY, S., SAUVÉ, S., e DORNER, S. (2015). Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. *Toxicon*, 103:48-54
- MANAGE, P.M., EDWARDS, C., SINGH, B.K., LAWTON, L.A. (2009). Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6924–6928.
- MANILOFF, J. (1997). Nannobacteria: size limits and evidence. *Science*, 276(5320):1776.
- MANKIEWICZ-BOCZEK, J., GAĞAŁA, I., JURCZAK, T., JASKULSKA, A., PAWEŁCZYK, J., DZIADEK, J. (2015). Bacteria homologous to *Aeromonas* capable of microcystin degradation. *Open LifeSci.* 10:119–129.
- MARAHIEL, M.A., STACHELHAUS, T. & MOOTZ, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97:26511-26573.

- MARQUES, K.N. (2006). Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em *Aphanothece* e sua capacidade de bioadsorção do <sup>226</sup>Ra. 118 p. Dissertação (Mestrado)- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba
- MILLER, M.J., CRITCHLEY, M.M., HUTSON, J., FALLOWFIELD, H.J. (2001). The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments. *Wat. Res.* 35, 1461–1468.
- MIYOSHI, T., IWATSUKI, T., NAGANUMA, T. (2005). Phylogenetic Characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol.* 71(2):1084-1088.
- MONKS, N. R., LIU, S., XU, Y., YU, H., BENDELOW, A.S., MOSCOW, J.A. (2007) Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Molec. Cancer Therap.*, 6(2):587–598
- MORENO, I.M.; MATE, A.; REPETTO, G.; VAZQUEZ, C.M. & CAMEAN, A.M. (2003). Influence of microcystin-LR on the activity of membrane enzymes in rat intestinal mucosa. *J. of Phys. and Biochem.* 59: 293-299
- MOORE, R.E., CHEN, J.L., MOORE, B.S., PATTERSON, G.M.L. & CHARMICHAEL, W.W. (1991). Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the Adda and Masp units. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5083–5084.
- MORRIS, R.J.; WILLIAMS, D.E.; LUU, H.A.; HOLMES, C.F.B.; ANDERSEN, R.J. & CALVERT, S.E. (2000). The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon.* 38:303-308
- MOU, X., LU, X., JACOB, J., SUN, S., HEATH, R. (2013). Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PlosOne* 8(4): e61890. doi:10.1371/journal.pone.0061890
- MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. (2009). *Microbiologia Médica*. 6ed. Mobay Elsevier.
- NEMERGUT, D. R., COSTELLO, E. K., HAMADY, M., LOZUPONE, C., JIANG, L., SCHMIDT, S. K., FIERER, N., TOWNSEND, A. R., CLEVELAND, C. C., STANISH, L., KNIGHT, R. (2011). Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol.* 13(1):135-144.
- NEWTON, R. J., JONES, S. E., EILER, A., MCMAHON, K. D., BERTILSSON, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microb. and Molec. Biol. Reviews* 75:14-49
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., NISHIWAKI, S., OHTA, T., YOSHIZAWA, S., SUGANUMA, M., HARADA, K. (1991).: Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japan. J. Canc. Res.* 82(9): 993-996;
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118(6): 420- 424;.
- NISHIZAWA, T., ASAYAMA, M., SHIRAI, M. (2001). Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiol.* v. 147, n.5, p.1235–1241.
- NOBRE, A. C. L., COELHO, G. R., COUTINHO, M. C. M., et al. (2001). The role of phospholipase A(2) and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. *Toxicon*, 39(5): 721-724.
- NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. M. C., HAVT, A., et al. (2003). Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophages activated by microcystin-LR: Role protein mediators. *Toxicon*, 41(3):377-381.

- NÜSSLEIN, K. e TIEDJE, J. M. (1999). Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3622-3626
- NYBOM SM, DZIGA D, HEIKKILA JE, KULL TP, SALMINEM SJ, MERILUOTO JA (2012). Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon* 59:171–181
- OKANO, K., SHIMIZU, K., KAWAUCHI, Y., MASEDA, H., UTSUMI, M., ZHANG, Z., NEILAN, B. A., SUGIURA, N. (2009). Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *J.Toxicol.*, 954291.
- O'NEIL, J., DAVIS, T.W., A., BURFORD, M., GOBLER, C.J., (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 313–334.
- PADISÁK, J.(2004). Phytoplankton In: O'Sullivan, P.E. & Reynolds,C.S. (ed). *Limnology and Ecology*. Blackwell., 1:251-308
- PAERL, H.(2008). Nutrient and Other Environmental Controls of Harmful Cyanobacterial Blooms along the freshwater-marine continuum. In: H.K. Hudnell (ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: state of Science and Research Needs*. *Adv. in Experim. Medic. and Biol.* 619: 217-213.
- PAERL, H. W. e T. G. OTTEN. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.* 65: 995–1010.
- PHELAN, R. R. e DOWNING, T.G. (2011). A growth advantage for microcystin production by *Microcystis*PCC7806 under high light, *J. Phycol.*, 47 (6), 1241–1246.
- PILOTTO, L., HOBSON, P., BURCH, M.D., RANMUTHUGALA, G., ATTEWELL, R., WEIGHTMAN, R. (2004): Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. *Aus and New Zeal J of Pub Health*, 28(3):220–224.
- PFLUGMACHER, S.; WIEGAND, C.; OBEREMM, A.; BEATTIE, K.A.; KRAUSE, E.; CODD, G.A.; STEINBERG, C.E.W 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochem. Biophys. Acta.* 1425:527-533.
- POMMIER, T., CANBÄCK, B., RIEMANN, L., BOSTRÖM, K. H., SIMU, K., LUNDBERG, P., TUNLID, A., HAGSTRÖM, A. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol.* 16(4):867-80
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J., GLÖCKNER, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Ac. Res.* 41(Database issue), D590–6
- RAMANI, A., REIN, K., SHETTY, K., JAYACHANDRAN, K. (2012). Microbial degradation of microcystin in Florida's freshwaters. *Biodegradation* 23:35–45.
- RAPALA, J., LAHTI, K., SIVONEN, K., NIEMALA, S.I. (1994). Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Letters in Applied Microbiology* 19:423-428.
- RAO, P.V., GUPTA, N., BHASKAR, A.S., JAYARAJ, R. (2002). Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *J. Environ. Biol.* 23, 215–224.
- REYNOLDS, C.S. (1987). Cyanobacterial water-blooms. In: J. Callow [ed.] *Advances in botanical research*. Academic Press., London. p. 67-143.



- REYNOLDS, C.S. (2006). Ecology of Phytoplankton. Cambridge. p.535.
- RIVASSEAU C, MARTINS S, HENNION MC (1998) Determination of some physicochemical parameters of microcystin (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. J Chromatogr 799:155-169
- ROLFE, R.D., HENTGES, D.J., CAMPBELL, B.J., BARRETT, J.T. (1978). Metabolism, Growth, and Industrial Microbiology Factors Related to the Oxygen Tolerance of Anaerobic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 36(2): 306-313
- RUDOLPH-BOÈHNER, S., MIERKE, D. F., e MORODER, L. (1994). Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. FEBS Letters, 349:319–323.
- RUNNEGAR, M. T. C., ANDREWS, J., GERDES, R. G., AND FALCONER, I. R. (1987). Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Toxicol, 25(11): 1235-1239.
- RUNNEGAR, M., BERNDT, N., KAPLOWITZ, N. (1995a): Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters. Toxic and Appl Pharma, 134(2):264 – 272.
- SAITO, T., OKANO, K., PARK, H. D. et al. (2003). Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese Lakes. FEMS Microbiol. Lett. 229, 271–6.
- SAITOU, T., SUGIURA, N., ITAYAMA, T., INAMORI, Y., MATSUMURA, M. (2003). Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. J. WaterSupplyRes.Technol.Aqua 52:13–18.
- SANT'ANNA, C.L, AZEVEDO, M.T.P., WERNER, V.R., DOGO, C.R., RIOS, F.R., CARVALHO, L.R. (2008). Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. Algal. Stud. 126:249-263
- SANTOS, A.A. (2014). Biodegradação de microcistina-LR por bactérias isoladas da lagoa de Jacarepaguá (RJ). Monografia apresentada ao Instituto Paulo de Goés (UFRJ) para obtenção do bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia p.50
- SCHAUER, R., BIENHOLD, C., RAMETTE, A., HARDER, J. (2010). Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. ISME J. 4(2):159-170.
- SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., LESNIEWSKI, R.A., OAKLEY, B.B., PARKS, D.H., ROBINSON, C.J., SAHL, J.W., STRES, B., THALLINGER, G.G., VAN HORN, D.J., WEBER, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. and Environ. Microbiol. 75(23):7537–41.
- SCHOPF, J.W., e WALTER, M.R. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence In N.G. Carr, & B. A. Whitton (eds), The Biology of Cyanobacteria. Blackwell, Oxford: 543–564.
- SCHOPF, J.W (2000). The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: Whitton BA, Potts M (eds) The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 13–35
- SCHUT, F., GOTTSAL, J.C., and PRINS, R.A.(1997). Isolation and Characterization of the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. FEMS Microbiol. Rev. 20:363–369.
- SEDAN, D., ANDRINOLO, D., TELESE, L. (2010). Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: its relation to liver lipid composition. Toxicol, 55(2-3): 333-342.

- SEDMARK, B. e ELERSEK, T. (2005). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons, *Microb. Ecol.*, 50 (2), 298–305.
- SIVONEN, K., JONES, G.J (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J(eds) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on the behalf of WHO by E & FN Spon, Londo, pp. 41-111
- SOARES, R. M., CAGIDO, V., FERRARO, R. B., MEYER-FERNANDES, J. R., ROCCO, P. R. M., ZIN, W. A., AZEVEDO, S. M. F.O. (2007). Effects of microcystin-LR on mouse lungs. *Toxicon*, 50(3): 330-338.
- SOINA, V.S., LYSAK, L.V., KONOVA, I.A., LAPYGINA, E.V., ZVYAGINTSEV. (2012). Study of Ultramicrobacteria (Nanoforms) in Soils and Subsoil Deposits by Electron Microscopy. *Euras. Soil Sci.* 45(11):1048-1056.
- SONG, H. H., REICHWALDT, E.S., GHADOUANI, A. (2014). Contribution of sediments in the removal of microcystin-LR from water. *Toxicon* 83:84–90.
- STEFFENSEN, D.A. (2008). Economic cost of cyanobacterial blooms. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: St. of the Sci. and Res. Needs* (Hudnell HK, ed.). p. 855–865.
- STUMM, W. (1992). *Chemistry of the solid–water interface: Processes at the mineral–water and particle–water interface in natural systems*. New York: Wiley.
- TAIPALE, S., JONES, R. I., TIROLA, M. (2009). Vertical diversity of bacteria in an oxygen-stratified humic lake, evaluated using DNA and phospholipid analyses. *Aquat. Microb. Ecol.* 55:1–16.
- TAKENAKA, S. e WATANABE, M. F. (1997) Microcystin-LR Degradation by *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *Chemosphere* 34(4):749-757.
- TAKENAKA, S. (2001). Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 9(4): 135-139.
- TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E (1993). Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27:244-253
- TILLETT, D., DITTMANN, E., ERHARD, M., VON DOHREN, H., BÖRNER, T., NEILAN, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* 7: 753–764.
- TORSVIK, V., GOKSOYR, J., and DAAE, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56, 782-787.
- TORSVIK, V., ØVREÅS, L., and THINGSTAD, T.F. (2002). Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science* 296, 1064-1066.
- TREVORS, J.T., (1996). Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Methods* 26:53–59.
- TSUJI, K., NAITO, S., KONDO, F., ISHIKAWA, N., WATANABE, M.F., SUZUKI, M., HARADA, K. (1994) Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerisation. *Environ Sci Technol* 28:173–177
- UENO, Y., NAGATA, S., TSUTSUMI, T. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6): 1317-1321.

- U.S. EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 2015. Health Effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Microcystins. EPA/820/R-15/102.
- UTKILEN, H. e GJOLME, N. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystisaeruginosa*, Appl. Environ. Microbiol. 61(2), 797–800
- VALERIA, A. M., RICARDO, E. J., STEPHAN, P., ALBERTO, W. D. (2006) Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba - Argentina) . Biodegradation 17:447-455
- VAN APELDOORN, M. E., VAN EGMOND, H.P., SPEIJERS, J.G.A., BAKKER, G.J.I. (2007): Toxins of cyanobacteria. Molec Nutr Food Research, 51(1):7–60.
- VELIMIROV, B. (2001). Nanobacteria, Ultramicrobacteria and Starvation Forms: A search for the smallest metabolizing bacterium. Microb. and Environ. 16(2):67-77
- VON DOËHREN, H., DIECKMANN, R. & PAVELA-VRANCIC, M. (1999). The nonribosomal code. Chem. Biol. 6,:273-279.
- WALSBY A. E. (1994). Gas vesicles. Microbiol. Rev.58:94-144.
- WELKER, M. (2008). Cyanobacterial hepatotoxins: Microcystins, nodularins, and cylindrospermopsins. In L. M. Botana (Ed.), Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection. pp. 825–844. (2nd ed.).
- WENG, D., LU, Y., WEI, Y., LIU, Y., SHEI, P. (2007). The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. Toxicology, 232(1-2): 15-23.
- WHITTON, B. E POTTS, M. (2000). The ecology of cyanobacteria. Netherlands, Kluwer academy Publisher, p. 1 11.
- WIEGAND, C.; PEUTHERT, A.; PFLUGMACHER, S.; CARMELI, S (2002). Effects of Microcin SF608 and microcystin-LR, two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms. Environ Toxicol. 17:400-406
- WILLIAMS, D. E., CRAIG, M., DAWE, S. C., ET AL. (1997). Evidence for a covalently 'bound form of microcystin-LR in salmon larvae and dungeness crab larvae. Chem. Res. in Toxicol. 10: 463-469. (Cited in WHO 1999)
- WILSON, A. E., GOSSIAUX, D. C., HÖÖK, T. O., BERRY, J. P., LANDRUM, P. F., DYBLE, J., GUILDFOR, S. J. (2008). Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). Canad. J. of Fish. and Aq. Sci. 65: 1487-1497.
- WOOD, S. A., BRIGGS, L. R., SPROSEN, J., ET AL. (2006). Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. Environ. Toxicol. 21: 205-222.
- WÖRMER L.; CIRÉS, S., QUESADA, A. (2011). Importance of natural sedimentation in the fate of microcystins. Chemosphere 82:1141–1146
- WU, X., XIAO, B., LI, R., WANG, C., HUANG, J., WANG, Z. (2011). Mechanisms and factors affecting sorption of microcystins onto natural sediments. Environ.Sci.Tecnol. 45:2641-2647
- WU, X., WANG, C., TIAN, C., XIAO, B., SONG, L. (2015). Evaluation of the potential of anoxic biodegradation of intracellular and dissolved microcystins in lake sediments. J. Hazard. Mat. 286:395-401
- XIE, L., XIE, P., GUO, L., ET AL. (2005). Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. Environ. Toxicol. 20: 293-300
- YAGHOBE, S., BAYANI, M., SAMIEI, N., JAHEDMANESH, N. (2015). What are the nanobacteria? Biotech. & Biotech. Equip. 29(5):826-833

- YAN, H., PAN, G., ZOU, H., LI, X., CHEN, H. (2004). Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria. *Chin. Sci. Bull.* 49:1694–1698.
- YOSHIZAWA, S., MATSUSHIMA, R., WATANABE, M.F., HARADA, K-I, ICHIHARA, A., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H. (1990). Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. of Can. Res. and Clin. Oncol.* 116: 609-614
- YOO, R.S., CARMICHAEL, W.W., HOEHN R.C., HRUDEY, S.E. (1995): Cyanobacterial (blue-green algae) Toxins: A Resource Guide. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 229.
- ŽEGURA, B., LAH, T. T., FILIPIČ, M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR induced DNA damage. *Toxicology*, 200(1): 59-68
- ZHANG, D., XIE, P., CHEN, J. (2010a) Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bull Environ Contam Toxicol.* 84:202–207
- ZHANG M, PAN G, YAN H (2010b) Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *J Environ Sci* 22:168–175.
- ZHANG, Y., GENG, J., MA, H., REN, H., XU, K., DING, LA. (2016). Characterization of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge under tetracycline and sulfamethoxazole selection pressure. (Article in Press) – *Scie. of the Total Environ.*
- ZIMBA, L., CHEN, W., PENG, L., ET AL. 2009. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: A systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu. *Wat. Res.* 41(13): 2853-2864.

<http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/microcystins-support-report-2015.pdf>

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxcyanbegin.pdf)

[http://www.btk.fi/Research\\_Groups/Protein\\_Phosphorylation\\_Group/protein\\_phosphorylation\\_group.html](http://www.btk.fi/Research_Groups/Protein_Phosphorylation_Group/protein_phosphorylation_group.html)

<http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/microcystins-support-report-2015.pdf>

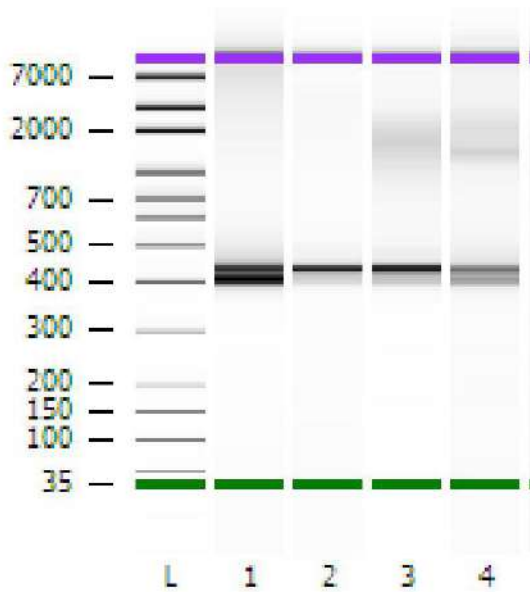
[http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwff/mdez/~edisp/inea\\_013615.pdf](http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwff/mdez/~edisp/inea_013615.pdf)

<http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mdgx/~edisp/inea0081549.pdf>

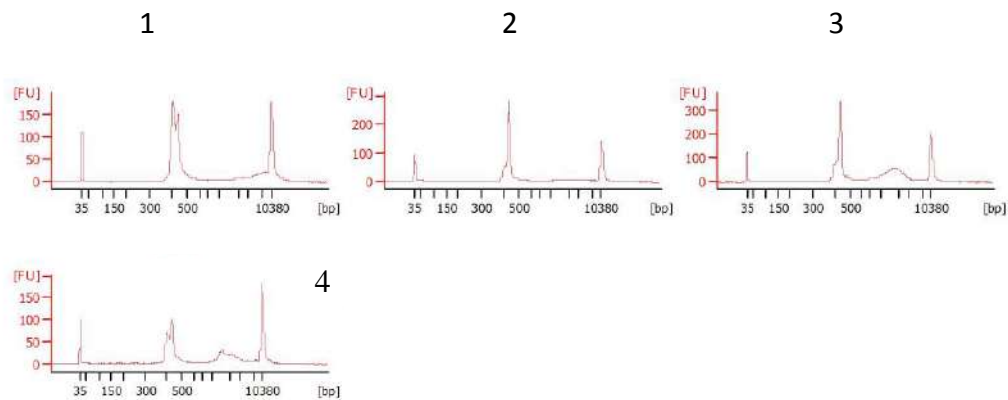
<http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mte1/~edisp/inea0115605.pdf>

## APÊNDICE

A



B



Análise por eletroforese dos produtos de amplificação da região v4 do 16SrDNA das amostras obtidas da lagoa de Jacarepaguá. (A) Gel virtual; (B) Eletroferograma; (L) padrão de peso molecular de DNA, em pares de base; (1) água intersticial do sedimento fração < 0,45 um de setembro de 2014; (2) água da lagoa fração < 0,45 um de setembro de 2014; (3) sedimento bruto de janeiro de 2015; (4) água intersticial do sedimento fração < 0,45 um de dezembro de de 2014. Análise no Bioanalyzer (Agilent) com o kit High Sensitivity DNA Assay.

