



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCINE KURIAMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO
DE MICROCISTINAS E BIOCONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS EM ÁGUAS**

LONDRINA
2012

FRANCINE KURIAMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO
DE MICROCISTINAS E BIOCONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS EM ÁGUAS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, visando à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento.

Orientadora: Prof. Dra. Emília Kiyomi Kuroda

LONDRINA
2012

FRANCINE KURIAMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE
MICROCISTINAS E BIOCONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS POR
MICRORGANISMOS EM ÁGUAS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina, visando à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Edificações e Saneamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^o Dra Emília Kiyomi Kuroda
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Orientador

Prof. Dr. Luiz Di Bernardo
Universidade de Ribeirão Preto - URP

Prof. Dra. Odete Rocha
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Londrina, 28 de fevereiro de 2012.

Dedico está dissertação aos meus pais Mauro e Francisca, pelos ensinamentos, pela confiança, apoio e companheirismo em todos os momentos, pela amizade e carinho, por estarmos unidos nesta caminhada.

Ao meu irmão, Mauro Henrique, as minhas tias Miriana e Luzia a minha prima Bia e todos os meus parentes e verdadeiros amigos que mesmo sem saberem ajudaram muito na conclusão desta etapa.

Ao meu amor, Marcio que esteve comigo me apoiando e me ajudando sempre.

A Deus

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado não seria finalizada sem a ajuda e apoio dos colaboradores e incentivadores que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, tornando possível a realização deste trabalho.

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Dra Emília Kiyomi Kuroda pela oportunidade concedida, pela orientação e preocupação durante a realização do trabalho. À Professora Dra Elisa Yoko Hirooka por todas as oportunidades. Ao Dr Ken-Ichi Harada.

Aos Professores: Dra Sandra Garcia, Dra Gisele de Andrade Nobrega, Dra Sandra Márcia Cesário Pereira da Silva, Dr Fernando Fernandes.

A Todos os docentes e funcionários do programa de Pós Graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento incluindo o funcionário César que me ajudou muito na manutenção dos equipamentos.

A Karla Bigetti Guergoletto pela grande ajuda e amizade.

Aos Amigos do LabSan: Aline, Amanda, André, Anelise, Camila, Cristiane, Elson, Flávia, Gisselma, Laís, Leandro, Leonardo, Marcos, Natália, Renan, Rodrigo, Sheedy, Simone, Vitor, Vilson e Viviane pela ajuda e amizade.

Aos colegas de turma: Alexandre, Wanessa, Jonathan, Fabrizio.

Aos amigos do laboratório do TAM: Cássia, Angélica, Cleiton, Tatiane, Cátia, Tiago e todos os estagiários.

À CAPES pela bolsa de estudos. Aos projetos de pesquisa ao qual estou vinculada. À Universidade Estadual de Londrina.

KURIAMA, Francine. **Avaliação do potencial de biodegradação de microcistinas e biocontrole de cianobactérias por microrganismos em águas.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

Para minimizar os problemas relacionados à ocorrência de cianobactéria em águas destinadas ao consumo humano há necessidade de se realizar estudos de alternativas técnicas de tratamento com destaque aos biofilmes com potencial de degradação de microcistinas - MCs. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de degradação de microcistinas - MCs e de inibição de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) por microrganismos - *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras, visando à obtenção de técnica alternativa para o tratamento de águas destinadas ao consumo humano. O trabalho foi dividido em cinco experimentos: Experimento 1: Crescimento populacional da cepa *Microcystis* sp. TAC 95, na qual foi possível definir as fases de crescimento da cepa utilizada nos experimentos subsequentes. Experimento 2: Seleção das condições de teste empregadas na avaliação do potencial de degradação de microcistinas totais e de inibição de cianobactérias por microrganismos, tendo as condições de biovolume e cultura com microrganismos adaptados, apresentado os melhores resultados. Experimento 3: Avaliação prospectiva de diferentes cepas dos microrganismos entre bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras em relação à capacidade de degradação de MCs totais. A bactéria B9 foi a que apresentou maiores porcentagens de degradação de MCs (95 a 98 %) após 96 h de exposição. Entre as bactérias lácticas probióticas a cepa La-5 foi a que apresentou maior porcentagem de degradação com 27 % e o kefir com 29 %. Já para as leveduras a cepa que apresentou maior porcentagem de degradação foi a Vale do Ivaí com 37 %. Experimento 4: Avaliação do potencial de degradação de MCs totais para os microrganismos selecionados de maior eficiência. Nas curvas de degradação com concentrações teóricas iniciais de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ os microrganismos selecionados apresentaram, após 96 h, porcentagens de degradação de 44 % para La-5, 43 % para kefir e 54 % para levedura Vale do Ivaí e 99 % para bactéria B9, mostrando novamente, ser esta mais eficiente dentre os microrganismos. Devido aos resultados promissores da bactéria B9, o Experimento 4 foi repetido com concentrações superiores de microcistinas, tendo resultado em 99 % de degradação após 24 h mesmo para concentrações 5 vezes superiores de microcistinas ($5000 \mu\text{g.L}^{-1}$). Experimento 5: Avaliação do potencial de inibição de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* -B9, podendo-se constatar que além da degradação de microcistinas, a bactéria B9 mostrou-se eficiente também na inibição do crescimento de cianobactérias incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Phormidium* e *Synechocystis*.

Palavras Chave: Biodegradação. Atividade anti-cianobactéria. *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9. Bactérias lácticas probióticas e Leveduras

KURIAMA, Francine. **Assessing the potential biodegradation of microcystins and Biocontrol of cyanobacteria by microorganisms in water.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) - Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

To minimize problems related to the occurrence of cyanobacteria in water for human consumption there is requirement to investigate alternative treatment techniques with emphasis on biofilms with the potential degradation of microcystins - MCs. This study aimed to evaluate the potential degradation of microcystins - MCs and inhibition of cyanobacterial growth (activity anti-cyanobacteria) by microorganisms - *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, probiotic lactic bacteria, yeast and water kefir, aiming to obtain alternative technique for water treatment. The work was divided into five experiments: Experiment 1: Population growth of strain *Microcystis* sp. TAC 95, in which it was possible to define the growth phases of this strain used in subsequent experiments. Experiment 2: Selection of test conditions used in the evaluation of the potential degradation of total microcystins and inhibition of cyanobacteria growth by microorganisms. The conditions of biomass and culture with adapted microorganisms, presented the best results. Experiment 3: Prospective evaluation of different strains of microorganisms among bacteria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, probiotic lactic bacteria, water kefir and yeasts in relation to the capacity of MCs degradation. The bacteria B9 showed the highest percentage of degradation of MCs (95 to 98 %) after 96 h of exposure. Among the lactic probiotic bacteria the La-5 strain showed the highest percentage of degradation with 27 % and water kefir with 29 %. Already for the yeasts the strain with the highest degradation percentage was the Vale do Ivaí with 37 %. Experiment 4: Evaluation of the potential degradation of MCs to selected microorganisms. In the degradation curves with theoretical initials concentrations of 1000 ug.L⁻¹, the selected microorganisms presented, after 96 h, percentages of degradation of 44 % for La-5, 43 % for kefir and 54 % for yeast Vale do Ivaí and 99 % to bacteria B9, showing again, it is the most efficient among the microorganisms. Due to the promising results of the bacteria B9, the experiment 4 was repeated with superior concentrations of MCs, resulting in 99 % of degradation after 24 h for concentrations 5 times superior of microcistinas (5000 ug.L⁻¹). Experiment 5: Evaluation of the potential of cyanobacteria growth inhibition (activity anti-cyanobacteria) by bacteria B9. It was possible to verify that besides MCs degradation, the bacteria B9 was efficient also in the inhibition of growth of cyanobacteria of in the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Phormidium* and *Synechocystis*.

Keyword: Biodegradation. Anticyanobacterial activity. *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9. Lactic probiotic bacteria and Yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral das nodularinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999).....	25
Figura 2 - Estrutura química da hepatotoxina cilindrospermopsina (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)	26
Figura 3 - Estrutura química molecular das microcistinas	28
Figura 4 - Estruturas químicas das neurotoxinas : (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a (s) e (D) estrutural geral das saxitoxinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)	29
Figura 5 - Estrutura química das debromoapliasiatoxinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999).....	30
Figura 6 - Desenho esquemático da contagem celular de cianobactérias e leveduras em Câmara de Neubauer.....	40
Figura 7 - Diluições decimais e seriadas para a contagem da bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9	40
Figura 8 - Diluições decimais e seriadas para a contagem de bactérias lácticas probióticas	41
Figura 9 - Ilustração do processo de reação do método de imunoenensaio ELISA para análise de MCs.....	42
Figura 10 -Cepas de cianobactérias mantidas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento.....	44
Figura 11 -Imagem microscópica das culturas de cianobactérias	44
Figura 12 -Esquema ilustrativo das condições de teste (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) utilizadas nos Experimentos 2, 3, 4 e 5	48
Figura 13 -Esquema ilustrativo da Condição de teste A do Experimento 2.....	52
Figura 14 -Esquema ilustrativo da Condição de teste B do Experimento 2	52
Figura 15 -Esquema ilustrativo da Condição de teste C e D do Experimento 2	53
Figura 16 -Esquema ilustrativo da Condição de teste E e F do Experimento 2	53
Figura 17 -Esquema ilustrativo da Condição de teste G e H do Experimento 2	54
Figura 18 -Esquema da preparação do extrato da cepa toxigênica de <i>Microcystis</i> sp. TAC 95	55
Figura 19 -Esquema ilustrativo das condições de teste I e J do Experimento 3	56
Figura 20 -Desenho esquemático do Experimento 4	57

Figura 21 -Esquema ilustrativo da Condição H utilizada no Experimento 5.....	58
Figura 22 -Fotos da cultura da cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 / Caracterização da cepa.....	61
Figura 23 -Foto ilustrativa do Experimento 3	77
Figura 24 -Fotos de 96 h dos controles e 96 h e 168 h das culturas / misturas do Experimento 5.84	
Figura 25 - Cultura de (a) Bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9, (b) Mistura de Bactérias Lácticas Probióticas <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>rhamnosus</i> LPR, (c) Grãos de kefir de água e (d) Levedura PA	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas de remoção de cianobactérias e de suas toxinas	33
Tabela 2 - Dados das cepas de cianobactérias mantidas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento.....	44
Tabela 3 - Dados das cepas de bactérias lácticas probióticas utilizadas nos experimentos	45
Tabela 4 - Dados das cepas de leveduras utilizadas nos experimentos.....	46
Tabela 5 - Especificação das condições de teste (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) utilizadas nos Experimentos 2, 3, 4 e 5	47
Tabela 6 - Valores absolutos de clorofila-a, feofitina-a, microcistinas totais, microcistinas extracelulares e contagem celular da cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 monitorado durante 57 dias	60
Tabela 7 - Valores absolutos [% de redução] de contagem celular da cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 antes e após 96 horas	62
Tabela 8 - Valores absolutos [% de redução] contagem celular da cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando bactérias lácticas probióticas <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>rhamnosus</i> - LPR (P1) antes e após 96 horas	66
Tabela 9 - Valores absolutos [% de redução] contagem de <i>M. sp.</i> TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - PA (L1) antes e após 96 horas	69
Tabela 10 - Valores absolutos, % de degradação de MCs totais no Experimento 3 utilizando a cepa de <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 e cepas de bactérias lácticas probióticas antes e após 96 horas	74
Tabela 11 - Valores absolutos, % de degradação de MCs totais no Experimento 3 utilizando a cepa de <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 e cepas de leveduras antes e após 96 horas	76
Tabela 12 - Valores absolutos [% de degradação] de MCs totais das cepas de bactéria B9, kefir de água P4, bactéria láctica probiótica P5 e levedura L5 do Experimento 4	78

Tabela 13 - Valores absolutos das concentrações teóricas iniciais de MCs totais e ao longo do tempo após exposição à cepa de bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9	80
Tabela 14 - Valores de contagem da cepa de bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 ..	81
Tabela 15 - Valores absolutos, média e porcentagem de inibição em relação à contagem celular para diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5	85
Tabela 16 - Valores absolutos, média e porcentagem de inibição de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5.....	86
Tabela 17 - Produtos utilizados na composição do meio ASM-1	97
Tabela 18 - Produtos utilizados para composição do Meio Sakurai e YPD.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Contagem celular, concentração de clorofila-a e feofitina-a e microcistinas totais e extracelulares da curva de crescimento da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 9560
- Gráfico 2** - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 antes e após 96 horas62
- Gráfico 3** - Valores médios de concentração de clorofila-a de cultura da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 antes e após 96 horas63
- Gráfico 4** - Valores médios de concentração residual de MCs totais da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 antes e após 96 horas64
- Gráfico 5** - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* - LPR (P1) antes e após 96 horas.....66
- Gráfico 6** - Valores médios de concentração de clorofila-a cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* - LPR (P1) antes e após 96 horas.....67
- Gráfico 7** - Valores médios de concentração de MCs totais da cepa *M. sp.* TAC 95 nas diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* (LPR) (P1) antes e após 96 horas.....67
- Gráfico 8** - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* - PA (L1) antes e após 96 horas69
- Gráfico 9** - Valores médios da concentração de clorofila-a da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* - PA (L1) antes e após 96 horas70

Gráfico 10 - Valores médios de concentração residual de MCs totais da cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - PA (L1) antes e após 96 horas.....	71
Gráfico 11 - Valores médios da contagem celular de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - PA (L1) para diferentes condições de teste antes e após 96 horas	72
Gráfico 12 - Degradação de MCs totais pela bactéria B9, cepas de bactérias lácticas probióticas e kefir utilizando extrato de MCs totais	74
Gráfico 13 - Degradação de MCs totais pela bactéria B9 e cepas de leveduras utilizando extrato de MCs totais	76
Gráfico 14 - Curvas de degradação de MCs totais com concentração teórica inicial de MCs totais aproximada de 1000 ug.L ⁻¹ pela cepa de bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> (B9), grãos de kefir de água (P4), cepa de bactéria láctica probiótica La-5 (P5) e cepa de levedura Vale do Ivaí (L5) ao longo do tempo até 96 h de exposição	79
Gráfico 15 - Curva de degradação de MCs totais com concentrações teóricas iniciais variadas ao longo do tempo após exposição à cepa de bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9	80
Gráfico 16 - Contagem da bactéria <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 nos tempos 0 e 96 h do controle e da curva de degradação de MCs totais com concentrações iniciais teóricas de 1000, 2000, 3000 4000 e 5000 ug.I ¹	81
Gráfico 17 - Valores médios da contagem das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5	87
Gráfico 18 - Valores médios de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5	87

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	40
Equação 2	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MIB - 2	metilisoborneol
Adda	3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4, 6- ácido dienóico
ATP	Adenosina trifosfato
Cenepi	Centro Nacional de Epidemiologia
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
DL50	Dose letal para 50 % dos organismos
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ETAs	Estações de Tratamento de Águas
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
LA	Leucina e Alanina
LR	Leucina e Arginina
LPS	Lipopolissacarídeos
MC-LR	Microcistina - LR
MC-RR	Microcistina - RR
MCs	Microcistinas
Mdha	N-metildehidroalanina
mg.Kg ⁻¹ p.c.	Miligrama por Kilograma de peso corpóreo
NaOH	Hidróxido de Sódio
ND	Não determinado
OMS	Organização Mundial da Saúde
opm	Orbitais por minuto
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PSP	<i>Paralithic Shellfish Poison</i>
rpm	Rotações por minuto
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
THM	Trialometanos
UFC.mL ⁻¹	Unidades Formadoras de Colônias por Mililitros
UM	Mouse Unit
U.S.A	<i>United States of America</i>
YA	Tirosina e Alanina

YM	Tirosina e Metionina
YR	Tirosina e Arginina
YPD	Extrato de Levedura, Peptona Glicose
ug.Kg ⁻¹ .p.c.	Micrograma por Kilograma de peso corpóreo

SUMÁRIO

1	RESUMO	6
2	ABSTRACT	7
3	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
4.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOBACTÉRIAS	22
4.2	CIANOTOXINAS	24
4.2.1	HEPATOTOXINAS	25
4.2.2	NEUROTOXINAS	28
4.2.3	DERMATOTOXINAS	29
4.3	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	30
4.4	TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTENDO CIANOBACTÉRIAS	31
4.5	BIODEGRADAÇÃO DE CIANOTOXINAS	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	MÉTODOS DE ANÁLISE.....	39
5.1.1	CONTAGEM CELULAR DE CIANOBACTÉRIAS E DE LEVEDURAS.....	39
5.1.2	CONTAGEM DE BACTÉRIA B9.....	40
5.1.3	CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS	40
5.1.4	ANÁLISE DE CLOROFILA-A E FEOFITINA-A	41
5.1.5	ANÁLISE DE MICROCISTINAS PELO IMUNOENSAIO ELISA (<i>ENZYME- LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	42
5.2	CEPAS DE MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS.....	43
5.2.1	CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS.....	43
5.2.2	CEPA DE BACTÉRIA <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> - B9 E CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
5.2.3	CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	45
5.2.4	CEPAS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	45

5.2.5	DIFERENTES CONDIÇÕES DE TESTE UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS	46
5.3	EXPERIMENTO 1: CRESCIMENTO POPULACIONAL DA CEPA TOXIGÊNICA DE <i>Microcystis</i> sp. TAC 95	49
5.4	EXPERIMENTO 2: SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE A SEREM EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS - MCs TOTAIS E DE INIBIÇÃO DE CIANOACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS	50
5.5	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE DIFERENTES CEPAS DE MICRORGANISMOS EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS MCs TOTAIS	54
5.6	EXPERIMENTO 4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MCS TOTAIS PARA OS MICRORGANISMOS SELECIONADOS	56
5.7	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CIANOACTÉRIAS (ATIVIDADE ANTI-CIANOACTÉRIA) PELA BACTÉRIA <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> B9	57
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1	EXPERIMENTO 1: CRESCIMENTO POPULACIONAL DA CEPA TOXIGÊNICA DE <i>Microcystis</i> sp. TAC 95	59
6.2	EXPERIMENTO 2 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE A SEREM EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS MCs TOTAIS E DE INIBIÇÃO DE CIANOACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS	61
6.3	EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE DIFERENTES CEPAS DE MICRORGANISMOS EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS MCs TOTAIS	73
6.4	EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MCS TOTAIS PARA OS MICRORGANISMOS SELECIONADOS	78
6.5	EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CIANOACTÉRIAS (ATIVIDADE ANTI-CIANOACTÉRIA) PELA BACTÉRIA <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> B9	82
7	CONCLUSÕES	88
8	BIBLIOGRAFIA	89
9	ANEXOS	97

3 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Cianobactérias são microrganismos procariotos, geralmente aquáticos, que realizam fotossíntese com liberação de oxigênio. Podem ser predominantes no fitoplâncton de águas continentais, alcançando uma ampla diversidade de formas, devido às adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas adquiridas durante seu longo processo evolutivo. Podem produzir metabólitos secundários como as cianotoxinas, potencialmente tóxicos aos humanos e animais (BITTENCOURT & MOLICA, 2003).

Estudos sobre a ocorrência, distribuição e frequência de cianobactérias tóxicas foram realizados em vários países até meados da década de 80, utilizando-se bioensaios. Os métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa das cianotoxinas só se tornaram disponíveis no final da década de 80. Os resultados de ambas as abordagens indicam que as neurotoxinas são geralmente menos comuns. Em contraste, as toxinas peptídicas cíclicas que causam lesões hepáticas (microcistinas e nodularinas), são encontradas com maior frequência, sendo assim mais estudadas. Os gêneros potencialmente produtores de microcistinas são *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Synechocystis*, *Aphanocapsa* e *Anabaenopsis* (CHORUS & BARTRAM, 1999; FUNASA, 2003 e SANT'ANNA *et al.*, 2006).

No Brasil, a presença de microalgas e cianobactérias em mananciais é um grave problema enfrentado pelas Estações de Tratamento de Águas - ETAs que utilizam as Tecnologias de Tratamento por Ciclo Completo, ou mesmo de Filtração Direta. Dependendo da espécie e do número de indivíduos, pode ocorrer a redução da duração das carreiras de filtração e / ou comprometimento da qualidade da água produzida, uma vez que os metabólitos dissolvidos não são eficientemente removidos por aqueles tratamentos. Nesse contexto a pré-cloração é uma prática realizada no Brasil, em muitos sistemas de tratamento de água, visando o controle e inativação de microalgas e cianobactérias. Entretanto, alguns problemas são gerados pela utilização deste pré-tratamento em mananciais com elevadas concentrações de fitoplâncton, com destaque à promoção de lise celular, com consequente liberação de metabólitos secundários, especialmente as cianotoxinas ou ainda, à formação de subprodutos organohalogenados potencialmente cancerígenos. Na tentativa de minimizar esses problemas, existem estudos visando o uso de microrganismos com a capacidade de degradar as microcistinas - MCs, a exemplo de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 (MARUYAMA *et al.*, 2006), que aderida a um suporte, degradou até 100 % de MCs com concentração inicial de 2 mg.L⁻¹, após 16 h de exposição (TSUJI

et al., 2006), ou ainda, que apresentam atividade lítica (OZAKI *et al.*, 2007) com potencial aplicação como biocontrole.

Outro microrganismo capaz de promover a degradação de MCs são os microrganismos probióticos utilizados na dieta alimentar, pelos benefícios à saúde de humanos e animais. Estudos comprovaram o potencial de degradação de MCs pelas bactérias lácticas probióticas (SONJA *et al.*, 2007, MERILUOTO *et al.*, 2005 e NYBOM, SALMINEN E MERILUOTO, 2007) com destaque aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*.

Na agricultura, o biocontrole de patógenos tem sido prioritariamente feito com a introdução de microrganismos antagonistas no alvo a ser protegido. Entre os utilizados, destacam-se as leveduras, especialmente quando o objetivo é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura* (KRAEMER *et al.*, 2007).

As principais características que tornam as leveduras aptas para usos industriais são: facilidade de obtenção e multiplicação, necessidade de nutrientes simples, possibilidade de cultivo em condições menos restritivas, pouca exigência de água e área, produção de compostos de valor nutritivo, além de serem consideradas normalmente seguras para uso de maneira geral (DEL RIO, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* e espécies filogeneticamente próximas são as mais utilizadas na fermentação industrial de alimentos e de bebidas. Alguns estudos também demonstram a capacidade desta espécie em remover metais pesados em água, tornando-a uma alternativa promissora para a descontaminação ambiental (WANG & CHEN, 2006).

Diante do exposto, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos visando a obtenção de técnica alternativa para degradação de microcistinas – MCs e inibição do crescimento de cianobactérias como forma de biocontrole em águas destinadas ao consumo humano.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de degradação de microcistinas – MCs e de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) por microrganismos entre - *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras, visando a obtenção de técnica alternativa para o tratamento de águas destinadas ao consumo humano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma avaliação prospectiva de microrganismos *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras com possível atividade de degradação de microcistinas - MCs;
- Avaliar o potencial de degradação de microcistinas – MCs pelos microrganismos selecionados mediante construção de curvas de degradação;
- Avaliar o potencial de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pelos microrganismos selecionados.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CIANOBACTÉRIAS

Cianobactérias, cianofíceas ou algas azuis não são consideradas bactérias comuns, pois apesar de serem microrganismos celulares procariontes, possuem características fotossintetizantes como as algas. São aeróbios fotoautotróficos e utilizam água, CO₂, substâncias inorgânicas e luz para obtenção de energia. Cianobactérias muito pequenas (0,2 – 2 µm) tem sido reconhecidas como fonte potencial na produção primária, em vários ambientes aquáticos (CAMPINAS *et al.*, 2002). Acredita-se ainda que as cianobactérias sejam responsáveis pelo início da formação da atmosfera atual rica em oxigênio, desencadeando a evolução de todos os organismos fotossintetizantes (BITTENCOURT & MOLICA, 2003). Através de fósseis desses microrganismos em rochas sedimentares no noroeste da Austrália, estima-se que sua origem ocorreu há cerca de 3,5 bilhões de anos.

Tendo habitado diversos ambientes desde terrestre, água doce, salobra ou marinha, até em ambientes extremos como fontes termais, neve e desertos, desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na ciclagem de nutrientes (MONDARDO, SENES E FILHO, 2006). Porém são predominantemente encontradas no meio aquático, alcançando uma ampla diversidade de formas, devido às adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, adquiridas no decorrer do seu processo evolutivo (OLIVEIRA, 2003). As cianobactérias possuem mecanismo que as tornam aptas a tolerar condições adversas com altas concentrações de metais pesados e baixas de oxigênio dissolvido, incidência de radiação ultravioleta, além de estruturas que permitem o deslocamento ao longo da coluna d'água (LIBÂNIO, 2010).

Entre os fatores que levam as cianobactérias predominarem sobre os outros grupos fitoplanctônicos (microalgas), destacam-se as características fisiológicas pelas quais as cianobactérias assimilam os nutrientes (N e P) do meio aquático. De maneira geral, as cianobactérias são menos eficientes na assimilação desses nutrientes do que as microalgas (algas verdes ou diatomáceas, por exemplo), que, em condições normais, crescem com maior facilidade e intensidade. No entanto, ao produzir uma descarga excessiva de nutrientes nos reservatórios, o homem propicia uma maior oferta desses nutrientes, facilitando assim, a assimilação dos mesmos e o crescimento das cianobactérias (FUNASA, 2003).

As condições ambientais favoráveis para o crescimento das cianobactérias são temperatura em torno de 25°C, valores de pH na faixa de 6 a 9, concentração elevada de nutrientes,

especialmente nitrogênio e fósforo, e estabilidade da coluna d'água (MUR, SKULBERG, UTKILEN, 1999). Há intrínseca relação entre a concentração média de fósforo e a magnitude da comunidade algal devido ao fato do fósforo, ser o principal fator limitante do crescimento da população de algas, juntamente com o nitrogênio. Este por sua vez, abundante no ar atmosférico (78 %), é fixado no meio aquoso por algumas espécies de algas e cianobactérias, contribuindo ainda mais para a ocorrência de florações algais. A relação entre a concentração de nutrientes e a formação de biovolume algal não é linear e adquire usualmente, uma configuração exponencial (LIBÂNIO, 2010).

O aumento da concentração de nutrientes nos ecossistemas aquáticos principalmente o nitrogênio e o fósforo podem ocasionar a eutrofização, em especial, em corpos d'água com pouco ou nenhuma turbulência. Pode ocorrer de forma natural (processo lento, porém contínuo) ou artificial (provocada pelo homem).

A eutrofização artificial produz mudanças na qualidade da água incluindo: redução do oxigênio dissolvido, perda das qualidades cênicas, aumento do custo de tratamento, morte extensiva de peixes e aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (AZEVEDO, 1998).

Embora a eutrofização seja reconhecida como um problema desde a década de 1950, somente a partir das últimas décadas a presença de florações de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos continentais passou a ser reconhecida como um problema para a saúde humana. Isso se deve à constatação de que vários gêneros e espécies de cianobactérias podem produzir potentes toxinas (cianotoxinas) (REBOUÇAS, BRAGA E TUNDISI, 2006).

Atualmente são conhecidos aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias, sendo, 46 espécies já foram identificadas como potencialmente tóxicas aos vertebrados (MONDARDO, SENES E FILHO, 2006). Os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Umezakia* podem formar florações com conseqüente liberação de toxina (cianotoxinas) através da lise celular (OLIVEIRA, 2003; CHORUS & BARTRAM, 1999).

Algumas dúvidas ainda persistem em relação à possível vantagem adaptativa na produção de cianotoxinas pelas cianobactérias. A hipótese mais aceita sustenta que estas substâncias tóxicas tenham função de defesa, como a dos anti-herbívoros produzidos por algumas plantas, que inibem a ação de predadores ou de algas competidoras (LIBÂNIO, 2010).

Além da produção de cianotoxinas que podem causar intoxicações agudas ou crônicas, e terem ações hepatotóxica, neurotóxica ou dermatotóxica, as cianobactérias também são produtores de compostos orgânicos voláteis associados à ocorrência de odor e sabor à água tais como 2-

metilisoborneol (2-MIB), β -cyclocitral, β -ionona e 2 (3)-metil-1-butanol (FREITAS, SIRTORI, ZAMORA, 2008; KURODA *et al.*, 2009). A ocorrência desses compostos tem causado problemas aos sistemas de abastecimento relacionados à vulnerabilidade da confiança do consumidor em relação à qualidade da água distribuída e aos sistemas de tratamento, por requerer processos específicos para remoção e implicar em custos adicionais.

4.2 CIANOTOXINAS

O caso mais antigo de intoxicação de animais está relacionado com uma intensa proliferação de algas na água, descrito por George Francis, de Adelaine, Austrália em 1878. Tratava-se de *Nodularia spumigena* que, sob temperaturas elevadas, reproduziu-se com grande intensidade no lago Alexandrina formando florações e provocando a morte rápida do gado e outros animais. (BRANCO, 1986).

As intoxicações em humanos e animais devido à ingestão de água contaminada com cianobactérias tóxicas já foram descritas em diversos países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul. No entanto o surto mais grave ocorreu em Caruaru - Brasil em 1996, envolvendo 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise, passando a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Destes, 54 faleceram até cinco meses após o início dos sintomas e, de acordo com informações fornecidas pela Secretaria de Saúde de Estado de Pernambuco, a referida clínica recebia água sem tratamento completo e usualmente era feita uma cloração no próprio caminhão-tanque utilizado para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública (AZEVEDO, 1998).

Os principais gêneros de cianobactérias que se destacam pela ampla distribuição, potencial capacidade de produzir toxinas e efeitos que podem causar em outros organismos de ambientes aquáticos são: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Nodularia*. A liberação das toxinas para o ambiente, na forma de toxina dissolvida, ocorre com a morte, lise ou senescência das células (MULLER, RODRIGUES E CYBIS, 2009).

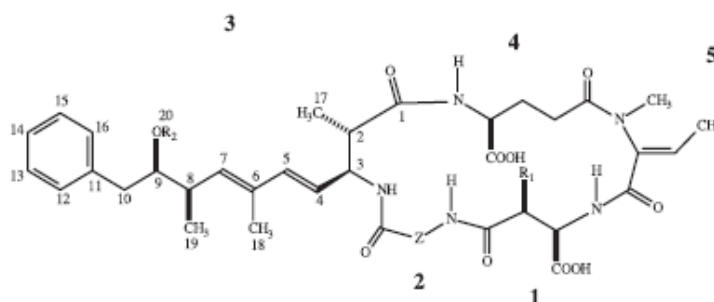
De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Entretanto, por sua ação farmacológica, as três principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são: hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas geralmente com efeitos de inibição na síntese de proteínas (REBOUÇAS, BRAGA E TUNDISI, 2006; CHORUS & BARTRAM, 1999).

4.2.1 HEPATOTOXINAS

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias está associado às hepatotoxinas, de ação lenta, podendo ocasionar a morte de mamíferos em um intervalo de poucas horas ou dias. As espécies já identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularina*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (REBOUÇAS, BRAGA E TUNISI, 2006). As microcistinas - MCs heptapeptídeos cíclicos e as nodularinas - pentapeptídeos cíclicos são as cianotoxinas mais freqüentemente encontradas em blooms de água doce (SIVONEN & JONES, 1999). A ação hepatotóxica para animais, com sinais exteriores de envenenamento incluem fraqueza, palidez, extremidades geladas, respiração pesada, vômitos e diarreia. São conhecidas mais de 60 variantes de MCs e seis variantes de nodularinas.

As nodularinas (Figura 1) são produzidas por espécies de *Nodularia*, especialmente por *N. spumigena*. São estruturalmente menores que as MCs diferenciando-se pela ausência de dois aminoácidos. Também possuem ação hepatotóxica, apresentando o mesmo mecanismo de ação farmacológica, porém, penetram nos hepatócitos mais facilmente do que as MCs. A dose letal DL50 para camundongos, por via intraperitoneal, é de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. para a nodularina e para as demais variantes, variam entre 75 e 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. (RINEHART *et al.* 1994; SAITO, *et al.*, 2001 *apud* SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Figura 1 – Estrutura geral das nodularinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)

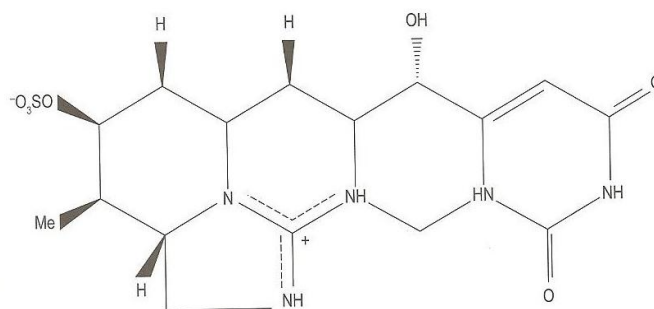


Fonte : FUNASA (2003 p. 15)

A cilindrospermopsina (Figura 2) é um alcalóide guanidínico cíclico produzido por *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans* e *Aphanizomenon ovalisporum*. Essa toxina inibe a síntese protéica, causando desestruturação e necrose no fígado, tendo sido também observados danos em células renais, cardíacas e pulmonares, e ainda em mucosa gástrica de camundongos. As cilindrospermopsinas possuem ação lenta, sendo necessários de 5 a 7 dias para

atingir seu efeito tóxico máximo. Em camundongos, por via intraperitoneal, a DL50 para 24 h, é de 2 mg.kg⁻¹p.c., e passa a ser de 0,2 mg.kg⁻¹ p.c., para 5 dias (TERAO *et al.*, 1994; FALCONER *et al.* 1999 *apud* SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Figura 2 - Estrutura química da hepatotoxina cilindrospermopsina (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)



Fonte : Di Bernardo (2010 p. 34)

4.2.1.1 MICROCISTINAS – MCs

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos produzidos por diversas espécies do gênero *Microcystis*, especialmente por *M. aeruginosa*, e por espécies de *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Synechocystis* e *Aphanocapsa* (DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010) de ocorrência comum em reservatórios de água doce. Podem causar intoxicações agudas e crônicas e dependendo da dose ingerida, provocar a morte de animais em algumas horas ou dias. O quadro clínico apresentado pelos animais expostos são prostração, ereção de pêlos, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia. A morte decorre de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico, e há um aumento da relação fígado / peso corpóreo de 5 % para cerca de 8-10 % (DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010). Os poderes maléficos comprovados devem-se à capacidade hepatocarcinogênica, cuja base molecular da toxicidade consiste na inibição de enzimas fosfatase 1 e 2 A do hepatócito.

A estrutura química molecular das microcistinas (Figura 3) constitui-se de heptapeptídeo monocíclico, composto de 3 D-aminoácidos que compõem a porção invariável e constante nas moléculas, 2 L-aminoácidos e 2 aminoácidos raros. Os D-aminoácidos são constituídos de alanina, ligação β eritro-β metil-ácido aspártico; ligação ácido glutâmico (Ala - β - Me - Asp - Glu). Os dois aminoácidos raros correspondem a N-metilhidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4, 6- ácido dienóico (Adda). Os 2 L-aminoácidos variáveis com, tirosina e

arginina (YR), tirosina e alanina (YA), e tirosina e metionina (YM) (KAMOGAE & HIROOKA, 2000).

As microcistinas possuem um destaque especial, pois são as mais relacionadas à intoxicação de pessoas e animais e, apresentam mais de 60 variantes, sendo as microcistinas RR (MC-RR) e LR (MC-LR), as duas mais comumente encontradas no meio aquático (LUCA, PEGORE E LUCA, 2010).

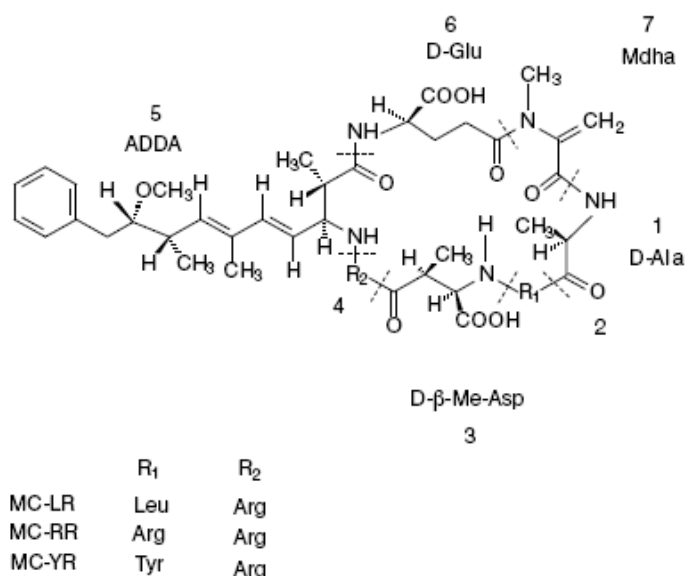
Assim, a sua toxicidade é classificada em 3 grupos, dependendo da substituição de dois L-aminoácidos variáveis: forte: -LR, -LA e -YR; média: -WR; ou fraca: -RR e -M(O)R. Resultados de pesquisas sugerem que os resíduos de (2S, 3S, 8S, 9S) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda) (HARADA, 2004) e Ácido glutâmico da molécula de microcistina possuem importante papel na hepatotoxicidade da microcistina (LEAL & SOARES, 2004).

Em camundongos, a DL50 da microcistina-LR varia de 25-150 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ p.c. (peso corpóreo); por via intraperitoneal. Para as demais MCs, esses valores situam-se entre 50-1200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ p.c., sendo essa variação atribuída às diferenças entre as estruturas das moléculas dessas cianotoxinas (CHORUS & BARTRAM, 1999 *apud* DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010).

As microcistinas - MCs são promotoras de tumores e também podem acarretar a destruição da estrutura e função do fígado, hemorragia intra-hepática e ocasionar a morte por problemas respiratórios. Além de causarem problemas sanitários, a exposição crônica às microcistinas em águas de abastecimento, mesmo em baixas concentrações, pode levar à promoção de tumores e carcinomas em mamíferos, especialmente de fígado, rins e cólon, o que torna a existência dessas toxinas um problema relevante para a Saúde Pública e para a produção agropecuária e aquícola (LUCA, PEGORE E LUCA, 2010).

Estas toxinas são solúveis em água, mas não são capazes de penetrar diretamente nas membranas lipídicas das células, exceto aquelas poucas que são hidrofóbicas. Estas hepatotoxinas são internalizadas nos hepatócitos por meio dos receptores dos ácidos biliares. Uma vez dentro da célula hepática, promovem uma desorganização dos filamentos intermediários e microfilamentos de actina, ocasionando a desestruturação do citoesqueleto dos hepatócitos. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais, provocando hemorragia intra-hepática (DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010).

Figura 3 - Estrutura química molecular das microcistinas

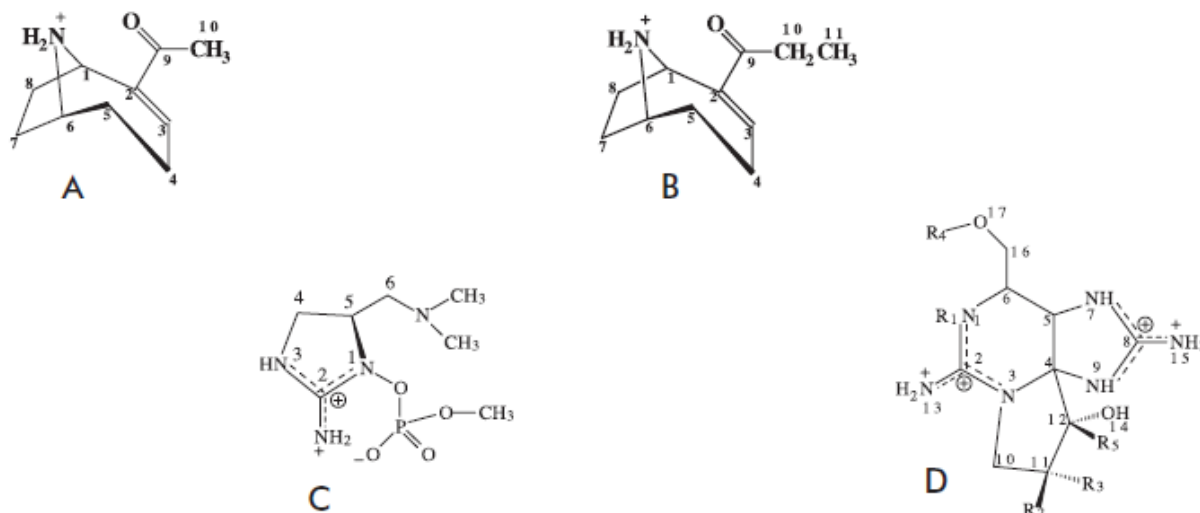


Fonte: LUCA (2010, p. 6)

4.2.2 NEUROTOXINAS

As neurotoxinas (Figura 4) são alcalóides do tipo carbamato, produzidos por espécies de *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis* e *Trichodesmium*. Embora os microrganismos pertencentes a esses gêneros também possam produzir peptídeos hepatotóxicos, as neurotoxinas possuem ação mais rápida e por isso, de efeito predominante. De um modo geral, os sintomas por intoxicações agudas são: paralisia, hipotensão, dispnéia e falência respiratória. São grandes as diferenças entre as potências das numerosas toxinas PSP (*Paralithic Shellfish Poison*), sendo que essas potências podem ser medidas em unidades denominadas UM (*Mouse Unit*), que é definida como a dosagem necessária para matar um camundongo de 20 g, por via intraperitonal, em 15 min. Para as saxitoxinas, uma das mais tóxicas substâncias pertence ao grupo PSP, cujo valor é de 2483 UM por μmol do composto enquanto que para as C-toxinas, é de 15-145 UM por μmol (KUIPER – GOODMAN *et al.*, 1999 *apud* SANT'ANNA *et al.*, 2006).

Figura 4 - Estruturas químicas das neurotoxinas : (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a (s) e (D) estrutural geral das saxitoxinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)



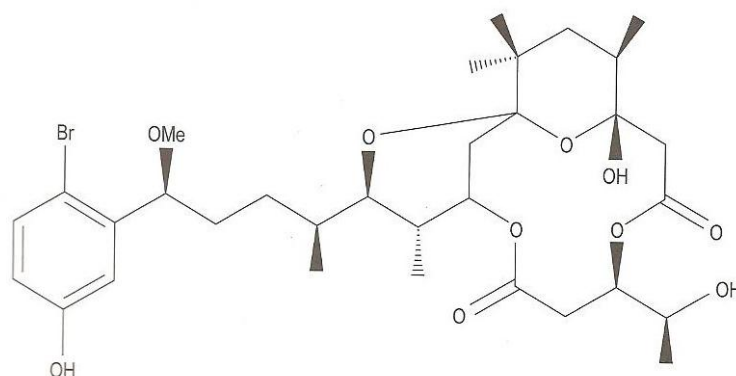
Fonte : FUNASA (2003, p. 13)

A DL50 das saxitoxinas, por via intraperitoneal, em camundongos machos é de cerca de 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. e em fêmeas é de 8,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c. (KUIPER – GOODMAN *et al.*, 1999 *apud* SANT’ANNA *et al.*, 2006).

4.2.3 DERMATOTOXINAS

Os lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 5) são componentes da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas, incluindo as cianobactérias; são agentes pirogênicos, capazes de induzir irritação na pele e alergias. Se ingeridas, essas toxinas induzem, tanto em humanos quanto em animais de experimentação, uma série de efeitos que incluem neutropenia, trombocitopenia, níveis anormais de glicose e mudanças metabólicas, como acidose e alcalose (SANT’ANNA *et al.*, 2006).

Figura 5 - Estrutura química de debromoapliasiatoxinas (adaptada de Chorus e Bartram, 1999)



Fonte : Di Bernardo (2010 p. 34)

4.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

A água destinada ao consumo humano deve ser potável isto é, segura (livre de contaminantes orgânicos e inorgânicos e de microrganismos patogênicos), de aspecto atraente, sabor agradável para ser bebida e adequada para finalidades domésticas e para a maior parte das atividades industriais. Além disso, a água não deve ter dureza elevada e deve ser estável, quer dizer, nem ser corrosiva nem incrustante. A avaliação da qualidade de uma água para uso humano ou industrial, tratada ou *in natura*, é feita pela determinação de diversos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos. Os padrões de potabilidade fixam valores para os parâmetros mais representativos da qualidade de uma água para que seja considerada adequada ao consumo humano (RICHTER, 2009).

Em junho de 2003, foi instituída a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde que assumiu as atribuições do Centro Nacional de Epidemiologia (Cenepi), até então localizado na estrutura da Fundação Nacional de Saúde (Funasa). Em virtude desse novo ordenamento na estrutura do Ministério da Saúde, a Portaria 1469 foi revogada, passando a vigorar a Portaria 518 de março de 2004 mantendo-se inalterado o número e valores de máximos permissíveis de cada parâmetro. As alterações processadas referem-se tão somente à transferência de competências da Funasa para SVS e à prorrogação no prazo para que as instituições ou órgãos aos quais se aplicam a Portaria promovessem as adequações necessárias ao seu cumprimento. Estas adequações concernem ao tratamento por filtração de água captada em manancial superficial e distribuída por meio de canalização, e à obrigação do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas (LIBÂNIO, 2010).

A Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004 obriga o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas estabelecendo o valor máximo permitido de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs para água de consumo humano. Também proíbe o uso de algicidas, para o controle do crescimento de cianobactérias, em mananciais cuja contagem ultrapasse 20.000 cel.mL^{-1} ou 2 $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$ de biovolume, pois pode causar a lise das células acarretando assim a liberação das toxinas, que conseqüentemente são mais difíceis de serem eliminadas da água.

Em 12 de dezembro de 2011 a Portaria nº 518 / 2004 foi revogada pela Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde. Dentre as principais alterações relacionadas às cianobactérias, destacam-se:

- Inclusão, no padrão de potabilidade, do valor máximo permitido de saxitoxinas de 3,0 μg equivalente STX/L e do valor máximo de percepção de 6 para qualquer característica de gosto e odor, com exceção do cloro livre;
- Recomendação de análise de cilindrospermopsinas (observando o valor máximo aceitável de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e anatoxina-a (s) no monitoramento de cianobactérias quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores dessas cianotoxinas no ponto de captação do manancial superficial;
- Em complementação ao monitoramento, recomenda-se a análise de clorofila-a no manancial, com frequência semanal, como indicador de potencial aumento da densidade de cianobactérias. Quando os resultados das análises revelarem que a concentração de clorofila-a em duas semanas consecutivas tiver seu valor duplicado ou mais, deve-se proceder nova coleta de amostra para quantificação de cianobactérias no ponto de captação do manancial, para reavaliação da frequência de amostragem de cianobactérias;
- Estabelecimento do prazo máximo de 24 (vinte e quatro) meses, contados a partir da data de publicação desta Portaria, para que os órgãos e entidades sujeitos à aplicação desta Portaria promovam as adequações necessárias ao seu cumprimento, no que se refere ao monitoramento dos parâmetros gosto e odor e saxitoxinas.

4.4 TRATAMENTO DE ÁGUAS CONTENDO CIANOBACTÉRIAS

A presença de microalgas e cianobactérias em mananciais brasileiros é um grave problema enfrentado pelas Estações de Tratamento de Água – ETAs, que utilizam as Tecnologias de Tratamento por ciclo completo e de Filtração Direta. Ou seja, dependendo da espécie e do número de indivíduos, pode ocorrer a redução da duração das carreiras de filtração e ou comprometer seriamente a qualidade da água produzida, principalmente devido à liberação de seus metabólitos.

A pré-cloração é uma prática realizada em muitos sistemas de tratamento de água, visando à remoção / inativação de microalgas e cianobactérias. Entretanto, alguns problemas foram observados na utilização deste pré-tratamento em mananciais com elevadas concentrações de fitoplâncton, sobretudo a formação de subprodutos clorados, como por exemplo, os trihalometanos (THM) os quais são considerados cancerígenos, e da liberação de metabólitos, que podem ser potencialmente tóxicos (MONDARDO, SENES E FILHO, 2006; KURODA, 2006). Também podem conferir sabor e odor às águas que podem estar associados com os compostos orgânicos voláteis (VOCs) (LIBÂNIO, 2008; KURODA, 2009).

Há evidências que as tecnologias de tratamento usuais, envolvendo a coagulação química, não são capazes de efetivamente remover as cianotoxinas dissolvidas na água. Isto provavelmente ocorre porque os coagulantes usualmente empregados são ineficazes na desestabilização e precipitação desses compostos, não sendo possível a separação com conseqüente remoção das cianotoxinas nas etapas seguintes de potabilização (LIBÂNIO, 2008).

A interferência da presença de algas e cianobactérias na potabilização das águas revela-se em varias perspectivas de acordo com o(s) grupo(s) predominante(s). Alguns grupos de algas interferem no tratamento das águas de diferentes formas. Usualmente, ocorre o aumento do consumo de produtos químicos, redução da sedimentabilidade dos flocos e das carreiras de filtração, elevação da demanda de cloro na desinfecção, com maior possibilidade de formação de THM, ocasionando maiores riscos à saúde humana. Embora ainda sejam casos raros no Brasil, sucessivas florações culminaram com a mudança do manancial ou com a alteração da tecnologia de tratamento com o emprego da floração por ar dissolvido, em virtude da mencionada baixa sedimentabilidade dos flocos formados (LIBÂNIO, 2008).

Para minimizar a problemática das cianobactérias existem diversos processos sendo desenvolvidos na tentativa de remover tanto as células intactas de cianobactérias potencialmente toxigênicas como de suas toxinas na água, buscando acima de tudo um acordo entre seus custos e a sua fácil manipulação (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2006).

Existem estudos abordando as mais variadas tecnologias (Tabela 1), como processos específicos de tratamento tais como filtração lenta, ultrafiltração, nanofiltração, flotação por ar dissolvido, radiação UV ou gama, adsorção em carvão ativado e solos argilosos, pós – oxidação combinados com os tratamentos convencionais, osmose reversa, tratamento químico (por agentes oxidantes como: ozônio, cloro e dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio dentre outros) e biodegradação (HASHIMOTO, 2007; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2006), com eficiências de até 95 a 100 % para remoção de compostos tóxicos presentes na água. Porém, deve-se considerar a grande limitação dos mesmos já que não existem muitos estudos com

relação à toxicidade dos subprodutos de reação formados e quais os seus efeitos crônicos e agudos sobre o ser humano (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2006).

Tabela 1 Técnicas de remoção de cianobactérias e de suas toxinas

Técnica de Tratamento	Expectativa de remoção		
	Células preservadas	Toxina extracelular	Comentários
Coagulação / sedimentação / flotação por ar dissolvido	>80%	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Precipitação / sedimentação	>90	<10}%	Remove apenas a toxina contida na célula
Filtração rápida	>60	<10%	Remove apenas a toxina contida na célula
Filtração lenta em areia	~90	Provavelmente significativa	A eficiência para ;MCs dissolvida depende do biofilme e do comprimento do filtro
Coagulação / sedimentação / filtração combinada	>90	<10	Remove apenas a toxina contida na célula
Flotação por ar dissolvido	>90	NA, PB	Remove apenas a toxina contida na célula
Processos de membranas	>99	Incerto	Depende do tipo de membrana
Adsorção (PAC)	Insignificante	>85	Para doses adequadas (>20 mg.L ⁻¹), a competição COD reduz a capacidade
Adsorção (GAC)	>60	>80	A competição COD reduz a capacidade e acelera a quebra, remove as células
Carvão ativado granular biológico	>60	>90	A atividade biológica aumenta a eficiência de remoção
Pré – ozonização	Aumenta coagulação	Aumento potencial	Utilizada em dosagens baixa risco de liberar toxina
Pré – cloração	-	Causa lise e libera metabólitos	Aplicável para cianobactérias tóxicas apenas se o tratamento subsequente remover as toxinas dissolvidas
Ozonização (pós - clarificação)	-	>98%	Rápido e eficiente para toxinas solúveis
Cloro livre (pós – filtração)	-	>80%	Efeito > 0,5 mg.L ⁻¹ após 30 minutos a pH<8 e baixo COD
Cloramina	-	Insignificante	Ineficiente
Dióxido de cloro	-	Insignificante	Não efetivo com doses usadas em tratamento de água para abastecimento
Permanganato de potássio	-	>95%	Efetivo sobre toxina solúvel, mas apenas na ausência de células completas
Peróxido de hidrogênio	-	Insignificante	Não efetivo
Radiação UV	-	Insignificante	Capaz de degradar MCs – LR e anatoxina-a, mas apenas em doses impraticavelmente altas

Fonte ALBUQUERQUE JUNIOR (2006 p.48)

4.5 BIODEGRADAÇÃO DE CIANOTOXINAS

Estudos voltados para o uso de microrganismos no combate a produtos tóxicos indicam que o uso dos mesmos requer uma fase de aclimatação dividida em três etapas: (i) indução de enzimas específicas ausentes ou presentes em baixos níveis antes da exposição (ii) seleção de novas capacidades metabólicas produzidas por mudanças genéticas; e (iii) aumento do número de organismos na população ativa. O crescimento biológico depende de outros fatores como: interação biológica (competição e predação), fatores abióticos, como presença e atividade de água, temperatura, pH e presença de matérias tóxicos (AMARANTE JUNIOR, VIEIRA E COELHO, 2006).

Quanto à temperatura, a elevação da mesma causa aumento de intensidade nos processos biológicos, até o limite da desnaturação das proteínas, quando as atividades celulares são inibidas e as células morrem. Valores de pH entre 6,0 e 8,0 são considerados ideais para atividade microbiana. A variação de pH tem, além da ação direta sobre os microrganismos, papel fundamental na química do solo e das águas naturais, uma vez que pode disponibilizar ou remover nutrientes e compostos tóxicos devido à atividade do íon hidrogênio em solução (AMARANTE JUNIOR, VIEIRA E COELHO, 2006).

Para minimizar os problemas relacionados à ocorrência de microalgas ou cianobactérias em mananciais de abastecimento, existem estudos voltados para o uso de vírus, protozoários, fungos, actinomicetos e bactérias diversas por apresentarem atividade antagonista às cianobactérias e ou de biodegradação de cianotoxinas.

A biodegradação é definida como a redução de complexidade de compostos químicos; isto é, a mudança na estrutura química de determinada substância ocasionada por processo biológico que, em geral, diminui o tamanho molecular (AMARANTE JUNIOR, VIEIRA E COELHO, 2006).

A atividade antagônica à cianobactéria é comum em actinomicetos e bactérias isoladas de solos ou ambientes aquáticos especialmente com florações de cianobactéria. Entre 83 espécies de actinomicetos isolados de sedimentos, 50 % apresentaram atividade cianobacteriolítica, com destaque para *Streptomyces phaeofaciens* S9. L-lisina, aminoácido secretado por S9, foi apontado como um dos fatores capazes de causar danos na parede celular de *M. aeruginosa* (YAMAMOTO *et al.*, 1998).

Saito *et al.*, (2003) detectaram o gene degradante de microcistinas – mlrA em *Sphingomonas* sp. MJ-PV e bactérias MD-1 e Y2 e verificaram que o gene mlrA é exclusivo para degradação de microcistinas.

Harada *et al.*, (2004) isolou o aminoácido Adda de microcistina-LR depois da degradação microbiana usando a cepa isolada *Sphingomonas* - B9. O Adda purificado que foi estruturalmente

caracterizado, não apresentou toxicidade em camundongos ou inibição da proteína fosfatase em contraste com a toxina natural. Portanto, o isolamento de Adda não foi apenas significativo para estudos de degradação de microcistinas em condições naturais, mas também para subseqüentes estudos de biossintética.

Estudos feitos por Bourne *et al.*, (2006) revelaram que a bactéria (MJ-PV) demonstrou capacidade de degradação de microcistina-LR, que foi investigado por aplicações em biorremediações em microcosmos de águas naturais e atividade biológica em filtros de areia lentos. Degradações superiores a 80 % de MC-LR foram observadas com inóculo (1×10^6 cel.mL⁻¹) no tratamento com água do rio após 2 dias.

Shunyu *et al.*, (2006) isolou uma bactéria do Lago Dianchi da província Yunnan, China, *Bacillus cereus*, capaz de provocar a lise de um bloom de cianobactéria *Aphanizomenon flos-aquae*. Esta bactéria mostrou atividade lítica contra uma ampla gama de cianobactéria / algas, incluindo *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis viridis*, *M. wesenbergi*, *M. aeruginosa*, *Chlorella ellipsoidea*, *Oscillatoria tenuis*, *Nostoc punctiforme*, *Spirulina maxima*, e *Selenastrum capricornutum*. A bactéria *Bacillus cereus* possui formato de bastonete, são Gram-positivo e produzem colônias brancas quando estriados no meio BG-11 suplementado com 6 g.L⁻¹ de caldo de tripticase de soja e solidificado com 1 % Agar. Não foi detectado efeito adverso em testes de toxicidade por bioensaios com ratos. Assim, *B. cereus* DC22 foi considerado um microrganismo seguro para o controle de blooms de cianobacterias / algas em ambientes naturais. A bactéria DC22 mostrou atividade lítica contra uma ampla gama de cianobacterias / algas em 7 dias.

Maruyama *et al.*, (2006) testaram três cepas de bactéria (Y2^T, MDB2 e MDB3), isoladas do Lago eutrófico Suwa e do Rio Tenryu, localizados no Japão, que degradaram microcistinas. As bactérias eram aeróbias e quimio-organotróficas com células Gram-negativas, em forma de bastonetes não esporulados, móveis por meio de flagelo polar único. Formavam colônias com pigmentos amarelos em Agar nutriente. A análise filogenética baseada em seqüências de gene 16S rRNA indicaram que os isolados formaram um conjunto da família *Sphingomonadaceae*, mas foram claramente separadas de gêneros estabelecidos desta família, por exemplo, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* e *Sphingopyxis*. Assim, as três cepas representam um novo gênero e espécie da família *Sphingomonadaceae* como o nome *Sphingosinicella microcystinivorans*.

Lemes *et al.*, (2007) testaram e confirmaram a biodegradação de duas variantes de microcistinas, MC-LR e [D-Leu1] MC-LR ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), por bactérias isoladas da Lagoa dos Patos na região estuarina. A maior taxa de biodegradação foi de 0,05 mg de MC-LR por dia observado no experimento com extratos de células de *Microcystis* RTS 9501 na amostra de água do estuário.

Também isolou uma cepa de bactérias capazes de crescer em um meio enriquecido com MC-LR como a única fonte de carbono. Esta cepa bacteriana foi identificada como pertencente ao grupo dos β -proteobactérias do gênero *Burkholderia*.

Tsuji *et al.*, (2006) isolaram onze cepas de bactérias ativas retiradas de amostras dos Lagos Tsukui e Sagami, Japão, em que três cepas de bactérias (B9, B10 e B11) apresentaram atividade de degradação de microcistinas – MCs (com concentração inicial ajustada para 2 mg.L⁻¹) de onde a cepa B9 obteve destaque nesta atividade, pois as MC-LR e MC-RR foram completamente degradadas em bactéria imobilizada em resina de poliéster após 1 d. Em condições otimizadas, a remoção com eficiência de 80 % foi observada de forma contínua por 2 meses, podendo assim, ser uma alternativa viável para aplicação no tratamento de microcistinas. A cepa B9 é aeróbia, quimio-organotrófica, e Gram-negativa. As células são bastonetes e produzem colônias amarelas em meio Agar Sakurai.

A bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 produz enzimas hidrolíticas capazes de degradar microcistinas - MCs e nodularinas que são peptídeos cíclicos tóxicos produzidos por cianobactérias. A bactéria B9 é capaz de degradar estes peptídeos cíclicos de cianobactérias por hidrólise de suas ligações peptídicas. Esta bactéria possui uma atividade hidrolítica que pode degradar estruturalmente diferentes peptídeos cíclicos e que este pode ser eficaz para a desintoxicação de resíduos perigosos. Estudos têm demonstrado que a bactéria - B9 pode degradar não somente MC-LR, mas outras MCs, tal como MC-RR, 3-desmetil MC-LR, dihidro MC-LR, e a MC-LR cisteína conjugada, mas também nodularinas (KATO *et al.*, 2007).

Outro microrganismo que pode promover a degradação das MCs são os microrganismos probióticos utilizados comumente na dieta alimentar pelos benefícios à saúde de humanos e animais. Vários estudos comprovam o potencial de degradação de MCs pelas bactérias lácticas probióticas (SONJA *et al.*, 2007, MERILUOTO *et al.*, 2005 e NYBOM, SALMINEN E MERILUOTO, 2007) com destaque aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*.

As bactérias lácticas probióticas estão presentes em vários ambientes naturais como a boca e o trato intestinal de humanos além de serem encontrados em produtos lácteos, cárneos e vegetais. Segundo a FAO/WHO, (2006) microrganismos probióticos são definidos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro”. Quando introduzidos no sistema digestivo, através da alimentação, apresentam a capacidade de resistência à acidez estomacal e à ação dos sais biliares, chegando à mucosa intestinal onde ocorre a sua aderência e colonização (PIMENTEL, FRANCKI, GOLLÜCKE, 2005).

Entre os efeitos benéficos atribuídos a estes microrganismos estão o alívio na constipação intestinal, melhora do sistema imune e ação antimicrobiana a microrganismos patogênicos e deteriorantes (GOMES & MALCATA, 1999).

Estudos envolvendo linhagens de bactérias lácticas probióticas para degradação de contaminantes têm sido avaliados em diversas matrizes. Niderkorn, Boudra e Morgavi, (2006), estudaram a capacidade de 25 linhagens de bactérias lácticas probióticas em degradar toxinas produzidas por *Fusarium* sp., e observaram redução de até 100 % de FB2. Halttunen, Salminen e Tahvonon (2007), obtiveram uma redução de 85 % de cádmio e chumbo em água após 5 min de incubação utilizando *L. plantarum*.

A capacidade das bactérias lácticas em produzir grande quantidade de ácidos orgânicos (fundamentalmente ácido láctico), por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos e conseqüentemente reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana dessas bactérias (MAGRO, CORBACHO E SORRIES, 2000). Três probióticos *Lactobacillus rhamnosus* cepas GG e LC-705 e *Bifidobacterium lactis* cepa Bb12 apresentaram capacidade de se ligarem a MC- LR de soluções aquosas, sendo que em mesmas condições de cultivo (7 h de incubação a 35 °C), *L. rhamnosus* foi a que apresentou maior capacidade de remoção (MERILUOTO *et al.*, 2005).

Dentre 11 cepas de bactérias lácticas testadas, *Lactobacillus rhamnosus* GG e LC-705, *Bifidobacterium longum* 46 e *Bifidobacterium lactis* 420 e Bb12 apresentaram maior efetividade na remoção de MC-LR, sendo que culturas de bactérias viáveis mostraram-se mais eficientes na remoção de MC-LR em relação a bactérias não viáveis ou liofilizadas, possivelmente porque o mecanismo de remoção pode estar associado ao metabolismo bacteriano (NYBOM, SALMINEN E MERILUOTO, 2007).

Na agricultura, o biocontrole de patógenos tem sido prioritariamente feito com a introdução de microrganismos antagonistas no alvo a ser protegido. Entre os utilizados, destacam-se as leveduras, especialmente quando o objetivo é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura* (KRAEMER *et al.*, 2007).

As leveduras são microrganismos eucarióticos predominantemente unicelulares pertencentes ao Reino *Fungi*, podem ser produzidas em grandes quantidades pelo uso da biotecnologia nas indústrias de pão e cervejeiras. Sua forma predominante é unicelular, sua reprodução vegetativa se faz, geralmente, por gemulação ou brotamento. Podem ser amplamente encontrados na natureza e possuem grande importância econômica por participarem de diversos processos industriais de fermentação. São obrigatoriamente aeróbias, porém algumas podem ser anaeróbias facultativas e são conhecidas como leveduras fermentativas. Estes organismos têm a capacidade de fermentar

açúcares produzindo etanol e dióxido de carbono e por isso são utilizados há milhares de anos na produção de pão e de bebidas alcoólicas, tendo importância econômica em escala industrial (CARVALHO, BENTO E SILVA, 2006).

Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos. O fator que é um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo, pode ser detectado nos gêneros *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp., *Ustilago* spp., *Rhodotorulla* spp., *Trichosporon* spp., *Hanseniaspora* spp., *Williopsis* spp., *Zygowilliopsis* spp. e *Zygosaccharomyces* spp..

Embora o fenômeno “killer” tenha sido descoberto em 1963, pouco se conhece ainda sobre seu mecanismo de ação. As evidências indicaram atuação na membrana de células sensíveis, reduzindo o pH intracelular e causando conseqüente extravasamento de íons potássio e ATP, entre outros. A atividade “killer” em meios de cultura é expressa sob condições ácidas (pH 3-6), com maior atuação em pH 4-5 e entre 15-20°C, podendo ser inativada em temperaturas superiores. Na indústria fermentativa, leveduras com caráter “killer” combatem cepas de leveduras selvagens deteriorantes, indesejáveis durante o processamento de cerveja e pão. A constatação da letalidade do fator “killer” em determinadas linhagens de leveduras perante fungos filamentosos ampliou ainda mais as perspectivas de aplicação, também sob ponto de vista de biocontrole dos fitopatógenos e bolores deteriorantes de alimentos (COELHO, HOFFMANN E HIROOKA, 2003).

A *Saccharomyces cerevisiae* e espécies filogeneticamente próximas são comumente empregadas nas indústrias de fermentação alimentícia e de bebidas. As principais características que tornam as leveduras interessantes para usos industriais são sua facilidade de obtenção e multiplicação, utilização de nutrientes na forma mais simples, possibilidade de cultivo independente do ambiente, pequena exigência de água e área, formação de produtos de valor nutritivo, além de serem consideradas seguras para uso de maneira geral (DEL RIO, 2004).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado a capacidade desta espécie em remover metais pesados da água, tornando uma alternativa promissora para descontaminação ambiental (WANG & CHEN, 2006).

5 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do potencial de degradação de microcistinas – MCs totais e de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) por microrganismos bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras, foi efetuada através de diferentes experimentos, em escala de bancada no Laboratório de Saneamento da Universidade Estadual de Londrina - UEL.

O estudo constituiu-se basicamente, de cinco experimentos consecutivos descritos a seguir.

- **Experimento 1:** Crescimento populacional da cepa toxigênica de *Microcystis* sp. TAC 95;
- **Experimento 2:** Seleção das condições de teste a serem empregadas na avaliação do potencial de degradação de microcistinas – MCs totais e de inibição de cianobactérias por microrganismos;
- **Experimento 3:** Avaliação prospectiva de diferentes cepas dos microrganismos: bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, bactérias lácticas probióticas, kefir de água e leveduras em relação à capacidade de degradação de MCs totais;
- **Experimento 4:** Avaliação do potencial de degradação de MCs totais para os microrganismos selecionados;
- **Experimento 5:** Avaliação do potencial de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9.

5.1 MÉTODOS DE ANÁLISE

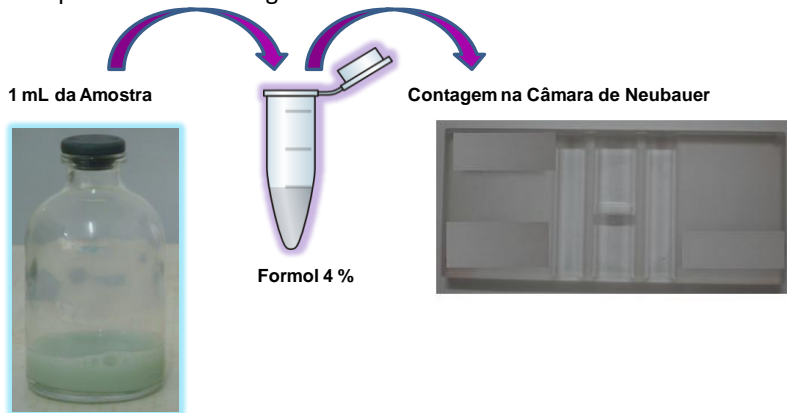
5.1.1 CONTAGEM CELULAR DE CIANOBACTÉRIAS E DE LEVEDURAS

Para determinação da contagem celular, foi utilizado o método 10200 F segundo APHA, AWWA, WEF, (2005) com adaptações. A determinação da contagem celular de cianobactérias e de leveduras foi realizada em câmara de Neubauer em alíquotas de 1 mL previamente fixadas em formol a 4 % (Figura 6). Para uniformizar a precisão de contagem, a diluição foi efetuada até que se obtivessem entre 100 e 250 células por quadrante. O número de células foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Contagem celular (cel. mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Número de células totais}}{4} \times \text{diluição} \times 10000$$

Equação 1

Figura 6 - Desenho esquemático da contagem celular de cianobactérias e leveduras em Câmara de Neubauer

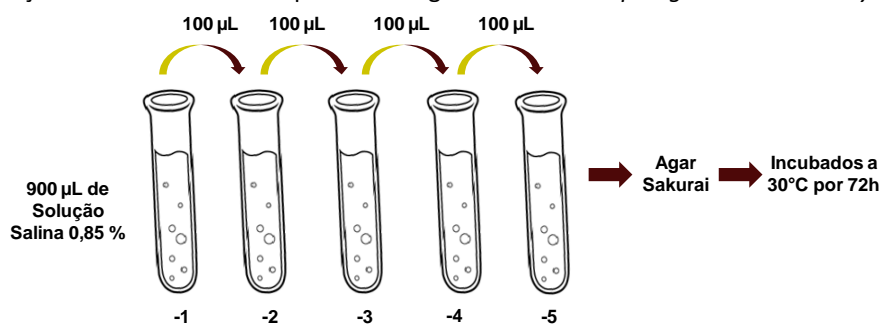


Fonte Do Autor (2012)

5.1.2 CONTAGEM DE BACTÉRIA B9

Para a contagem da bactéria B9, foram retiradas alíquotas de 100 μL das amostras e submetidas a diluições decimais e seriadas em 900 μL de solução salina 0,85 % estéril. Em seguida, as amostras diluídas de bactéria B9 foram inoculadas em superfície de Agar Sakurai e incubadas a 30°C por 72 h. O número de bactéria B9 foi dado em UFC.mL⁻¹ (Figura 7).

Figura 7 - Diluições decimais e seriadas para a contagem da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9



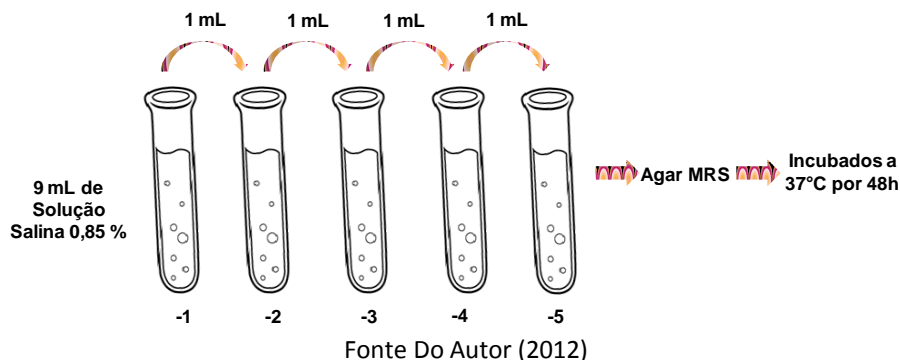
Fonte Do Autor (2012)

5.1.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS

Para a contagem das bactérias lácticas probióticas, foram retiradas alíquotas de 1 mL das amostras e submetidas a diluições decimais e seriadas em solução salina 0,85 % estéril. Em

seguida, as amostras diluídas de bactérias lácticas probióticas, foram inoculadas em profundidade (pour - plate) em Agar MRS e incubadas a 37°C por 48 h. O número de bactérias lácticas probióticas foi dado em UFC.mL⁻¹ (Figura 8).

Figura 8 - Diluições decimais e seriadas para a contagem de bactérias lácticas probióticas



5.1.4 ANÁLISE DE CLOROFILA-A E FEOFITINA-A

Para análise de clorofila-a e feofitina-a foi utilizado o método espectrofotométrico 10200 H segundo APHA, AWWA, WEF, (2005) com adaptações. Alíquotas de 10 mL foram retiradas das amostras e filtradas em membrana tipo GF / C marca Sartorius sob baixa iluminação. Em seguida, as membranas foram submetidas à extração em 5 mL de acetona 90 % a 4°C por no mínimo 12 h e posteriormente, os extratos foram centrifugados a 1520 × g por 15 min para a retirada do material particulado e leitura da absorbância a 665 nm do sobrenadante, descontando-se a interferência de particulados a 750 nm. A acidificação do extrato para determinação da feofitina-a foi realizada com pH ajustado para 2,3 e 2,8 adicionando-se solução de ácido clorídrico 0,1 N. A leitura do extrato acidificado foi realizada entre 30 seg e 3 min, nos mesmos comprimentos de onda citados. A quantificação de clorofila-a e feofitina-a foi realizada pela Equação 2 apresentada a seguir:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 26,73 \times \{ (665 \text{ b} - 750 \text{ b}) - (665 \text{ a} - 750 \text{ a}) \} \times \frac{v}{V \times s}$$

Equação 2

$$\text{Feofitina a } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 26,73 \times \{ [1,7 \times (665 \text{ a} - 750 \text{ a})] - (665 \text{ b} - 750 \text{ b}) \} \times \frac{v}{V \times s}$$

em que:

UA b: absorbância da amostra não acidificada;

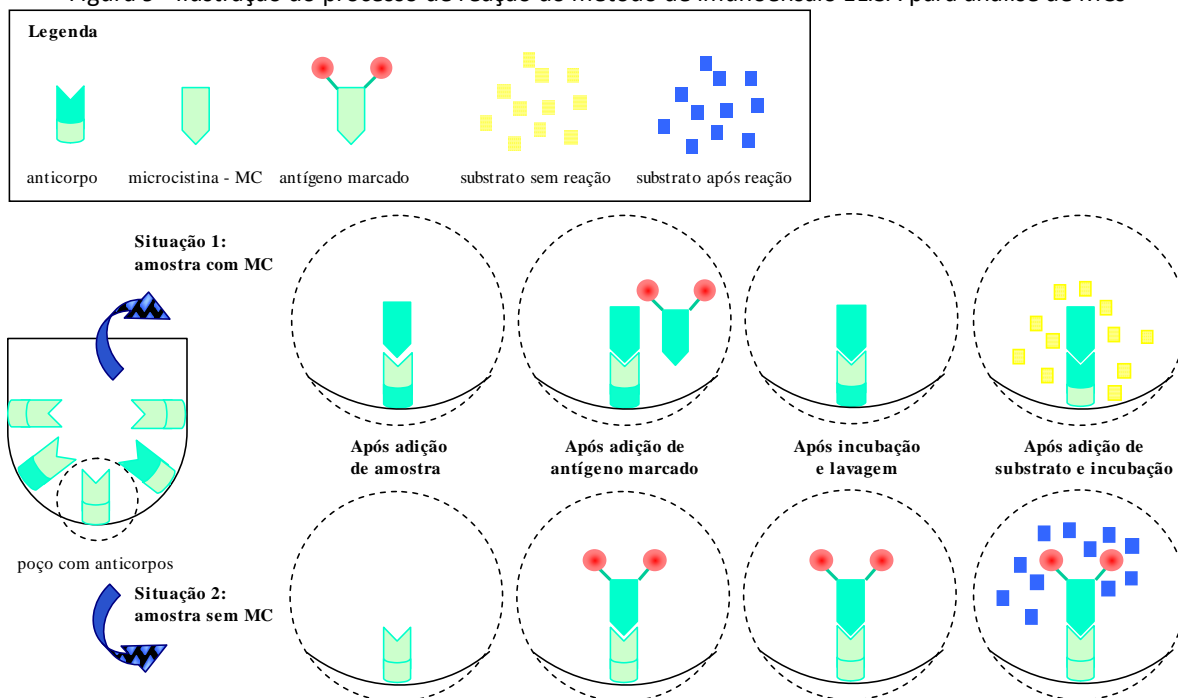
UA a: absorbância da amostra acidificada;

v: volume do solvente (mL);
 V: volume da amostra filtrada (L);
 s: comprimento óptico da cubeta (cm),
 26,73: coeficiente de absorção específica da clorofila-a em solução aquosa de acetona 90 %;
 1,7: razão de rendimento da clorofila a não acidificada para acidificada.

5.1.5 ANÁLISE DE MICROCISTINAS PELO IMUNOENSAIO ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

A análise de microcistinas - MCs totais por imunoenensaio ELISA foi realizada com o kit de placas da Beacon Analytical Systems Inc. O método de imunoenensaio ELISA utilizado baseia-se na competição direta entre a MC presente na amostra, seguida, da MC marcada com a peroxidase, com anticorpo policlonal de coelho anti-MC-LR, com reatividade cruzada com análogos de MCs (100 % para MC-LR, 87 % para a MC-RR e 48 % para a MC-YR) imobilizados nos poços. Assim, os resultados das análises por imunoenensaio ELISA são expressos, neste caso, na forma de equivalentes de MCs totais. O processo de reação do método é ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Ilustração do processo de reação do método de imunoenensaio ELISA para análise de MCs



Fonte KURODA (2006)

As curvas de calibração foram construídas e validadas, antes de cada bateria de análise, com o emprego de padrão externo com concentração previamente conhecida, se a porcentagem de

recuperação resultasse entre 80 e 130 % (faixa estabelecida pelo fabricante para validação da curva de calibração). As análises foram realizadas no mínimo em duplicata e preferencialmente em triplicata, sendo estas consideradas válidas, se os valores de coeficiente de variação – CV máximo resultassem inferiores a 15 %. As análises foram realizadas com emprego de micropipetas automáticas de volume variáveis devidamente calibradas e reservadas especificamente para esse fim. As amostras foram previamente diluídas em água ultra pura de forma a possibilitar a quantificação pela curva de calibração com faixa de concentração entre 0 e 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs totais.

5.2 CEPAS DE MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS

Para facilitar o entendimento são apresentadas a seguir as cepas de microrganismos e as condições de teste utilizadas nos experimentos com seus respectivos códigos. Na Figura 25 são apresentadas fotos ilustrativas de culturas dos microrganismos utilizados.

5.2.1 CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS

Para o desenvolvimento dos experimentos, foram adquiridas 05 cepas de cianobactérias *Microcystis* (TAC95 e NPLJ4), *Anabaena* (AU02g), *Phormidium* (NIES-611) e *Synechocystis* (PCC-6803) (Tabela 2). A cepa NPLJ-4 foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dra. Sandra Azevedo do LETC-IBCCF-UFRJ e as demais, pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do *Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University Nagoya - Aichi – Japão*.

Para a realização dos testes, as cepas de cianobactérias utilizadas foram mantidas no laboratório através de inoculações quinzenais em meio ASM-1 (GORHAM, 1964) estéril (autoclavado a 121°C durante 20 min).

As culturas (Tabela 2) foram mantidas em triplicata em tubos de ensaio de 22 mL com 10 mL de meio e em duplicata em erlenmeyers de 125 mL com 20 mL de meio à temperatura de 25°C e iluminação de 35 $\mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 h.d^{-1} .

Tabela 2 - Dados das cepas de cianobactérias mantidas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento

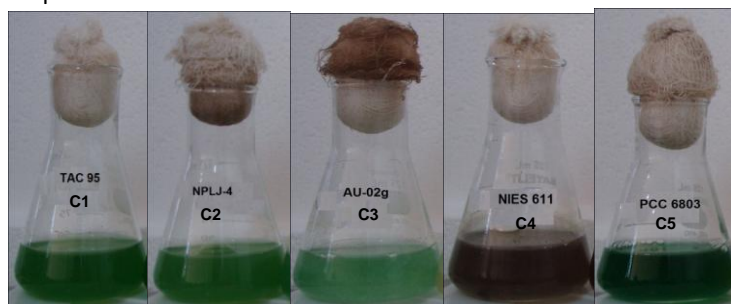
Código	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
C1	TAC 95	<i>Microcystis</i> sp.	Japão	ASM-1
C2	NPLJ 4	<i>Microcystis</i> spp.	Lagoa de Jacarepaguá / RJ, Brasil	
C3	AU 02g	<i>Anabaena ucrainica</i>	Floração Lago Sagami / Kanagawa, C7Japão, 2002	
C4	NIES 611	<i>Phormidium tenue</i>	Lago Biwa C8 / Shiga, Japão, 1987	
C5	PCC-6803	<i>Synechocystis</i>	California, U.S.A., 1968	

NIES: National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japão;
PCC: Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, Paris, França.

Fonte Do Autor (2012)

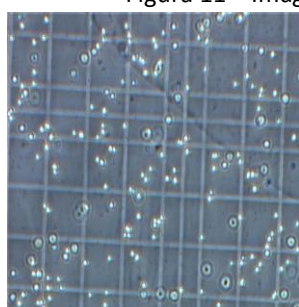
Na Figura 10 são apresentadas fotos ilustrativas das culturas de cianobactérias (Tabela 2) 15 dias após inoculação e a Figura 11 apresenta imagens microscópicas das culturas de cianobactérias.

Figura 10 - Cepas de cianobactérias mantidas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento



Fonte Do Autor (2012)

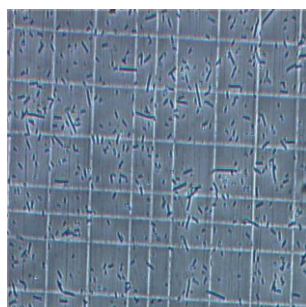
Figura 11 – Imagem microscópica das culturas de cianobactérias



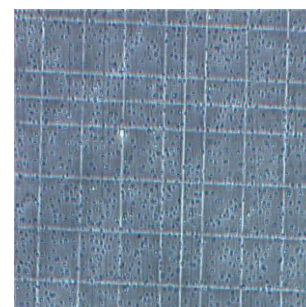
Microcystis



Anabaena ucrainica



Phormidium tenue



Synechocystis

Fonte KURODA, (2010)

5.2.2 CEPA DE BACTÉRIA *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 foi isolada do Lago Tsukui, Kanagawa e cedida pelo Prof. Dr. Ken-Ichi Harada do *Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University Nagoya - Aichi – Japão*. A cepa foi mantida em meio sólido Sakurai (TSUJI *et al.*, 2006) a 4°C. Para utilização nos experimentos, a cepa foi previamente ativadas por 2 vezes incubando-se em meio sólido Sakurai a 30°C por 48-72 h e posteriormente, cultivada em meio líquido (peptona de caseína 0,2 %, extrato de levedura 0,1 % e glicose 0,05 %) a 30° C por 72 h.

5.2.3 CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Na Tabela 3 são relacionadas as cepas de bactérias lácticas probióticas, gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Sandra Garcia do departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, utilizadas nos experimentos. As cepas de bactérias lácticas probióticas foram mantidas a -20°C com 10 % de glicerol. Para utilização nos experimentos, as cepas foram previamente ativadas por 3 vezes em Caldo MRS a 37°C por 18 h.

Os grãos de kefir de água foram ativados previamente por 3 vezes em solução de açúcar mascavo 5 % à temperatura ambiente por 24 h.

Tabela 3 - Dados das cepas de bactérias lácticas probióticas utilizadas nos experimentos

Código	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
P1	LPR	<i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>rhamnosus</i>	Sacco	MRS
P2	Bb12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Christian Hansen	
P3	LC-1	<i>Lactobacillus casei</i>	Christian Hansen	
P4	Kefir	Água	Laboratório de Ciência de Alimentos CCA-UEL	Açúcar mascavo
P5	La-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Christian Hansen	MRS

Fonte Do Autor (2012)

5.2.4 CEPAS DE LEVEDURAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Na Tabela 4 são apresentados dados das cepas de leveduras, gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Gisele Maria de Andrade de Nóbrega do departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina, utilizadas nos experimentos. As cepas de leveduras foram cultivadas em meio YPD a 25°C por 24 h.

Tabela 4 - Dados das cepas de leveduras utilizadas nos experimentos

Código	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
L1	PA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	YPD
L2	C2	<i>Pichia fermentans</i>	-	
L3	Da Calda	Cepa não identificada	Isolada de cana de açúcar	
L4	A2	Cepa não identificada	Isolada de carambola	
L5	Vale do Ivaí	Cepa não identificada	Isolada de cana de açúcar	
L6	CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isolada de cana de açúcar	

Fonte Do Autor (2012)

5.2.5 DIFERENTES CONDIÇÕES DE TESTE UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

Para facilitar o entendimento as condições de teste utilizadas nos Experimentos 2, 3, 4 e 5 foram codificadas conforme Tabela 5 e ilustração da Figura 12.

Tabela 5 - Especificação das condições de teste (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) utilizadas nos Experimentos 2, 3, 4 e 5

Código	Condição teste	Experimento
A-Controle	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada ou extrato de MCs + ASM-1 complementar	2 e 5
B	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + meio ^(*)	2
C	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + 0,1 mL biovolume ^(**)	2
D	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + 0,7 à 1 mL biovolume ^(**)	2
E	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + 0,1 mL biovolume ^(**) + 1 mL meio ^(*)	2
F	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + 0,7 à 1 mL biovolume ^(**) + 1 ou 2 mL de meio ^(*)	2
G	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + ASM-1 complementar + 1 ou 2 mL ou 2g cultura ^(**) + 1 ou 2 mL de meio ^(*)	2
H	Cultura de cianobactérias / cepa toxigênica de <i>M. sp.</i> TAC 95 pré-condicionada + 1 ou 20 mL cultura ^(**) + 1 ou 20 mL de meio ^(*) pH 8,0 com ou sem adição de meio ASM-1 complementar	2 e 5
I	Extrato de MCs ^(***) + 1 ou 4 mL da cultura ^(**) + 1 ou 4 mL de meio ^(*)	3, 4
J	Extrato de MCs ^(***) + 1 mL de biovolume ^(**) + 1 mL de meio ^(*)	3

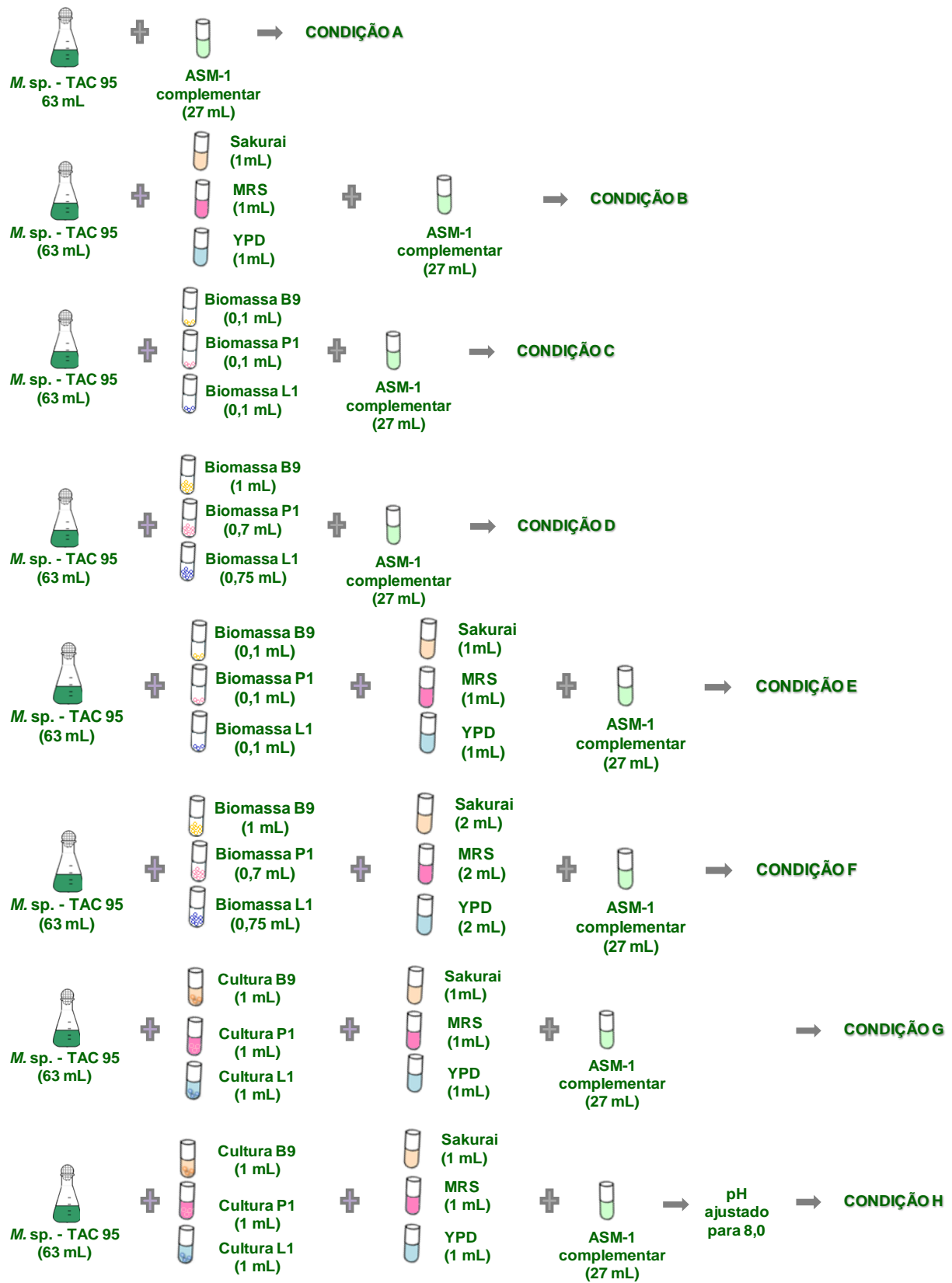
(*) meio específico dos microrganismos: B9 – Sakurai ou bactérias lácticas probióticas – MRS ou kefir – açúcar mascavo ou leveduras – YPD

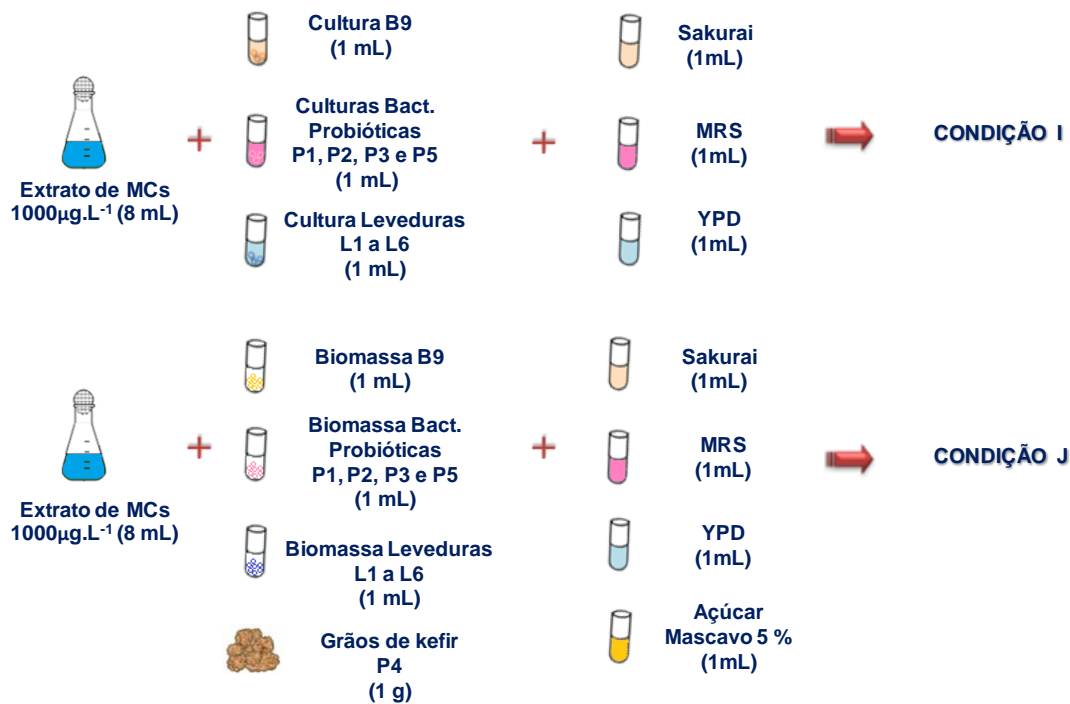
(**) cultura ou biovolume específica dos microrganismos B9 ou bactérias lácticas probióticas ou leveduras

(***) extratos de MCs com diferentes concentrações

Fonte Do Autor (2012)

Figura 12 - Esquema ilustrativo das condições de teste (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) utilizadas nos Experimentos 2, 3, 4 e 5





Fonte Do Autor (2012)

5.3 EXPERIMENTO 1: CRESCIMENTO POPULACIONAL DA CEPA TOXIGÊNICA DE *Microcystis* sp. TAC 95

O Experimento 1 teve como objetivo, construir a curva de crescimento celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 com a finalidade de fornecer subsídios sobre as fases de crescimento celular e produção de microcistinas – MCs para auxiliar o planejamento dos experimentos subsequentes.

A cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 foi cedida pelo Prof. Ken-Ichi Harada do *Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya - Aichi - Japão*. Esta cepa foi selecionada por caracterizar-se pela produção predominante de MC-LR em elevadas concentrações.

Inicialmente, foram preparados 2,7 L de meio ASM-1 estéril e inoculado a 10 % com uma cultura concentrada da cepa de *M. sp.* TAC 95, a fim de se obter contagem inicial de aproximadamente 10^6 cel.mL⁻¹. Em seguida, a cultura foi incubada à temperatura de 25°C, iluminação de 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e aeração contínua.

Para a construção da curva de crescimento celular, alíquotas (1 mL) foram retiradas diariamente da cultura durante 57 dias e preservadas com formol a 4 % para contagem celular em

microscópio óptico, utilizando-se câmara de Neubauer, conforme método apresentado no item 5.1.1.

As condições fisiológicas foram monitoradas por retiradas de alíquotas (10 mL) para determinação das concentrações de clorofila-a e feofitina-a, segundo método apresentado no item 5.1.4. Adicionalmente, alíquotas (2 mL) foram amostradas para determinação das concentrações de MCs totais pelo método de imunoenensaio ELISA (kits de placas da Beacon *Analytical Systems* Inc.) segundo o item 5.1.5.

5.4 EXPERIMENTO 2: SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE A SEREM EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS – MCs TOTAIS E DE INIBIÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS

O Experimento 2 foi efetuado com o objetivo de avaliar diferentes condições de teste (A, B, C, D, E, F, G e H) e selecionar as condições experimentais a fim de possibilitar a avaliação do potencial de inibição de cianobactérias e de degradação de microcistinas – MCs por microrganismos, a serem empregadas nos experimentos subsequentes, conforme apresentado na Tabela 5. Neste experimento foram avaliados, de forma preliminar e simultânea, as atividades de degradação de MCs e de inibição do crescimento de *Microcystis* sp. TAC 95, especificamente em relação às cepas de bactéria B9, de bactéria láctica probiótica LPR (P1) e de levedura PA (L1).

Para avaliar a atividade de degradação as amostras foram congeladas e descongeladas três vezes devido a presença de células intactas nas culturas / misturas, proporcionando assim a lise das células e conseqüente liberação de toxinas residuais.

A seguir são descritos os procedimentos específicos utilizados para viabilizar as condições de teste consideradas no Experimento 2.

- **Cultura da cepa toxigênica de *Microcystis* sp. TAC 95 pré-condicionada**

As culturas da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* foram preparadas em triplicata, adicionando-se 9 mL de inóculo da cepa de *M. sp. TAC 95* em 54 mL de meio ASM-1 em erlenmeyers de 125 mL, e mantendo-se a 27°C sob iluminação ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e agitação de 100 opm. O pré-condicionamento das culturas foi realizado mantendo-se as condições de cultura citadas por 3 dias, antecedendo a inoculação das culturas / biovolumes dos microrganismos.

- Culturas dos microrganismos

Para obtenção das culturas das cepas de bactéria B9, de bactéria láctica probiótica LPR (P1) e de levedura PA (L1), estas foram ativadas, conforme métodos descritos nos itens 5.2.2 a 5.2.3, e cultivadas em 700 mL de meio líquido Sakurai (extrato de levedura 0,1 %; glicose 0,05 % e peptona de caseína 0,2 %) a 25°C por 48-72 h, Caldo MRS e meio líquido a 37° C por 18 h e YPD (extrato de levedura 1 %; glicose 2 % e peptona de caseína 2 %) a 25°C por 24 h, respectivamente.

- Biovolume dos microrganismos

Para obtenção da biovolume das cepas de bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (P1) e levedura PA (L1), culturas desses microrganismos foram preparadas especificamente para este fim, conforme métodos descritos nos itens 5.2.2 a 5.2.4, sendo posteriormente centrifugadas a 1521 x g por 10 min para remoção dos meios de cultivos.

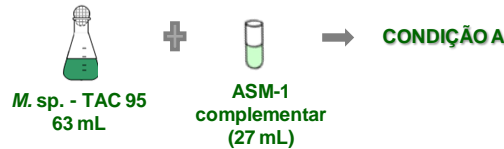
- Procedimento geral do Experimento 2:

Foram adicionados volumes de cultura ou biovolume dos microrganismos em diferentes quantidades, com ou sem adição dos meios líquidos específicos (Sakurai, MRS e YPD) e ajuste de pH, às culturas pré-condicionadas de *M. sp. TAC 95* (em triplicata), seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1, de modo que as condições iniciais de cultivo da cepa de *M. sp. TAC 95* resultassem similares àquelas empregadas na curva de crescimento celular, com contagem inicial da ordem de 10^6 cel.mL⁻¹.

Em seguida, as culturas / misturas foram mantidas a 27°C sob iluminação ($20 \mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e agitação de 100 opm por um período de 96 h. Nos tempos 0 e 96 h, foram coletados dessa culturas / misturas, 10 mL para determinação da concentração de clorofila-a e feofitina-a, 2 mL para análise de MCs totais, 1 mL para determinação da contagem de *M. sp. TAC 95*, 1 mL para contagem de bactérias lácticas probióticas e 1 mL para contagem de levedura conforme métodos de análise apresentados no item 5.1.1.

A avaliação das diferentes condições de teste foram realizadas comparativamente em relação às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* que receberam apenas a adição complementar de 27 mL de meio ASM-1, denominadas por controle negativo - Condição A (Figura 13).

Figura 13 – Esquema ilustrativo da Condição de teste A do Experimento 2



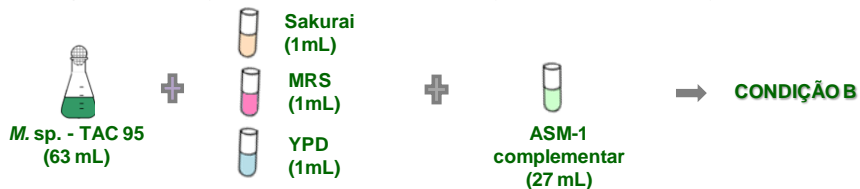
Fonte Do Autor (2012)

Apresentam-se a seguir os procedimentos específicos utilizados para:

- Avaliação da influência dos meios específicos de cultivo dos microrganismos

Para avaliar a influência dos meios específicos de cultivo dos microrganismos foram adicionados 1 mL de cada um dos meios líquidos estéreis (Sakurai, MRS e YPD) às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1 – Condição B (Figura 14).

Figura 14 – Esquema ilustrativo da Condição de teste B do Experimento 2

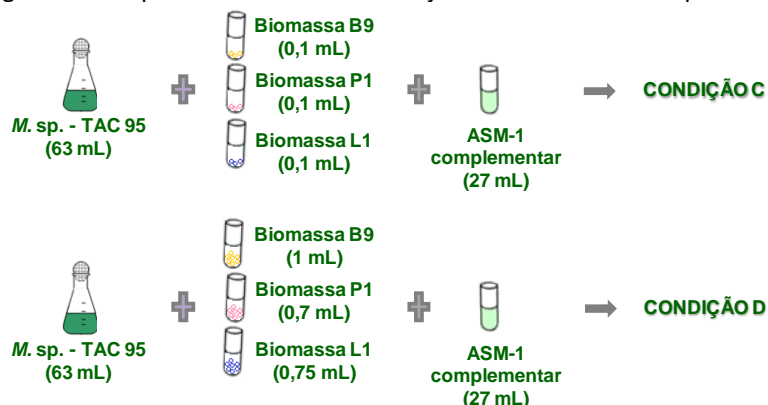


Fonte Do Autor (2012)

- Avaliação da influência da quantidade de biovolume

Para avaliar a influência da quantidade de biovolume na atividade de degradação de MCs totais e de inibição de *Microcystis sp.* TAC 95, foram adicionados diferentes quantidades de biovolume pura 0,1 e (0,7 a 1) mL de cada um dos microrganismos (bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (L1) e levedura PA (P1)) às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1 – Condições C e D (Figura 15).

Figura 15 – Esquema ilustrativo da Condição de teste C e D do Experimento 2



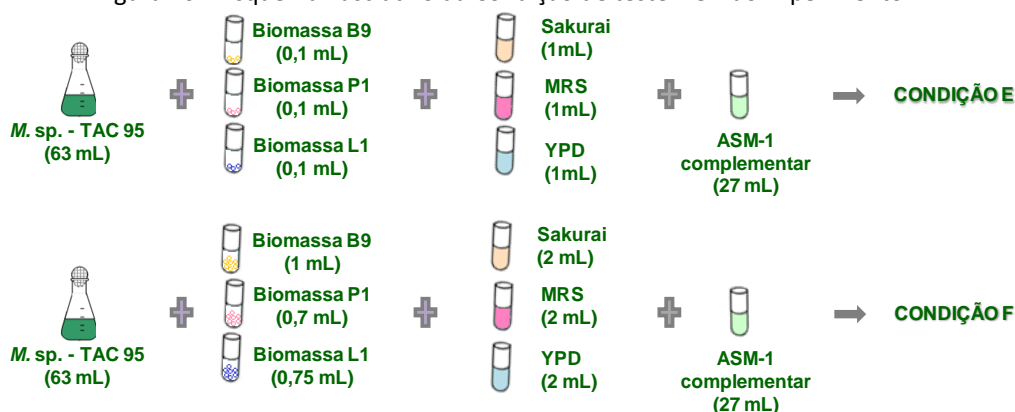
Fonte Do Autor (2012)

- Avaliação da capacidade de manutenção dos microrganismos

A capacidade de manutenção dos microrganismos (bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (P1) e levedura PA (L1)) durante o experimento foi também testada pela adição complementar de meio específico: 1 mL de meios estéreis (Sakurai, MRS e YPD) para as misturas que receberam 0,1 mL de biovolume pura de bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (P1) e levedura PA (L1) às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95*, seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1 – Condição E (Figura 16).

Na Condição F (Figura 16) – foram adicionados 2 mL de meios líquidos estéreis (Sakurai, MRS e YPD) para as misturas que receberam 0,7; 0,75 e 1 mL de biovolume pura de bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (L1) e levedura PA (L1) às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95*, seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1.

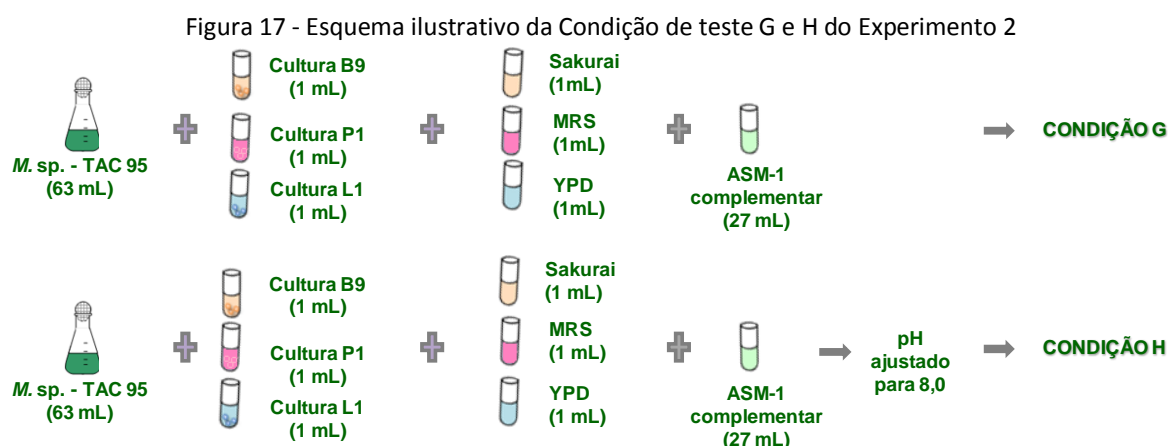
Figura 16 – Esquema ilustrativo da Condição de teste E e F do Experimento 2



Fonte Do Autor (2012)

- Avaliação da influência da adição de microrganismos na condição adaptada – cultura e do potencial hidrogeniônico - pH da mistura

Para avaliar a influência da adição de microrganismos na condição adaptada – cultura e do potencial hidrogeniônico na atividade de degradação de MCs totais e de inibição de *M. sp.* TAC 95, foram adicionados 1 mL de cultura de bactéria B9, bactéria láctica probiótica LPR (L1) e levedura PA (L1), seguidos de adição complementar de 1 mL de meios líquidos estéreis (Sakurai, MRS e YPD), com e sem ajuste do valor de pH para 8,0 (valor de referência estabelecido para o cultivo de cianobactérias em meio ASM-1), utilizando solução de NaOH 0,1N estéril, às culturas pré-condicionadas da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, seguidas de adição complementar de 27 mL de meio ASM-1 – Condições G e H (Figura 17).



Fonte Do Autor (2012)

5.5 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE DIFERENTES CEPAS DE MICRORGANISMOS EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS – MCs TOTAIS

O objetivo deste experimento foi selecionar entre as cepas de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, de bactérias lácticas probióticas, kefir de água (Tabela 3) e leveduras (Tabela 4), a(s) que apresentaram maior percentual de degradação de microcistinas - MCs totais.

▪ Preparação do extrato de microcistinas - MCs

Para preparação do extrato de MCs utilizou-se a cepa toxigênica de *Microcystis sp.* TAC 95. Esta cepa foi selecionada por caracterizar-se pela produção predominante de MC-LR em elevadas concentrações.

Primeiramente, a cepa foi cultivada em meio ASM-1 estéril por 20-30 dias em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ e aeração contínua. Em

seguida, as culturas foram centrifugadas a 1521 x g por 20 min para obtenção de biovolume. Estas foram congeladas a -20°C e submetidas a 3 séries de congelamento / descongelamento , liofilizadas, maceradas e ressuspensas em água ultrapura (Figura 18).

Em seguida o extrato foi filtrado em membrana de fibra de vidro com porosidade média de 0,2 µm Millipore e armazenado a -20°C.

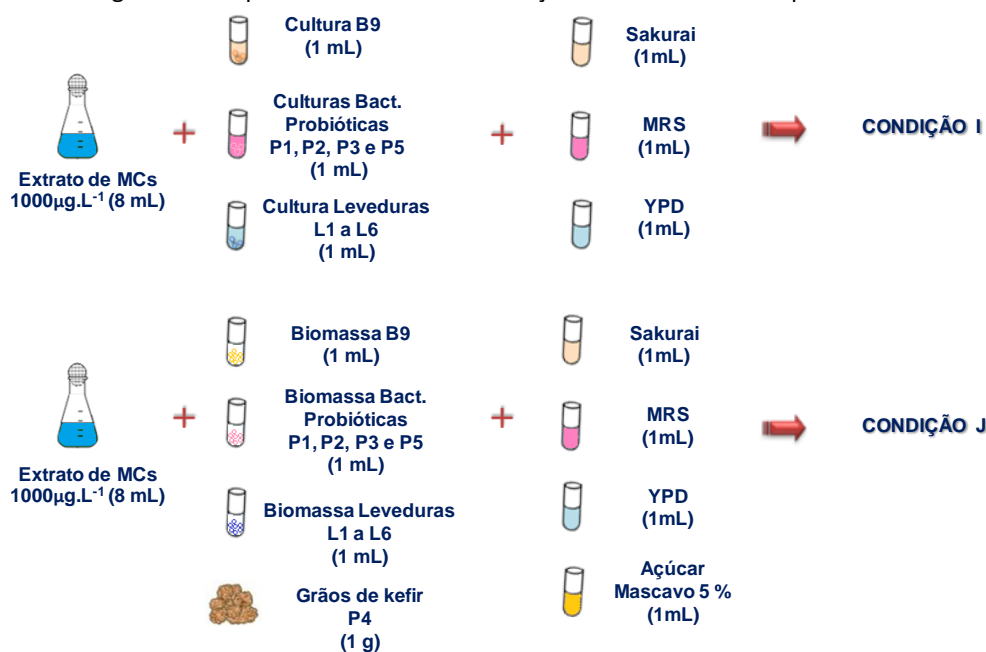


▪ Procedimento Típico do Experimento 3:

O experimento para avaliação prospectiva de diferentes cepas de microrganismos em relação à capacidade de degradação de MCs totais foi realizado utilizando-se a condição de teste selecionada no Experimento 2 (Condição I e J) em duplicata. Foram adicionados 8 mL de extrato de MCs e 1 mL dos microrganismos (bactéria B9, bactérias lácticas probióticas e leveduras) na forma de cultura (I) e biovolume (J) + 1 mL de meios líquidos específicos (Sakurai, MRS e YPD) em frascos de vidro com capacidade de 50 mL, de forma que a concentração final de MCs totais resultasse da ordem de 1000 µg.L⁻¹. Para o teste com o kefir, foi utilizado 1 g de kefir + 1 mL de meio açúcar mascavo 5 % (Figura 19).

Posteriormente, os extratos / misturas foram mantidos a 27°C com agitação de 100 opm. Nos tempos 0 e 96 h, foram retiradas amostras de 1 mL para análise de MCs totais por imunoenensaio ELISA, de acordo com o método apresentado no item 5.1.5.

Figura 19 - Esquema ilustrativo das condições de teste I e J do Experimento 3



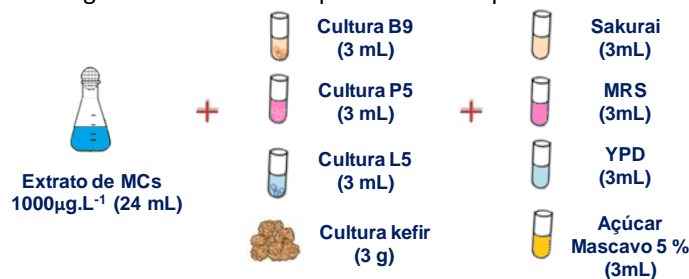
Fonte Do Autor (2012)

5.6 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MCS TOTAIS PARA OS MICRORGANISMOS SELECIONADOS

O Experimento 4 teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação de MCS totais ao longo do tempo para os microrganismos, adicionados na forma de cultura + 1 mL de meios líquidos específicos (Sakurai, MRS e YPD) (Condição I) selecionados no Experimento 3: cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* (B9), cepa de bactéria láctica probiótica La-5 (P5), grãos de kefir de água (mistura de bactérias láctica, acética e levedura) (P4) e cepa de levedura Vale do Ivaí (L5).

Primeiramente adicionou-se 24 mL do extrato de MCs (de forma que as concentrações de MCs resultassem da ordem de 1000 µg.L⁻¹) em frascos de vidro com capacidade de 50 mL. Para os diferentes extratos / misturas foram adicionados 3 mL de cultura de cada microrganismo testado (B9, P5 e L5), acrescidos de 3 mL de meio líquido específico (Sakurai, MRS e YPD). No teste com grãos de kefir (P4) foram adicionados 3 g de grãos acrescidos de 3 mL de solução de açúcar mascavo 5 % (Figura 20).

Figura 20 - Desenho esquemático do Experimento 4



Fonte Do Autor (2012)

Posteriormente, os extratos / misturas foram mantidos a 27°C com agitação de 100 opm. Nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, foram retiradas amostras de 1 mL para análise de MCs totais por imunoenensaio ELISA, de acordo com o método apresentado no item 5.1.5. A contagem dos microrganismos testados foi realizada com amostras retiradas nos tempos 0 e 96 h de acordo com os itens 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3.

Em função dos resultados de elevada eficiência obtidos para a cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* (B9), o Experimento 4 foi repetido para a bactéria B9 com as concentrações de 2000, 3000, 4000 e 5000 µg.L⁻¹ de MCs totais.

5.7 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CIANOBACTÉRIAS (ATIVIDADE ANTI-CIANOBACTÉRIA) PELA BACTÉRIA *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9

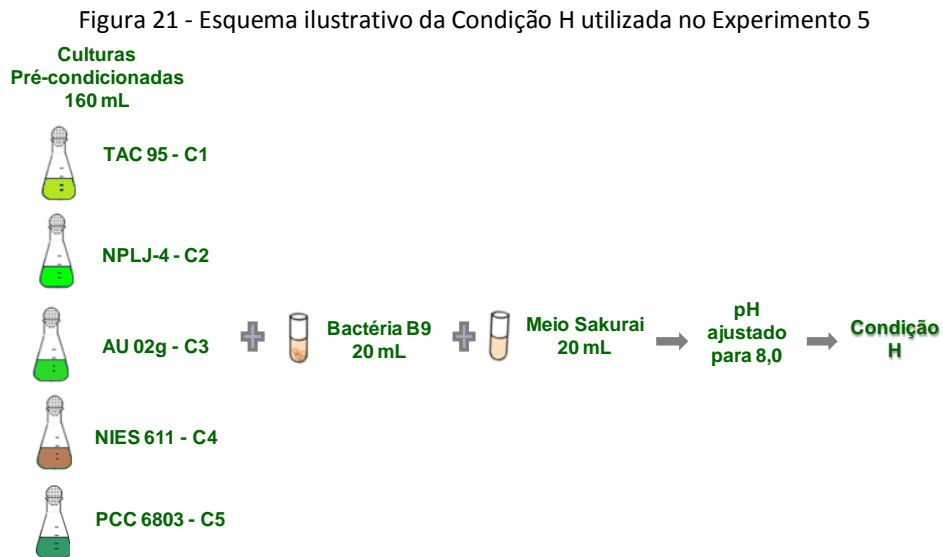
O Experimento 5 teve como objetivo avaliar o potencial de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 selecionada nos experimentos anteriores.

As cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5 foram: *Microcystis* sp. TAC 95, *Microcystis* spp. NPLJ-4, *Anabaena ucrainica* AU 02g, *Phormidium tenue* NIES 611 e *Synechocystis* PCC 6803, codificadas de C1 a C5 de acordo com a Tabela 2.

O experimento foi efetuado em triplicata utilizando a condição (H) como mostra a Tabela 5. Primeiramente foram preparadas culturas das diferentes cepas de cianobactérias adicionando-se um inóculo de 80 mL em 400 mL de meio ASM-1 que foram mantidos a 25 °C sob iluminação (20 µE. m⁻².s⁻¹), fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e aeração contínua por 7 dias. Após este período 20 mL das culturas foram adicionadas a 140 mL de meio ASM-1 e pré-condicionadas por 3 dias a 27°C sob iluminação (20 µE. m⁻².s⁻¹), fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e agitação de 100 opm.

A obtenção da cultura de bactéria B9 foi conforme método descrito no item 5.2.2 e cultivadas em 400 mL de meio líquido Sakurai (extrato de levedura 0,1 %; glicose 0,05 % e peptona de caseína 0,2 %) a 30°C por 48-72 h.

Após o pré-condicionamento das culturas de cianobactérias adicionou-se 20 mL da cultura de bactéria B9 e 20 mL de meio Sakurai líquido como mostra a Figura 21.



Fonte Do Autor (2012)

A avaliação da atividade anti-cianobactéria, foi efetuada através de amostras retiradas nos tempos 0, 96, 168 e 336 h para contagem celular e análise de clorofila-a das culturas / misturas, segundo métodos apresentados nos itens 5.1.1 e 5.1.4. Para verificar o crescimento da bactéria B9 foi efetuada a contagem nos tempos 0 e 96 h como mostrado no item 5.1.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussão divididos por experimento.

6.1 EXPERIMENTO 1: CRESCIMENTO POPULACIONAL DA CEPA TOXIGÊNICA DE *Microcystis* sp. TAC 95

Na Tabela 6 e no Gráfico 1, estão representados os valores de contagem celular, clorofila-a, feofitina-a, MCs totais e extracelulares da curva de crescimento da cepa toxigênica *Microcystis* sp. TAC 95 monitorada até o 57º dia. Os valores de contagem celular foram acompanhados de acréscimos proporcionais da concentração de clorofila-a e MCs totais em função do tempo e variaram entre, $1,8 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ (1º dia), $4,0 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ (32º dia) e $5,6 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ (57º dia). Os valores das concentrações de clorofila-a resultaram entre 280,7 µg.L⁻¹ (1º dia) e 3528,4 µg.L⁻¹ (20º dia), os de feofitina-a entre 320,8 µg.L⁻¹ (1º dia) e 2579,4 µg.L⁻¹ (32º dia) e os de MCs totais entre 134,3 µg.L⁻¹ (1º dia) e 3170,0 µg.L⁻¹ (25º dia).

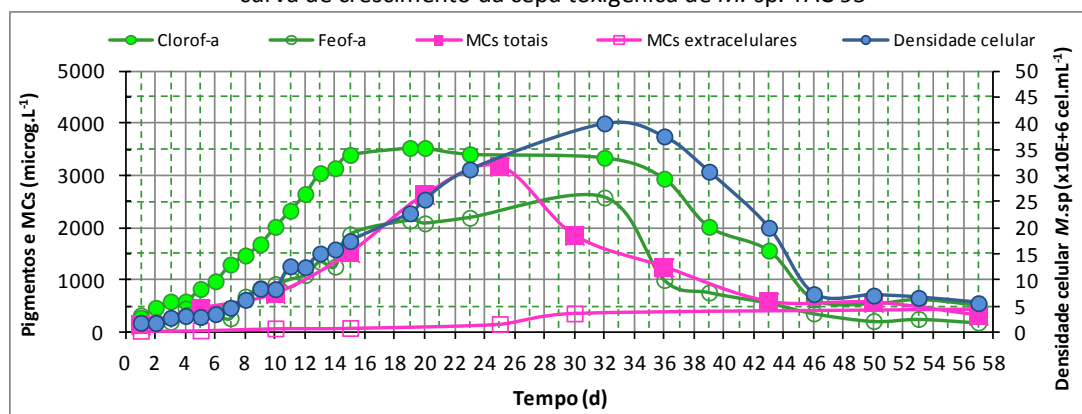
A produção de microcistinas – MCs por uma cultura de cianobactérias é diretamente proporcional ao seu crescimento e aumenta durante a fase exponencial de crescimento, sendo mais elevada no final da mesma. Segundo Sivonen & Jones, (1999), à medida que as células entram na fase estacionária de crescimento, ocorre um aumento da fração dissolvida extracelular, devido ao aumento da quantidade de células mortas. Mesmo na fase exponencial de crescimento das células em uma cultura, uma pequena porcentagem de células de determinada população pode morrer e entrar em lise (liberando toxinas intracelulares), apesar de se verificar um crescimento geral positivo da população. Estudos laboratoriais determinaram que 10 – 20 % do total de toxinas (microcistinas, nodularinas e saxitoxinas) em culturas saudáveis na fase exponencial de crescimento são extracelulares (SIVONEN & JONES, 1999).

A liberação para a água na forma extracelular dissolvida ocorre mais, se não exclusivamente, durante o final da fase estacionária ou morte ou lise das células, do que por excreção contínua, ou seja, até a senescência de um bloom a maioria das toxinas mantém-se na forma intracelular (SIVONEN & JONES, 1999).

Tabela 6 - Valores absolutos de clorofila-a, feofitina-a, microcistinas totais, microcistinas extracelulares e contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 monitorado durante 57 dias

Tempo (Dia)	Concentração de				Contagem celular (x10E+6 cel.mL ⁻¹)
	Clorofila-a (µg.L ⁻¹)	Feofitina-a (µg.L ⁻¹)	MCs totais (µg.L ⁻¹)	MCs extracelulares (µg.L ⁻¹)	
1	280,7	320,8	134,3	27,4	1,8
2	467,8	200,5			1,8
3	588,1	200,5			2,8
4	588,1	454,4			3,1
5	828,6	401,0	445,9	34,9	2,9
6	975,6	374,2			3,5
7	1296,4	267,3			4,7
8	1470,2	681,6			6,2
9	1684,0	842,0			8,3
10	2018,1	922,2	730,2	73,3	8,3
11	2325,5	1015,7			12,6
12	2646,3	1095,9			12,5
13	3047,2	1349,9			15,1
14	3140,8	1256,3			15,9
15	3394,7	1871,1	1515,9	81,5	17,5
19	3528,4	2138,4			22,8
20	3528,4	2084,9	2628,0		25,4
23	3408,1	2191,9			31,2
25			3170,0	156,9	
30			1848,5	360,1	
32	3341,3	2579,4			40,0
36	2940,3	1000,0	1241,4		37,5
39	2018,1	761,8			30,8
43	1563,7	561,3	579,1		20,0
46	628,2	360,9			7,3
50	548,0	213,8	564,7		7,0
53	628,2	253,9			6,6
57	521,2	187,1	316,2	439,8	5,6

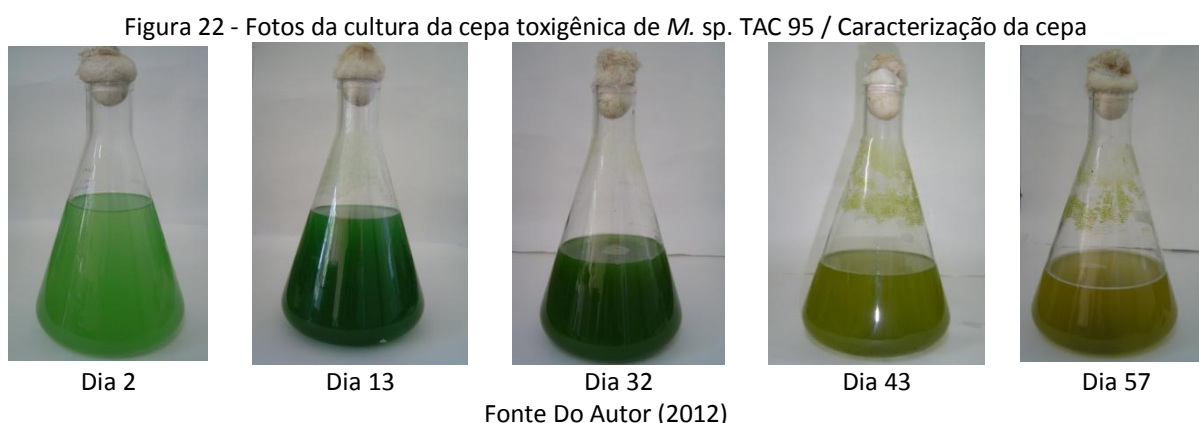
Gráfico 1 - Contagem celular, concentração de clorofila-a e feofitina-a e microcistinas totais e extracelulares da curva de crescimento da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95



Fonte Do Autor (2012)

Com os resultados de clorofila-a, contagem celular e concentração de MCs, foi possível estabelecer as fases de crescimento que caracterizam a cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para as

condições empregadas. A fase de adaptação ocorreu entre 0 e 6 dias (lag). Após 6 dias de fase Lag (adaptação), iniciou-se a fase exponencial atingindo o estágio de crescimento em 20 e 30 dias. Após o 30º dia, é iniciada a fase de senescência ou morte celular. Observa-se na Figura 22, que inicialmente a cultura apresentou coloração esverdeada, que se intensificou gradualmente até o 32º dia atingindo um tom esverdeado mais intenso, correspondente aos valores máximos de contagem celular e de clorofila-a e posteriormente, um tom verde amarelado devido à degradação de clorofila-a.



6.2 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE A SEREM EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS – MCs TOTAIS E DE INIBIÇÃO DE CIANOACTÉRIAS POR MICRORGANISMOS

A Tabela 7 e os Gráfico 2, Gráfico 3 e Gráfico 4 mostram a média de três repetições dos valores de contagem celular da cepa toxigênica de *Microcystis sp.* TAC 95, das concentrações de clorofila-a e de MCs totais nas culturas / misturas nos tempos 0 e 96 h, utilizando-se a cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 para as condições de teste: controle (A); *M. sp.* TAC 95 com adição de meio Sakurai (B); *M. sp.* TAC 95 com adição de 0,1 mL de biovolume de B9 (B9-C); *M. sp.* TAC 95 com adição de 1 mL de biovolume de B9 (B9-D); *M. sp.* TAC 95 com adição de 0,1 mL de biovolume adicionados de 1 mL de meio Sakurai (B9-E); *M. sp.* TAC 95 com adição de 1 mL de biovolume de B9 adicionados de 1 mL de meio Sakurai (B9-F); *M. sp.* TAC 95 adicionado de 1 mL da cultura de B9 e 1 mL de meio Sakurai (B9-G) e *M. sp.* TAC 95 adicionado de 1 mL da cultura de B9 e 1 mL de meio Sakurai com ajuste de pH para 8,0 (B9-H).

A Tabela 7 mostra os valores absolutos [% de redução] de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste empregadas com a cepa B9. Foi possível observar que a adição de biovolume pura de B9 em quantidades diferenciadas e de seu meio específico Sakurai não ocasionaram diferenças significativas nos valores de pH da mistura.

Tabela 7 - Valores absolutos [% de redução] de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 antes e após 96 horas

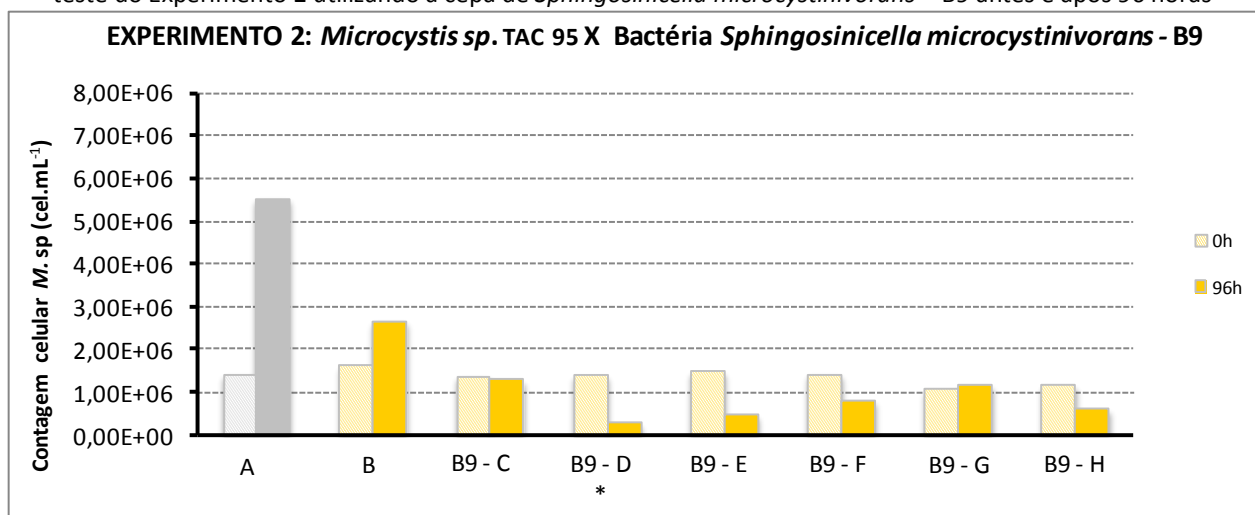
Condição de teste	pH	Contagem de <i>M. sp.</i> (cel.mL ⁻¹)		Clorofila-a (µg. L ⁻¹)		MCs totais (µg. L ⁻¹)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
A - Controle	7,7	1,4x10 ⁶	5,6x10 ⁶	245	637	313	607
B	7,8	1,6x10 ⁶	2,7x10 ⁶ [52%] ^a	214	414[35%] ^a	313	255[18%] ^b
B9-C	7,8	1,4x10 ⁶	1,3x10 ⁶ [77%] ^a	258	241[62%] ^a	313	148[53%] ^b
B9-D*	7,5	1,4x10 ⁶	3,0x10 ⁵ [95%] ^a	245	85[87%] ^a	313	315[0%] ^b
B9-E	7,7	1,5x10 ⁶	4,8x10 ⁵ [91%] ^a	249	129[80%] ^a	190	163[14%] ^b
B9-F	7,3	1,4x10 ⁶	8,2x10 ⁵ [85%] ^a	200	200[68%] ^a	159	128[20%] ^b
B9-G	7,7	1,1x10 ⁶	1,2x10 ⁶ [79%] ^a	200	174[72%] ^a	215	132[39%] ^b
B9-H	8,0	1,2x10 ⁶	6,2x10 ⁵ [89%] ^a	214	127[80%] ^a	241	52[79%] ^b

(a): porcentagem de inibição calculada em relação aos valores de contagem celular e concentração de clorofila-a no controle negativo para o tempo de 96 h;

(b): porcentagem de degradação calculada em relação à concentração de MCs totais no tempo de 0 h para cada condição de teste;

* : Condição de teste invalidada devido à ocorrência de contaminação.

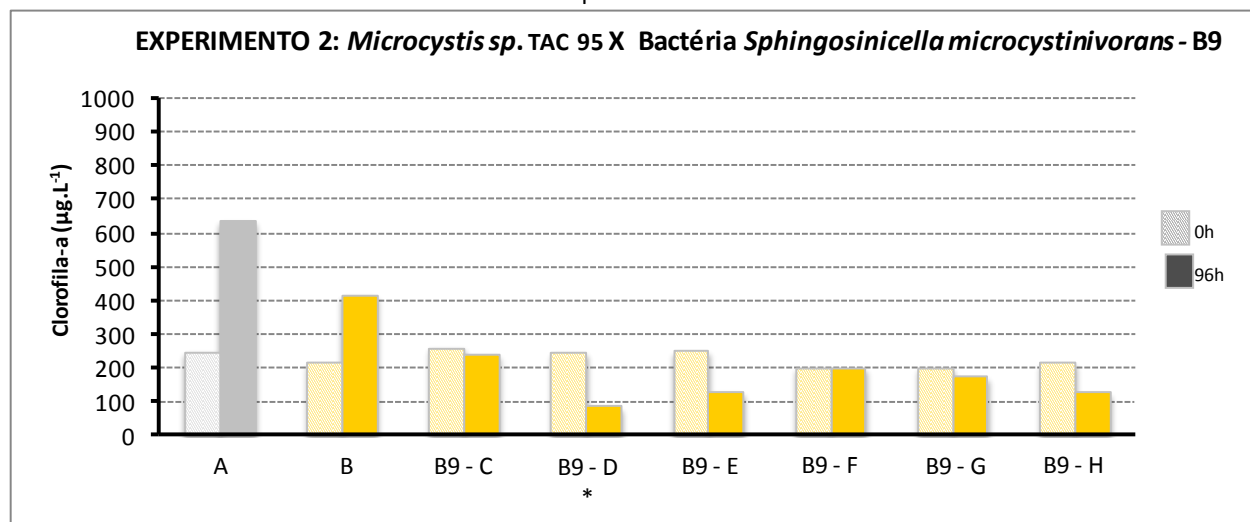
Gráfico 2 - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 antes e após 96 horas



* : Condição de teste invalidada devido a ocorrência de contaminação

Fonte Do Autor (2012)

Gráfico 3 - Valores médios de concentração de clorofila-a de cultura da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 antes e após 96 horas



* : Condição de teste invalidada devido a ocorrência de contaminação

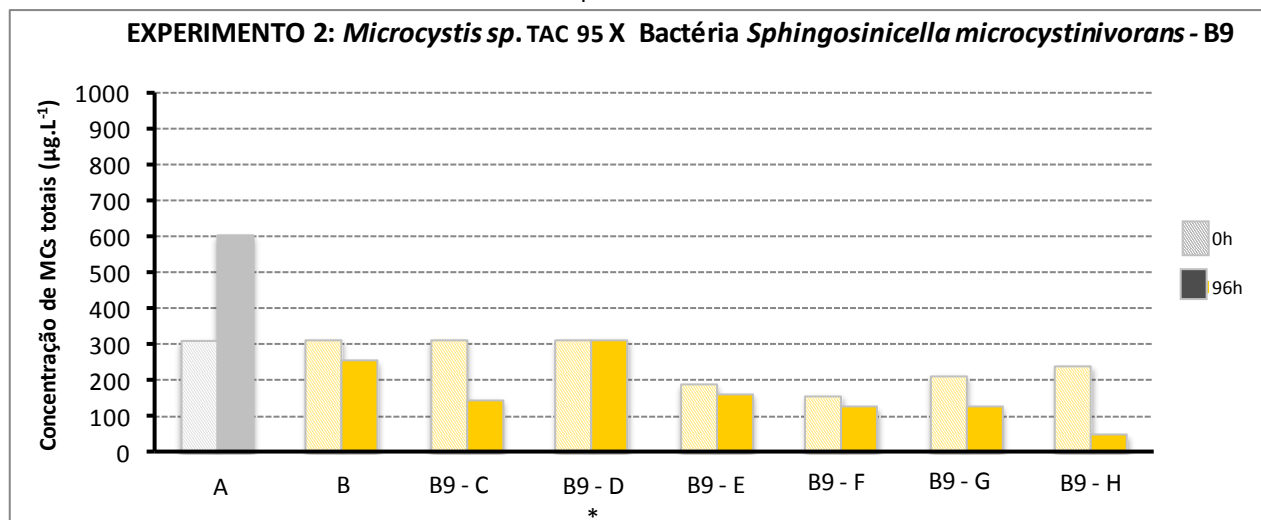
Fonte Do Autor (2012)

Em relação aos resultados de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* e de concentração de clorofila-a foi observado que após 96 h, independentemente das condições testadas, a adição da cepa B9 (condições B9-C e B9-H) apresentou atividade de inibição no crescimento de *M. sp. TAC 95*, tendo resultado em valores absolutos de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* e de clorofila-a sempre inferiores ou equivalentes aos valores correspondentes aos de 0 h para cada condição de teste.

Comparando-se os resultados de contagem celular de *M. sp. TAC 95* e de concentração de clorofila-a em relação ao controle negativo após 96 h ($5,6 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ e 637 µg.L⁻¹ de clorofila-a), as porcentagens de inibição foram superiores a 77 e 62 % respectivamente, o que comprova o potencial de atividade anti-cianobactéria / *M. sp. TAC 95* da cepa de bactéria B9.

Os resultados do teste de atividade de degradação de MCs totais utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, a qual apresenta capacidade comprovada de degradação de MCs estão apresentados na Gráfico 4.

Gráfico 4 - Valores médios de concentração residual de MCs totais da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 antes e após 96 horas



* : Condição de teste invalidada devido a ocorrência de contaminação

Fonte Do Autor (2012)

Como a atividade anti-cianobactéria / *M. sp. TAC 95* da cepa B9 foi positiva, a variação da densidade celular de *M. sp. TAC 95* resultou consequentemente, em concentrações diferenciadas de MCs totais. Assim, a análise de degradação de MCs totais para as condições experimentais testadas, foi realizada em relação à concentração de MCs totais no tempo de 0 h para cada condição de teste.

Na condição experimental A – Controle pode-se observar que após 96 h a concentração de MCs totais aumentou para valores da ordem de $600 \mu\text{g.L}^{-1}$ o que está de acordo com os valores obtidos na curva de crescimento da Gráfico 1, devido ao aumento da concentração de MCs totais após 96 h de incubação.

As concentrações residuais de MCs totais após 96 h de incubação para as condições de teste foram de $255 \mu\text{g L}^{-1}$ com a adição do meio específico Sakurai (B9-B); $52 \mu\text{g L}^{-1}$ com a adição de 1 mL de B9 + Sakurai com ajuste de pH 8,0 (B9-H); e entre $132\text{-}315 \mu\text{g L}^{-1}$ para as demais condições. Esses valores correspondem às porcentagens de degradação de 18 % com a adição do meio específico Sakurai (B9-B); 79 % com a adição de 1 mL de B9 + Sakurai com ajuste de pH 8,0 (B9-H); e entre 14 a 53 % para as demais condições.

Comparando-se os valores de contagem celular de *M. sp. TAC 95*, de clorofila-a e das concentrações de MCs totais iniciais e finais (após 96 h), foi possível observar que a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 apresentou além de atividade anti-cianobactéria / *Microcystis sp. TAC 95* atividade de degradação de MCs totais. Além disso, a adição de diferentes proporções de biovolume de B9 (B9-C a B9-F) não resultaram em diferenças significativas nas

porcentagens de inibição de *M. sp. TAC 95* mas a adição de cultura de B9 (B9-H) resultou na maior porcentagem de degradação de MCs totais. Infelizmente neste experimento não foi possível efetuar a contagem de bactéria B9.

A Tabela 8 e os Gráfico 5, Gráfico 6 e Gráfico 7 mostram a média de três repetições dos valores de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95*, das concentrações de clorofila-a e de MCs totais nas culturas / misturas nos tempos 0 e 96 h, utilizando-se a cultura mista de bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) para as condições de teste: controle (A); *M. sp. TAC 95* com adição de meio MRS (B); *M. sp. TAC 95* com adição de 0,1 mL de biovolume de LPR (P1-C); *M. sp. TAC 95* com adição de 0,7 mL de biovolume de LPR (P1-D); *M. sp. TAC 95* com adição de 0,1 mL de biovolume adicionados de 1 mL de meio MRS (P1-E); *M. sp. TAC 95* com adição de 1 mL de biovolume de LPR adicionados de 1 mL de meio MRS (P1-F); *M. sp. TAC 95* adicionado de 1 mL da cultura de LPR e 1 mL de meio MRS (P1-G) e *M. sp. TAC 95* adicionado de 1 mL da cultura de LPR e 1 mL de meio MRS com ajuste de pH para 8,0 (P1-H).

Na Tabela 8 estão apresentados os valores absolutos [% de redução] de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95*, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste empregadas com a cultura probiótica *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) antes e após 96 h.

Com exceção da condição de teste P1-H e diferentemente do observado nas condições de teste utilizando a cepa B9, independente da proporção de biovolume ou cultura houve uma redução substancial nos valores de pH após a adição das bactérias lácticas probióticas, provavelmente, devido à produção de ácidos orgânicos (ácido láctico). Em função deste fato não foi possível avaliar o potencial de inibição da cultura probiótica *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) para as condições testadas (P1-C a P1-G). No entanto a correção do pH realizada na condição P1-H possibilitou a constatação de 55 e 59 % de inibição considerando a contagem celular *M. sp. TAC 95* e clorofila-a respectivamente.

Tabela 8 - Valores absolutos [% de redução] contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) antes e após 96 horas

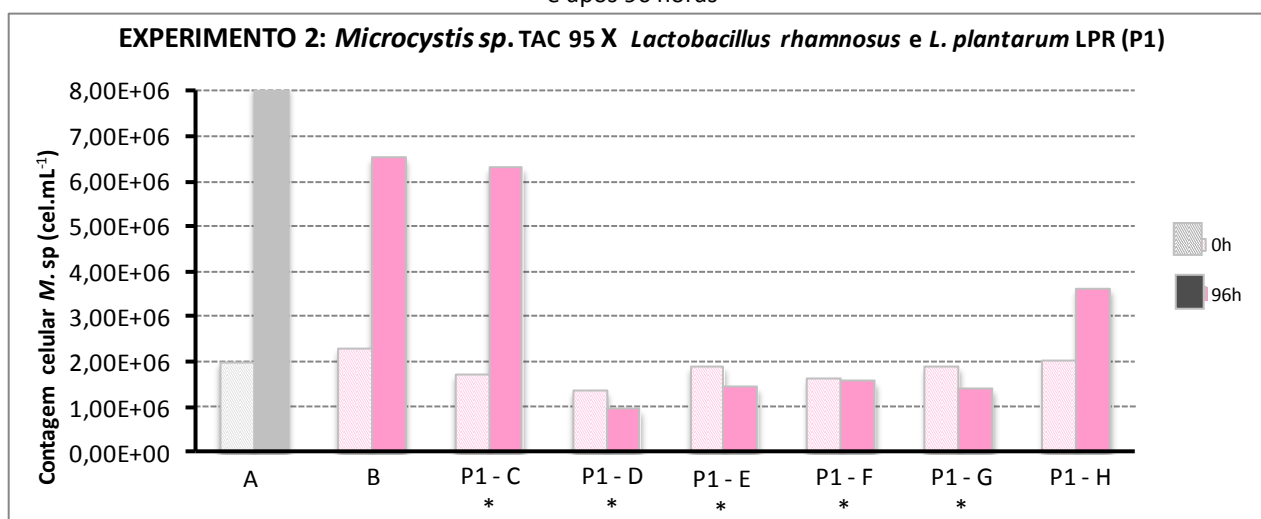
Condição de teste	pH	Contagem de <i>M. sp.</i> (cel.mL ⁻¹)		Clorofila-a (µg. L ⁻¹)		MCs totais (µg. L ⁻¹)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
A - Controle	6,9	2,0x10 ⁶	8,1x10 ⁶	343	660	217	826
B	7,1	2,3x10 ⁶	6,5x10 ⁶	325	677	217	656[-] ^b
P1-C*	6,0	1,7x10 ⁶	6,3x10 ⁶	281	508	217	600[-] ^b
P1-D*	4,9	1,4x10 ⁶	9,5x10 ⁵	178	45	186	148[21%] ^b
P1-E*	5,0	1,9x10 ⁶	1,4x10 ⁶	227	33	215	179[17%] ^b
P1-F*	4,2	1,6x10 ⁶	1,6x10 ⁶	151	71	185	198[-] ^b
P1-G*	5,2	1,9x10 ⁶	1,4x10 ⁶	218	26	206	151[27%] ^b
P1-H	8,0	2,0x10 ⁶	3,6x10 ⁶	236	272	246	288[0%] ^b

(b): porcentagem de degradação calculada em relação à concentração de MCs totais para o tempo de 0 h;

(-): sem degradação de MCs

* : Condição de teste invalidada para a atividade anti-cianobactéria (análises de contagem celular e clorofila-a) devido a diminuição do pH.

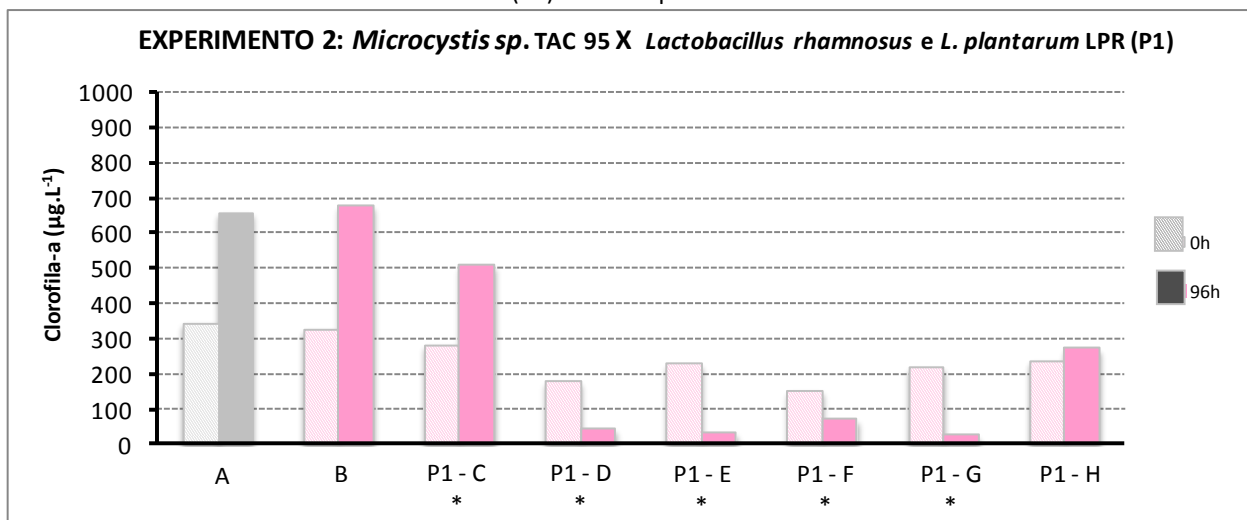
Gráfico 5 - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) antes e após 96 horas



* : Condição de teste invalidada para a atividade anti-cianobactéria (análises de contagem celular e clorofila-a) devido a diminuição do pH.

Fonte Do Autor (2012)

Gráfico 6 - Valores médios de concentração de clorofila-a cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* – LPR (P1) antes e após 96 horas

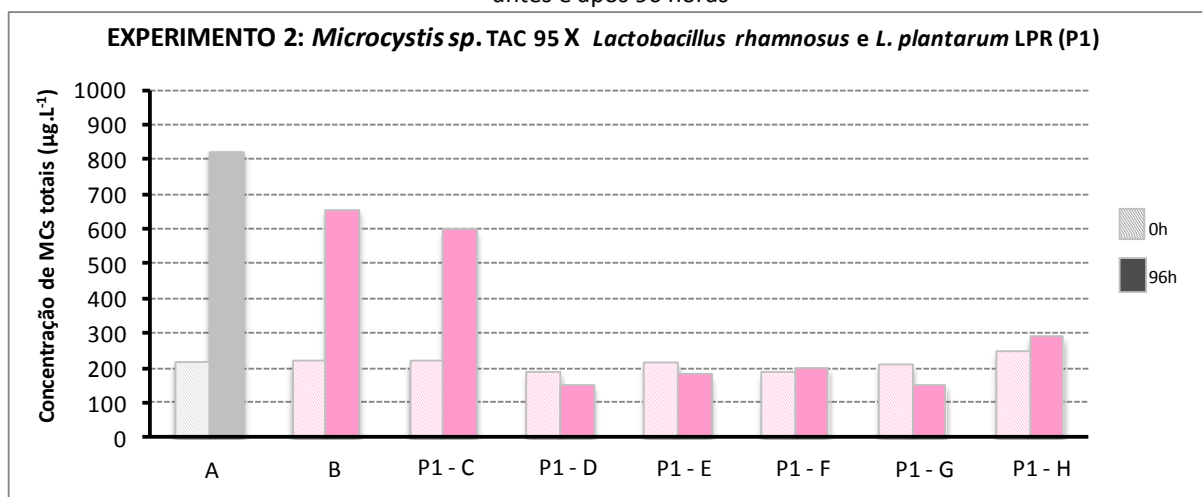


* : Condição de teste invalidada para a atividade anti-cianobactéria (análises de contagem celular e clorofila-a) devido a diminuição do pH.

Fonte Do Autor (2012)

Os resultados de atividade de degradação de MCs totais pelas bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* – LPR (P1) estão apresentados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Valores médios de concentração de MCs totais da cepa *M. sp. TAC 95* nas diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cultura mista probiótica *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* (LPR) (P1) antes e após 96 horas



Fonte Do Autor (2012)

A degradação de MCs totais por *Lactobacillus plantarum e rhamnosus* – LPR (P1) foi avaliada em relação à concentração de MCs totais no tempo de 0 h para cada condição de teste.

Nybon *et al.*, (2007), testaram a capacidade de 11 linhagens de bactérias lácticas probióticas para degradar MC-LR (extraída de *Anabaena sp.* e purificada por HPLC) em diferentes condições

para obtenção de máxima degradação. Os resultados mostraram que quando as células se encontravam ativas e cultivadas previamente em Caldo MRS, a remoção era significativamente maior após 24 h de incubação. O maior percentual de remoção de MC-LR foi de 58,1 % observada com *B. lactis* Bb12 (concentração da toxina de 100 µg.L⁻¹). Estes autores também observaram que a remoção de MCs totais é proporcional à quantidade de células sendo maior quanto maior a concentração bacteriana. Além disso, sugeriram que o mecanismo de degradação é metabolicamente ativo.

Contrariando os resultados obtidos por Nybon *et al.*, (2007), a adição de diferentes proporções de biovolume de LPR (P1) (P1-C a P1-F) bem como de cultura (P19-G e P1-H) não resultaram em diferenças significativas de porcentagens de degradação de MCs totais e foram limitadas variando entre 17 e 27 %.

Em (2008), Nybon *et al.*, avaliaram a degradação de outros tipos de MCs por bactérias lácticas probióticas e observaram que o processo de degradação é dependente do tipo de toxina e espécie de bactéria láctica probiótica utilizada (concentração da toxina de 100 µg.L⁻¹). Para MC-LR a maior degradação foi observada com *L. rhamnosus* GG (60,3 %), para MC-RR foi *L. rhamnosus* LC-705 (62,8 %) e para MC-LF, *L. rhamnosus* LC-705 (77,4 %). Adicionalmente, foram realizados estudos misturando as diferentes espécies de bactérias lácticas probióticas, tendo sido observado um aumento para 80 % de degradação.

Para verificar a viabilidade da bactéria láctica probiótica durante o período de incubação com a cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, bem como estimar a densidade de microrganismos utilizada nos testes, o número de células viáveis de LPR foi determinado nos tempos 0 e 96 h. Inicialmente as culturas que foram inoculadas com 1 mL de LPR com MRS continham 6x10⁷ UFC mL⁻¹, as inoculadas com 0,1 mL de biovolume centrifugada, 2x10⁸ UFC mL⁻¹ e as inoculadas com 0,7 mL, continham 2x10⁹ UFC mL⁻¹. Ao final de 96 h, as condições de teste que não receberam adição de meio MRS complementar, se mantiveram nessa concentração. Em contrapartida os que receberam, tiveram um aumento de cerca de 1 ciclo log no número de unidades formadoras de colônias o que comprova a necessidade de adição de meio específico para manutenção da atividade celular.

A Tabela 9 e os Gráfico 8, Gráfico 9 e Gráfico 10 mostram a média de três repetições dos valores de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95, das concentrações de clorofila-a e de MCs totais nas culturas / misturas nos tempos 0 e 96 h, utilizando-se a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* - PA (L1) para as condições de teste : controle (A); *M. sp.* TAC 95 com adição de meio YPD (B); *M. sp.* TAC 95 com adição de 0,1 mL de biovolume de PA (L1-C); *M. sp.* TAC 95 com adição de 0,75 mL de biovolume de PA (L1-D); *M. sp.* TAC 95 com adição de 0,1 mL de biovolume de PA adicionados de 1 mL de meio YPD (L1-E); *M. sp.* TAC 95 com

adição de 0,75 mL de biovolume de PA adicionados de 1 mL de meio YPD (L1-F); *M. sp. TAC 95* adicionado de 1 mL da cultura de PA e 1 mL de meio YPD (L1-G) e *M. sp. TAC 95* adicionado de 1 mL da cultura de PA e 1 mL de meio YPD com ajuste de pH para 8,0 (L1-H).

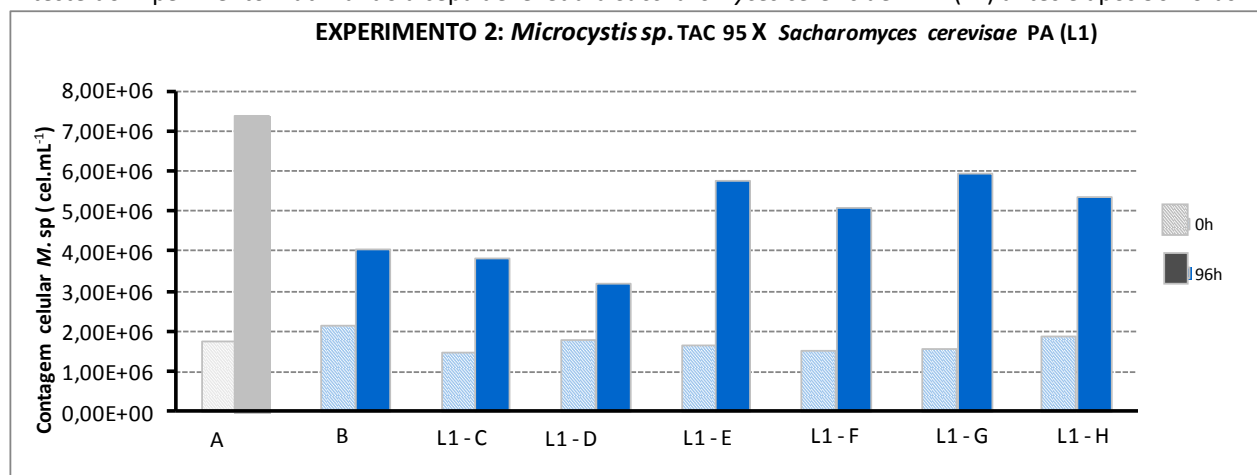
Na Tabela 9 estão apresentados os valores absolutos [% de redução] contagem de *M. sp. TAC 95*, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste empregadas com a cepa de levedura PA (L1) antes e após 96 h.

Tabela 9 - Valores absolutos [% de redução] contagem de *M. sp. TAC 95*, clorofila-a e MCs totais para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* - PA (L1) antes e após 96 horas

Condição de teste	pH	Contagem de <i>M. sp.</i> (cel.mL ⁻¹)		Clorofila-a (µg.L ⁻¹)		MCs totais (µg.L ⁻¹)	
		0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
A - Controle	6,6	1,8x10 ⁶	7,4x10 ⁶	258	1056	234	649
B	7,03	2,1x10 ⁶	4,1x10 ⁶ [45%] ^a	289	601[43%] ^a	234	235
L1-C	7,05	1,5x10 ⁶	3,8x10 ⁶ [48%] ^a	218	699[34%] ^a	234	481
L1-D	6,6	1,8x10 ⁶	3,2x10 ⁶ [57%] ^a	147	450[57%] ^a	177	255
L1-E	6,4	1,6x10 ⁶	5,8x10 ⁶ [22%] ^a	102	699[34%] ^a	177	244
L1-F	5,8	1,5x10 ⁶	5,1x10 ⁶ [31%] ^a	44	53[95%] ^a	238	281
L1-G	6,5	1,6x10 ⁶	6x10 ⁶ [19%] ^a	200	824[22%] ^a	272	386
L1-H	8,1	1,9x10 ⁶	5,4x10 ⁶ [27%] ^a	204	731[31%] ^a	188	357

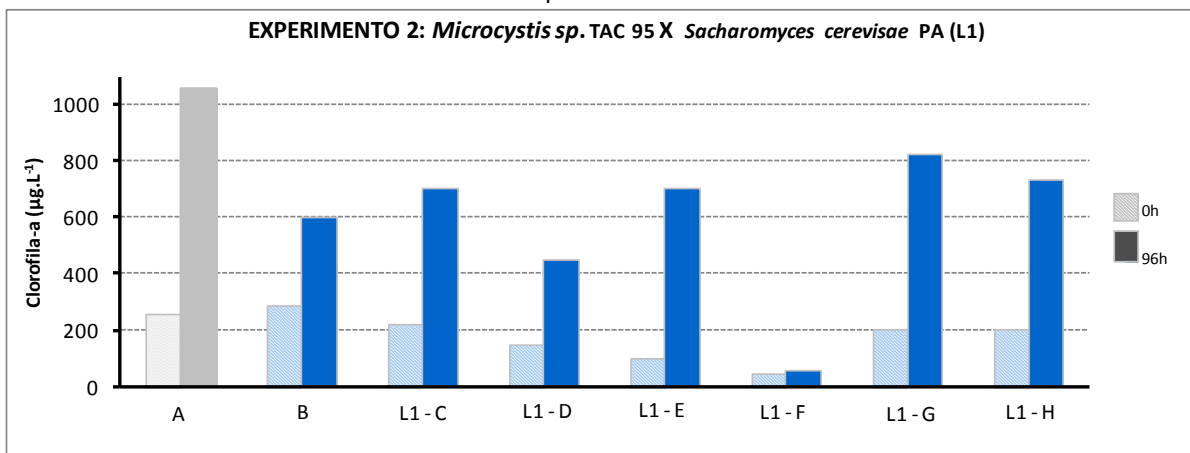
(a): porcentagem de inibição calculada em relação aos valores de contagem celular e concentração de clorofila-a do controle negativo para o tempo de 96 h;

Gráfico 8 - Valores médios de contagem celular da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) antes e após 96 horas



Fonte Do Autor (2012)

Gráfico 9 - Valores médios da concentração de clorofila-a da cepa toxigênica de *M. sp.* TAC 95 para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) antes e após 96 horas



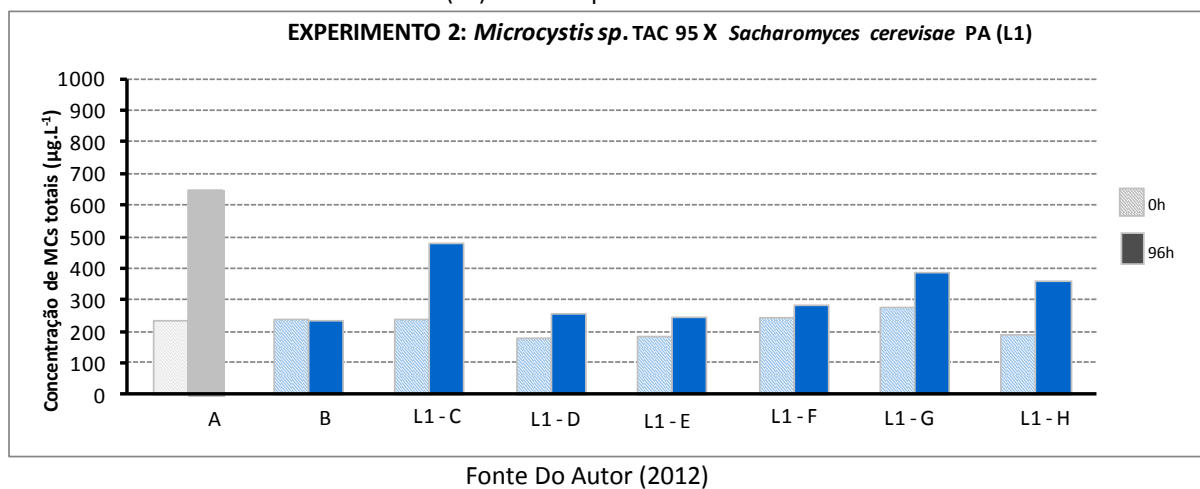
Fonte Do Autor (2012)

Comparando-se os resultados de contagem celular de *M. sp.* TAC 95 e de concentração de clorofila-a em relação ao controle negativo após 96 h ($7,4 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ e 1056 µg.L⁻¹ de clorofila-a), para todas as condições de teste empregadas com a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1), pode-se observar que, as porcentagens de inibição encontraram se entre 19 e 57 % para contagem celular e 22 a 95 % para clorofila-a. Porém as maiores inibições ocorreram nas condições L1-D e L1-F com 57 e 31 % para contagem e 57 e 95 % para clorofila-a respectivamente. Esta maior porcentagem pode estar relacionada à maiores quantidades de microrganismos utilizadas nessas condições de teste (Tabela 9).

A adição de biovolume de *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) ou meio específico YPD resultaram na redução dos valores de pH com variações entre 5,8 e 7,0 (Tabela 9), valores inferiores aos obtidos no experimento em que foi utilizada a cepa B9 (Tabela 7).

Os valores médios das concentrações residuais de MCs totais utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) estão representados no Gráfico 10.

Gráfico 10 - Valores médios de concentração residual de MCs totais da cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95* para diferentes condições de teste do Experimento 2 utilizando a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) antes e após 96 horas



Em todas as condições testadas pode-se observar que como a densidade de *M. sp. TAC 95* aumentou após 96 h não houve degradação de MCs totais, pelo contrário a concentração de MCs totais foi aumentada após 96 h como pode ser observado no Gráfico 10.

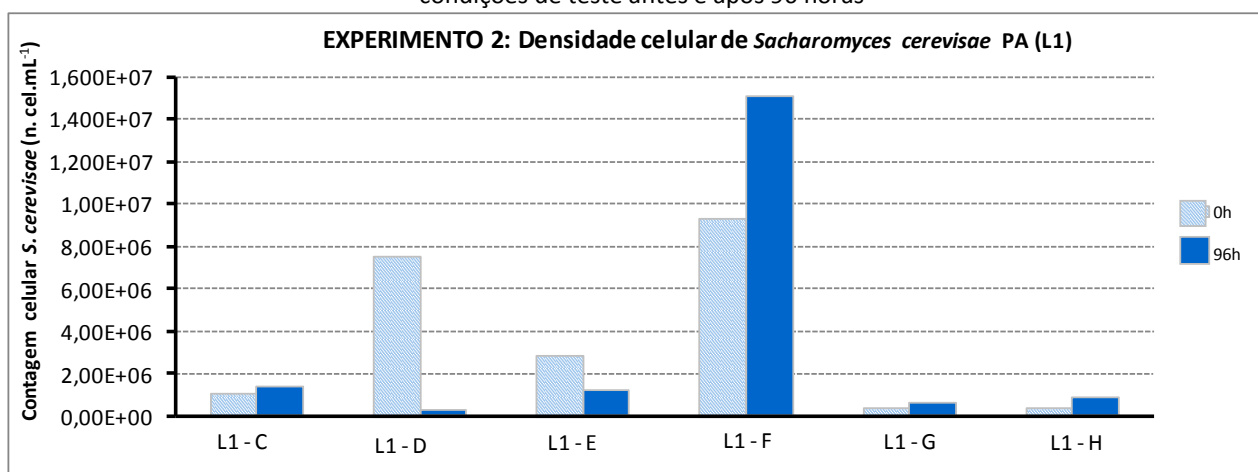
Comparando os valores da contagem de *M. sp. TAC 95*, e das concentrações de clorofila-a e de MCs totais iniciais e finais (após 96 h), foi possível constatar que a cepa de levedura *Sacharomyces cerevisiae* - PA (L1) apresentou atividade anti-cianobactéria / *M. sp. TAC 95* porém, não apresentou atividade de degradação de MCs totais.

Para verificar a viabilidade das leveduras durante o período de incubação com a cepa toxigênica de *M. sp. TAC 95*, bem como estimar a densidade de microrganismos utilizada nos testes, o número de células de leveduras foi determinado nos tempos 0 e 96 h para todas as condições experimentais (Gráfico 11).

O Gráfico 11 mostra a média de três repetições da contagem celular da cepa de levedura *Sacharomyces cerevisiae* - PA nos tempos 0 e 96 h, com os tratamentos L1-C, L1-D, L1-E, L1-F, L1-G e L1-H.

Inicialmente as culturas que foram inoculadas com 1 mL de levedura PA (L1) com YPD (L1-G) continham $3,7 \times 10^5$ cel.mL⁻¹, as inoculadas com 0,1 mL de biovolume centrifugada (L1-C), $1,1 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ e as inoculadas com 0,75 mL (L1-D), continham $7,6 \times 10^6$ cel.mL⁻¹. Os resultados mostraram que a contagem celular aumentou somente para a condição L1-F indicando a necessidade de adição complementar de meio YPD para manutenção do crescimento celular e possível atividade anti-cianobactéria ou de degradação de MCs totais.

Gráfico 11 - Valores médios da contagem celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) para diferentes condições de teste antes e após 96 horas



Fonte Do Autor (2012)

De forma geral, pôde-se constatar que:

- A adição de diferentes proporções de biovolume de B9, P1 e L1 (Condições de teste C a F) bem como de cultura (microrganismos adaptados) (G e H) não resultaram em diferenças significativas de porcentagens de inibição de *M. sp. TAC 95*, bem como de degradação de MCs totais;
- A verificação da viabilidade das cepas de bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1) e de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1) indicaram a necessidade de adição dos respectivos meios específicos para manutenção da atividade celular no período de 96 h;
- Em relação à cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9:

Considerando os resultados de contagem celular de *M. sp. TAC 95* e de concentração de clorofila-a em relação ao controle negativo após 96 h, as porcentagens de inibição da cepa de bactéria B9 foram superiores a 77 e 62 % respectivamente, o que comprova seu potencial de atividade anti-cianobactéria / *M. sp. TAC 95*;

A concentração mínima residual de MCs totais após 96 h de incubação foi de 52 $\mu\text{g L}^{-1}$ (79% de degradação) com a adição de 1 mL de B9 + Sakurai com ajuste de pH 8,0 (B9-H) e entre 132-315 $\mu\text{g L}^{-1}$ (14 - 53 % de degradação) para as demais condições.

- Em relação à cultura mista de bactérias lácticas probióticas *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* – LPR (P1):

A avaliação do potencial de inibição do crescimento de *M. sp. TAC 95* com bactérias lácticas probióticas requer o ajuste de pH devido à produção de ácidos orgânicos (ácido láctico);

A adição de diferentes proporções de biovolume bem como de cultura de LPR (P1) não resultaram em diferenças significativas de porcentagens de degradação de MCs totais e foram limitadas variando entre 17 e 27 %;

- Em relação à cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* – PA (L1):

Comparando os valores da contagem de *M. sp. TAC 95*, e das concentrações de clorofila-a e de MCs totais iniciais e finais (após 96 h), foi possível constatar que a cepa de levedura PA (L1) apresentou atividade anti-cianobactéria / *M. sp. TAC 95* porém, não apresentou atividade de degradação de MCs totais.

Assim, por simplicidade de aplicação, especialmente em escala real, adotou-se para os experimentos subseqüentes a adição de microrganismos na forma de:

- 1 mL de cultura (microrganismos adaptados) acrescido de 1 mL de meio líquido específico com ajuste de pH quando necessário;
- 1 mL de biovolume acrescido de 1 mL de meio líquido específico com ajuste de pH quando necessário.

6.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE DIFERENTES CEPAS DE MICRORGANISMOS EM RELAÇÃO À CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS – MCs TOTAIS

A Tabela 10 e o Gráfico 12 mostram a concentração de MCs totais nos tempos 0 e 96 h em relação aos resultados obtidos no experimento com a bactéria B9 e as cepas de bactérias lácticas probióticas P1 a P5 nas condições experimentais I e J: Extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de B9 e 1 mL de meio de Sakurai (B9-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume e 1 mL de meio Sakurai (B9-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* (P1) e 1 mL de meio de MRS (P1-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume de *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* e 1 mL de meio MRS (P1-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Bifidobacterium lactis* (P2) e 1 mL de meio de MRS (P2-I) extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume de *Bifidobacterium lactis* e 1 mL de meio MRS (P2-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Lactobacillus casei* (P3) e 1 mL de meio MRS (P3-I) extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume de *Lactobacillus casei* e 1 mL de meio MRS (P3-J); extrato de MCs totais com adição de 1 g de kefir de água (P4) e 1 mL de meio de açúcar mascavo 5 % (P4); extrato de

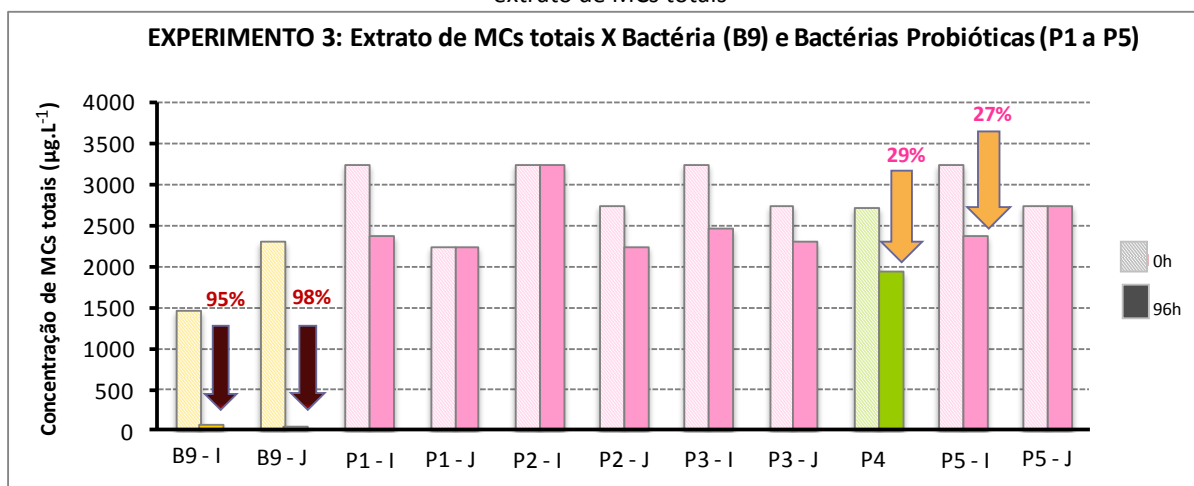
MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Lactobacillus acidophilus* (P5) e 1 mL de meio de MRS (P5-I) extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume de *Lactobacillus acidophilus* e 1 mL de meio MRS (P5-J).

Tabela 10 - Valores absolutos, % de degradação de MCs totais no Experimento 3 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 e cepas de bactérias lácticas probióticas antes e após 96 horas

Condição experimental	MCs totais ($\mu\text{g. L}^{-1}$)		% de degradação
	0 h	96 h	
B9-I (*)	1460,9	68,2	95
B9-J	2301,6	50,5	98
P1-I	3245,8	2369,6	27
P1-J	2234,3	2234,3	0
P2-I	3245,8	3245,8	0
P2-J	2740,0	2249,6	18
P3-I	3245,8	2477,4	24
P3-J	2740,0	2317,4	15
P4 (*)	2723,1	1944,2	29
P5-I (*)	3245,8	2369,6	27
P5-J	2740,0	2740,0	0

(*): Condição selecionada

Gráfico 12 - Degradação de MCs totais pela bactéria B9, cepas de bactérias lácticas probióticas e kefir utilizando extrato de MCs totais



Fonte Do Autor (2012)

Dentre os microrganismos testados, independentemente das condições experimentais, a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 apresentou as maiores porcentagens de degradação de MCs totais com 95 e 98 %, quando adicionada na forma de cultura (B9-I) e biovolume (B9-J), respectivamente. Essas eficiências comprovam os resultados obtidos por Tsuji *et al.*, (2006), em que a imobilização da bactéria - B9 em biorreatores constituídos de resinas de poliéster resultou na eliminação completa de MC-LR (2 mg. L^{-1}) após 24 h. A variação da porcentagem de degradação observada não justifica a adoção do uso da cepa de bactéria B9 na forma de biovolume.

Entre as bactérias lácticas probióticas o maior percentual de degradação de MCs totais após 96 h foi de 27 %, obtido pelas cepas La-5 adicionada na forma de cultura (P5-I) e LPR adicionada na forma de biovolume (P1-J). O percentual de degradação de MCs totais dos grãos de kefir foi de 29 % após 96 h de incubação (P4). No entanto, as porcentagens de degradação observadas para as bactérias lácticas probióticas e kefir de água foram bem inferiores às apresentadas pela B9 (Tabela 11). Estudos feitos com *Lactbacillus* e *Bifidobacteria* mostraram que esses microrganismos foram eficientes para remoção de MCs totais, porém há necessidade de adaptá-los para serem utilizados em escala real (SONJA *et al.*, 2007).

As adições da cepa La-5 na forma de cultura (P5-I) e da cepa LPR na forma de biovolume (P1-J) apresentaram a mesma porcentagem de degradação de 27 %. Assim, por simplicidade de aplicação as condições experimentais selecionadas para as cepas de bactérias lácticas probióticas correspondem à adição de La-5 adicionada na forma de cultura (P5-I) e de grãos de kefir (P4).

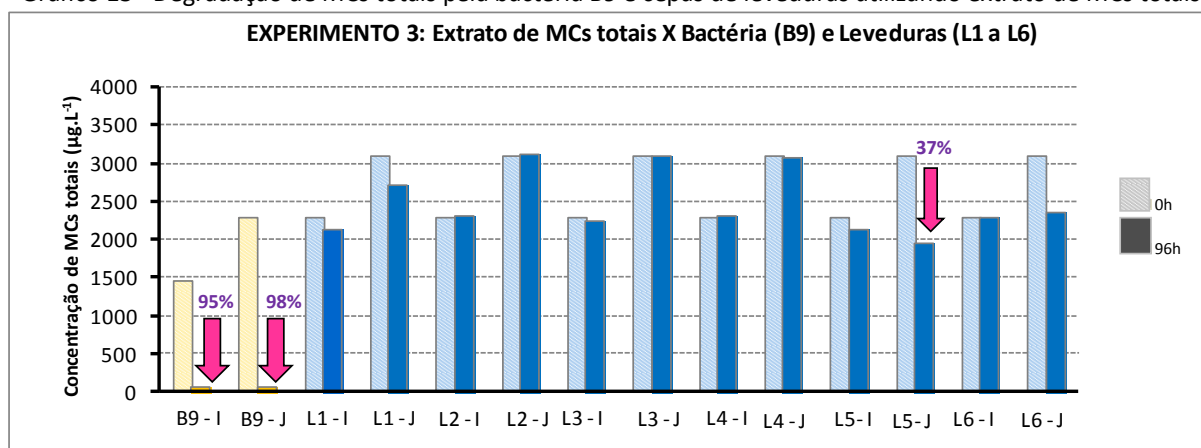
A Tabela 11 e o Gráfico 13 mostram as concentrações de MCs totais nos tempos 0 e 96 h em relação aos resultados obtidos no experimento com a bactéria B9 e as cepas de leveduras L1 a L6 nas condições experimentais I e J: Extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (L1) e 1 mL de meio de YPD (L1-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume *Saccharomyces cerevisiae* e 1 mL de meio YPD (L1-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Pichia fermentans* (L2) e 1 mL de meio de YPD (L2-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume de *Pichia fermentans* e 1 mL de meio YPD (L2-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cepa não identificada (L3) e 1 mL de meio de YPD (L3-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume da cepa não identificada e 1 mL de meio YPD (L3-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cepa não identificada (L4) e 1 mL de meio de YPD (L4-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume da cepa não identificada e 1 mL de meio YPD (L4-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cepa não identificada (L5) e 1 mL de meio de YPD (L5-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume da cepa não identificada (L5) e 1 mL de meio YPD (L5-J); extrato de MCs totais com adição de 1 mL da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (L6) e 1 mL de meio de YPD (L6-I); extrato de MCs totais com adição de 1 mL de biovolume *Saccharomyces cerevisiae* e 1 mL de meio YPD (L6-J).

Tabela 11 - Valores absolutos, % de degradação de MCs totais no Experimento 3 utilizando a cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 e cepas de leveduras antes e após 96 horas

Condição experimental	MCs totais ($\mu\text{g. L}^{-1}$)		% de degradação
	0 h	96 h	
B9-I (*)	1460,9	68,2	95
B9-J	2301,6	50,5	98
L1-I	2301,6	2125,3	7
L1-J	3104,5	2701,4	12
L2-I	2301,6	2301,6	0
L2-J	3104,5	3104,5	0
L3-I	2301,6	2233,0	3
L3-J	3104,5	3079,7	0,8
L4-I	2301,6	2301,6	0
L4-J	3104,5	3056,9	1,5
L5-I	2301,6	2125,3	8
L5-J (*)	3104,5	1953,9	37
L6-I	2301,6	2277,6	1
L6-J	3104,5	2346,3	24

(*): Condição selecionada

Gráfico 13 - Degradação de MCs totais pela bactéria B9 e cepas de leveduras utilizando extrato de MCs totais



Dentre as cepas de leveduras testadas, as maiores eficiências de degradação após 96 h foram obtidas pela cepa Vale do Ivaí adicionada na forma de biovolume (L5-J) a qual apresentou 37 %, seguida da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 adicionada na forma de biovolume (L6-J), com 24 % (Tabela 11) e portanto, bem inferiores às porcentagens de degradação observadas pela B9. As outras cepas apresentaram resultados inferiores a 13 % de degradação, sendo assim consideradas insatisfatórias para uso como potencial de degradação.

Por outro lado, as condições de manutenção das leveduras são bastante simples quando comparadas às da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 e às das bactérias lácticas probióticas, podendo-se constituir como alternativa promissora para estudos futuros, desde que sua capacidade de degradação seja potencializada.

De uma maneira geral, as capacidades de degradação de MCs totais pelas bactérias lácticas probióticas e leveduras foram limitadas. Entre as bactérias lácticas probióticas, as maiores eficiências foram obtidas pela cepa La-5 (P5) com degradação de 27 %, enquanto os grãos de kefir (P4) apresentaram 29 % de degradação de MCs totais. Em relação às leveduras testadas, a cepa Vale do Ivaí (L5) apresentou o maior percentual de degradação, com 37 %, após 96 h de incubação.

Assim, os microrganismos que apresentaram as maiores eficiências de degradação de MCs totais após 96 h foram a bactéria B9, a cepa de bactéria láctica probiótica La-5 (P5), o kefir (P4) e a cepa de levedura Vale do Ivaí (L5), sendo assim, selecionados para o Experimento 4. Por simplicidade de aplicação, especialmente em escala real, adotou-se no Experimento 4, adição dos microrganismos selecionados na forma de cultura – Condição experimental I.

A Figura 23 mostra a foto ilustrativa do Experimento 3 de degradação de MCs com diferentes microrganismos.

Figura 23 - Foto ilustrativa do Experimento 3



Fonte Do Autor (2012)

6.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE MCS TOTAIS PARA OS MICRORGANISMOS SELECIONADOS

A Tabela 12 representa as concentrações teóricas iniciais de MCs totais e ao longo do tempo após exposição às cepas de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* (B9), kefir de água (mistura de bactérias láctica, acética e levedura) (P4), bactéria láctica probiótica *Lactobacillus acidophilus* (P5) e levedura Vale do Ivaí (L5).

Tabela 12- Valores absolutos [% de degradação] de MCs totais das cepas de bactéria B9, kefir de água P4, bactéria láctica probiótica P5 e levedura L5 do Experimento 4

Concentrações teóricas de MCs totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
Tempo de coleta (h)	B9	P4	P5	L5
0	881,3	676,1	764,8	807,4
6	ND	ND	ND	687,5[15%]
10	873,1 [0,9%]	ND	ND	ND
12	ND	676,1	677,0[11%]	ND
24	760,1 [14%]	438,4[35%]	ND	506,7[37%]
48	209,2 [76%]	422,3[37%]	711,0[7%]	ND
72	ND	ND	ND	ND
96	2,1[99%]	375,4[44%]	434,5[43%]	390,5[53%]

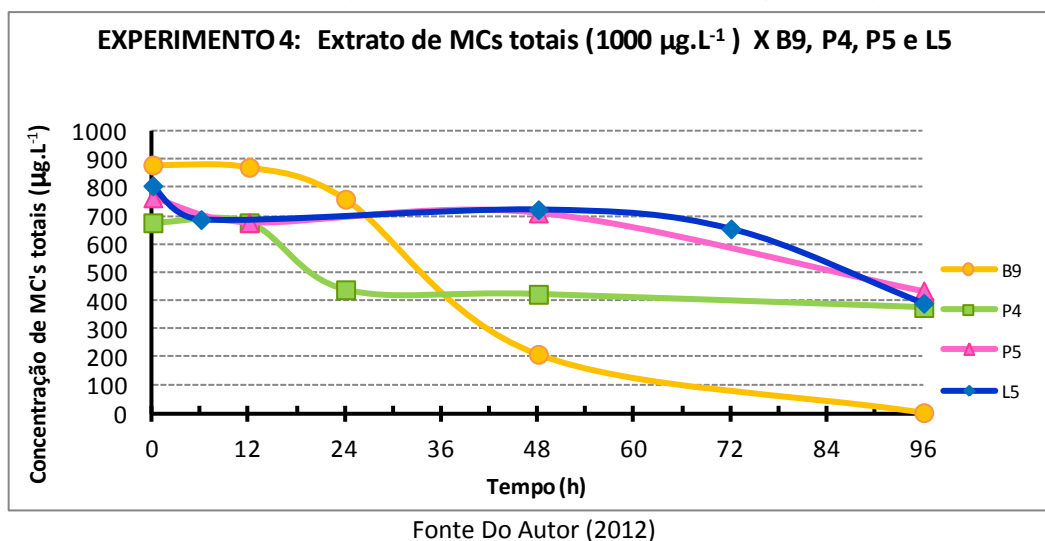
ND : Não determinado

[]:Porcentagem de degradação calculada em relação à concentração de MCs totais para o tempo de 0 h;

Apesar da concentração teórica inicial de MCs totais prevista ter sido de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, de acordo com a Tabela 12 e o Gráfico 14, estas variaram entre 676 e $881 \mu\text{g.L}^{-1}$. Após 96 h de exposição, as porcentagens de degradação calculadas em relação à concentração de MCs totais para o tempo de 0 h foram de 99, 44, 43 e 53 % para as cepas de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* (B9), kefir de água (P4), de bactéria láctica probiótica (P5) e de levedura (L5), respectivamente. Confirmando os resultados obtidos no Experimento 3, a cepa de bactéria B9 apresentou a maior porcentagem de degradação de MCs totais, com concentrações inicial de $881,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e final de $2,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e porcentagens de degradação de MCs totais de 99 % após 96 h.

No Gráfico 14 são apresentadas as curvas de degradação de MCs totais com concentração teórica inicial de MCs totais de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ pela cepa de bactéria (B9), grãos de kefir de água (P4), cepa de bactéria láctica probiótica La-5 (P5) e cepa de levedura Vale do Ivaí (L5) ao longo do tempo até 96 h de exposição.

Gráfico 14 - Curvas de degradação de MCs totais com concentração teórica inicial de MCs totais aproximada de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ pela cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* (B9), grãos de kefir de água (P4), cepa de bactéria láctica probiótica La-5 (P5) e cepa de levedura Vale do Ivaí (L5) ao longo do tempo até 96 h de exposição



No Gráfico 14 pode se observar que nos tempos iniciais até 24 h de exposição os microrganismos P4, P5 e L5 apresentaram maior atividade de degradação de MCs totais em relação à bactéria B9. No entanto, após este período a bactéria B9 apresentou substancial aumento da atividade de degradação de MCs totais, chegando a 99 % de redução após 96 h, enquanto que os demais microrganismos mantiveram os mesmos níveis de eficiência com porcentagens de degradação de 44, 43 e 54 % para os microrganismos P4, P5 e L5, respectivamente. Assim pôde-se confirmar a potencialidade da cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 para aplicação em técnica alternativa no tratamento de águas contendo MCs totais, conforme observado por Tsuji *et al.*, (2006).

De uma maneira geral, a capacidade de degradação de MCs totais pela levedura Vale do Ivaí (L5), bactéria láctica probiótica La-5 (P5) e kefir mostraram-se mais elevadas se comparadas com as porcentagens de degradação observadas no Experimento 3.

Em função dos resultados de elevada eficiência obtidos para a cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9, o Experimento 4 foi repetido para as concentrações iniciais teóricas de 2000, 3000, 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs totais.

Na Tabela 13 são apresentados os valores absolutos das concentrações de MCs totais iniciais e ao longo do tempo após exposição à cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 e no Gráfico 15, as curvas de degradação de MCs totais correspondentes.

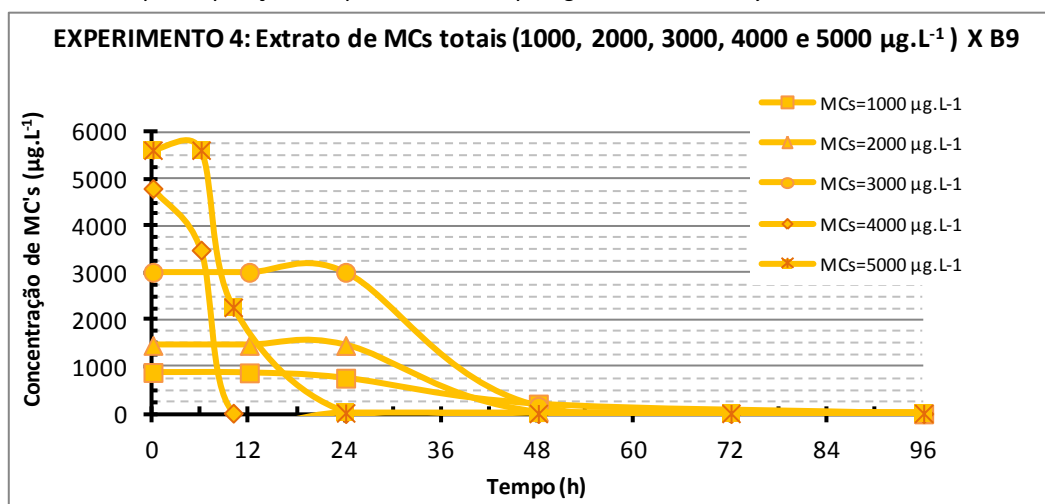
Tabela 13 - Valores absolutos das concentrações teóricas iniciais de MCs totais e ao longo do tempo após exposição à cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9

Tempo de exposição (h)	Concentração teórica inicial de MCs total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
	1000 *	2000 *	3000 *	4000 *	5000 *
0	881,3	1458,5	3014,6	4800,5	5616,2
6				3488,0 [27,3%]	5616,2 [-]
10	873,1[0,9%]	1458,5[-]	3014,6[-]	14,1 [99,7%]	2268,1 [41,3%]
24	760,1[14%]	1456,7[-]		5,2 [99,9%]	20,2 [99,5%]
48	209,2[76%]	47,9[96%]	159,7[94,7%]	5,2 [99,9%]	8,2 [99,8%]
72				4,4 [99,9%]	9,2 [99,8%]
96	2,1[99,7%]	3,4[99,7%]	3,35[99,8%]	5,6 [99,9%]	10,6 [99,8%]

[-]: sem degradação de MCs

* Concentrações teóricas iniciais de MCs totais

Gráfico 15 - Curva de degradação de MCs totais com concentrações teóricas iniciais variadas ao longo do tempo após exposição à cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9



Fonte Do Autor (2012)

A Tabela 14 mostra os valores da contagem de unidades formadoras de colônias por mL da cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 utilizada no teste de degradação de MCs totais da cepa toxigênica de *M. sp.* – TAC 95.

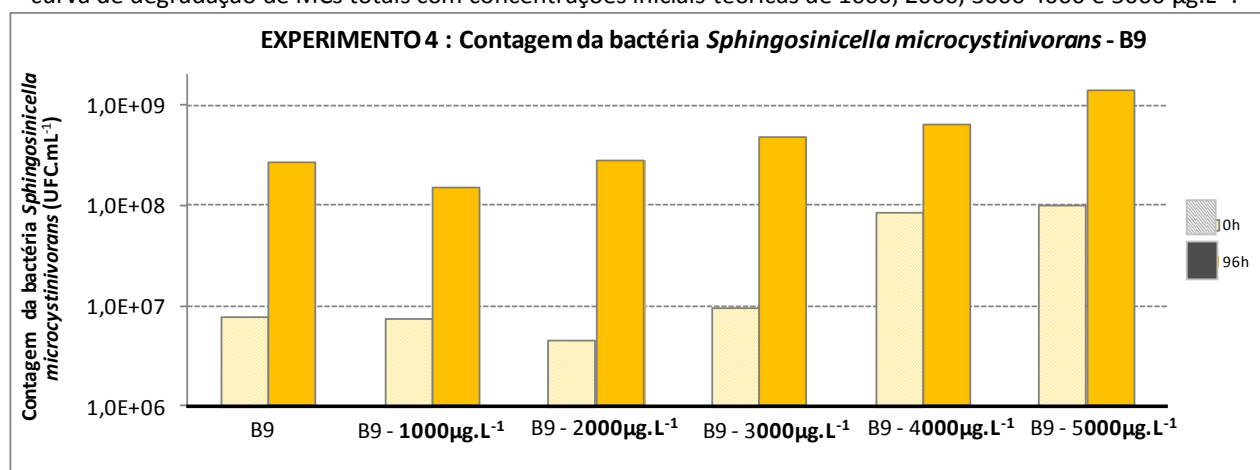
Pode-se observar que a cinética de degradação da bactéria B9 representada pelas curvas de degradação com concentrações teóricas iniciais de MCs totais de 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi diferenciada em relação às curvas com concentrações teóricas iniciais de MCs totais de 1000 a 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Uma possível explicação pode estar relacionada à necessidade do uso de um novo extrato de MCs com concentração mais elevada preparada especialmente para este fim, enquanto que para as concentrações de 1000 a 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi utilizado um extrato submetido à várias séries de congelamento / descongelamento, o que pode ter ocasionado a liberação de outros metabólitos que influenciaram negativamente na degradação.

Tabela 14- Valores de contagem da cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 utilizada no Experimento 4

Concentração teóricas iniciais de MCs totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Tempo de coleta (h)	
	0	96
Controle B9	$7,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$
1000	$7,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$
2000	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^8$
3000	$9,4 \times 10^6$	$4,7 \times 10^8$
4000	$8,5 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$
5000	$1,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$

O Gráfico 16 mostra a contagem da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 nos tempos 0 e 96 h do controle (sem adição de extrato) e da curva de degradação de MCs totais com concentrações iniciais de 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Gráfico 16 - Contagem da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 nos tempos 0 e 96 h do controle e da curva de degradação de MCs totais com concentrações iniciais teóricas de 1000, 2000, 3000 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.



Fonte Do Autor (2012)

De acordo com o Gráfico 16, pode-se observar que a contagem inicial de bactéria B9 utilizada nas curvas de degradação com concentrações de 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi da ordem de 13 vezes superior em relação a contagem de bactéria B9 utilizada nas concentrações de 1000 a 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Observando os valores de contagem da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 antes e após 96 h pode-se verificar que, para todas as concentrações de MCs houve aumento de cerca de 1 ciclo log no número de unidades formadoras de colônias da bactéria B9.

Considerando os dados das Tabela 13 e Tabela 14 e dos Gráfico 14 e Gráfico 15 pode-se contatar que:

- Para as concentrações iniciais teóricas de MCs totais de 1000 a 3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 foi capaz de degradar 76, 96, 95 % das MCs totais presentes após 48 h de exposição e no mínimo 99,7 % das MCs totais presentes após 96 h de exposição resultando em concentração máxima residual de 3,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs totais;
- Para a mistura com concentração teórica de MCs totais de 4000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a degradação efetiva foi observada após 10 h atingindo 99,7 % de degradação; para a concentração teórica de 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a degradação efetiva foi observada em 24 h com 99,4 %.
- A maior degradação observada nas concentrações de 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs totais pode ser justificada pela maior quantidade de bactéria B9 inoculada no tempo de 0 h cerca de 13 vezes superior em relação à inoculada nas demais curvas de degradação;
- Após 96 h as concentrações residuais de MCs totais foram de 5,7 a 10,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para as curvas de degradação com concentrações iniciais teóricas de 4000 e 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MCs totais.

6.5 EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CIANOBACTÉRIAS (ATIVIDADE ANTI-CIANOBACTÉRIA) PELA BACTÉRIA *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9

As Tabela 15 e Tabela 16 mostram os valores absolutos das triplicatas, suas médias e a porcentagem de inibição do crescimento através da contagem celular de cianobactéria e análise de clorofila – a respectivamente, efetuadas nos tempos 0, 96, 168 e 336 h. Na Figura 10 estão representadas fotos das cepas de cianobactérias mantidas no laboratório, 15 dias após inoculação para serem utilizadas no Experimento 5.

Foi possível constatar que a bactéria B9 possui além de potencial de degradação de MCs como mostrado nos experimentos anteriores, atividade de inibição do crescimento de cianobactérias ou atividade anti-cianobactéria em relação às cepas de *Microcystis* sp. e spp., *Anabaena ucrainica*, *Phormidium tenue* e *Synechocystis*.

Considerando os resultados de contagem celular das culturas / misturas de cianobactérias, pode-se observar que:

- Após 96 h, as porcentagens de inibição variaram de 41,4 a 79,3 %;
- Após 168 h, com exceção da cepa *M. sp. TAC 95 - C1* todas as outras cepas apresentaram um aumento na porcentagem de inibição variando de 42,2 a 90,6 %;

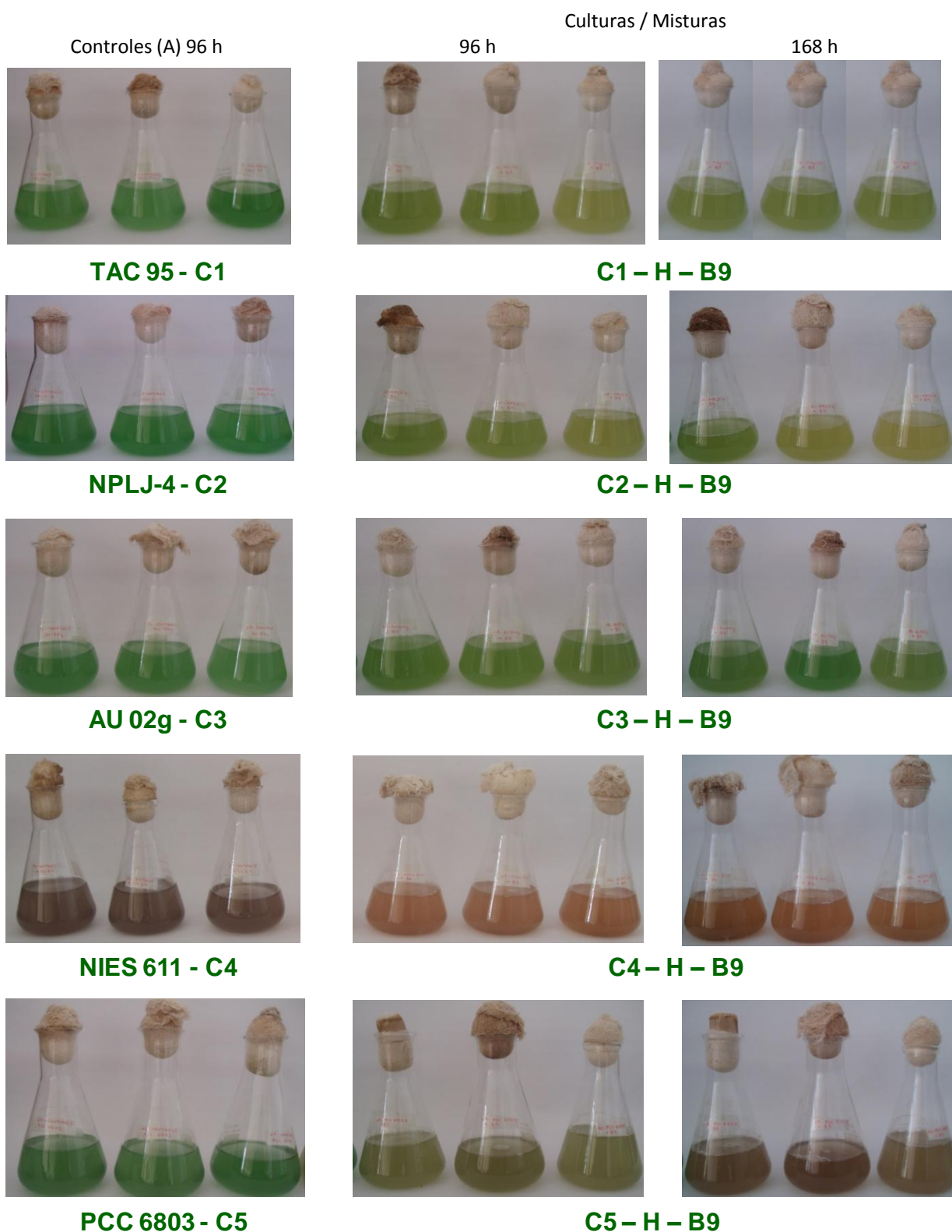
- Nas contagens de 336 h não foi observado um aumento significativo na porcentagem de inibição variando de 46,9 a 97,2 %.

Considerando os resultados das análises de clorofila-a das culturas / misturas de cianobactérias, pode-se observar que:

- Após 96 h as porcentagens de inibição variaram de 34,4 a 68,9 %;
- Após 168 h as porcentagens aumentaram variando de 51,0 a 76,4 %;
- Após 336 h a porcentagem de inibição diminuiu variando de 52,5 a 70,2 %.

A Figura 24 mostra as fotos de 96 h dos controles e 96 h e 168 h das culturas / misturas de do Experimento 5, no qual pode-se observar a mudança de coloração após 96 e 168 h nas culturas / misturas.

Figura 24 – Fotos de 96 h dos controles e 96 h e 168 h das culturas / misturas do Experimento 5



Fonte Do Autor (2012)

Tabela 15 – Valores absolutos, média e porcentagem de inibição em relação à contagem celular para diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5

Classificação - cepa	Amostras	Contagem 0h	Contagem Média 0h	Contagem 96h	Contagem Média 96h	% de Inibição 96h	Contagem 168h	Contagem Média 168h	% de Inibição 168h	Contagem 336h	Contagem Média 336h	% de Inibição 336h
<i>Microcystis sp.</i> TAC 95	C1-A	5,4E+06	6,0E+06	1,5E+07	1,6E+07		8,3E+06	1,2E+07		2,58E+07	3,69E+07	
	C1-A	6,8E+06		1,8E+07			1,6E+07			1,17E+07		
	C1-A	5,9E+06		1,4E+07			1,2E+07			7,32E+07		
	C1-H-B9	7,8E+06	7,0E+06	3,6E+06	3,3E+06	79,3 ^a	5,0E+06	7,1E+06	42,2 ^a	1,48E+06	1,96E+07	46,9 ^a
	C1-H-B9	8,2E+06		2,5E+06			1,2E+07			3,27E+07		
	C1-H-B9	5,0E+06		3,8E+06			3,9E+06			2,46E+07		
<i>Microcystis sp.</i> NAPLJ-4	C2-A	5,7E+05	9,9E+05	5,6E+06	7,3E+06		8,6E+06	6,8E+06		1,23E+07	1,73E+07	
	C2-A	1,4E+06		7,6E+06			8,5E+06			2,02E+07		
	C2-A	1,0E+06		8,6E+06			3,3E+06			1,93E+07		
	C2-H-B9	1,8E+06	1,5E+06	2,6E+06	2,2E+06	70,3 ^a	1,5E+06	1,1E+06	83,3 ^a	8,30E+05	4,75E+05	97,2 ^a
	C2-H-B9	1,5E+06		2,4E+06			1,3E+06			4,53E+05		
	C2-H-B9	1,3E+06		1,5E+06			5,5E+05			1,43E+05		
<i>Anabaena ucrainica</i> AU02g	C3-A	2,2E+06	2,1E+06	4,3E+06	4,2E+06		2,7E+06	4,7E+06		1,46E+07	1,39E+07	
	C3-A	1,9E+06		6,8E+06			7,1E+06			1,31E+07		
	C3-A	2,3E+06		1,7E+06			4,5E+06			1,40E+07		
	C3-H-B9	1,9E+06	2,0E+06	2,5E+06	1,9E+06	55,4 ^a	8,6E+05	1,3E+06	71,8 ^a	2,55E+06	2,50E+06	82,0 ^a
	C3-H-B9	2,0E+06		2,1E+06			2,1E+06			3,11E+06		
	C3-H-B9	2,0E+06		1,1E+06			1,1E+06			1,84E+06		
<i>Phormidium tenue</i> NIES 611	C4-A	8,6E+06	6,0E+06	1,4E+07	1,6E+07		1,7E+07	3,0E+07		5,90E+07	2,64E+07	
	C4-A	6,1E+06		1,9E+07			2,5E+07			2,58E+06		
	C4-A	3,4E+06		1,4E+07			4,8E+07			1,76E+07		
	C4-H-B9	7,5E+06	7,1E+06	6,7E+06	9,3E+06	41,4 ^a	3,8E+06	2,8E+06	90,6 ^a	1,55E+06	1,81E+06	93,1 ^a
	C4-H-B9	7,4E+06		1,1E+07			3,5E+06			4,53E+05		
	C4-H-B9	6,4E+06		1,0E+07			1,2E+06			3,43E+06		
<i>Synechocystis</i> PCC - 6803	C5-A	8,3E+06	7,5E+06	2,3E+07	1,9E+07		1,5E+07	2,5E+07		7,24E+07	6,88E+07	
	C5-A	8,0E+06		2,2E+07			1,2E+07			7,65E+07		
	C5-A	6,3E+06		1,1E+07			4,7E+07			5,76E+07		
	C5-H-B9	4,7E+06	7,2E+06	6,5E+06	6,8E+06	63,5 ^a	5,0E+06	6,2E+06	75,2 ^a	1,65E+07	1,01E+07	85,3 ^a
	C5-H-B9	7,9E+06		7,5E+06			8,9E+06			9,39E+06		
	C5-H-B9	9,1E+06		6,5E+06			4,6E+06			4,37E+06		

(a): porcentagem de inibição calculada em relação aos valores de contagem celular no controle negativo para o tempo de 96 h;

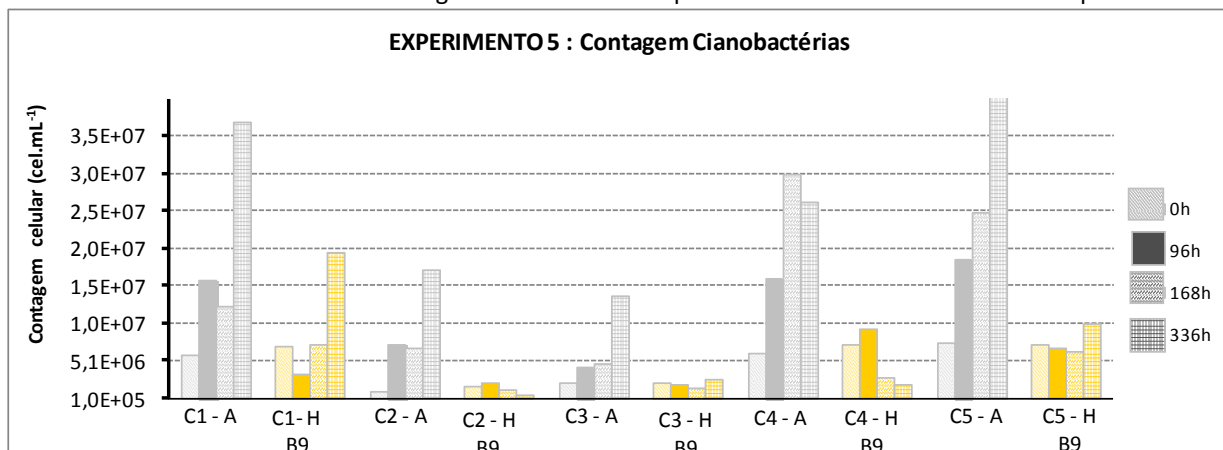
Tabela 16 – Valores absolutos, média e porcentagem de inibição de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5

Classificação - cepa	Amostras	Clorofila-a 0h	Clorofila-a Média 0h	Clorofila-a 96h	Clorofila-a Média 96h	% de Inibição 96 h	Clorofila-a 168h	Clorofila-a Média 168h	% de Inibição 168h	Clorofila-a 336h	Clorofila-a Média 336h	% de Inibição 336h
<i>Microcystis</i> sp. TAC 95	C1-A	521,2		1042,5			1456,8			1777,5		
	C1-A	401,0		1002,4			1416,7			2485,9		
	C1-A	548,0	490,1	1336,5	1127,1		1750,8	1541,4		2472,5	2245,3	
	C1-H-B9	467,8		614,8			721,7			1136,0		
	C1-H-B9	467,8		588,1			828,6			1242,9		
	C1-H-B9	267,3	401,0	414,3	539,1	52,2 ^a	347,5	632,6	59,0 ^a	761,8	1046,9	53,4 ^a
<i>Microcystis</i> spp. NAPLJ-4	C2-A	401,0		1162,8			1202,9			908,8		
	C2-A	374,2		1363,2			1363,2			1189,5		
	C2-A	401,0	392,0	1162,8	1229,6		1349,9	1305,3		1256,3	1118,2	
	C2-H-B9	401,0		801,9			454,4			414,3		
	C2-H-B9	454,4		695,0			401,0			307,4		
	C2-H-B9	401,0	418,8	534,6	677,2	44,9 ^a	334,1	396,5	69,6 ^a	280,7	334,1	70,1 ^a
<i>Anabaena</i> <i>ucrainica</i> AU02g	C3-A	681,6		1390,0			1470,2			2579,4		
	C3-A	641,5		1416,7			1951,3			1817,6		
	C3-A	534,6	619,2	1269,7	1358,8		1376,6	1599,3		1376,6	1924,6	
	C3-H-B9	708,3		895,5			815,3			855,4		
	C3-H-B9	681,6		895,5			828,6			1470,2		
	C3-H-B9	641,5	677,2	882,1	891,0	34,4 ^a	708,3	784,1	51,0 ^a	414,3	913,3	52,5 ^a
<i>Phormidium</i> <i>tenue</i> NIES 611	C4-A	401,0		948,9			1283,0			1710,7		
	C4-A	467,8		1002,4			1015,7			2044,8		
	C4-A	521,2	463,3	1055,8	1002,4		1323,1	1207,3		1790,9	1848,8	
	C4-H-B9	441,0		307,4			253,9			507,9		
	C4-H-B9	360,9		294,0			347,5			748,4		
	C4-H-B9	360,9	387,6	334,1	311,9	68,9 ^a	253,9	285,1	76,4 ^a	481,1	579,2	68,7 ^a
<i>Synechocystis</i> PCC - 6803	C5-A	454,4		788,5			1202,9			588,1		
	C5-A	320,8		855,4			775,2			561,3		
	C5-A	294,0	356,4	614,8	752,9		748,4	908,8		601,4	583,6	
	C5-H-B9	481,1		414,3			334,1			721,7		
	C5-H-B9	494,5		374,2			467,8			735,1		
	C5-H-B9	320,8	432,1	401,0	396,5	47,3 ^a	307,4	369,8	59,3 ^a	334,1	597,0	-2,3 ^a

(a): porcentagem de inibição calculada em relação aos valores de clorofila-a no controle negativo para o tempo de 96 h;

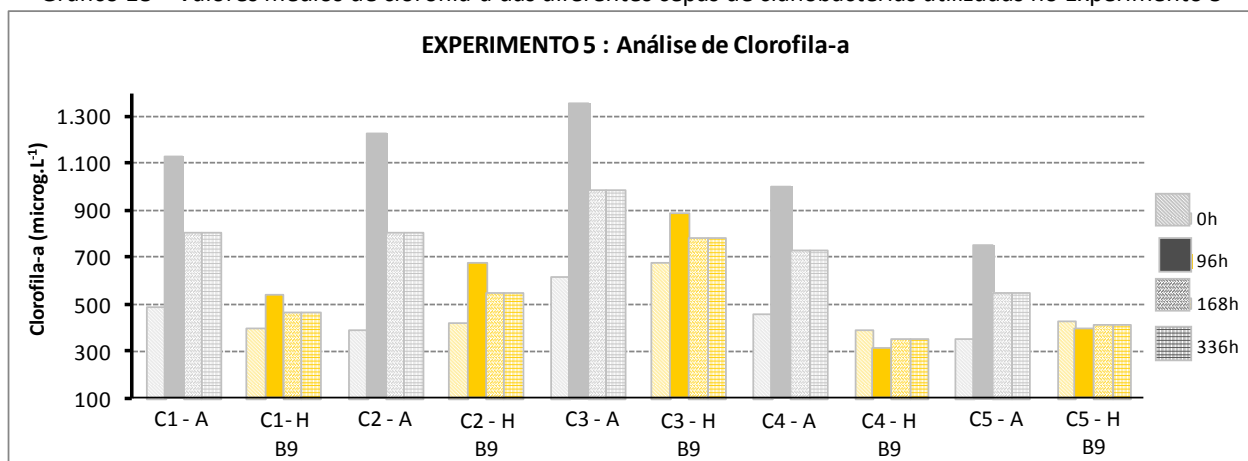
Nos Gráfico 17 e Gráfico 18 estão representados, respectivamente os valores médios da contagem celular e de clorofila-a nos tempos 0, 96, 168 e 336 h.

Gráfico 17 – Valores médios da contagem das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5



Fonte Do Autor (2012)

Gráfico 18 – Valores médios de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento 5



Fonte Do Autor (2012)

A contagem da bactéria B9 no tempo 0 h variou de $3,2 \times 10^6$ a $1,22 \times 10^7$. Após 96 h ocorreu o pico de crescimento aumentando em valores mínimos de $3,1 \times 10^7$ e máximos de $2,6 \times 10^8$ e após este período não foi observado crescimento significativo da bactéria B9.

7 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho pode-se concluir que:

- Dentre as condições de estudo testadas para avaliar as atividades de biodegradação e de inibição do crescimento de cianobactérias, a adição de cultura adaptada do microrganismo acrescida de meio específico foi a condição selecionada;
- Entre as bactérias lácticas probióticas testadas as que apresentaram maiores porcentagens de degradação foram grãos de kefir (P4) e *Lactobacillus acidophilus* La-5 (P5) e em relação às leveduras a que apresentou maior porcentagem de degradação foi a Vale do Ivaí (L5);
- Além do potencial de degradação de microcistinas totais, a bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 apresentou também atividade anti-cianobactéria.

8 BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF) / 21ª edição, 2005.

ALBUQUERQUE JUNIOR, E. C. **Produção e caracterização de carvão ativado para remoção de microcistinas**. 2006. 239 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 2006.

AMARANTE JUNIOR, O. P. VIEIRA, E. M. COELHO, R. S. **Poluentes Orgânicos Dinâmica, destino e determinação no ambiente**. v 1, São Carlos: Editora: RIMA, 2006.

AZEVEDO, S. M. F. O. **Toxinas de Cianobactérias: Causas e conseqüências para a Saúde Pública**. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm> Acesso em: 15 fev 2011.

BITTENCOURT, M. C. O. MOLICA, R. **Cianobactéria Invasora**. Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/cianobacteria.pdf>> .

BOURNE, D.G. BLAKELEY, R.L. RIDDLES, P. JONES, G. J. *Biodegradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin LR in Natural Water and Biologically Active Slow Sand Filters*. **Water Research**, Austrália, v.40, p. 1294–1302, janeiro 2006.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3ªed. São Paulo: CETESB/ASCETESCB, 1986

CAMPINAS, M. TEIXEIRA, M. R. LUCAS, H. ROSA, M. J. Previsão da capacidade de remoção de cianobactérias e cianotoxinas na ETA de Alcantrarrilha. In: ENCONTRO NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE SANEAMENTO BÁSICO, 10, 2002, Universidade do Minho, p. 16-19.

CARVALHO, G. B. M. BENTO, C. V. SILVA, J. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. Disponível em < www.revistaanalytica.com.br/ed_antiores/25/art03.pdf.

CARMICHAEL, W. W. *The toxins of Cyanobacteria. Scientific American.* 270(1), pp. 78-86, 1994.

CHORUS, I. BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* London e New York: WHO, 1999.

CHORUS, I. BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* London e New York: WHO, 1999. *apud* DI BERNARDO, L. MINILLO, A. DANTAS, A. D. **Florações de algas e de cianobactérias: Suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento.** São Carlos: Editora LDiBe, 2010.

COELHO, A. R. HOFFMANN, F. L. HIROOKA, E. Y. Biocontrole de doenças pós colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n 2, p. 337-358, julho./dezembro. 2003.

DEL RIO, D. T. **Biossorção de Cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***, 2004. 66 f. Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

DI BERNARDO, L. MINILLO, A. DANTAS, A. D. **Florações de algas e de cianobactérias: Suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento.** São Carlos: Editora LDiBe, 2010.

FALCONER, I. R. HARDY, S. J. HUMPAGE, A. R. FROSCIO, S. M. TOZER, G. J. HAWKINS, P. R. *Hepatic and renal toxicity of the blue – green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis reciborskii* in male swiss albino mice.* **Toxicology** 14 (1): 143 – 150, 1999. *apud* SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de**

cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

FAO/WHO. *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*, FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 85, 2006.

FREITAS, A. M. SIRTORI, C. ZAMORA, P. G. P. Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com geosmina e 2-MIB. **Quim. Nova**, v. 31 n 1, p. 75-78, 2008.

GOMES, A. M. P. MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics.* **Trend in food science and technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GORHAM, P. R.; “*Toxic algae*”. In: JACKSON (ed.) – *Algae and Man*. D. F. New York: Plenum Press, p. 307-36, 1964.

HALTTUNEN, T. SALMINEN, S. TAHVONEN, R. *Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria.* **International. Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 30–35, 2007.

HARADA, K. IMANISHI, S. KATO, H. MIZUNO, M. ITO, E. TSUJI, K.. *Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation.* **Toxicon**, v.44, p. 107 – 109, Maio, 2004.

HASHIMOTO, E. H. **Avanço Metodológico no Biocontrole de Cianobactérias Toxigênicas com Ênfase a Degradação de Microcistina-LR e Bioensaio na Qualidade de Água e Psicultura.** 2007. 134 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, UEL, 2007.

KAMOGAE, M. HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas , **Acta Scientiarum**, Londrina, v. 22, n. 5, p. 1189 – 1200, 2000.

KATO, H. IMANISHI, S. Y. TSUJI, K. HARADA, K. *Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides.* **Water Reserarch**, v. 41, p. 1754 – 1762, Fevereiro 2007.

KRAEMER, B. PETRINI, L. J. KREIN, T. GREGOLIN, C. NEUNFELT, T. H. LOHMANN, T. R. STANGARLIN, J. R. Utilização de leveduras para controle biológico de podridão em morango. In: EAIC, XVI, 2007.

KUIPER – GOODMAN, T. FALCONER, I. FITZGERALD, J. *Human health aspects. In: Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health. Consequences, monitoring and management* (CHORUS, I. BARTRAM, J. Eds.). E & FN Spon, Londres, p. 114 – 153, 1999. *apud* SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras.** São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

KURODA, E. K. **Remoção de células e subprodutos de *Microcystis* spp. por dupla filtração, oxidação e adsorção.** 2006. 276 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

KURODA, E. K. TSUJI, K. HIROOKA, E. Y. ONO, E. Y. S. HARADA, K. Compostos orgânicos voláteis de cianobactérias I-058. CONGRESSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 25, 2009, Recife / PE.

KURODA, E. K. HARADA, K. I. TSUJI, K. KURIAMA, F. GUERGOLETTO, K. B. HIROOKA, E. Y. Volatile organic compounds of cyanobacteria. In: Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos ICBF, 4º e X ERSCTA, 2010.

LEAL, A. C. SOARES, M. C. P. Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Belém, 2004.

LEMES, G. A. F. KERSANACH, R. PINTO, L. S. DELLAGOSTIN, O. A. YUNES, J. S. MATTHIENSEN, A. *Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. Ecotoxicol. Environm. Safety,* 2007.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água,** Ed. 3, Campinas – SP, Editora Átomo, 2008.

LUCA, S. J. PEGORER, M. G. LUCA, M. A. Oxidação de microcistinas-LR em águas pelo íon ferrato (VI), **Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 5 – 10, jan/mar 2010.

MAGRO, M. L. M. CORBACHO, J. M. M. SORRIBES, C. H. *Las bacteriocinas de las bacterias lacticas I: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección*. **Alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000.

MARUYAMA, T. PARK, H. OZAWA, K. TANAKA, Y. SUMINO, T. HAMANA, K. HIRAISHI, A. KATO, K. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. Nov., sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Japão, v. 56, p. 85 – 89, 2006.

MERILUOTO, J. GUEIMONDE, M. HASKARD, C. A. SPOOF, L. SJÖVALL, O. SALMINEN, S. *Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics*. **Toxicon**, v. 46, p. 111-114, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Portaria nº 518 publicada em 25 de março de 2004 no Diário Oficial da União - Seção 1 pg 269 ISSN 1677-7042.

MONDARDO, R. I. SENS, M. L. FILHO, L. C. M. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n 4 out/dez 2006.

MÜLLER, C. C. RODRIGUEZ, M. T. R, CYBIS, L. F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, jan/mar 2009.

MUR, L. R. SKULBERG, O. M. UTKILEN, H. *Cyanobacteria in the environment, in Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, editado por Ingrid Chorus e Jamie Bartram, London, E & FN SPON, 1999.

NIDERKORN, V. BOUDRA, H. MORGAVI, D. P. *Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, v. 101, 2006.

NYBOM, S. M. K. SALMINEN, S. J. MERILUOTO, J. A. O. *Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. FEMS Microbiol Lett*, v. 270, p. 27 - 33, 2007.

NYBON, S. M. K. SALMINEN, S. J. MERILUOTO, J. A. O. *Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. Toxicon*, v. 1, n. 52, p. 214 – 220, 2008.

OLIVEIRA, M. C. B. Cianobactéria invasora, Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil, **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, Janeiro/Junho 2003.

OZAKI, K. OHTA, A. IWATA, C. HORIKAWA, A. TSUJI, K. ITO, E. IKAI, Y. HARADA, K. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. **Chemosphere**, p. 8, Dezembro, 2007.

PIMENTEL, M. B. V. C. FRANCKI, M. V. GOLLÜCKE, B. P. A. **Alimentos funcionais. Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Livraria Varela, 2005.

REBOUÇAS, A. C. BRAGA, B. TUNDISI, J. G. **Águas Doces no Brasil Capital Ecológico, Uso e Conservação**, 3ª Edição, São Paulo: Editora Escrituras, 2006.

RICHTER, C. A. **Água: Métodos e tecnologias de tratamento**, São Paulo: Editora Blucher, 2009.

RINEHART, K. L. NAMIHOSHI, M. & CHOI, B. W. *Structure and biosynthesis of toxins from blue – green algae (Cyanobacteria). Journal of Applied Phycology* 6: 159, 1994. *apud* SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

SAITO, K. KONNO, A. ISII, H. SAITO, H. NISHIDA, F. ABE, T. & CHEN, C. *Nodularin – Har: a new nodularin from Nodularia. Journal of Natural Products* 64: 139 – 141, 1996. *apud* SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

SAITO, T. OKANO, K. PARK, H. D. ITAYAMA, T. INAMORI, Y. NEILAN, B. A. BURNS, B. P. SUGIURA, N. *Detection and Sequencing of the Microcystin LR-Degrading Gene, mlrA, from New Bacteria Isolated from Japanese Lakes, FEMS Microbiology Letters*, Japão, v. 229, p. 271-276, Dezembro 2003.

SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

SHUNYU, S. YONGDIND, L. YINWU, S. GENBAO, L. DUNHAI, L. *Lysis of Aphanizomenon flos-aquae (Cyanobacterium) by a bacterium Bacillus cereus. Biological Control*, v. 39, n 3, p. 345 – 351, Dezembro 2006.

SIVONEN, K. e JONES, G. – *Cyanobacterial toxins, in Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Managament*, editado por Ingrid Chorus e Jamie BBartram, London, Editora: E & FN SPON, 1999.

SONJA, M. K. NYBOM, S. J. SALMINEM & JUSSI, A. O. MERILOUTO *Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bactéria. FEMS Microbiol Lett*, Tykistökatu, n. 270, p. 27 – 33, Janeiro 2007.

TERAO, K. OHMORI, S. IGARASHI, K. OHTANI, I. WATANABE, M. F. HARADA, K. I. ITO, E. WATANABE, M. *Ligth and electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolate from blue – green algae Umezakia natans. Toxicon* 32: 833, m 1994. *apud* SANT’ANNA, C. L. AZEVEDO, M. T. P. AGUJARO, L. F. CARVALHO, M. C. CARVALHO, L. R. SOUZA, R. C. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Editora Independência Ltda, 2006.

TSUJI, K. ASAKAWA, M. ANZAI, Y. SUMINO, T. HARADA, K. *Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. Chemosphere, Japan*, n. 65, p. 117 - 124, Março 2006.

Vigilância Ambiental em Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano, Brasília 2003

WANG, J. CHEN, C. *Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: A review, Biotechnology Advances*, v. 24, n. 5, p. 427 – 451, Outubro 2006.

WILMOTTE, A. & GOLUBIC, S. *Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta / Cyanobacteria, Algological Studies (Stuttgart)*, v. 64, p. 1-24, 1991.

YAMAMOTO, Y. KOUCHIWA, T. HODOKI, Y. HOTTA, K. UCHIDA, H. HARADA, K-I. *Distribution and Identification of Actinomycetes Lysing Cyanobacteria in an Eutrophic Lake. Journal of Applied Phycology*, v. 10, p. 391-397, 1998.

9 ANEXOS

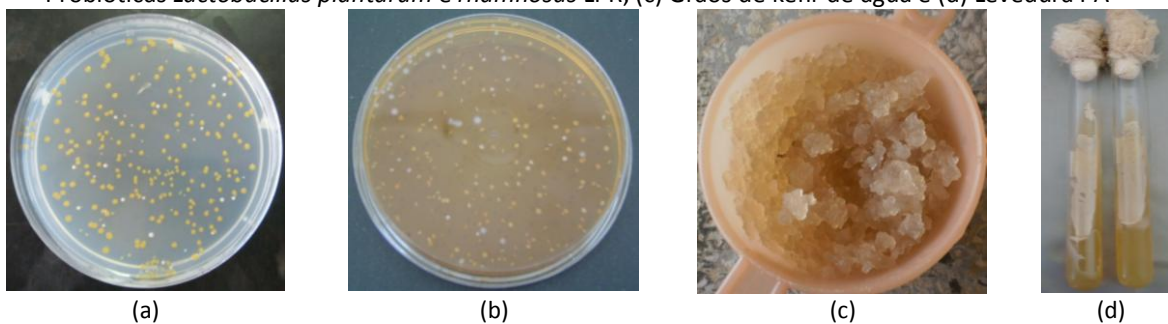
Solução Estoque	Produtos Químicos	Peso (g) para 100 L
A Vol completo = 2000 mL	NaNO ₃	17
	MgCl ₂ .6H ₂ O	4,1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	4,9
	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,9
B Vol completo = 200 mL	K ₂ HPO ₄ ou	1,74
	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	2,28
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou	3,56
	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2,66
C Vol completo = 10 mL	H ₃ BO ₃	0,248
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,139
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,108
	ZnCl ₂	0,0335
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0019
	CuCl ou	0,00014
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,00013
D Vol completo = 40 mL	EDTA.Na ₂	0,744

Para 1L de ASM-1: 20mL de A + 2mL de B + 0,1mL de C + 0,4mL de D

Tabela 18 - Produtos utilizados para composição do Meio Sakurai e YPD

Produtos Químicos	Peso (g) para 100 mL	
	Meio Sakurai	Meio YPD
Extrato de Levedura	0,1	1
Glicose	0,05	2
Peptona	0,2	2
Agar	2	2

Figura 25- Cultura de (a) Bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, (b) Mistura de Bactérias Lácticas Probióticas *Lactobacillus plantarum* e *rhamnosus* LPR, (c) Grãos de kefir de água e (d) Levedura PA



Fonte Do Autor (2012)