

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

**JULIA SOBOTTKA VENDRUSCOLO**

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE  
MICROCISTINA-LR EM LABORATÓRIO: INFLUÊNCIA DA  
CONCENTRAÇÃO INICIAL DA TOXINA, TEMPERATURA, LUZ  
E CAMADA SUPORTE**

**VERSÃO CORRIGIDA  
SÃO CARLOS (SP)  
2018**





**JULIA SOBOTTKA VENDRUSCOLO**

**Avaliação da degradação biológica de microcistina-LR em laboratório: influência da concentração inicial da toxina, temperatura, luz e camada suporte**

**Trabalho de Graduação apresentado a  
Escola de Engenharia de São Carlos  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Engenheira  
Ambiental**

**Orientador:**

**Profº Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha**

**VERSÃO CORRIGIDA**

**SÃO CARLOS (SP)**

**2018**

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

V453a	Vendruscolo, Julia Sobottka Avaliação da degradação biológica de microcistina-LR em laboratório: influência da concentração inicial da toxina, temperatura, luz e camada suporte / Julia Sobottka Vendruscolo; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha. São Carlos, 2018.  Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.  1. Cianotoxina. 2. Microcistina. 3. Biodegradação. 4. Tratamento avançado de águas de abastecimento. 5. Sphingomonas. I. Título.
-------	--

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

# FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Julia Sobottka Vendruscolo**

Data da Defesa: 21/11/2018

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha (Orientador(a))**

APROVADA

**Prof. Dr. Gabriel Dibbern Sacchi**

APROVADA

**Doutorando Felipe Henrique Martins Moutinho**

Aprovada



**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe, Cristina Sobottka e minha avó, Deolinda Sobottka, meus exemplos de vida, que sempre me ensinaram a enfrentar as dificuldades e encarar a vida com amor; ao meu pai, Roberto Capelozzi Jr, que sempre me ensinou a matar um leão por dia. E à meus irmãos, Enzo e Lorenzo, meus eternos bebês, minha fonte de amor inesgotável.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço minha família, pelo exemplo, por todo o apoio e, muitas vezes, o não apoio, que me ensinaram a ser forte e lutar por aquilo que acredito. O meu caráter e a minha garra vem de vocês.

Ao meu orientador, Davi Gasparini Fernandes Cunha, por ser admirável enquanto pessoa e professor, por despertar em mim o amor pela área do saneamento e acreditar no meu potencial para uma pesquisa tão minuciosa e nova. Obrigada por todos os ensinamentos, desde a sala de aula, e pela paciência sempre que necessária.

Aos meus professores, do Colégio Moura Lacerda (Ribeirão Preto – SP) e do Cursinho Popular da Medicina (CPM), que sempre me incentivaram à faculdade pública e acreditaram que eu era capaz.

Ao meu grande amigo Maurício Cartagena, por todos os ensinamentos de vida social e acadêmica, cruciais para minha formação. Ao meu primeiro chefe de trabalho, Sérgio Henrique de Souza Motta, por me tornar uma pessoa crítica e sempre me incentivar a fazer o melhor, em qualquer que seja a área.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pela concessão de bolsa de iniciação científica, processo 2016/04715-2. Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio ao projeto Universal “*Filtros de carvão ativado para remoção de microcistina de água de abastecimento: estudo dos fenômenos de adsorção e biodegradação*”.

Ao grupo de extensão mais lindo do mundo, Grupo de Estudos e Intervenções Socioambientais (GEISA), pelos maiores ensinamentos que pude ter, fora de sala de aula. Sem vocês, eu não teria suportado e nem alcançado os resultados esperados.

Aos amigos e profissionais do Biotace, que me acompanharam, ensinaram e apoiaram durante o desenvolvimento desta pesquisa, Andréia Ortolan, Janaína Malta, Henrique Sonobe e Adriana Miwa. Em especial, agradeço à Janaína, que me acompanhou no desbravamento desta área, nos dias de preparo dos ensaios, na discussão dos resultados e nas infinitas revisões que fizemos do relatório.

À querida professora Eloisa Pozzi, do LPB, pela ajuda crucial com as “meninas” e toda simpatia e paciência comigo. E também à querida secretária da Ambiental, Silvana Ferreira, pela simpatia e disposição em ajudar sempre, fossem dias de greve, fossem de TCC.

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

Aos membros da banca de defesa, Felipe Henrique Martins Moutinho e Gabriel Dibbern Sacchi por aceitarem o trabalho de avaliação desta pesquisa e darem grandes contribuições.



## RESUMO

VENDRUSCOLO, J.S. **Avaliação da degradação biológica de microcistina-LR em laboratório: influência da concentração inicial da toxina, temperatura, luz e camada suporte**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A microcistina (MC), produzida por espécies de cianobactérias como a *Microcystis aeruginosa* (mais preponderante), é a toxina mais frequentemente observada em florações fitoplanctônicas, com ocorrência inclusive em reservatórios de água para abastecimento público. As estações de tratamento de água (ETA) de ciclo completo são geralmente ineficientes na remoção desta toxina dissolvida. Sendo assim, na presente pesquisa, investigou-se o potencial de degradação biológica de MC-LR (principal variante) em face à sua eventual aplicabilidade em ETAs e biorremediação de águas naturais. Os inóculos foram provenientes de fontes ambientais como lago artificial de antiga pedreira, represa artificial, nascente e foz de rios urbanos, entrada e saída de filtro biológico de ETA e também de culturas laboratoriais dos gêneros *Sphingomonas*, *Brevundimonas* e de microrganismos provenientes do extrato bruto de microcistina-LR. Os inóculos foram mantidos em contato com o extrato bruto de MC-LR e meio Zinder por quatro dias, sob as seguintes condições: diferentes concentrações iniciais de MC-LR (20 e 100 µg/L), de temperatura (17, 25 e 40 °C), ausência ou presença de luz artificial e camada suporte (espuma de poliuretano). A cianotoxina foi quantificada através do Ensaio do Imunoabsorvente Ligado à Enzima – ELISA. Neste estudo constatou-se que a comunidade bacteriana autóctone presente no extrato bruto de MC-LR obteve o melhor desempenho, nas condições de 25 °C, presença de luz e camada suporte (96,4% de remoção de MC-LR). Portanto, a biodegradação de microcistina-LR por microrganismos se mostra como potencial alternativa aos processos físico-químicos, ressaltando que a biodegradação promove a transformação do poluente alvo em outros subprodutos menos tóxicos, e não somente sua transferência.

**Palavras-chave:** Biodegradação; Cianotoxinas; Microcistina; Sphingomonas; Tratamento Avançado de águas de abastecimento.

## ABSTRACT

VENDRUSCOLO, J.S. **Evaluation of biological degradation of microcystin in laboratory: influence of initial toxin concentration, temperature, light and support layer.** 2018. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Microcystin (MC), produced by species of cyanobacterias such as *Microcystis aeruginosa* (most preponderant), is the toxin most frequently observed in phytoplankton blooms, occurring even in water reservoirs for public supply. Full-cycle water treatment plants (WTP) are generally inefficient in removing this dissolved toxin. Therefore, in the present research, the potential of biological degradation of MC-LR (main variant) was investigated in face of its possible applicability in WTP's and natural water bioremediation. The inoculants came from environmental sources such as artificial lake of old quarry, artificial dam, spring and mouth of urban rivers, entrance and exit of biological filter of WTP and also of laboratory cultures of the genus *Sphingomonas*, *Brevundimonas* and microorganisms from the crude microcystin-LR extract. The inoculums were kept in contact with the crude extract of MC-LR and Zinder medium for four days under the following conditions: different initial MC-LR (20 and 100 µg/L), temperature (17, 25 and 40 °C), absence or presence of artificial light and support layer (polyurethane foam). Cyanotoxin was quantified by the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In this study, it was observed that the autochthonous community present in the crude extract of MC-LR obtained the best performance, in the conditions of 25 °C, presence of light and support layer (96.4% removal of MC-LR). Therefore, biodegradation of microcystin-LR by microorganisms is shown as a potential alternative to physicochemical processes, emphasizing that biodegradation promotes the transformation of the target pollutant into other less toxic by-products, and not only their transference.

**Keywords:** Biodegradation; Cyanotoxins; Microcystin; Sphingomonas; Advanced Treatment of Water Supply.

## ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS (1 A 6) E DE CULTURAS LABORATORIAIS (7 A 10), ASSIM COMO O MEIO UTILIZADO EM CADA CASO. ....	37
--	----

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE MC-LR NO QUARTO DIA, COM DESTAQUE PARA OS TRÊS MELHORES RESULTADOS EM CADA UMA DAS CONDIÇÕES INICIAIS E A MÉDIA.....	47
TABELA 2 - PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE MC-LR NO QUARTO DIA, COM DESTAQUE PARA O MELHOR RESULTADO – ETAPA B .....	52
TABELA 3- PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE MC-LR NO QUARTO DIA .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DE MC E SUAS PRINCIPAIS VARIANTES DETECTADAS. AS LETRAS R1 E R2, DESTACADAS EM VERMELHO, REPRESENTAM OS L-AMINOÁCIDOS RESPONSÁVEIS PELA NOMENCLATURA DAS VARIANTES DA CIANOTOXINA. ....	22
FIGURA 2 - FLORAÇÕES DE MICROCYSTIS SPP REPORTADAS NO MUNDO. A COR AZUL REPRESENTA PAÍSES OU TERRITÓRIOS ONDE FORAM REPORTADAS FLORAÇÕES DE MICROCYSTIS SPP; A COR VERDE REPRESENTA PAÍSES OU TERRITÓRIOS ONDE FORAM REPORTADAS FLORAÇÕES DE MICROCYSTIS SPP E DETECTADA MC; A COR BRANDA INDICA QUE NÃO HOUVE REGISTRO DE FLORAÇÃO E/OU DETECÇÃO DE MC. ....	23
FIGURA 3 - VIA DE DEGRADAÇÃO DA MC-LR E A FORMAÇÃO DE PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS (MENOS TÓXICOS) PELO GÊNERO <i>SPHINGOMONAS</i> (CEPA ACM-3962). PM: PESO MOLECULAR. ....	30
FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO GERAL DA PESQUISA: DIVISÃO EM TRÊS ETAPAS SEQUENCIADAS, VARIANDO, RESPECTIVAMENTE EM CADA UMA A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE MC-LR (A), COMBINAÇÃO DE TEMPERATURA E LUZ (B) E PRESENÇA DE MEIO SUPORTE (C). ....	34
FIGURA 5 - EXEMPLO DE REALIZAÇÃO DO MÉTODO ELISA. A COLORAÇÃO AMARELA INDICA A SOLUÇÃO DOS REAGENTES DO KIT E A AZUL, O FINAL DA REAÇÃO ENTRE ESTES E A MC. A COLORAÇÃO AZUL MAIS ESCURA REPRESENTA CONCENTRAÇÕES MAIS ALTAS E A AZUL MAIS CLARA, AS MAIS BAIXAS. ....	34
FIGURA 6 – MATERIAIS UTILIZADOS PARA O PREPARO DO MEIO ZINDER, ANTES DESTA SEGUIR PARA AUTOCLAVE. ....	36
FIGURA 7 - LAGO URBANO PRÓXIMO AO SHOPPING PASSEIO – SÃO CARLOS/SP .....	38
FIGURA 8 - REPRESA DO LOBO .....	39
FIGURA 9 - NASCENTE DO CÓRREGO TIJUCO PRETO. A SETA INDICA O LOCAL DE COLETA. ....	39
FIGURA 10 - FOZ DO CÓRREGO SANTA MARIA DO LEME. ....	40

FIGURA 11 - FILTROS DE AREIA DA ETA DE SÃO CARLOS – SAAE .....	40
FIGURA 12 - COLÔNIAS CULTIVADAS NO LABORATÓRIO LPB, A PARTIR DO EXTRATO BRUTO DE MC-LR .....	41
FIGURA 13 – PREENCHIMENTO DOS ERLLENMEYERS COM ESPUMAS DE POLIURETANO PARA A ETAPA C, COM DESTAQUE EM VERMELHO. ....	44
FIGURA 14 - DECAIMENTO DE MC-LR POR CULTURAS LABORATORIAIS, DURANTE OS QUATRO DIAS DE ENSAIO DA ETAPA A .....	45
FIGURA 15 - DECAIMENTO DE MC-LR POR AMOSTRAS AMBIENTAIS, DURANTE OS QUATRO DIAS DE ENSAIO DA ETAPA A .....	46
FIGURA 16 - DECAIMENTO DE MC-LR NOS GRUPOS CONTROLE ZINDER E CONTROLE ÁGUA DURANTE OS QUATRO DIAS DE ENSAIO DA ETAPA A .....	47
FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DOS FILOS MICROBIANOS PARA AS 464 OTU OBTIDAS COM BASE NO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA. FONTE: MALTA (2018).....	52
FIGURA 18 - BIODEGRADAÇÃO DE MC-LR POR AMOSTRA ADVINDA DO EXTRATO BRUTO .....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BIOTACE	Laboratório de Biotoxicologia em Águas Continentais e Efluentes
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EF	Entrada do filtro rápido da ETA
ELISA	<i>Enzyme Linked Sorbent Assay</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MC	Microcistina
MC-LR	Microcistina-LR
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SF	Saída do filtro rápido da ETA
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SP	São Paulo
T	Temperatura
TDH	Tempo de detenção hidráulica
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1.	CONTEXTO HISTÓRICO: EUTROFIZAÇÃO E CIANOBACTÉRIAS.....	19
2.2.	CIANOTOXINAS: CASO DE SAÚDE PÚBLICA.....	20
2.3.	CIANOTOXINAS EM RESERVATÓRIOS DE ÁGUA.....	23
2.4.	MÉTODOS PARA REMOÇÃO DE MC-LR.....	24
2.4.1.	<i>Processos físico-químicos .....</i>	<i>24</i>
2.4.2.	<i>Processos físicos.....</i>	<i>25</i>
2.4.3.	<i>Processos biológicos .....</i>	<i>26</i>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1.	ORGANIZAÇÃO GERAL DA PESQUISA .....	33
4.2.	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MC-LR .....	35
4.3.	MEIOS DE CULTIVO .....	35
4.4.	ETAPA A – SELEÇÃO DE INÓCULOS.....	36
4.4.1.	<i>Obtenção e descrição das amostras .....</i>	<i>38</i>
4.5.	ETAPA B – AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS.....	42
4.6.	ETAPA C – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MEIO SUPORTE.....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1.	ETAPA A.....	45
5.1.1.	<i>Grupos Controle .....</i>	<i>48</i>
5.1.2.	<i>Amostras Ambientais .....</i>	<i>48</i>
5.1.3.	<i>Amostras Laboratoriais.....</i>	<i>48</i>

5.1.4.	<i>Influência da concentração inicial de MC-LR</i> .....	49
5.1.5.	<i>Influência do meio nutriente</i> .....	49
5.1.6.	<i>Seleção dos melhores inóculos</i> .....	50
5.1.7.	<i>Análises extras</i> .....	50
5.2.	ETAPA B .....	52
5.2.1.	<i>Grupo Controle</i> .....	53
5.2.2.	<i>Análise das amostras selecionadas</i> .....	53
5.2.3.	<i>Influência da temperatura</i> .....	54
5.2.4.	<i>Influência da luminosidade</i> .....	54
5.3.	ETAPA C .....	55
5.3.1.	<i>Grupo Controle</i> .....	55
5.3.2.	<i>Influência da camada suporte</i> .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
	<b>ANEXO I</b> .....	<b>74</b>





## 1 INTRODUÇÃO

A eutrofização, frequentemente acelerada por atividades antrópicas devido à poluição da água por matéria orgânica e nutrientes, pode causar desequilíbrio ecológico, facilitando os eventos denominados florações fitoplanctônicas ou “*blooms*” (termo em inglês). Durante tais eventos, há um crescimento excessivo de algas e cianobactérias, sendo essas últimas um dos grupos fitoplanctônicos que mais causa preocupação, por seu potencial de produção de metabólitos secundários tóxicos, as cianotoxinas. Tais toxinas são secretadas naturalmente, liberadas durante a fase de senescência ou também devido à lise celular (ruptura) (CHORUS; BARTRAM, 1999).

As cianotoxinas podem trazer riscos à saúde humana e animal, causando intoxicação por meio de contato, inalação do vapor da água contaminada ou sua ingestão, sendo esta a via mais comum (FUNASA, 2014). Entre as cianotoxinas, a microcistina (MC) é a toxina mais comumente encontrada nas florações de cianobactérias. A microcistina-LR (MC-LR) é a forma predominante dentre as variantes de MC e a mais tóxica, possuindo características como estabilidade química e resistência a elevadas temperaturas, além de grande solubilidade em água e recalcitrância, tornando difícil sua remoção (RASTOGI; MADAMWAR; INCHAROENSAKDI, 2015; RODRÍGUEZ et al., 2007b).

O ciclo completo utilizado nas ETAs se mostra capaz de remover as células de cianobactérias, restando a toxina que está no interior destas. No entanto, tal eficiência não se aplica à toxina dissolvida (LI; LI; LI; 2017; MEREL et al., 2013a). No Brasil, em 14 estados já foram documentadas florações de cianobactérias; em 11 destes o evento foi detectado em reservatórios para abastecimento público (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006; FINAL, 2006; JARDIM et. al., 2014). Devido ao fato de que a via oral é a principal forma de exposição à cianotoxinas, o aumento da ocorrência de florações em reservatórios superficiais aliado à insuficiência das ETAs geram preocupação quando se trata do risco de intoxicação animal e humana.

Dos processos estudados para remoção da cianotoxina dissolvida, os métodos físico-químicos como cloração, ozonização, coagulação e floculação e oxidação em geral, não têm apresentado efetividade. Isto porque, apesar da eficiência na remoção de cianotoxina, os processos apresentam a possibilidade de formação de subprodutos também tóxicos (como organohalogenados e trihalometanos), ou que conferem odor

e/ou sabor à água (como geosmina), além de forte dependência de outras variáveis como pH e presença de matéria orgânica (EKE, WAGH, e ESCOBAR, 2018; FAN et al., 2014; ZHU et al., 2015).

Entre os métodos que não envolvem agentes químicos, tais como carvão ativado, membranas e filtro biológico, encontram-se elevadas eficiências na remoção de MC. No entanto, semelhante aos processos físico-químicos, têm sua eficiência altamente dependente de outras variáveis. À exemplo do carvão ativado, sua eficiência é reduzida se houver competição e bloqueio dos sítios de sorção pela matéria orgânica, compostos residuais da cloração e pela variação de pH (HUANG et al., 2007; SHI et al., 2012). Desta maneira, estes métodos podem gerar custos adicionais com o tratamento e/ou disposição final do material quando este exauriu sua capacidade.

Portanto, a degradação da toxina extracelular por processos biológicos – biodegradação – pode ser uma alternativa viável. Seu potencial decorre da possibilidade de ser um tratamento sem necessidade de uso de produtos químicos e risco de formação subprodutos tóxicos (HARADA et al., 2004; LI, LI, LI et al., 2017).

Apesar do amplo e constante avanço em relação ao estudo da biodegradação, ainda hoje há insuficiência de dados relativos aos fatores intervenientes no processo (LEZCANO et al., 2016, 2017; LI; LI; LI; 2017; ZHU et al., 2016). Desta forma, a biodegradação da MC deve ser estudada não somente em relação ao conhecimento dos microrganismos degradadores e à compreensão dos mecanismos de conversão, mas também aos fatores ambientais intervenientes, tais como temperatura, pH, concentração de inóculo, concentração da toxina, presença de nutrientes, presença de biofilme e disponibilidade de luz.

Em função da escassez de informações sobre o tema, especialmente em países de clima tropical/subtropical, a presente pesquisa voltou-se ao estudo da biodegradação de MC-LR por inóculos ambientais (como lago eutrofizado, lago de antiga pedreira, represa artificial, nascente e foz de rios urbanos, entrada e saída de filtro biológico de ETA) e também provenientes de culturas laboratoriais (como cepas dos gêneros *Sphingomonas* e *Brevundimonas*) avaliando preliminarmente, em laboratório, a influência da presença de luz, variação de temperatura e concentrações iniciais de MC-LR.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Contexto histórico: eutrofização e cianobactérias

As principais causas de degradação dos recursos hídricos são de origem antrópica, com destaque para a eutrofização. Esse fenômeno consiste no aumento do nível trófico de rios, lagos e reservatórios devido ao aporte de nutrientes – tipicamente nitrogênio e fósforo – e consequente desequilíbrio do ecossistema (SMITH; TILMAN; NEKOLA, 1999). É um fenômeno natural, no entanto, têm sido frequentemente acelerado pelas atividades humanas, recebendo o nome de eutrofização artificial. Esta tem sido associada à remoção da mata ciliar, ao desenvolvimento agrícola e industrial e, destacadamente, ao aumento da urbanização e às fontes pontuais de poluição (MOSS, 1988 *apud in* CODD<sup>1</sup> et al., 2000). Desta forma, o crescimento excessivo de algas e cianobactérias pode causar depleção de oxigênio, obstrução da passagem de radiação solar ao longo da coluna de água, alteração na qualidade da água, além da perda de biodiversidade (WANG, 2006).

As cianobactérias constituem um dos grupos fitoplanctônicos que mais causa preocupação, por sua potencial toxicidade. São, provavelmente, os primeiros microrganismos procarióticos e fotossintetizantes a surgir na Terra, há cerca de 3,5 bilhões de anos (SCHOPF e PACKER, 1987). Ainda hoje, as cianobactérias continuam a desempenhar um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas, contribuindo para o sequestro de dióxido de carbono (MORÁN, 2007 e GOERICKE e WELSCHMEYER, 1993) e também para fixação biológica de nitrogênio, essencial ao nível trófico primário (ZEHR et al., 2001). As cianobactérias são predominantemente aquáticas, mas podem ser encontradas em nichos terrestres. Têm a capacidade de sobreviver a ampla variedade de condições ambientais normalmente desfavoráveis a outros organismos planctônicos, incluindo grandes períodos de radiação solar ou limitação da mesma, além do excesso ou deficiência de nutrientes, sendo por isso nomeadas “ecostrategistas” (WHO, 1999; 2002).

---

<sup>1</sup> CODD, Geoffrey A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological engineering**, v. 16, n. 1, p. 51-60, 2000

Contudo, a reprodução e aglomeração exagerada desses microrganismos, evento conhecido como floração ou “*blooms*” (termo em inglês) – que pode ser visível como faixas azuis esverdeadas na superfície da água – tem consequências danosas ao meio ambiente e à saúde humana. Além de prejuízo aos aspectos estéticos dos cursos d’água, as cianobactérias podem produzir odor e sabor desagradáveis na água pela liberação de substâncias durante seu crescimento, aumentar os custos de tratamento de água, contaminar os mananciais e prejudicar os seus múltiplos usos (FALCONER, 1999, MA et al., 2012). As cianobactérias possuem elevadas taxas de reprodução e crescimento em águas mais quentes, entre 25 e 30°C (WHO, 1998) e por isso, há aumento da preocupação com o iminente aquecimento global, pois este poderia favorecer ainda mais a ocorrência de florações (PAERL et al., 2008; PAUL, 2008; O’NEIL et al., 2012).

Nos eventos de florações pode haver produção de metabólitos secundários tóxicos conhecidos como cianotoxinas. Tais toxinas são secretadas naturalmente, liberadas durante a fase de senescência ou também devido à lise (ruptura) celular, induzida principalmente pelo uso de algicidas (CHORUS e BARTRAM, 1999; WHO, 2002).

## **2.2. Cianotoxinas: caso de saúde pública**

As cianotoxinas se tornaram problema de saúde pública, com visibilidade mundial, após a ocorrência do caso conhecido como a “Tragédia de Caruaru”. O episódio ocorreu na cidade de Caruaru- PE, em 1996, quando a água utilizada para hemodiálise em uma clínica particular (conveniada ao Sistema Único de Saúde - SUS) levou mais de 60 pacientes a óbito. Após o ocorrido, descobriu-se que a mesma estava contaminada com MCs e cilindrospermopsinas (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998). Alguns anos depois, a tragédia se converteu em revisão da regulamentação brasileira relativa à qualidade da água potável, promovida pelo Ministério da Saúde em colaboração com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). A então Portaria GM n.º 36/1990, foi substituída pela Portaria MS n.º 1469 de 29 de dezembro de 2000, que incluía o controle de cianobactérias e cianotoxinas (AZEVEDO et al., 2002; BRASIL, 2000). Até hoje a portaria vem recebendo atualizações, sendo a Portaria de Consolidação nº5/2017 do Ministério da Saúde (MS) a que está em vigor até o presente momento (BRASIL, 2017).

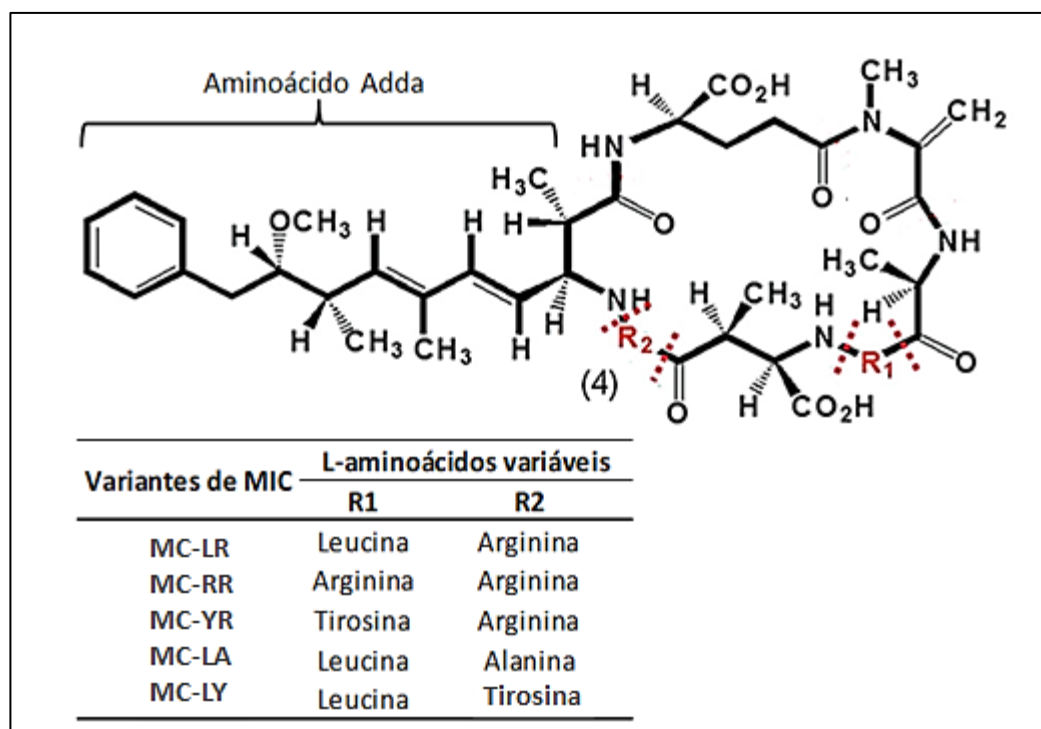
As cianotoxinas podem trazer riscos à saúde humana e animal, causando intoxicação por meio da ingestão, contato ou até inalação do vapor<sup>2</sup> da água contaminada (MEREL et al., 2013a), sendo a via oral, pela ingestão de água potável contaminada, a rota mais comum (FUNASA, 2014). Além disso, devido à significativa variabilidade química estrutural, as cianotoxinas possuem mecanismos de ação diferenciados, sendo classificadas de acordo com o sítio de ação em neurotoxinas (cérebro), hepatotoxinas (fígado) e dermatotoxinas (pele e mucosas) (MEREL et al., 2013a). Os efeitos sobre os ecossistemas se tornam especialmente preocupantes pela possibilidade de bioacumulação de tais toxinas nas teias alimentares, como no zôoplancton, bivalves e peixes (IBELINGS; CHORUS, 2007; PHAM; UTSUMI, 2018).

Entre as cianotoxinas, a MC, produzida pela espécie *Microcystis aeruginosa* (mais preponderante), mas também por gêneros como *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Planktothrix (Oscillatoria)* e *Cylindrospermopsis*, é a toxina mais comumente encontrada nas florações de cianobactérias (SPOOF, 2004; RODRÍGUEZ et al., 2007b; RASTOGI, MADAMWAR e INCHAROENSAKDI, 2015). Estas toxinas consistem em peptídeos cíclicos com sete grupos de aminoácidos, sendo dois deles variáveis e, por isso, possuem mais de 240 variantes (SPOOF e CATHERINE, 2017). Dentre tais aminoácidos, possui o denominado Adda, ao qual se atribui a toxicidade da MC (STOTTS et al., 1993; RASTOGI, MADAMWAR e INCHAROENSAKDI, 2015). Carmichael et al. (1988) propuseram oficialmente uma nomenclatura para tais MCs, que consiste do nome ‘microcistina’ – associado ao primeiro gênero produtor identificado – seguido da abreviação dos aminoácidos variáveis. Entre as variantes, a mais comum é a toxina MC-LR, em que a leucina (L) e a arginina (R) são os aminoácidos da posição variável, como demonstrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (HO, SAWADE, NEWCOMBE, 2012).

---

<sup>2</sup> Em caso, por exemplo, de reservatórios artificiais utilizados para recreação, o sol e os ventos podem ser responsáveis por transportar o vapor de água contaminada até o sistema respiratório de pessoas e animais.

**Figura 1 – Estrutura química geral de MC e suas principais variantes detectadas. As letras R1 e R2, destacadas em vermelho, representam os L-aminoácidos responsáveis pela nomenclatura das variantes da cianotoxina.**



Fonte: Adaptado de Li; Li; Li, 2017.

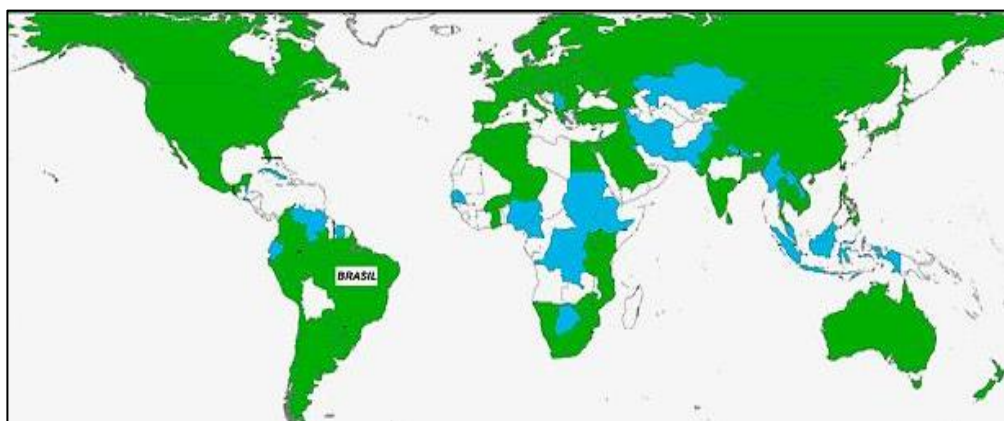
Em ambientes naturais, Welker e Steinberg (2000) estimaram que o tempo para decaimento de meia vida da MC-LR é estimado entre 90 e 120 dias por metro de coluna d'água. Harada et al. (1996) testaram a estabilidade da MC-LR, a partir de amostra não esterilizada de lago eutrofizado, sob diferentes associações de temperatura (5, 10, 21-30 e 40 °C) e pH (1, 5, 7 e 9). A MC-LR apresentou decaimento de meia-vida após 10 semanas sob pH 9 e 3 semanas sob pH 1, ambos à temperatura de 40 °C. Nas condições restantes, não apresentou variação significativa em sua estrutura. Resultado semelhante foi observado por Codd e Bell (1996), que testaram MC-LR sob condições de pH entre 1 a 10, associados à 20 °C e concluíram ser necessário o mínimo de 17 dias para início da queda de concentração da MC-LR (Codd e Bell, 1996 *apud in* SVIRČEV et al., 2017). Ainda, foi observado que as MCs são mais estáveis em água filtrada ou deionizada do que em corpos hídricos de água natural, onde há influência de microrganismos degradadores e pigmentos fotossintetizantes, que podem aumentar a fotossensibilidade das moléculas (PRAKASH et al., 2009; TSUJI et al., 1994). Além disso, as MCs apresentam solubilidade em água e recalcitrância, dificultando sua remoção (RASTOGI; SINHA; INCHAROENSAKDI, 2014). As cianotoxinas, portanto,

oferecem riscos aos sistemas de abastecimento de água (FUNASA, 2014; LEAL e SOARES, 2003; LI, LI, LI, 2017).

### 2.3. Cianotoxinas em reservatórios de água

No mundo todo, de 257 países e territórios estudados, em 109 países já foram reportados florações de *Microcystis* spp em reservatórios de água doce (HARKE et al., 2016). A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** demonstra de forma elucidativa a distribuição mundial da ocorrência destas florações, diferenciando-as entre florações tóxicas (em verde) e não tóxicas (em azul).

**Figura 2 - florações de *Microcystis* spp reportadas no mundo. A cor azul representa países ou territórios onde foram reportadas florações de *Microcystis* spp; a cor verde representa países ou territórios onde foram reportadas florações de *Microcystis* spp e detectada MC; a cor branca indica que não houve registro de floração e/ou detecção de MC.**



**Fonte: adaptado de Harke et al., 2016**

É possível notar que a quase totalidade dos países sul-americanos reportaram a ocorrência de florações tóxicas de *Microcystis*. Nestes países, frequentemente são utilizados reservatórios de água superficiais como fonte principal de abastecimento para consumo humano (DÖRR et al., 2010). No caso do Brasil, em torno de 56% dos municípios utilizam ao menos um manancial superficial como fonte de abastecimento (ANA, 2015). Devido ao fato de que a via oral é a principal forma de exposição à cianotoxinas, estes dados geram preocupação quando se trata do risco de intoxicação animal e humana.

Considerando os 26 estados brasileiros, após extensa revisão na literatura, em 14 deles já foram documentadas florações de cianobactérias, predominantemente em reservatórios artificiais (DÖRR et al., 2010; FINAL, 2006; JARDIM et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2011). Nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas

Gerais, Pará, Paraná, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Sergipe e Distrito Federal tais florações foram encontradas em reservatórios para abastecimento público (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Estes estados concentram 145 milhões de brasileiros, cerca de 70% da população brasileira, tornando preocupante o fato citado. Os gêneros mais comuns encontrados foram *Microcystis* e *Anabaena*. A produção de cianotoxinas em florações e suas consequências deletérias ao ser humano se tornaram alvo emergente para autoridades de saúde pública, mostrando os desafios de se controlar o crescimento massivo de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e da busca por tratamentos eficientes para remoção das cianotoxinas dissolvidas.

## **2.4. Métodos para remoção de MC-LR**

### **2.4.1. Processos físico-químicos**

Do total de água captada no Brasil, cerca de 80% passa por estações de tratamento de água (ETAs) (SNIS, 2016). O processo clássico de operações unitárias do denominado “ciclo completo” de tratamento de água – coagulação-floculação-sedimentação-filtração –, é utilizado atualmente em cerca de 70% das ETAs no Brasil (IBGE, 2011). Sua eficiência foi comprovada na remoção das células de cianobactérias sem danificá-las, retendo a toxina no interior das mesmas (HALL et al., 2000; DRIKAS et al., 2001; SUN et al., 2018). Contudo, Drikas et al. (2001) apontaram ainda a lise em mais de 90% das células não removidas dentro de 24 horas após o tratamento. Este resultado é relevante em razão da possível liberação das toxinas e provável intoxicação humana pela água das redes de abastecimento. Além disso, esse tratamento pode ser ineficiente para alguns gêneros de cianobactérias que possuem vacúolos gasosos, que impedem a sua sedimentação (PIETERSE e CLOOT, 1997).

Em relação à toxina extracelular, no Brasil, a Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2017), baseada na proposição da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1998 (WHO,1998), admite a concentração máxima aceitável de MC na água tratada para consumo humano de 1 µg/L. O ciclo completo tem se mostrado insuficiente para atender tal padrão de potabilidade (HALL et al., 2000; KURODA, 2006; MEREL et al., 2013a; LI, LI, LI, 2017). Desta forma, evidencia-se a urgência pela busca de soluções eficientes de tratamento.

O estudo de novas tecnologias para remoção das cianotoxinas extracelulares tem ganhado interesse ao redor do mundo. A cloração, usualmente utilizada para

desinfecção em ETAs, tem se mostrado eficiente, chegando a 100% de remoção de cianotoxina (MA et al., 2012; KURODA, 2006). Contudo, o processo possui forte dependência do pH e do teor de matéria orgânica na água (MA et al., 2012; KURODA, 2006; FAN et al., 2014), variando assim a dose de agente oxidante a ser utilizada. Existe, ainda, o risco de formação de subprodutos organohalogenados (HONG et al., 2008; CHU et al., 2017), como trihalometanos, e de manutenção de cloro residual acima da concentração limite de 0,1 mg/L na água tratada (BRASIL, 2011; RODRÍGUEZ et al., 2007b). Merel et al. (2010) pontuaram, ainda, que a cloração não deve ser tomada como medida corretiva suficiente se houver mais de um tipo de toxina presente na água. Este fato, comum em florações, requer condições diferenciadas de cloração, podendo o tratamento não atingir a eficiência mínima necessária (MEREL et al., 2010).

A ozonização também é um processo comumente utilizado em ETAs, no entanto, não há consenso sobre sua eficiência no tratamento de MC (EKE, WAGH, e ESCOBAR, 2018; LIU et al., 2017), sendo observado que pode aumentar a formação de trihalometanos, ácidos haloacéticos e tricloronitrometano se utilizado como pré-tratamento (ZHU et al., 2015). O processo também pode provocar ruptura das células de cianobactérias (WEN et al., 2017).

#### 2.4.2. Processos físicos

Entre os métodos que não envolvem agentes químicos, a utilização de carvão ativado promove eficiente remoção das toxinas extracelulares quando aplicado em etapa adicional nas estações de tratamento (HITZFELD et al., 2000; KURODA, 2006; SONOBE, 2018). Porém, alguns estudos têm constatado queda significativa na capacidade de adsorção pela competição e bloqueio dos sítios de sorção pela matéria orgânica, compostos residuais da cloração e pela variação de pH (HUANG et al., 2007; SHI et al., 2012). A regeneração do carvão ativado ou a sua destinação final quando o material exauriu sua capacidade adsorptiva também requerem cuidados e custos adicionais.

A filtração por membranas específicas (por exemplo, de acetato de celulose ou polisulfona, com variação de 125 a 225 nm) também têm apresentado viabilidade para remoção de MC (EKE, WAGH, e ESCOBAR, 2018). Membranas hidrofílicas foram apresentadas como detentoras dos maiores potenciais, devido à também propriedade

hidrofílica da MC. No entanto, tem-se mostrado que a interação de cargas entre a superfície da membrana e a cianotoxina é fator interferente na capacidade de adsorção da primeira. A interação de cargas, bem como a hidrofília da MC, têm se mostrado variável de acordo com o pH, sendo a molécula hidrofílica em pH neutro a básico e hidrofóbica em pH mais ácido. Não obstante, pode gerar dificuldades semelhantes às do carvão ativado ao atingir o limite da sua capacidade adsortiva (EKE, WAGH, e ESCOBAR, 2018).

#### 2.4.3. Processos biológicos

##### Descrição do processo de biodegradação

Considerando relações de custo benefício e as vantagens e desvantagens associadas às tecnologias de tratamento avançado de águas de abastecimento, os processos biológicos, há muito tempo já utilizados no tratamento de águas residuárias, podem ser vistos como promissores para a degradação de cianotoxinas (HO et al., 2012). A predação das cianobactérias por outros organismos planctônicos, por exemplo, por *Daphnia*, no entanto, é um processo muito lento (WU et al., 2015) e sujeito a oscilações de eficiência, uma vez que as cianobactérias podem desenvolver novos mecanismos de defesa (GER et al., 2014). Desta forma, a degradação da toxina extracelular por processos biológicos pode ser mais interessante.

O potencial da biodegradação da microcistina tem sido associado ao fato de alguns organismos produzirem naturalmente enzimas específicas capazes de transformar as cianotoxinas em outros compostos e subprodutos não tóxicos (SAITO et al., 2003; HO et al., 2007). Tais enzimas constituem o denominado gene *cluster* e consistem de três peptidases intracelulares conhecidas como *mlrA* (microcistinase), *mlrB*, *mlrC* e um gene transportador (*mlrD*), sendo a *mlrA* citada como mais importante no processo de biodegradação (JIANG et al., 2011; ZHU et al., 2016). Isso se deve ao fato de que a *mlrA* tem capacidade de quebrar a estrutura cíclica da MC, resultando em uma molécula linear 160 vezes menos tóxica (BOURNE et al., 1996). Esta via de degradação foi extensamente estudada, revelando que seus subprodutos consistem em MC linearizada, o aminoácido Adda e tetrapeptídeos (LI, LI, LI, 2017; SHIMIZU et al., 2011). O único Adda presente na molécula de MC, quando avaliado como subproduto de biodegradação da mesma, não apresentou toxicidade aguda em estudos realizados com ratos (HARADA et al., 2004).

Recentemente descobriu-se que esta não é a única via de degradação de cianotoxinas, ainda que este gene seja característico de bactérias degradadoras de cianotoxinas (LI, LI, LI et al., 2017). Pesquisas como de Lezcano et al. (2016) não encontraram, em 72% das cepas bacterianas estudadas, o gene *mlrA*, mas ainda assim tais cepas mostraram potencial de degradação de MC. Lezcano et al. (2017) também sugerem e reforçam a existência e abundância de outras vias de degradação, apesar de ainda não completamente descritas. Por todo o exposto, a biodegradação vem sendo amplamente estudada pela possibilidade de ser um tratamento sem necessidade de uso de produtos químicos e com baixo risco de subprodutos tóxicos.

Ao longo das últimas décadas, desenvolveram-se muitas pesquisas relacionadas à biodegradação da MC, em razão de sua abundância nas florações. Aos poucos, a comunidade acadêmica vem conhecendo e descrevendo os microrganismos capazes de tal ação (BOURNE et al., 1996; KURIAMA, 2012; LEMES et al., 2008; MINILLO et al., 2013; SAITO et al., 2003; LI; LI; LI, 2017). Além disso, os fatores ambientais intervenientes, tais como temperatura, pH, concentração de microrganismos degradadores, concentração da toxina, presença de nutrientes, possibilidade de formação de biofilme e disponibilidade de luz têm sido investigados (LI; LI; LI, 2017; MINILLO et al., 2013, ZHU et al., 2016).

#### Fatores intervenientes no processo de biodegradação

A temperatura e pH são os fatores abióticos mais estudados. É consenso entre a maioria das pesquisas que o intervalo entre 25 – 30 °C conduz às melhores taxas de biodegradação (BAO; WU, 2016; MALTA, 2018; LI; LI; LI, 2017), provavelmente pela desaceleração do metabolismo e/ou por inibição das enzimas que atuam na degradação da cianotoxina (LI, LI e LI, 2017). Wang et al. (2007) estudaram a remoção de MC-LR e MC-LA em filtros biológicos de carvão ativo granulado, sob as temperaturas de 22, 25, 30 e 40 °C. Observaram também que as melhores eficiências de remoção ocorreram sob as temperaturas de 25 e 30 °C, ao passo que a temperatura de 40 °C não apresentou significativa remoção de MC, provavelmente por inibição das enzimas em altas temperaturas. No que se refere ao pH, a maioria dos estudos constatou que a faixa entre 7 e 8 é a que promove melhores resultados de biodegradação, sendo o pH próximo à neutralidade (7,1 a 7,5) o melhor para o processo (LI, LI e LI, 2017; MINILLO et al., 2013, MEREL et al., 2013; MORÓN-LÓPEZ et al., 2017; ZHU et al., 2016). Os efeitos

do pH sobre a biodegradação podem ser atribuídos à inibição de enzimas, mudança da velocidade de absorção de nutrientes por variação estrutural dos mesmos ou desaceleração do metabolismo (LI, LI e LI, 2017).

Em relação à adição de outras fontes de nutrientes, tais como carbono, nitrogênio e fósforo, alguns resultados encontrados em literatura são conflitantes. Lezcano et al. (2016) relataram que esta diferença possivelmente está ligada ao metabolismo diferenciado entre cepas com presença ou ausência do gene *cluster*. A presença de fontes alternativas de carbono e nitrogênio, enquanto requerimento nutricional, posteriormente melhorou a eficiência de degradação de MC para cepas dotadas do gene, enquanto prejudicou daquelas que não o possuíam. Isto provavelmente pelo aumento (ou não) nas taxas de crescimento dos microrganismos. Morón-López et al. (2017) observaram ainda que a diferença de concentração dos nutrientes causou resultados contraditórios em um mesmo tipo de cepa. À exemplo de cepa bacteriana com ausência de gene *cluster* (denominada IM-4), que apresentou melhora nas taxas de degradação em concentrações médias de nitrato de sódio (20 mg/L), levando 9 horas para degradar por completo a MC, enquanto em baixas e altas concentrações do nutriente (2 e 100 mg/L), levaram em torno de 24h. Em relação ao de fósforo, sob várias formas, é consenso até o momento desta pesquisa que sua presença pode influenciar positivamente nas taxas de crescimento e, conseqüentemente, nas taxas de degradação (LI et al., 2014; MEREL et al., 2013; MORÓN-LÓPEZ et al., 2017). Em contraste, a ausência total de nutrientes pode retardar expressivamente a degradação, pelo efeito reverso no metabolismo (LI et al., 2011, 2012).

A presença de biofilme imobilizado em meio suporte foi capaz de aumentar em até quatro vezes a taxa de degradação de microcistinas quando comparado com microrganismos dispersos em meio líquido (TSUJI et al., 2006; MINILLO et al., 2013). Yang et al. (2018) observaram ainda, que a presença de outros gêneros bacterianos no biofilme levaram à taxas de degradação maiores do que em cepas de apenas um gênero. Desta forma, é possível atribuir a melhora da eficiência de degradação ao aumento da concentração de microrganismos e da quantidade de gêneros presentes (provavelmente vivendo em simbiose). Também foi observado que muitos dos gêneros degradadores de cianotoxinas são encontrados em filtros biológicos de ETA (LI, LI e LI, 2017), sendo parte inerente da camada biológica, o que reforça a ideia de que a presença dos mesmos

favorece as taxas de biodegradação. Apesar disso, outros estudos obtiveram resultados não compatíveis com os acima citados (e.g. LI et al., 2011). A discrepância entre alguns resultados pode ser atribuída ao desenvolvimento das populações capazes de degradar as cianotoxinas em locais distintos, variando as condições ambientais mais favoráveis, como já observado por Klitzke e Fastner (2012) e Li et al. (2015).

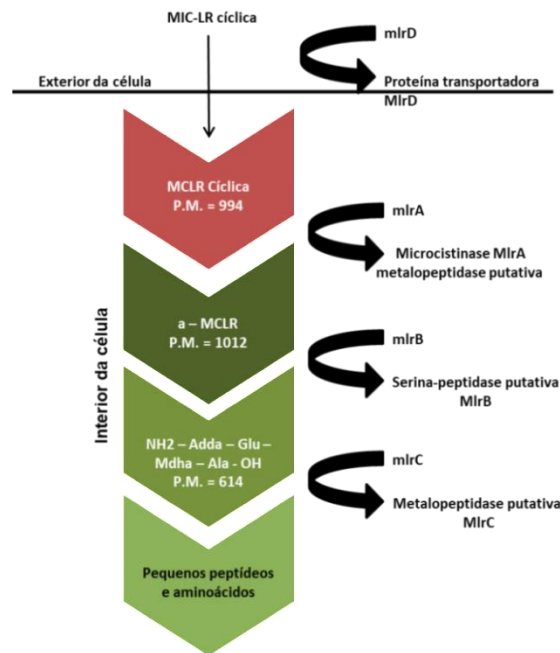
Dentro desse contexto, ao contrário do que se pensava, não parece ser necessária longa exposição prévia dos microrganismos à cianotoxina para propiciar a sua degradação. A primeira exposição às cianotoxinas promove a fase lag (período de adaptação ou latência) na microbiota capaz de degradá-la, sendo este o único diferencial (DZIGA et al., 2017; EDWARDS et al., 2008; LEZCANO et al., 2018). Há influência da concentração de toxina disponível, sendo que maiores concentrações normalmente elevam as eficiências de biodegradação (EDWARDS et al., 2008; HO et al., 2012; MALTA, 2018; MORÓN-LOPEZ, NIETO-REYES e EL-SHEHAWY, 2017). Morón-López et al. (2017) observaram ainda que a maior concentração de toxina induziu a uma maior expressão dos genes *cluster* nos microrganismos que os possuíam, considerados por estes pesquisadores mais eficientes para biodegradação frente àqueles com ausência de tais genes. Tais fatos podem ser favoráveis às ETAs, uma vez que podem diminuir o tempo necessário para realizar o processo completo e torná-lo viável para aplicação em escala real.

#### O gênero *Sphingomonas*

A diversidade descrita de microrganismos capazes de realizar biodegradação tem crescido nos últimos anos, apesar de em sua maioria, serem bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* e *Sphingopyxis* (PARK et al., 2001; TSUJI et al., 2006; LI, LI, LI, 2017). O gênero *Sphingomonas* é bastante estudado no quesito de degradação de MCs (JONES et al., 1994; PARK et al., 2001; TSUJI et al., 2006, LI, LI, LI, 2017), cabendo ressaltar que não é enquadrada como patógeno para o ser humano. Esses organismos são encontrados em ambientes múltiplos, são bactérias aeróbias, gram-negativas, não fermentativas e oxidase-positivas (TAKEUCHI; HAMANA; HIRAIISHI, 2001). Tem sido demonstrado que este gênero possui habilidades únicas, como a capacidade de degradação de contaminantes refratários (WHITE; SUTTON; RINGELBERG, 1996) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HOEFEL et al., 2006). Além disso, foram consideradas como um dos poucos gêneros capazes de

degradar MC em águas naturais em condições aeróbias (BOURNE et al., 1996). Após extensa revisão de literatura, foi encontrada uma única via de biodegradação de MC, detalhadamente caracterizada, também pelo gênero *Sphingomonas* (KORMAS e LYMPEROPOULOU, 2013 ZHU et al., 2016), demonstrada na Figura 3.

**Figura 3 - Via de degradação da MC-LR e a formação de produtos intermediários (menos tóxicos) pelo gênero *Sphingomonas* (cepa ACM-3962). PM: peso molecular.**



**Fonte: adaptado de Kormas e Lymeropoulou, 2013.**

A biodegradação da MC, portanto, deve ser estudada não somente em relação à compreensão dos mecanismos de conversão, mas também aos fatores ambientais intervenientes, tais como temperatura, pH, concentração de inóculo, concentração da toxina, presença de nutrientes, presença de biofilme e disponibilidade de luz. Em função da insuficiência de informações sobre o tema, especialmente em países de clima tropical/subtropical, a presente pesquisa voltou-se ao estudo da biodegradação de MC-LR em laboratório avaliando a influência da presença de luz, variação de temperatura e concentrações iniciais de MC-LR.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar, em escala laboratorial, a degradação biológica de MC-LR como forma de contribuir para o aprimoramento de tecnologias voltadas ao tratamento avançado de águas de abastecimento, considerando os padrões de potabilidade atualmente vigentes no Brasil. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a eficiência de remoção da cianotoxina a partir de inóculos bacterianos provenientes de diferentes fontes (e.g., reservatórios e filtros rápidos de ETAs);

- Estimar a eficiência de remoção biológica da microcistina-LR em escala de bancada sob diferentes condições de concentração inicial da cianotoxina, luz e temperatura;

- Avaliar se a presença de meio suporte para a comunidade microbiana favorece a biodegradação do poluente-alvo.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Organização Geral da pesquisa

A pesquisa foi dividida em três etapas, com intuito de facilitar a visualização e análise dos fatores intervenientes estudados.

A etapa A consistiu da escolha de dez inóculos, representados por amostras ambientais e laboratoriais. Estas amostras foram testadas sob iguais condições iniciais, exceto pela concentração inicial de MC-LR: um grupo recebeu concentração de 20 µg/L, e o outro grupo de 100 µg/L. O objetivo da etapa A foi comparar a influência da concentração inicial da toxina no processo de degradação e apontar os três melhores inóculos, isto é, aqueles que obtivessem maior porcentagem de remoção de MC-LR, para prosseguir na etapa B.

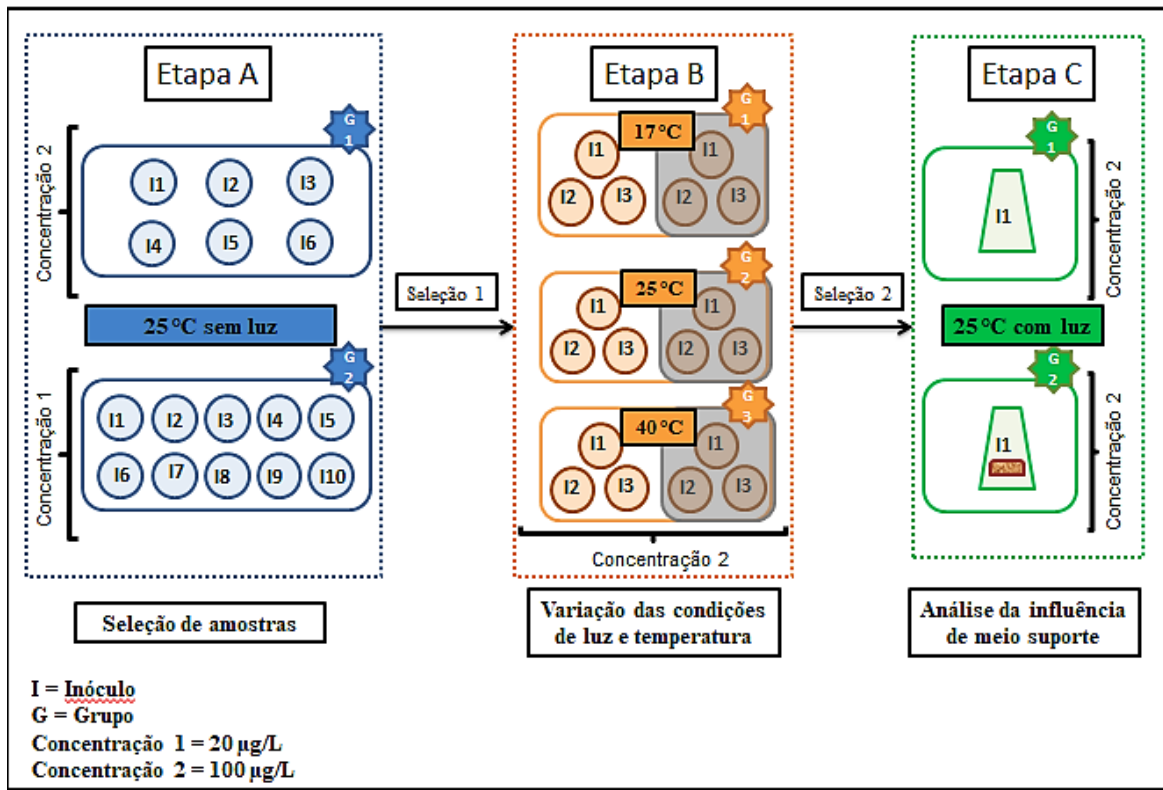
A etapa B consistiu de três grupos de amostras (cada grupo contendo os três inóculos selecionados) com variação das condições de luz e temperatura (a serem detalhados no item 0 Fonte: da própria autora.

Etapa B – Avaliação das condições ambientais). Nesta etapa, selecionou-se o inóculo e condições iniciais mais eficientes para prosseguir na etapa C.

A etapa C foi dividida em dois grupos, diferenciando-os pela inserção de camada suporte. O objetivo principal desta etapa foi observar as possibilidades de crescimento de biofilme na camada suporte e auxílio no aumento da eficiência de degradação de MC-LR. Todas as etapas foram realizadas em duplicata e possuíam grupos controle. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** resume as etapas descritas de forma elucidativa.

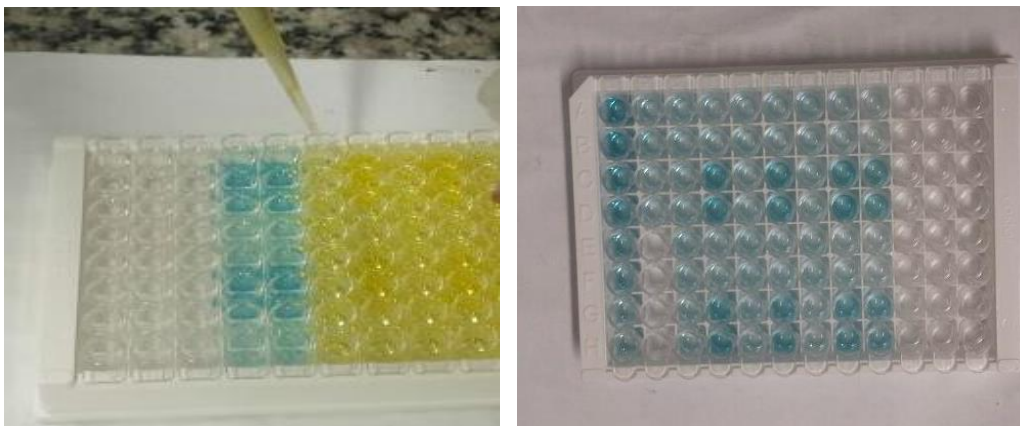
Em todas as etapas, a quantificação da MC-LR foi realizada pelo método bioquímico do Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima – ELISA, no Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE). As **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Figura 5 elucidam as etapas de realização de tal método.

Figura 4 - Organização geral da pesquisa: divisão em três etapas sequenciadas, variando, respectivamente em cada uma a concentração inicial de MC-LR (A), combinação de temperatura e luz (B) e presença de meio suporte (C).



Fonte: da própria autora.

Figura 5 - Exemplo de realização do método ELISA. A coloração amarela indica a solução dos reagentes do kit e a azul, o final da reação entre estes e a MC. A coloração azul mais escura representa concentrações mais altas e a azul mais clara, as mais baixas.



Fonte: da própria autora.

#### 4.2. Obtenção do extrato de MC-LR

O extrato de MC-LR foi obtido a partir da cepa de *M. aeruginosa* (BB005). A cepa foi cultivada ao longo de 30 dias por Ortolan (2016) em meio WC, com o pH previamente ajustado para 8,0 e tamponado com TRIS a 0,5 g/L. A cultura foi mantida com fotoperíodo de 12 horas e com intensidade luminosa de 60  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Ao final do cultivo, foi realizada uma sequência de quatro etapas de congelamento e de descongelamento da cultura, segundo o método proposto por Törökne et al. (2004) e Yilmaz et al. (2008) para extração de toxina, visto que essa metodologia permite a liberação de toxinas intracelulares da cianobactéria por lise celular. O material obtido foi armazenado em freezer, e apresentou concentração aproximada de 350  $\mu\text{g}/\text{L}$  de MC-LR (Ortolan, 2016), sendo que a quantificação desta foi realizada pelo método bioquímico do Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima – ELISA.

#### 4.3. Meios de cultivo

Nas etapas A, B e C utilizou-se o meio mineral Zinder (ZINDER et al., 1984), acrescido de vitaminas (com receita adaptada de WIDDEL & PFENNIG, 1984 e DUBOURGUIER et al., 1987) e solução traço de metais (ZINDER et al., 1984). As composições dessas soluções estão descritas no Anexo I.

Na etapa A também se testou meio nutriente orgânico composto por glicose (90  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), extrato de levedura (100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) e peptona (100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) – meio de cultivo utilizado por Minillo et al. (2013) – em uma amostra (amostra 10), unicamente para se comparar a porcentagem de degradação da MC-LR na presença de fonte de carbono nesta etapa.

O substrato Zinder foi preparado em capela de fluxo laminar (próximo ao bico de Bunsen). Cada reagente foi pesado e solubilizado antes de ser transferido para um béquer (com capacidade de 2000 mL) completando-se o volume até 1000 mL. Em seguida, o substrato foi autoclavado a 121°C, por 15 minutos. As soluções de metais e de vitaminas (previamente filtradas em membranas) foram obtidas de estoque e adicionadas apenas no primeiro dia do experimento (dia 0 – zero). A Figura 6 apresenta os materiais para preparação do meio Zinder.

**Figura 6 – Materiais utilizados para o preparo do meio Zinder, antes deste seguir para autoclave.**



**Fonte: da própria autora.**

#### **4.4. Etapa A – Seleção de inóculos**

Na etapa A, foram avaliadas duas concentrações iniciais diferentes do poluente alvo, sendo aproximadamente 20  $\mu\text{g/L}$  ou 100  $\mu\text{g/L}$  de MC-LR, que são concentrações frequentemente observadas em florações menos ou mais extensas de cianobactérias tóxicas (CHORUS, INGRID; BARTRAM, 1999). Os testes foram realizados em bancada, tendo um total de quatro grupos, em que dois deles foram grupos “controle” e outros dois grupos que receberam os inóculos.

Dividiram-se os grupos controle de acordo com a composição do meio, nomeando o primeiro grupo como “Controle Água” e o segundo como “Controle Zinder”. O grupo Controle Água foi representado por água deionizada, esterilizada (121 °C - 20 min), acrescida do extrato bruto da toxina (não esterilizado e não filtrado), com sua microbiota associada. O grupo Controle Zinder foi representado por meio Zinder esterilizado (121 °C - 20 min), acrescida do mesmo extrato bruto da toxina. Este segundo grupo representou o meio utilizado nos grupos que receberam os inóculos. O extrato bruto de MC-LR não foi esterilizado, portanto, foi mantida sua microbiota associada. Dos grupos inoculados, utilizou-se meio Zinder esterilizado (121 °C - 20 min), acrescida do extrato bruto da toxina e inoculação da amostra na proporção de 10% em volume do meio (10 mL em 100 mL de volume total).

As amostras ambientais foram testadas sob diferentes concentrações iniciais de MC-LR, sendo elas de 20 e 100 µg/L. As amostras laboratoriais foram testadas somente sob concentração inicial de 100 µg/L. O Quadro 1 detalha as fontes de cada inóculo.

**Quadro 1 - Identificação das amostras ambientais (1 a 6) e de culturas laboratoriais (7 a 10), assim como o meio utilizado em cada caso.**

<b>Amostra</b>	<b>Fonte</b>	<b>Coordenadas de origem</b>	<b>Meio</b>
<b>Amostra 1</b>	Lago do Shopping Passeio (antiga pedreira)	22° 00' 24,63'' S 47° 54' 18,55'' O	Zinder
<b>Amostra 2</b>	Represa do Lobo	22° 10' 07,48'' S 47° 54' 12,75'' O	Zinder
<b>Amostra 3</b>	Nascente Rio Tijuco Preto	22° 00' 37,26'' S 47° 52' 28,52'' O	Zinder
<b>Amostra 4</b>	Foz do Rio Santa Maria do Leme	22° 00' 01,00'' S 47° 54' 00,00'' O	Zinder
<b>Amostra 5</b>	ETA São Carlos – saída dos filtros	22° 00' 39,81'' S 47° 53' 55,38'' O	Zinder
<b>Amostra 6</b>	ETA São Carlos – entrada dos filtros		Zinder
<b>Amostra 7</b>	Mix 1 – cultura de <i>Sphingomonas</i>	22° 00' 08,20'' S 47° 55' 46,30'' O	Zinder
<b>Amostra 8</b>	Mix 2 – cultura de <i>Brevundimonas</i> .	22° 00' 08,20'' S 47° 55' 46,30'' O	Zinder
<b>Amostra 9</b>	Mix 3 – culturas de <i>Sphingomonas</i> . e <i>Brevundimonas</i> .	22° 00' 08,20'' S 47° 55' 46,30'' O	Zinder
<b>Amostra 10</b>	Mix 3 – cultura de <i>Sphingomonas</i> . e <i>Brevundimonas</i> .	22° 00' 08,20'' S 47° 55' 46,30'' O	Carbono

O conteúdo das amostras foi mantido em *erlenmeyers*, fechados com tampões de algodão (para possibilitar a passagem de oxigênio), dentro de incubadora (sem luz evitando a possibilidade de foto-oxidação da MC-LR) na temperatura de 25 °C, em volume total de 100 mL, sem camada suporte. Os testes tiveram duração de quatro dias, com coleta de amostras no dia 0 (dia da inoculação), dia 1, dia 2 e dia 4. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário (11:00 h da manhã) e foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada amostra nos dias pré-definidos. A temperatura inicial foi escolhida de acordo com relatos encontrados em literatura, a qual mostrou que a faixa de 25 a 30 °C promove melhor desempenho na biodegradação de MC (LI; LI; LI et al., 2017; MINILLO et al., 2013). Os dias de ensaio e coleta foram baseados no estudo de

Minillo et al. (2013), o qual relatou remoção completa de MC após 4 dias de experimento.

#### 4.4.1. Obtenção e descrição das amostras

##### 4.4.1.1 Amostras ambientais

As amostras numeradas de 1 a 6 (Quadro 1) foram coletadas em frasco de polietileno e mantidas sob refrigeração a 4° C (por uma semana) até o dia inicial do experimento. As amostras foram submetidas ao processo de filtração em membrana de 0,6 µm para a retirada do excesso de sólidos grosseiros e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos, rotação de 11.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804R). A centrifugação foi repetida por três vezes até obter a formação de pellets. Após todo o processo, retirou-se o sobrenadante até restar no tubo o volume aproximado de 20 mL (volume mais próximo ao pellet formado) e homogeneizou-se a amostra em agitador do tipo Vortex para inoculação no béquer (cada amostra em seu respectivo béquer).

A amostra 1 foi coletada no lago próximo ao Shopping Passeio São Carlos, em área de antiga pedreira (Figura 7). Escolheu-se este lago pela proximidade com a área urbana e, sendo assim, provavelmente já tenha passado pelo fenômeno da eutrofização e contenha microrganismos que possivelmente utilizem cianotoxinas como substrato em seu metabolismo.

**Figura 7 - Lago urbano próximo ao Shopping Passeio – São Carlos/SP**



Fonte: Google Maps, 2018

A amostra 2 refere-se à represa do Lobo, também conhecida como Broa (Figura 8). Esta represa possui 35 km<sup>2</sup> de espelho d'água, com sua barragem no município de Itirapina (SP) e serve como reservatório da Usina Hidrelétrica do Lobo, além de atrair pessoas para atividades recreativas (PREFEITURA DE SÃO CARLOS, 2010).

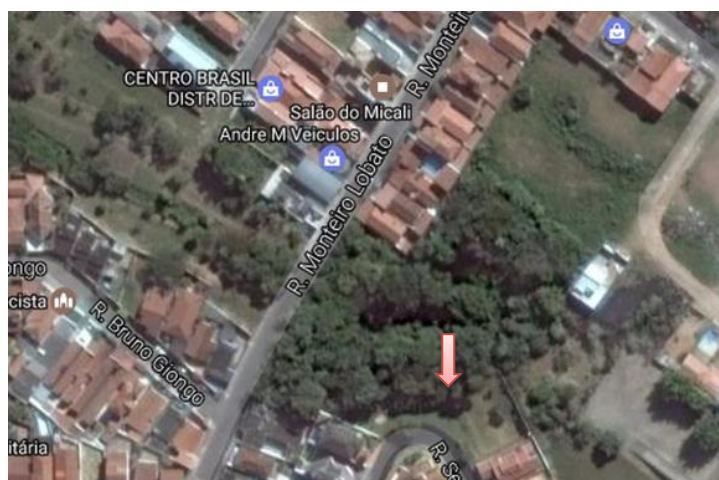
**Figura 8 - Represa do Lobo**



**Fonte: Prefeitura de Itirapina.**

A amostra 3 (Figura 9) representa a nascente do córrego Tijuco Preto. Este córrego nasce em área urbana e atravessa o município de São Carlos na direção Leste-Oeste, sendo um dos afluentes da margem esquerda do Rio do Monjolinho. A amostra 4 (Figura 10) é a foz do córrego Santa Maria do Leme, localizada próxima ao Campus I da USP-São Carlos. Estes locais recebem efluentes domésticos e foram escolhidos por representarem ambientes onde possivelmente se encontra uma significativa diversidade de microrganismos.

**Figura 9 - Nascente do córrego Tijuco Preto. A seta indica o local de coleta.**



**Fonte: Google Maps, 2018.**

**Figura 10 - Foz do córrego Santa Maria do Leme.**



**Fonte: Google Maps, 2018.**

As amostras 5 e 6 representam as amostras retiradas respectivamente da saída e entrada dos filtros de areia da estação de tratamento de água Vila Pureza, de São Carlos, operada pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE), com colaboração da Eng<sup>a</sup> Leila Jorge Patrizzi (Figura 11). A estação trata uma vazão média de 480 L/s de água proveniente de mananciais superficiais por meio de tratamento do tipo convencional, que consiste em coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção, fluoretação e correção de pH (SAAE, 2017). O filtro de areia foi escolhido, pois, de acordo com Minillo et al., al. (2013), Park et al. (2001) e Wang et al. (2007a), há microrganismos integrantes da camada biológica dos mesmos que têm potencial de remover MC-LR da água.

**Figura 11 - Filtros de areia da ETA de São Carlos – SAAE**



**Fonte: da própria autora.**

#### 4.4.1.2 Amostras laboratoriais

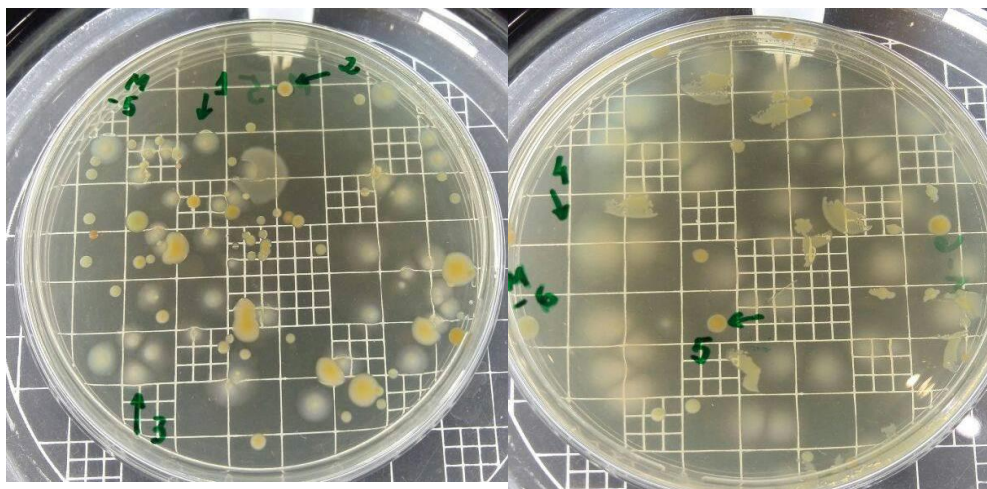
As amostras laboratoriais representavam bactérias do gênero *Brevundimonas*, *Sphingomonas* e colônias de bactérias (não identificadas para esta etapa), todas isoladas do extrato bruto de MC-LR (Figura 12). As culturas laboratoriais foram cultivadas em parceria com o Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos – USP (EESC-USP). Utilizaram-se placas de Petri autoclavadas por 20 minutos, a 121°C e pressão 1 atm e meio ágar. As placas foram inoculadas com as amostras de bactérias pela técnica de esgotamento por estrias e incubadas invertidas a 25°C sem luz. O período de incubação foi de sete dias.

A amostra 7, nomeada de Mix 1, continha bactérias do gênero *Sphingomonas* e solução contendo duas colônias (numeradas 1 e 2) provenientes do extrato bruto de MC-LR.

A amostra 8 nomeada de Mix 2 continha bactérias do gênero *Brevundimonas* e solução contendo duas colônias (numeradas 1 e 2) provenientes do extrato bruto de MC-LR.

As amostras 9 e 10 continham bactérias dos dois gêneros – *Sphingomonas* e *Brevundimonas* – e solução contendo três colônias (numeradas 3, 4 e 5) provenientes do extrato bruto de MC-LR. A amostra 9 apresentava meio mineral Zinder e a amostra 10, meio orgânico (com carbono), sendo esta a única diferença entre elas.

**Figura 12 - Colônias cultivadas no laboratório LPB, a partir do extrato bruto de MC-LR**



**Fonte: da própria autora.**

#### 4.5. Etapa B – Avaliação das condições ambientais

Na etapa B, manteve-se apenas a concentração de 100 µg/L de MC-LR, uma vez que a literatura relata melhores eficiências de biodegradação em concentrações mais altas de cianotoxina (LI; LI; LI et al., 2017).

A partir dos três melhores inóculos selecionados na etapa A, testaram-se três faixas de temperaturas pré-definidas, sendo T1: 17 °C (temperatura média comumente observada nas águas superficiais no período de inverno), T2: 25 °C (temperatura média da água comumente observada no verão) e T3: 40 °C (para observar o comportamento do processo em condição extrema). Em cada uma dessas temperaturas, houve um grupo correspondente com ausência e presença de luz. Esses testes foram realizados em incubadoras Nova Ética® com fotoperíodo, que permitem regular a temperatura e as intensidades de luz desejadas. Para o grupo que recebeu luminosidade, a intensidade foi fixada em 100 µE/m<sup>2</sup>, enquanto o outro grupo foi envolto em papel alumínio para manter ausência de luz por todo o período do teste.

A partir desta etapa, a concentração inicial de MC-LR escolhida foi de 100 µg/L. Ainda, o extrato de MC-LR foi esterilizado em autoclave, a 121°C por 15 minutos, a fim de eliminar a presença de outros microrganismos interferentes no processo de degradação e de elementos orgânicos associados à MC em seu estado bruto. De acordo com Lemes et al. (2008), a presença destes últimos representa fonte de carbono e energia para microrganismos degradadores, que podem priorizá-los em face da MC-LR. Estes procedimentos foram realizados dois dias antes da inoculação, deixando as soluções contendo o meio mineral Zinder e o extrato bruto de MC-LR sob as respectivas temperatura de teste por no mínimo 24 horas antes de iniciar os procedimentos, a fim de se evitar a morte de microrganismos estudados por influência da alta temperatura. Ressalta-se apenas que, quando utilizado como amostra, o volume de extrato bruto de MC não foi esterilizado. O volume utilizado como toxina a ser degradada foi o mesmo dos outros inóculos, ou seja, aquele esterilizado.

O conteúdo de cada um dos três inóculos selecionados foi inserido em *erlenmeyers*, contendo meio Zinder (esterilizado), acrescida do extrato bruto de MC-LR (esterilizado) e sem camada suporte, na proporção de 10% em volume (10 mL em 100 mL de volume total). O restante foi preenchido com meio Zinder e extrato bruto de MC-LR.

Dentro dos grupos controle, houve modificações: o grupo Controle Água não foi utilizado. Já o grupo Controle Zinder consistiu de meio Zinder esterilizado (121°C - 20 min), acrescida de MC-LR também esterilizada.

Os testes foram realizados em duplicata e tiveram duração de quatro dias, com coleta de amostras no dia 0 (dia da inoculação) e dia 4. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário.

#### **4.6. Etapa C – Avaliação da presença de meio suporte**

Na etapa C, manteve-se apenas a concentração de 100 µg/L de MC-LR uma vez que a literatura relata melhores eficiências de biodegradação em concentrações mais altas de cianotoxina (LI; LI; LI et al., 2017).

A partir do melhor inóculo e melhor condição ambiental selecionados na etapa B, com fotoperíodo de 12 horas em intensidade luminosa de 100 µE/m<sup>2</sup> realizaram-se testes para avaliação da influência da presença de meio suporte sobre o processo de biodegradação.

O inóculo selecionado foi inserido em solução com concentração inicial de 100 µg/L de MC-LR em *erlenmeyers* (em volume aproximado de 250 mL) sem e com presença de camada suporte (espuma de poliuretano), conforme ilustra a Figura 13. A espuma de poliuretano foi escolhida por ser um material inerte, comumente utilizado em testes com efluentes sanitários.

**Figura 13 – Preenchimento dos erlenmeyers com espumas de poliuretano para a etapa C, com destaque em vermelho.**



**Fonte: da própria autora.**

Esta etapa foi dividida em três ciclos de quatro dias. Cada ciclo consistiu em adicionar no primeiro dia a solução com concentração inicial de 100  $\mu\text{g/L}$  de MC-LR, meio Zinder e inóculo (mantendo a proporção de inóculo em 10% em volume) e no último dia (4º dia), após a coleta para quantificar a concentração final de MC-LR, descartá-la totalmente (processo em batelada). Esperava-se, com isso, um aumento temporal progressivo da eficiência dos inóculos com presença de meio suporte, devido à possibilidade de formação de biofilme. As espumas de poliuretano foram mantidas dentro dos *erlenmeyers*, sem passar por processo de esterilização ou lavagem, bem como evitou-se o contato destas com outros materiais ou o meio externo.

No primeiro ciclo, fez-se coleta no dia 0 (zero – dia da inoculação) e no quarto dia. Nos dois ciclos seguintes, fez-se coleta no dia 0, dia 2 e dia 4 das amostras que continham meio suporte, a fim de observar se a existência de biofilme aumentaria as porcentagens de degradação da MC-LR.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Etapa A

As Figura 14, Figura 15 e Figura 16 representam o decaimento das concentrações de MC-LR durante o período do ensaio (quatro dias) em cada uma das amostras, sob diferentes condições iniciais (concentrações iniciais de toxina – Condição 1: ~20µg/L e Condição 2: ~100 µg/L).

**Figura 14 - Decaimento de MC-LR por culturas laboratoriais, durante os quatro dias de ensaio da etapa A**

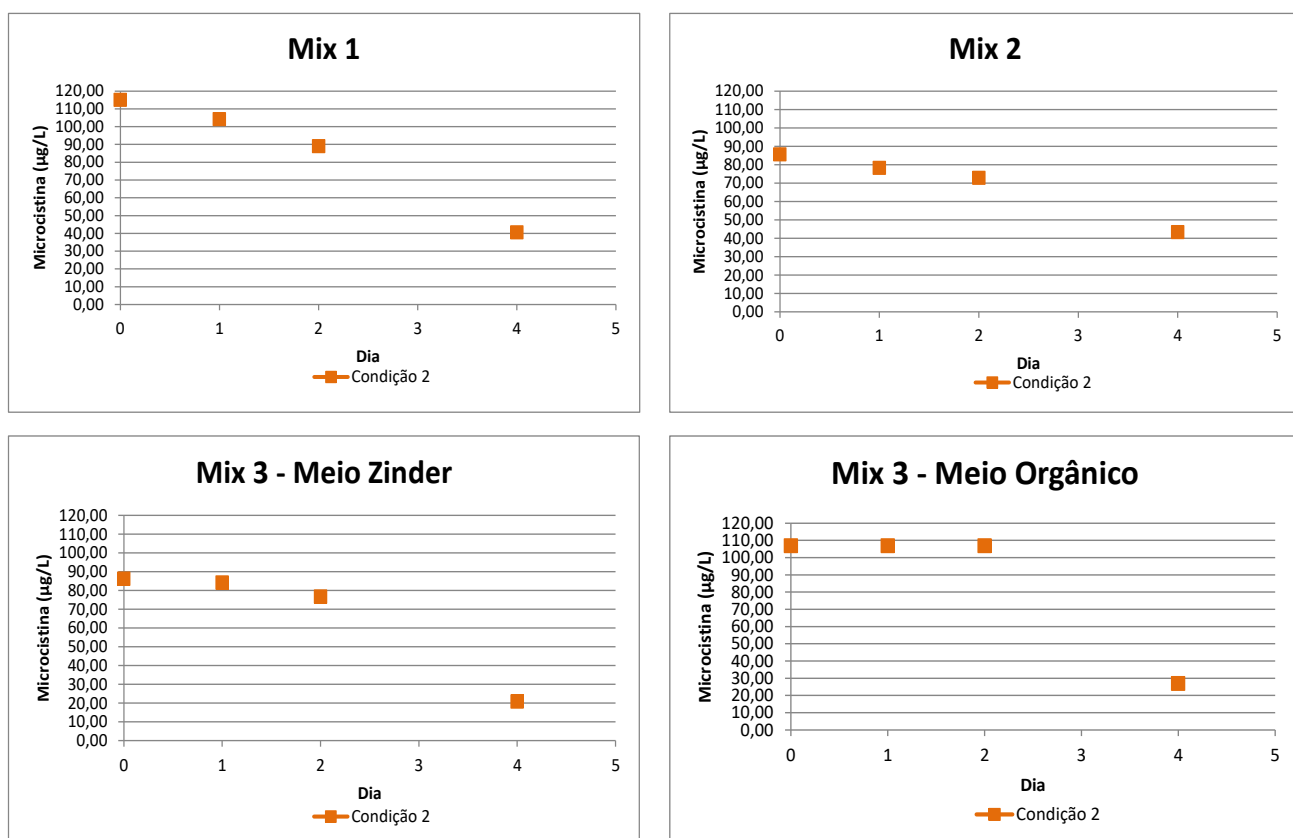
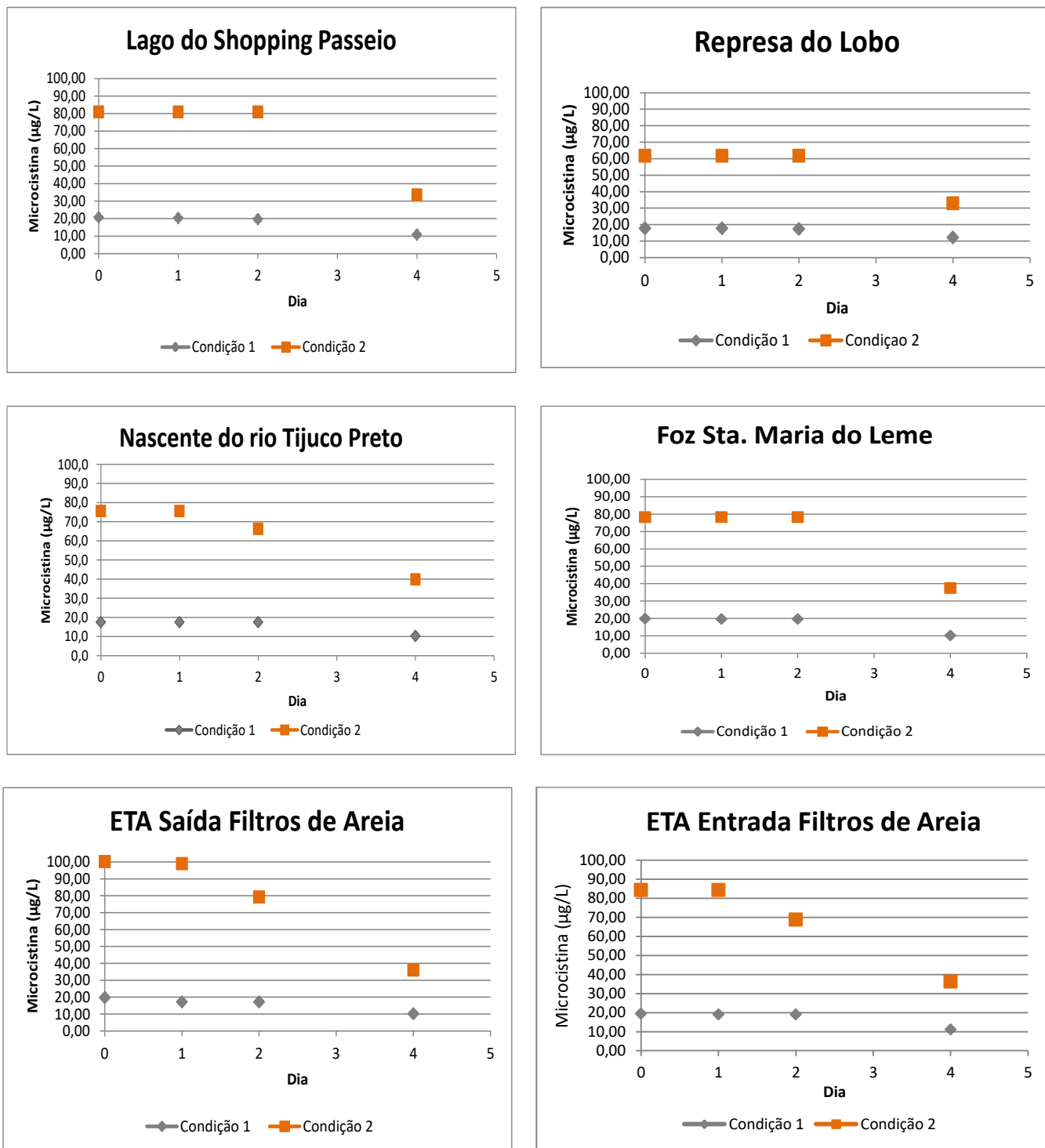
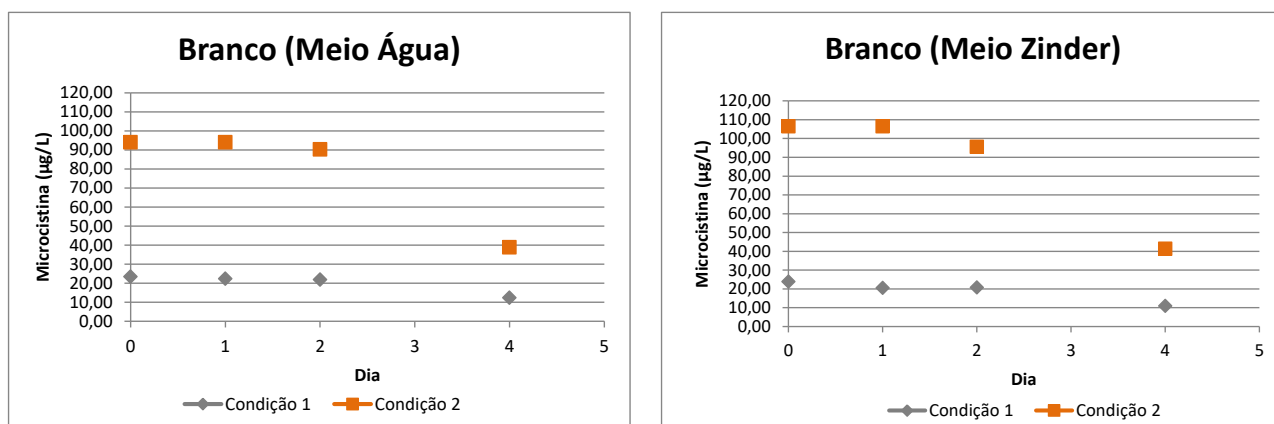


Figura 15 - Decaimento de MC-LR por amostras ambientais, durante os quatro dias de ensaio da etapa A



**Figura 16 - Decaimento de MC-LR nos grupos controle Zinder e controle Água durante os quatro dias de ensaio da etapa A**



A Tabela 1 apresenta uma síntese dos resultados obtidos com base no cálculo da eficiência global (isto é, a remoção total desde o dia zero ao quarto dia de experimento) para cada amostra. Para as amostras ambientais (1 a 6), que foram testadas sob duas condições iniciais, fez-se uma média dos resultados obtidos. Assim, foi possível identificar os três inóculos que obtiveram melhor desempenho, isto é, maior eficiência de remoção de MC-LR. Cabe ressaltar, antes das análises, que a amostra 10 continha o mesmo inóculo da amostra 9, sendo considerado apenas o melhor resultado dentre ambos.

**Tabela 1 - Porcentagem de remoção de MC-LR no quarto dia, com destaque para os três melhores resultados em cada uma das condições iniciais e a média.**

Amostra	Inóculo	Remoção de MC-LR 4º dia (%)		
		Condição 1 (inicial 20 µg/L)	Condição 2 (inicial 100 µg/L)	Média
Controle*	Água	41,4	31,8	36,6
Controle*	Zinder	54,5	59,6	57,1
1	Lago do Shopping	<b>47,7</b>	58,6	53,1
2	Represa do Lobo	31,5	46,8	39,1
3	Córrego Tijuco Preto	41,4	47,3	44,3
4	Córrego St. Maria do Leme	<b>48,8</b>	52,1	50,4
5	Saída filtro areia	<b>48,2</b>	<b>64</b>	<b>56,1</b>
6	Entrada filtro areia	42,7	57,1	49,9
7	Mix 1 (Sphingomonas)	-	<b>64,7</b>	<b>64,7</b>
8	Mix 2 (Brevundimonas)	-	49,3	49,3
9	Mix 3 (Sph. e Brev.)	-	<b>75,9</b>	<b>75,9</b>
10	Mix 3 (Sph. e Brev.)	-	74,9	74,9

\*controle com microbiota associada

### 5.1.1. Grupos Controle

Os resultados da etapa A sugeriram que, mesmo nos grupos controle, houve diminuição relevante das concentrações de MC-LR ao longo do tempo. Sabe-se que a MC tem um período de decaimento natural (tempo de meia vida) Contudo, a elevada porcentagem de remoção de MC-LR nestes grupos foi associada à existência de outros microrganismos, que provavelmente se desenvolveram juntamente às cianobactérias durante seu cultivo e permaneceram no extrato bruto da toxina (visto que, como dito anteriormente, A MC-LR não foi esterilizada). Desta forma, devido ao resultado encontrado, nas etapas posteriores, o extrato bruto de MC foi considerado também como possível fonte de microbiota potencialmente degradadora.

### 5.1.2. Amostras Ambientais

Nas amostras ambientais (1 a 6), que foram testadas sob as duas condições iniciais, observou-se que a degradação porcentual da cianotoxina até o segundo dia (dia 2) foi, em geral, inferior a 5%, o que pode indicar um período de adaptação dos microrganismos degradadores. Contudo, no quarto dia houve aumento substancial da degradação, tendo-se, em média, 50% de remoção.

Dentre estas amostras, a amostra 5, (saída do filtro de areia), foi a que obteve maior média de remoção (56,1%), reforçando a premissa de Park et al. (2001), Minillo et al. (2013) e Kumar et al. (2018) sobre a potencialidade de degradação de cianotoxina por microrganismos integrantes das camadas de filtros de areia. É possível dizer ainda que a microbiota presente no extrato de MC pode ter se associado à microbiota presente na saída do filtro de areia, potencializando a degradação da MC-LR.

Já a amostra ambiental que obteve menor média de remoção de MC-LR foi a advinda da represa do Lobo (Broa), com eficiência média de 39,1%.

### 5.1.3. Amostras Laboratoriais

Em relação às amostras provenientes de culturas laboratoriais, diferentemente das amostras ambientais, observou-se que, desde o primeiro dia, a degradação de MC-LR resultou acima de 5%. No segundo dia, a média de remoção encontrou-se acima de 10%, chegando a 22% no caso da amostra 7 (mix que continha o gênero *Sphingomonas*). E finalmente, a média de remoção foi acima de 65% no quarto dia de ensaio.

Dentre as amostras avaliadas, a amostra 8 (mix que continha o gênero *Brevundimonas*) foi a que obteve menor eficiência de remoção (49,3%). A amostra 9 (mix que continha ambos os gêneros) apresentou a maior eficiência de remoção, com 75,9% no quarto dia de ensaio. Possivelmente a cepa de *Brevundimonas* faz parte do conjunto de bactérias degradadoras de cianotoxinas e, desta forma, a concentração de organismos degradadores foi mais elevada na amostra 9, aumentando a eficiência de degradação, como já observado em outros estudos (LI; LI; LI, 2017).

As bactérias do gênero *Brevundimonas* já foram estudadas pelo seu potencial biorremediador de águas residuárias e compostos recalcitrantes (LI et al. 2004; MASOUDZADEH et al. 2011). No entanto, esta é, provavelmente, uma das primeiras pesquisas no Brasil, juntamente com Malta (2018) a relatar a biodegradação de MC-LR por bactérias do gênero.

#### 5.1.4. Influência da concentração inicial de MC-LR

Em todas as amostras ambientais, a porcentagem de degradação de MC-LR sob a condição 2 (concentração de 100 µg/L de MC-LR) foi maior do que aquelas sob a primeira condição (concentração de 20 µg/L de MC-LR). Estes resultados corroboram os estudos como de Minillo et al. (2013), Ho et al. (2007, 2010, 2012), Klitze e Fastner (2012) e Malta (2018), os quais relataram que a maior concentração de toxina disponível influencia positivamente na eficiência da biodegradação.

#### 5.1.5. Influência do meio nutriente

Constatou-se que a amostra contendo meio nutriente com fonte orgânica de carbono (amostra 10) alcançou significativa remoção de MC-LR no quarto dia de ensaio. No entanto, não foi observada nenhuma degradação da toxina até o terceiro dia de coleta, diferente da amostra 9, que apresentou remoção à partir do segundo dia. Este resultado não é compatível com os estudos de Park et al. (2001) e Minillo et al. (2013), que estudaram a biodegradação para cepas bacterianas do gênero *Sphingomonas* e para cepas provenientes de biofilme de filtro biológico, respectivamente. Ambos estudos relataram que a presença de carbono diminuiu a eficiência de biodegradação, atribuindo este fato à presença de fontes orgânicas de carbono, mais facilmente assimiláveis, que provavelmente ganharam a preferência dos microrganismos.

Já Lezcano et al. (2016), que estudaram cepas bacterianas com ausência e presença do gene *cluster mlr*, obtiveram aumento na eficiência da biodegradação em presença de carbono orgânico para àquelas dotadas de tais genes. Este resultado provavelmente se deve à assimilação rápida do carbono por aqueles microrganismos, acelerando sua taxa de crescimento e, por consequência, melhorando a eficiência da biodegradação. Desta forma, possivelmente os resultados do presente estudo são compatíveis com os de Lezcano et al. (2016), no entanto, seriam necessárias análises mais aprofundadas acerca destes fatores.

Ainda, no caso do presente estudo, não houve amostras suficientes para conclusão da real influência de fontes orgânicas de carbono na eficiência da degradação biológica. Desta maneira, optou-se por manter apenas o meio Zinder nas etapas subsequentes da pesquisa, por este não prover outras fontes de carbono para os microrganismos e, de certa forma, direcioná-los à degradação da cianotoxina primeiro.

#### 5.1.6. Seleção dos melhores inóculos

Levando em consideração as análises realizadas, as amostras selecionadas para prosseguir na etapa B foram a 1 (lago do Shopping Passeio), 5 (saída do filtro de areia), e o grupo Controle Zinder (contendo a microbiota associada ao extrato bruto de MC-LR).

#### 5.1.7. Análises extras

##### Análise da fase de adaptação

Pôde-se fazer uma análise superficial relativa à diminuição da fase de adaptação para microrganismos provenientes de ambientes que provavelmente já sofreram o processo de eutrofização (ou seja, àqueles já expostos ao menos uma vez à cianotoxina). Sendo assim, a amostra 3, nascente do córrego Tijuco Preto, foi considerada de ambientes não eutrofizado. As amostras 1, 2 e 4, respectivamente lago do Shopping Passeio, Represa do Lobo e foz do do córrego Santa Maria do Leme, foram consideradas amostras de ambientes possivelmente já eutrofizados. Para esta análise, desconsiderou-se as amostras 5 e 6, sejam elas, entrada e saída do filtro de areia da ETA, pela microbiota associada não ser de ambiente natural.

Analisando-se as eficiências médias para o quarto dia de remoção entre estes dois grupos, têm-se que a maior diferença entre elas é em relação às amostras 1 e 3, com aproximadamente 10%. Ainda, as amostras apresentaram remoção de MC na seguinte ordem: Amostra 1 (53,1%) > Amostra 4 (50,4%) > Amostra 3 (44,3%) > Amostra 2 (39,1%). Apesar da diferença de eficiência entre elas não ser muito ampla, pode-se inferir este resultado corrobora os estudos de Minillo et al. (2013), Li, Li e Li (2017) e Lezcano et al. (2018), os quais concluem que comunidades bacterianas previamente expostas à eutrofização e às cianobactérias seriam mais aptas a degradar MCs.

*Caracterização filogenética da microbiota do extrato bruto de microcistina-LR e do filtro de areia da ETA Vila Pureza*

Malta (2018) caracterizou filogeneticamente a microbiota associada ao extrato bruto de MC, bem como os microrganismos presentes na saída e entrada do filtro da ETA Vila Pureza (mesmos inóculos da presente pesquisa). Foi empregada a metodologia do 16S rRNA (Plataforma Illumina). Obteve-se o total de 464 Unidades Taxonômicas Operacionais (*operational taxonomic units* – OTU), sendo 66 OTU provenientes da comunidade bacteriana autóctone presente no extrato bruto de MC-LR, 213 e 185 OTU da entrada e saída do filtro rápido da ETA, respectivamente. A Figura 17 resume o resultado encontrado.

**Figura 17 - Identificação dos filios microbianos para as 464 OTU obtidas com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. Fonte: Malta (2018).**

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

O filo Proteobacteria têm sido estudado devido ao seu potencial para degradação de compostos tóxicos (HÖCKENREINER, NEUGEBAUER E ELANGO, 2015; MUANGCHINDA et al., 2015) e mesmo de MC. O gênero *Sphingomonas*, utilizado nesta pesquisa é pertencente à este filo. Os filios Actinobacteria e Firmicutes também possuem bastantes representantes descritos em literatura como degradadores de MC, tais como bactérias dos gêneros *Arthrobacter sp.* e *Lactobacillus sp.*, respectivamente de cada filo (LI, LI, LI, 2017; NYBOM, SALMINEM e MERILUOTO, 2007; SURONO et al., 2008). Portanto, o resultado encontrado se mostra compatível com a literatura.

## 5.2. Etapa B

A partir dos três melhores inóculos selecionados na etapa A, sejam eles água proveniente do filtro rápido da ETA de São Carlos, o lago do Shopping Passeio e o próprio extrato bruto de MC-LR, foi avaliada a influência da luz e da temperatura. A Tabela 2 apresenta a eficiência de remoção da MC-LR após o período do ensaio (quatro dias) em cada um dos casos, sob diferentes condições iniciais.

**Tabela 2 - Porcentagem de remoção de MC-LR no quarto dia, com destaque para o melhor resultado – Etapa B**

Inóculo	Média de Eficiência de Remoção 4º dia (%)				
	Condição				
	17°C (com luz)	17°C (sem luz)	25°C (com luz)	25°C (sem luz)	40°C (sem luz)
Controle Zinder	13,0	7,4	23,3	15,3	14,2

Extrato Bruto	49,2	*	<b>91,2</b>	89,7	89,7
Lago	*	2,2	11,6	15,8	60,6
ETA	*	*	17,6	25,4	19,1

\* remoção não observada

### 5.2.1. Grupo Controle

Assim como nos resultados da etapa A, os resultados da etapa B apresentaram nos grupos controle diminuição das concentrações de MC-LR. Apesar de não tão elevadas quanto na etapa A, este resultado sugere, mesmo após esterilização do extrato bruto da toxina, alguns microrganismos foram capazes de sobreviver (provavelmente pela produção de esporos) e participar da degradação de MC.

Ainda, foi possível observar que, mesmo após o processo de esterilização, a concentração da toxina não foi significativamente alterada, se mantendo próxima à 100 µg/L.

### 5.2.2. Análise das amostras selecionadas

A amostra proveniente do filtro da ETA foi a que obteve pior desempenho, sendo que não obteve remoção de MC-LR na temperatura de 17°C, baixa remoção na temperatura de 25°C, atingindo o máximo de 25,4% na presença de luz e atingindo remoção de 19,1% na temperatura de 40°C (sem luminosidade). Estes resultados sugerem que não houve interferência significativa da luminosidade sobre a eficiência de degradação de MC-LR para essa amostra.

A amostra proveniente do lago próximo ao shopping Passeio também não obteve bom desempenho nas temperaturas de 17 e 25°C, atingindo o máximo de 15,8% na presença de luz. Contudo, sob a temperatura de 40°C (sem luminosidade), atingiu 60% de eficiência na remoção de MC-LR. Estudos adicionais seriam necessários para confirmar esse resultado e avaliar se a comunidade de microrganismos presentes no lago é mais tolerante a elevadas temperaturas. Também não se observou interferência significativa da luminosidade sobre a eficiência de degradação de MC-LR para esse inóculo.

Já para o caso em que o extrato bruto de MC-LR foi o próprio inóculo, obteve-se o melhor desempenho quando comparado às outras amostras e os grupos controle. Analisando os resultados, foi possível observar que na temperatura de 17°C com

presença de luz, obteve-se 49,2% de remoção de MC-LR. Na ausência de luz, não houve desempenho significativo. Nessa temperatura em específico (17°C), a ausência de luz produziu efeito significativo, fazendo com que não houvesse degradação na amostra. A temperatura de 25°C foi a que alcançou melhor desempenho, com eficiência de remoção de 91,2% e 89,7% respectivamente na presença e ausência de luz. Sob temperatura de 40°C (sem luminosidade), o extrato bruto alcançou 89,7% de remoção, resultado semelhante ao da condição de 25°C na ausência de luz.

Esses resultados sugerem que os microrganismos presentes no extrato bruto sejam mesófilos e que não haja interferência significativa da luminosidade sobre a eficiência de degradação de MC-LR.

#### 5.2.3. Influência da temperatura

Referente às temperaturas avaliadas, os resultados suportam os estudos de Malta (2018) para cepas encontradas em filtro de areia e extrato bruto de MC-LR, Minillo et al. (2013) e Wang et al. (2007) com uso de biofilme de filtro biológico de carvão ativado e Zhu et al. (2016), com cepas bacterianas do gênero *Rhizobium* sp. Estes pesquisadores também encontraram eficiências de biodegradação maiores entre as temperaturas de 22 e 30°C e eficiência reduzidas abaixo de 20°C ou acima de 30°C.

#### 5.2.4. Influência da luminosidade

A não interferência de luminosidade na eficiência de biodegradação em todas as amostras não corrobora os estudos de Wang et al. (2006). Porém, cabe ressaltar que estes autores citaram diferença significativa na degradação de MC na presença de luz natural, fator que pode ter causado diferença em relação aos presentes resultados. Isto porque a luz natural possui um espectro eletromagnético maior que a luz artificial, abrangendo, por exemplo, radiação UV, a qual não está presente em lâmpadas artificiais. Esses tipos de radiação possivelmente são capazes de influenciar através da foto-oxidação das cianotoxinas, diferentemente da luminosidade artificial. Além disso, estudos mais aprofundados devem ser realizados com os microrganismos degradadores de cianotoxina, a fim de se avaliar se a luminosidade natural é capaz de interferir no metabolismo dos mesmos e melhorar a eficiência de biodegradação ou não.

### 5.3. Etapa C

A partir do melhor inóculo e melhor condição de luz/temperatura selecionados na etapa B (inóculo: extrato bruto de MC-LR; temperatura: 25°C; com luz), foi avaliado o efeito da presença de meio suporte. A Tabela 6 representa a eficiência de biodegradação da MC-LR em cada ciclo, após o período do ensaio (quatro dias) em cada uma das diferentes condições iniciais.

**Tabela 3- Porcentagem de remoção de MC-LR no quarto dia**

<b>Média de Eficiência de Remoção 4º dia (%)</b>		
<b>Inóculo</b>	<b>Condição</b>	
	<b>Com meio suporte</b>	<b>Sem meio suporte</b>
<b>Ciclo 1</b>		
Controle Zinder	23,9	13,7
Extrato Bruto	95,0	93,7
<b>Ciclo 2</b>		
Controle Zinder	26,7	18,4
Extrato Bruto	96,2	93,2
<b>Ciclo 3</b>		
Controle Zinder	26,8	18,9
Extrato Bruto	96,4	93,0

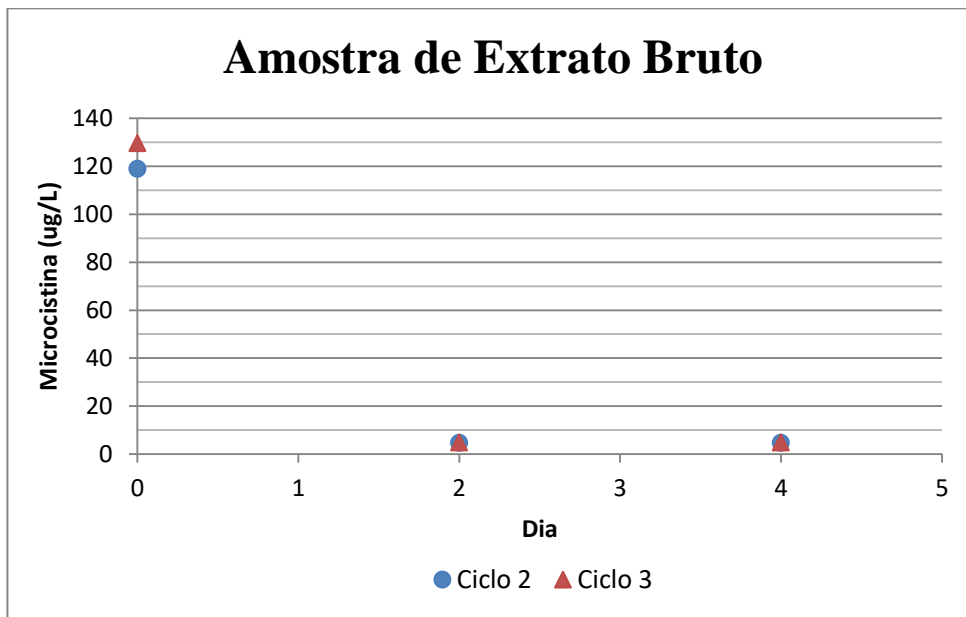
#### 5.3.1. Grupo Controle

Nos grupos controle, em cada ciclo, houve diferenças entre as amostras que continham meio suporte e aquelas que não continham (decaimentos de 23,9-26,8% com meio suporte e de 13,7-18,9% sem meio suporte). Este fato pode ser atribuído à possível absorção de cianotoxina no meio suporte (espumas de poliuretano). Destaca-se, ainda, que não foram mantidas condições de assepsia nesses ciclos, o que pode ter afetado os resultados.

### 5.3.2. Influência da camada suporte

Os resultados da etapa C sugeriram, ainda, indícios de que a presença do meio suporte pode influenciar na eficiência de biodegradação. Em relação aos resultados com o extrato bruto, *a priori*, não se nota diferença significativa da degradação no quarto dia com ou sem a camada suporte. Já o acompanhamento da concentração da toxina no segundo dia do ensaio, a partir do segundo ciclo mostra um notável aumento nas taxas de degradação, como mostra a Figura 18.

**Figura 18 - Biodegradação de MC-LR por amostra advinda do extrato bruto**



Nas etapas anteriores (A e B), para praticamente todos os casos, sempre foi observado que antes do quarto dia de experimento não havia decaimento significativo da MC-LR. Na Etapa C, para os casos em que havia camada suporte, observou-se que no segundo dia do ciclo 2 e ciclo 3, a eficiência encontrada já foi semelhante a do quarto dia, alcançando respectivamente 96,2 e 96,4% de eficiência de remoção. Inicialmente, conclui-se que a camada suporte poderia acelerar o processo de biodegradação, corroborando os estudos de Tsuji et al. (2006) e Minillo et al. (2013).

No entanto, cabe ressaltar que não se pode descartar a possibilidade de absorção da MC-LR pelas espumas de poliuretano. Analisando os grupos controle com e sem as espumas, nota-se uma diferença média de 8,8% na eficiência. Se este valor fosse subtraído da eficiência da amostra de extrato bruto com meio suporte, no quarto dia de cada ciclo, as eficiências seriam respectivamente 87,4 e 87,6%. Estes valores se

aproximam da eficiência da amostra de extrato bruto no quarto dia da etapa anterior, seja ela 91,2% (à 25°C, com luminosidade e sem camada suporte). Analisando por este viés, não é possível afirmar que a camada suporte teve influência significativa no processo de biodegradação. Para uma comparação mais aprofundada, seria necessário obter dados de coleta do segundo dia da etapa B, não realizada no presente estudo.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do estudo exploratório da biodegradação da MC-LR em laboratório, considerando diversos fatores como tipo de inóculo, condições experimentais (luz, temperatura e camada suporte), foi possível delinear as seguintes conclusões e estabelecer algumas perspectivas:

1. Observou-se uma degradação natural da cianotoxina, associada com seu tempo de meia-vida, que deve ser considerado no balanço final de remoção da mesma;
2. Pôde-se verificar indícios da ocorrência de biodegradação da MC por diversos microrganismos, presentes tanto em amostras ambientais quanto em culturas cultivadas em laboratório. Destacaram-se os inóculos provenientes das camadas de filtro de areia da ETA e o próprio extrato bruto de MC-LR (que, dentre outros microrganismos, contemplava culturas de bactérias dos gêneros *Sphingomonas* e *Brevundimonas*). É importante ressaltar que o extrato bruto de MC-LR foi obtido de cultivo realizado no próprio laboratório, sem que fosse possível manter condições axênicas. Sendo assim, a hipótese formulada para os resultados satisfatórios de remoção obtidos com o próprio extrato da MC-LR é que esse extrato já possui, além da toxina, microrganismos adaptados à exposição à mesma e, possivelmente, aptos a metabolizá-la quando condições propícias ao seu desenvolvimento/crescimento são oferecidas.
3. Os resultados sugeriram que a concentração de toxina influenciou nas taxas de degradação, sendo que a maior concentração inicial (100 µg/L) esteve associada

com maiores porcentagens de remoção. Em relação à temperatura, observou-se que a de 25°C foi a que gerou os melhores resultados de remoção, na presença ou não de luz. Este resultado é interessante, pois sinaliza que as condições ambientais em países tropicais/subtropicais são propícias e favorecem a biodegradação de cianotoxinas. Em relação à disponibilidade de luz, não se observou influência significativa nas taxas de decaimento do poluente-alvo.

4. A combinação das variáveis temperatura de 25°C, fotoperíodo (12 horas) e presença de meio suporte foi a melhor condição experimental encontrada para remoção da MC-LR, chegando à 96,2% e 96,4% nos ciclos 2 e 3, respectivamente; permitindo inferir que, a despeito da possível absorção da toxina pelas espumas de poliuretano, a presença de meio suporte provavelmente favoreceu a formação de biofilme, e possivelmente ajudou na eficiência de degradação.
5. As diferenças entre os resultados de condições de degradação desta pesquisa e às outras encontradas em literatura possivelmente poderão ser explicadas devido à diferenças metabólicas de organismos que possuem ou não o gene cluster *mlrA-D*. Serão necessárias, no entanto, estudos mais aprofundados no assunto para confirmação desta hipótese.

Espera-se, desta forma, poder contribuir para o aprimoramento de tecnologias voltadas ao tratamento avançado de águas e para a remediação de mananciais com florações tóxicas de cianobactérias, seja na forma de imobilização dos microrganismos/consórcio por liofilização, seja em reator adaptado para este tipo de processo. Acreditamos ainda que, em vista dos pontos acima considerados e relevância do tema, mais pesquisas na área sejam de suma importância, buscando parcerias governamentais e privadas para realização das mesmas.

## 7 RECOMENDAÇÕES

- Para as etapas B e C, escolheu-se manter apenas uma concentração de cianotoxina, seja ela a maior, de 100 µg/L de acordo com os melhores resultados obtidos. No entanto, seria interessante em estudos posteriores seguir com ambas as concentrações iniciais, a fim de analisar mais intensivamente os resultados.
- Durante a Etapa C, foram colhidas amostras para realização de ELISA durante os dias 0, 2 e 4. Como descrito anteriormente, no segundo dia de ensaio já se observou porcentagens de remoção de toxina semelhantes ao quarto dia. Sendo assim, para próximas pesquisas, seria interessante considerar coletas no dia 1 e 3 ou, se possível, a cada 12 horas. O mesmo aplica-se à etapa B, esperando com isto poder comparar e avaliar de forma mais sistemática e assertiva a influência da presença de camada suporte no processo de biodegradação.
- Também na Etapa C, observou-se uma notável diferença de remoção de MC-LR no grupo controle, entre amostras com meio suporte e sem. Foi possível inferir que o material utilizado como camada suporte (espuma de poliuretano) provavelmente interagiu com o poluente, física ou quimicamente, interferindo nas análises. Desta forma, uma das alternativas ao problema seria substituir o material utilizado por algum que, comprovadamente não exerça interação com a cianotoxina. Fato semelhante foi observado por SONOBE (2018). Portanto, materiais plásticos devem ser evitados para armazenamento e ensaios com a toxina.

- A fim de evitar interferências da microbiota associada ao extrato bruto de MC, buscar métodos para esteriliza-la, tentando desta forma não interferir nas suas características físico-químicas.

## REFERÊNCIAS

\_\_\_Portaria MS nº 1.469, de 29 dez. 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, 22 fev. 2001. Seção 1.

ANA. Agência Nacional de Águas (ANA), Atlas. Disponível em <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/RegioesAdministrativas.aspx>> Acesso em 02 de janeiro de 2017.

AZEVEDO, Sandra MFO et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BAO, Ziyun; WU, Yue. Biodegradation of microcystin-LR by an amino acid-degrading anaerobic bacterium. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 2, p. 870-880, 2016.

BOURNE, David G. et al. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. **Applied and Environmental microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4086-4094, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12/2011. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água para consumo humano em todo o território nacional. DOU, Brasília: 23 jan. 1990, Seção I, p. 1651-1654.

CARMCHAEL, Wayne W. et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 971-973, 1988.

CHEN, Gang; YU, Shunzhang; WEI, Guorong. Studies on microcystin contents in different drinking water in highly endemic area of liver cancer. **Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]**. v. 30, n. 1, p. 6-9, 1996.

CHORUS, Ingrid; BARTRAM, Jamie. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Spon Press, 1999.

CHU, Wenhai et al. Production of trihalomethanes, haloacetaldehydes and haloacetonitriles during chlorination of microcystin-LR and impacts of pre-oxidation on their formation. **Journal of hazardous materials**, v. 327, p. 153-160, 2017.

CODD, Geoffrey A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological engineering**, v. 16, n. 1, p. 51-60, 2000.

DÖRR, Felipe Augusto et al. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1247-1256, 2010.

DRIKAS, Mary et al. Using coagulation, flocculation, and settling to remove toxic cyanobacteria. **Journal-American Water Works Association**, v. 93, n. 2, p. 100-111, 2001.

DZIGA, Dariusz et al. The biodegradation of microcystins in temperate freshwater bodies with previous cyanobacterial history. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 145, p. 420-430, 2017.

EDWARDS, Christine et al. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1315-1321, 2008.

ELEUTERIO, Lazaro; BATISTA, Jacimaria R. Biodegradation studies and sequencing of microcystin-LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1434-1442, 2010.

EPA. Environmental Protection Agency. Harmful Algal Blooms & Drinking Water Treatment. Disponível em: <<http://www.epa.gov/water-research/harmful-algal-bloomsdrinking-water-treatment>>. Acesso: fevereiro/2016.

FALCONER, Ian R. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 5-12, 1999.

FUNARI, Enzo; TESTAI, Emanuela. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 2, p. 97-125, 2008.

FUNASA. Manual de Controle da Qualidade da Água para Técnicos que Trabalham em ETAS. p. 45-48. 2014.

GER, Kemal A.; HANSSON, Lars-Anders; LÜRLING, Miquel. Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. **Freshwater Biology**, v. 59, n. 9, p. 1783-1798, 2014.

GOERICKE, Ralf; WELSCHMEYER, Nicholas A. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 40, n. 11, p. 2283-2294, 1993.

HALL, T. et al. Laboratory-scale investigations of algal toxin removal by water treatment. **Water and Environment Journal**, v. 14, n. 2, p. 143-149, 2000.

HARADA, Ken-ichi et al. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 107-109, 2004.

HARADA, Ken-ichi et al. Stability of microcystins from cyanobacteria-III.\* Effect of pH and temperature. **Phycologia**, v. 35, n. 6S, p. 83-88, 1996.

HARKE, Matthew J. et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4-20, 2016.

HITZFELD, Bettina C.; HÖGER, Stefan J.; DIETRICH, Daniel R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. Suppl 1, p. 113, 2000.

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

HO, Lionel et al. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters. **Journal of hazardous materials**, v. 180, n. 1, p. 628-633, 2010.

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

HO, Lionel; SAWADE, Emma; NEWCOMBE, Gayle. Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal—A review. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1536-1548, 2012.

HOEFEL D, Ho L, Aunkofer W, Monis PT, Keegan A, Newcombe G, Saint CP.. Cooperative biodegradation of geosmin by a consortium comprising three gram-negative bacteria isolated from the biofilm of a sand filter column. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006.

HONG, Hua Chang et al. Trophic state, natural organic matter content, and disinfection byproduct formation potential of six drinking water reservoirs in the Pearl River Delta, China. **Journal of Hydrology**, v. 359, n. 1, p. 164-173, 2008.

HUANG, Winn-Jung et al. Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v.141, n.1, p.115-122, 2007.

IBELINGS, Bas W.; CHORUS, Ingrid. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. **Environmental pollution**, v. 150, n. 1, p. 177-192, 2007.

IBGE. Municípios, total e com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição por existência e tipo de tratamento na água distribuída e com fluoretação adicionada, segundo as grandes regiões e as unidades da federação. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso: fevereiro/2018.

JARDIM, Fernando Antônio et al. Fatores Determinantes Das Florações De Cianobactérias Na Água Do Rio Doce—Minas Gerais—Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 19, n. 3, 2014.

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

JOCHIMSEN, Elise M. et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KLITZKE, Sonda; FASTNER, Jutta. Cylindrospermopsin degradation in sediments– The role of temperature, redox conditions, and dissolved organic carbon. **Water Research**, v.46, n.5, p. 1549-1555, 2012.

KORMAS, Konstantinos Ar; LYMPEROPOULOU, Despoina S. Cyanobacterial toxin degrading bacteria: who are they?. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

KUMAR, Pratik et al. Biodegradation of microcystin-LR using acclimatized bacteria isolated from different units of the drinking water treatment plant. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 407-416, 2018.

KURIAMA, Francine et al. Potencial de biodegradação de microcistinas por microrganismos. **Eng Sanit Ambient**, v. 17, n. 2, p. 181-186, 2012.

KURODA, Emília Kiyomi. Remoção de células e subprodutos de *Microcystis* spp. por dupla filtração, oxidação e adsorção. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.

LEAL, A.C.; SOARES, M.C.P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 2. p.84-89. 2004.

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

LEZCANO, Maria Angeles et al. Diversity and temporal shifts of the bacterial community associated with a toxic cyanobacterial bloom: An interplay between microcystin producers and degraders. **Water research**, v. 125, p. 52-61, 2017.

LEZCANO, María Ángeles et al. Presence or absence of *mlr* genes and nutrient concentrations co-determine the microcystin biodegradation efficiency of a natural bacterial community. *Toxins*, v. 8, n. 11, p. 318, 2016

LI, Hong; PAN, Gang. Enhanced and continued degradation of microcystins using microorganisms obtained through natural media. **Journal of microbiological methods**, v. 96, p.73-80, 2014.

LI, Jieming et al. Assessment of the factors contributing to the variations in microcystins biodegradability of the biofilms on a practical biological treatment facility. **Bioresource technology**, v. 175, p. 463-472, 2015.

LI, Jieming et al. Comparative study for the effects of variable nutrient conditions on the biodegradation of microcystin-LR and concurrent dynamics in microcystin-degrading gene abundance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 20, p. 9509-9517, 2011.

LI, Jieming et al. Divergent responses of functional gene expression to various nutrient conditions during microcystin-LR biodegradation by *Novosphingobium* sp. THN1 strain. **Bioresource technology**, v. 156, p. 335-341, 2014.

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

LI, Jieming; LI, Renhui; LI, Ji. Current research scenario for microcystins biodegradation—a review on fundamental knowledge, application prospects and challenges. **Science of The Total Environment**, v. 595, p. 615-632, 2017.

LI, Y. et al. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from Russian space laboratory Mir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 819–825, 2004.

LIU, Bin et al. Microcystis aeruginosa-laden water treatment using enhanced coagulation by persulfate/Fe (II), ozone and permanganate: Comparison of the simultaneous and successive oxidant dosing strategy. **Water research**, v. 125, p. 72-80, 2017.

MA, Min et al. Chlorination of *Microcystis aeruginosa* suspension: cell lysis, toxin release and degradation. **Journal of hazardous materials**, v. 217, p. 279-285, 2012.

MAGHSOUDI, Ehsan et al. Cyanotoxin degradation activity and mlr gene expression profiles of a *Sphingopyxis* sp. isolated from Lake Champlain, Canada. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 11, p. 1417-1426, 2016.

MASOUDZADEH, N. et al. Biosorption of cadmium by *Brevundimonas* . ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, p. 190–198, 2011.

MEREL, Sylvain et al. Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. **Toxicon**, v. 76, p. 118-131, 2013b.

MEREL, Sylvain et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, v. 59, p. 303-327, 2013a.

MEREL, Sylvain; CLEMENT, Michel; THOMAS, Olivier. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 677-691, 2010.

MINILLO, Alessandro et al. Biodegradation of hepatotoxin (D-Leu1)-microcystin-LR by bacteria in carbon biological filters. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.18, n.3, p.205-214. 2013.

MORÁN, Xosé Anxelu G. Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: a major contribution to carbon fluxes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 49, n. 3, p. 267, 2007.

MORÓN-LÓPEZ, J.; NIETO-REYES, L.; EL-SHEHAWY, R. Assessment of the influence of key abiotic factors on the alternative microcystin degradation pathway ( s ) ( mlr - ): A detailed comparison with the mlr route ( mlr + ). **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 1945–1953, 2017.

NYBOM, Sonja MK; SALMINEN, Seppo J.; MERILUOTO, Jussi AO. Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 1, p. 27-33, 2007.

O'NEIL, J. M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, p. 313-334, 2012.

PAERL, Hans W. et al. Blooms like it hot. **Science - New York Then Washington**. v.320, n.5872, p. 57, 2008.

PARK, Ho-Dong et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. **Environmental toxicology**. v.16, n.4, p.337-343. 2001.

PAUL, Valerie J. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Springer New York. p. 239-257. 2008.

PIETERSE, A.J.H.; CLOOT, A. Algal cells and coagulation, flocculation and sedimentation processes. *Water Science Technology*. 36:111–8. 1997.

PHAM, Thanh-Luu; UTSUMI, Motoo. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. **Journal of environmental management**, v. 213, p. 520e529, 2018.

POURIA, Shideh et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, v. 352, n. 9121, p. 21-26, 1998.

PRAKASH, Satya; LAWTON, Linda A.; EDWARDS, Christine. Stability of toxigenic *Microcystis* blooms. **Harmful Algae**, v. 8, n. 3, p. 377-384, 2009.

PREFEITURA MUNICIPAL DE ITIRAPINA. Disponível em: <<http://www.upcomunicacao.com/itirapina/index.php/noticias-cidade/45-r-4-358-326-19-e-o-valor-ja-pago-de-dividas-itirapina>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO CARLOS. **Especialistas apresentam plano para salvar represa do Broa.** Disponível em: <<http://www.saocarlos.sp.gov.br/index.php/noticias-2010/156313-viva-o-broa.html>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2016.

RASTOGI, R. P.; MADAMWAR, D.; INCHAROENSAKDI, A. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–22, 2015.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. The cyanotoxin-microcystins : current overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, n. 13, p. 215–249, 2014.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P.; INCHAROENSAKDI, A. The cyanotoxin-microcystins: Current overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 215–249, 2014.

RODRÍGUEZ, Eva et al. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. **Water Research**, v.41, n.15, p.3381-3393, 2007.

SAITO, Takeshi et al. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 2, p. 271-276, 2003.

SCHOPF, J. William; PACKER, Bonnie M. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. **Science**, v. 237, n. 4810, p. 70-73, 1987.

Serviço Autônomo de Água e Esgoto - SAAE. Disponível em: <<http://www.saaesaocarlos.com.br/joomla4/index.php/aguamenutop/etasmenu>>. Acesso em: 05 de agosto de 2017.

SHI, Honglan et al. pH effects on the adsorption of saxitoxin by powdered activated carbon. **Harmful Algae**, v. 19, p. 61-67, 2012.

SHIMIZU, Kazuya et al. How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 16, n. 3, p. 169-178, 2011.

SIVONEN, K; JONES G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London, UK: E & FN Spon; p. 41–111, 1999.

SMITH, Val H.; TILMAN, G. David; NEKOLA, Jeffery C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental pollution**, v. 100, n. 1, p. 179-196, 1999.

SONOBE, Henrique Gamon. **Remoção de microcistina por filtros de carvão ativado granular: aplicação de modelos matemáticos para obtenção de parâmetros de dimensionamento**. 2018. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

SONOBE, Henrique Gamon. **Remoção de microcistina por filtros de carvão ativado granular: aplicação de modelos matemáticos para obtenção de parâmetros de dimensionamento**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.

SOVADINOVA, Iva et al. Chlorination and ozonation differentially reduced the microcystin content and tumour promoting activity of a complex cyanobacterial extract. **Advances in Oceanography and Limnology**, v. 8, n. 1, 2017.

SPOOF, Lisa. High-performance liquid chromatography of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide toxins. Åbo Akademi University, 2004.

SPOOF, Lisa; CATHERINE, Arnaud. Appendix 3: tables of microcystins and nodularins. **Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis**, p. 526-537, 2016.

STANIER, R.Y; PALLERONI, N.J; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study J. Gen. Microbiol., 43. pp. 159–271. 1966.

STOTTS, Richard R. et al. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. **Toxicon**, v. 31, n. 6, p. 783-789, 1993.

SUN, Julong et al. Removal of *Microcystis aeruginosa* by UV/chlorine process: Inactivation mechanism and microcystins degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 408-415, 2018.

SURONO, Ingrid Suryanti et al. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 502-507, 2008.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposta do gênero *Sphingomonas* sensu stricto e três novos gêneros, *Sphingobium*, *Novosphingobium* e *Sphingopyxis*, com base em análises filogenéticas e quimiotaxonômicos. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, pp. 1405-1417. 2001.

TÖRÖKNE, A. et al. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 280–284, 2004.

TSUJI, Kiyomi et al. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 1, p. 173-177, 1994.

TSUJI, Kiyomi et al. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake. **Chemosphere**, v. 65, n. 1, p. 117-124, 2006.

VASCONCELOS, J. F. et al. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 39, n. 2, p. 1-20, 2011.

WANG, Haixiang et al. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4262-4270, 2007.

WANG, Haixiang. Adsorption and biological filtration of microcystins. Tese de Doutorado. 2006.

WELKER, Martin; STEINBERG, Christian. Rates of humic substance photosensitized degradation of microcystin-LR in natural waters. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 16, p. 3415-3419, 2000.

WEN, Gang et al. Formation of assimilable organic carbon during the oxidation of water containing *Microcystis aeruginosa* by ozone and an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 364-371, 2017.

WHITE, David C.; SUTTON, Susan D.; RINGELBERG, David B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n.3, p. 301-306, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Eutrophication and health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. Geneva: WHO, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information: addendum. 1998.

WU, Xingqiang et al. Evaluation of the potential of anoxic biodegradation of intracellular and dissolved microcystins in lake sediments. **Journal of hazardous materials**, v. 286, p. 395- 401, 2015.

YANG, Fei et al. Microcystin-LR degradation utilizing a novel effective indigenous bacterial community YFMCD1 from Lake Taihu. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, n. 7, p. 184-193, 2018.

YILMAZ, M et al. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. **Toxicon**, v. 51, p. 130-139, 2008.

ZAMYADI, Arash et al. Chlorination of *Microcystis aeruginosa*: toxin release and oxidation, cellular chlorine demand and disinfection by-products formation. **Water research**, v. 47, n. 3, p. 1080-1090, 2013.

ZEHR, Jonathan P. et al. Unicellular cyanobacteria fix N<sub>2</sub> in the subtropical North Pacific Ocean. **Nature**, v. 412, n. 6847, p. 635-638, 2001.

ZHU, Mingqiu et al. Impact of pre-ozonation on disinfection by-product formation and speciation from chlor (am) ination of algal organic matter of *Microcystis aeruginosa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 120, p. 256-262, 2015.

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

## ANEXO I

Tabela I - Composição do meio de cultura Zinder

Componentes	Massas ou volumes – q.s.p* 1000 mL de água
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 g
MgCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Solução traço de metais**	10 mL
Solução de vitaminas**	10 mL

Fonte: Zinder et al., 1984; \*q.s.p. = quantidade suficiente para

\*\*retirados a partir de solução-estoque

Tabela II - Composição da solução traço de metais para meio Zinder

Componentes	Massas ou volumes – q.s.p* 1000 mL de água
NTA (ácido nitrilotriacético)	4,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,556 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,086 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17 g
ZnSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O	0,21 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,19 g
NiCl <sub>2</sub>	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g

\*q.s.p. = quantidade suficiente para

Adaptada de Zinder et al. (1984)

**Tabela III - Composição da solução de vitaminas**

<b>Componentes</b>	<b>Massas ou volumes – q.s.p* 1000 mL de água</b>
Biotina	0,002 g
Ácido Fólico	0,002 g
Piridoxina HCl	0,010 g
Tiamina HCl.2H <sub>2</sub> O	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
D-pantotenato de Cálcio	0,005 g
Vitamina B <sub>12</sub>	0,0001 g
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,005 g
Ácido lipóico	0,005 g

**\*q.s.p. = quantidade suficiente para**

**Adaptada de Widdel & Pefnig (1984) e Dubourguier et al. (1987)**