

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO E BACTÉRIAS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS (CIANOTOXINA)

Andreia Maria da Anunciação Gomes^{1*}, Ana Cláudia Pimentel de Oliveira² & Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo¹

¹ Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Ilha do Fundão. CEP 21941-590. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Divisão de Laboratórios, Laboratório de Biologia – Avenida Salvador Allende, 5500, Recreio dos Bandeirantes. CEP 22780-160. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*E-mail: amagomes@biof.ufrj.br

RESUMO

O processo de degradação de microcistinas está relacionado a diversos fatores como: a sua concentração inicial, os microrganismos presentes, a temperatura da água, o pH e a disponibilidade de fontes de carbono orgânico, dentre outros. Este trabalho teve como objetivo verificar o processo de degradação de microcistinas em águas com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) e a influência da comunidade bacteriana nesse processo. Para tanto, um extrato aquoso de microcistinas semi-purificado foi adicionado a água da Lagoa de Jacarepaguá (RJ), previamente diluída em água deionizada para obtenção das concentrações de 28, 43 e 60mg L⁻¹ de COD na presença de bactérias e 43 e 60mg.L⁻¹ de COD na ausência de bactérias. Durante os testes foram determinadas as concentrações de microcistinas e a quantificação da população bacteriana. As maiores concentrações de COD (43 e 60mg L⁻¹), que apresentavam 10⁷ colônias mL⁻¹ de bactérias, favoreceram a degradação total das microcistinas em 14 dias, enquanto que na condição de 28mg L⁻¹ com 10⁵ colônias mL⁻¹, após 42 dias ainda era possível detectar 12,8µg L⁻¹ de microcistinas. As maiores concentrações de COD favoreceram o crescimento bacteriano e também foram as mais eficientes na degradação das microcistinas. Na ausência de bactérias, o processo de degradação foi bastante lento (30 dias), confirmando os resultados anteriores que mostram a importância da atividade bacteriana nesse processo. Entretanto, não foi verificada a degradação das microcistinas pelas cepas de bactérias Gram negativas isoladas.

Palavras-chave: Cianobactérias, microcistinas, biodegradação, carbono orgânico dissolvido, bactéria.

ABSTRACT

EFFECTS OF DIFFERENT DISSOLVED ORGANIC CARBON CONCENTRATIONS AND BACTERIAL ACTIVITY ON BIODEGRADATION OF MICROCYSTIN (CYANOTOXIN).

Microcystins degradation depends on several factors like initial concentration in water, presence of microorganisms, temperature, pH, presence of other available sources of organic carbon, and others. The aims of this study were to measure microcystin degradation under different concentrations of dissolved organic carbon (DOC), and determine the influence of bacterial community on this process. For this purpose, water from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil) was diluted in deionized water in order to obtain final concentrations of DOC of 60, 43 and 28mg L⁻¹ (water with bacteria), and final DOC concentrations of 43 and 60mg L⁻¹ (water without bacteria). A semi-purified microcystin extract was prepared and mixed with these samples, and the concentration of microcystin and bacteria were quantified through the time. We found that DOC concentrations of 43 and 60mg L⁻¹ with bacteria promoted total degradation of microcystin within 14 days. On the other hand, a DOC concentration of 28mg L⁻¹ with bacteria still contained detectable microcystin after 42 days. Higher DOC concentrations promoted bacterial growth and rapid microcystin degradation. Microcystin degradation just occurred after 30 days in the absence of bacteria, illustrating their importance in this process. However, Gram negative bacteria strains isolated during the tests were not able to biodegrade microcystin.

Keywords: Cyanobacteria, microcystins, biodegradation, dissolved organic carbon, bacteria.

RESUMEN

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBONO ORGÂNICO DISUELTO EN BACTERIAS DE DEGRADACIÓN DE MICROCISTINAS (CIANOTOXINAS). El proceso de degradación de microcistinas está relacionado con diversos factores tales como: su concentración inicial, los microorganismos presentes, la temperatura del agua, el pH y la disponibilidad de fuentes de carbono orgánico, entre otros. El objetivo de este trabajo fue verificar el proceso de degradación de microcistinas en aguas con diferentes concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) y la influencia de la comunidad bacteriana en la biodegradación de microcistinas. Para ello, un extracto acuoso semi-purificado de microcistinas fue adicionado al agua del Lago de Jacarepaguá (RJ), previamente diluido en agua desionizada para obtener las concentraciones de 28, 43 y 60mg L⁻¹ de COD con bacterias presentes, y de 43 y 60mg L⁻¹ en ausencia de bacterias. Durante el ensayo, fueron determinadas las concentraciones de microcistinas y cuantificadas las poblaciones bacterianas. Los resultados mostraron que las mayores concentraciones de COD (43 y 60mg L⁻¹), las cuales presentaban 10⁷ colonias mL⁻¹ de bacterias, favorecen la total biodegradación de microcistinas en 14 días. Por otra parte, en una concentración de 28mg L⁻¹ de COD, con 10⁵ colonias mL⁻¹, fue posible detectar 12.8 µg microcistinas L⁻¹ pasado los 42 días. Las mayores concentraciones de COD promovieron el crecimiento bacteriano y fueron más eficientes en la degradación de microcistinas. Fue posible observar que en ausencia de bacterias, los procesos de degradación de microcistinas fueron bastante lentos, confirmando los resultados anteriores que muestran la importancia de la actividad bacteriana en la biodegradación de microcistinas. No fue verificada la degradación de microcistinas por las bacterias Gram negativas aisladas.

Palabras claves: Cianobacterias, microcistinas, biodegradación, carbono orgánico disuelto, bacteria.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos procariotos capazes de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio (O₂). A sua capacidade de crescimento nos mais diferentes ambientes é uma das características marcantes desse grupo que apresenta estruturas e sistemas enzimáticos específicos que lhes conferem grande plasticidade adaptativa (Azevedo 1998).

A dominância de cianobactérias vem sendo associada a fatores ambientais característicos, tais como: regime de mistura com estratificação duradoura da coluna d'água (Reynolds 1987) ou diária (constância ambiental) (Ganf 1974); baixa disponibilidade luminosa (Zevenboom & Mur 1980, Smith 1986); reduzida razão zona eufótica/zona de mistura (Jensen *et al.* 1994); elevadas temperaturas (Shapiro 1990); pH elevado e baixa disponibilidade de CO₂ (King 1970, Shapiro 1990, Caraco & Miller 1998); alta concentração de P-total (McQueen & Lean 1987, Watson *et al.* 1997); baixos teores de N-total (Smith 1983) e de nitrogênio inorgânico dissolvido (Blomqvist *et al.* 1994) e baixa razão N/P (Smith 1983). Além do fato delas apresentarem vantagens adaptativas para estocar fósforo, capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, habilidade para minimizar

herbivoria e para fluuabilidade (Pettersson *et al.* 1993, Haney 1987, Reynolds 1987, 2006, Paerl 2006)

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

As cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos, de acordo com suas estruturas químicas: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Entretanto, por sua ação farmacológica, as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são as neurotoxinas e hepatotoxinas.

As neurotoxinas têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos e são produzidas por espécies incluídas nos gêneros: *Anabaena*,

Aphanizomenon, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael *et al.* 1990, Mahamood & Carmichael 1986, Sivonen *et al.* 1989, Hawser *et al.* 1991, Lagos *et al.* 1999). Estas toxinas interferem no funcionamento do sistema nervoso e frequentemente causam a morte em poucos minutos pela indução da paralisia dos músculos respiratórios (Carmichael 1994).

No entanto, os tipos mais comuns de cianotoxinas são as hepatotoxinas (peptídicas ou alcalóides hepatotóxicos). As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Umezakia* e *Aphanizomenon* (Chorus & Bartram 1999). A maioria das hepatotoxinas, até agora caracterizada, são heptapeptídios cíclicos conhecidos como microcistinas ou um pentapeptídeo chamado nodularina, e ainda um alcalóide hepatotóxico, chamado de cilindrospermopsina (Luukkainen *et al.* 1994, Harada *et al.* 1996).

As microcistinas (MCYSTs) foram as primeiras hepatotoxinas identificadas, isoladas da espécie *Microcystis aeruginosa* (Bishop *et al.* 1959). A estrutura dessas microcistinas foi determinada como sendo um heptapeptídeo monocíclico, composto de três D-aminoácidos, dois L-aminoácidos e dois aminoácidos não usuais: N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico, conhecido abreviadamente como Adda (Luukkainen *et al.* 1994).

Atualmente são conhecidos mais de 70 tipos diferentes de MCYSTs. A diferença estrutural das mesmas depende principalmente da variação de um dos dois L-aminoácidos e da presença ou ausência de grupos metilados em β -Me-Asp e/ou Mdha (Spoof *et al.* 2003).

As microcistinas são extremamente tóxicas para animais e já foram envolvidas em acidentes de intoxicação em humanos levando-os a morte e também em casos de envenenamento em animais (Jochimsen *et al.* 1998, Duy *et al.* 2000).

Essas hepatotoxinas provocam danos no fígado por promoverem uma desorganização dos microfilamentos de actina que compõe parte do citoesqueleto (Runnegar & Falconer 1986). Esta desorganização leva a uma densa agregação desses microfilamentos para o centro da célula, que resulta

na perda do suporte celular. Com a destruição das células parenquimais e sinusoidais do fígado, ocorre hemorragia intra-hepática e o choque hipovolêmico, causando morte entre poucas horas a poucos dias (Carmichael 1994, Lambert *et al.* 1994).

Além disso, já é conhecida a sua capacidade de inibição das proteínas fosfatases tipo 1 e 2A de células eucariontes (Mackintosh *et al.* 1990, Matsuhima *et al.* 1990, Yoshizawa *et al.* 1990). Também são reconhecidas como promotoras de tumores hepáticos (Falconer 1991, Fujiki 1992, Nishiwaki-Matsuhima *et al.* 1992).

A toxicidade das MCYSTs em animais de laboratório apresenta DL_{50} (i.p.) entre 25 e 150 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corpóreo e entre 5.000 e 10.900 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corpóreo por administração oral (Chorus & Bartram 1999).

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

O tratamento químico da água com sulfato de cobre remove células de *Microcystis*, porém resulta na lise das células e liberação de microcistinas para água. As microcistinas são quimicamente estáveis em soluções aquosas e uma vez liberadas das células podem persistir na coluna d'água por um longo período (Watanabe *et al.* 1992).

Vários tratamentos químicos da água vêm sendo propostos, no entanto, é possível que esses tratamentos possam gerar substâncias carcinogênicas e até substâncias mutagênicas (Rook 1974, Hemming *et al.* 1986, Acero *et al.* 2005). A biodegradação pode ser uma alternativa de tratamento da água para remoção de toxinas de cianobactérias.

Nos últimos anos, vem sendo reportada a capacidade de algumas bactérias em degradar cianotoxinas. Em 1994, Jones *et al.* isolaram uma bactéria capaz de degradar microcistina-RR e LR, mas não foi capaz de degradar nodularina. Bourne *et al.* (1996) verificaram que microcistina-LR permaneceu ativa

na coluna d'água durante 2 semanas, até a ocorrência de uma proliferação de bactérias que degradaram essa cianotoxina, sendo ainda detectada uma pequena concentração após 1 mês. Watanabe (1996) também verificou que microcistina-LR e -YR eram degradadas mais rapidamente em meio de cultivo com bactérias do que na água destilada.

Bourne *et al.* (1996) descreveram a via de degradação enzimática da MCYT-LR por uma cepa de *Sphingomonas* sp. Essa via de degradação consiste na hidrólise seqüencial das ligações peptídicas entre Arg-Adda, Ala-Leu e entre Adda-Glu, onde os produtos intermediários de degradação formados são a MCYST linearizada (H-Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-OH), um tetrapeptídeo (H-Adda-Glu-Mdha-Ala-OH) e o Adda, respectivamente. Hyenstrand *et al.* (2003) encontrou o dióxido de carbono como o principal produto final da degradação de MCYSTs.

Entretanto, pouco se sabe sobre o processo de degradação das microcistinas em águas com diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD). O COD origina-se principalmente da decomposição de plantas aquáticas e animais e a partir de produtos de excreção destes organismos. Os principais componentes de COD são: ácido glicólico, proteínas, carboidratos, peptídeos, aminoácidos, enzimas, substâncias voláteis, aldeídos, cetonas, aminas e outros compostos estimuladores ou inibidores de crescimento (Esteves 1998, Foog 1977).

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

METODOLOGIA

Os extratos de microcistinas (MCYSTs) foram obtidos a partir do cultivo da cepa NPLJ-4 da espécie *Microcystis aeruginosa* isolada da Lagoa de Jacarepaguá – RJ. Esta cepa foi isolada da referida lagoa que vêm apresentando florações constantes de cianobactérias.

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

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

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

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

TESTE DO EFEITO DO COD NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE MCYSTS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE BACTÉRIAS

A partir da análise da concentração de COD da água da Lagoa de Jacarepaguá e do concentrado de MCYSTs no extrato, foram feitas diluições desta água mais o extrato de MCYSTs dissolvidas, com o objetivo de obter diferentes concentrações de COD.

No teste para avaliar o efeito do COD no processo de degradação de MCYSTs na presença de bactérias, foram utilizadas as concentrações de 60, 43 e 28mg L^{-1}

de COD. A condição de 60mg L^{-1} de COD foi feita a partir de 1L de água da Lagoa de Jacarepaguá contendo $26,0\text{mg L}^{-1}$ de COD e adicionado-se a este volume $300\mu\text{L}$ do extrato de MCYSTs, totalizando $60,0\text{mg L}^{-1}$ de COD. A condição de 43mg L^{-1} de COD foi obtida a partir de 360mL da água da Lagoa de Jacarepaguá diluída em 640mL de água deionizada mais $300\mu\text{L}$ do extrato de MCYSTs. E a última condição, 28mg L^{-1} foi obtida adicionando o mesmo volume do extrato de MCYSTs em 1L de água deionizada.

O teste de degradação de MCYSTs foi realizado sob intensidade luminosa de $88\mu\text{E m}^2\text{ s}^{-1}$ e temperatura de $23\pm 2^\circ\text{C}$. Essas condições foram escolhidas por estarem mais próximas dos valores determinados no ambiente.

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

A metodologia utilizada para verificar o processo de degradação de MCYSTs na ausência de bactérias foi a mesma do experimento citado acima, o que diferiu foi que todo o material utilizado, como a água da lagoa, a água deionizada e o extrato de MCYSTs semi-purificado foram filtrados em condições assépticas em filtro de $0,22\mu\text{m}$ (Millipore). Os valores de COD testados foram de 43 e 60mg L^{-1} e as variáveis analisadas foram as mesmas já citadas, nos tempos amostrais de 0, 1, 2, 4, 8, 13, 16, 20 e 31 dias.

Todos os testes foram realizados em triplicatas.

TESTE DE ATIVIDADE BACTERIANA NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DAS MCYSTS

O objetivo desse teste foi verificar a ação das bactérias, isoladas durante o experimento do efeito de COD, na degradação das MCYSTs.

As bactérias foram isoladas através do plaqueamento em meio de cultura Mueller Hinton Broth semi-solidificado em agar, e cada cepa bacteriana Gram negativa isolada foi inoculada em 20mL solução salina 0,85% esterilizada, tendo concentração de 10^6 células mL^{-1} de bactérias e $40\mu\text{g mL}^{-1}$ de MCYSTs. A condição controle foi realizada adicionando $40\mu\text{g mL}^{-1}$ de MCYSTs em 20mL de solução salina.

A fim de promover maior crescimento bacteriano,

esse experimento foi realizado a temperatura de $30\pm 2^\circ\text{C}$ e retiradas alíquotas de 1mL nos tempos amostrais de 0, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 144 e 240 horas. O volume amostrado foi filtrado em filtro de nylon de $0,22\mu\text{m}$ (Millipore) e o filtrado utilizado para a quantificação de MCYSTs através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MCYSTS EXTRACELULARES

A semi-purificação das MCYSTs presentes no concentrado seguiu a metodologia proposta por Tsuji *et al.* (1994), onde este volume foi passado em cartucho de octadesilsilano (C18), sendo o material retido eluído com 20mL de água deionizada, metanol 20% e metanol 100%. A fração de metanol 100% foi passada em cartucho de sílica e eluída com 30mL de metanol 100% e 20mL de solução de TFA/água/metanol 100% (1:100:899 v/v). A última fração foi recolhida e evaporada à secura, sendo, ressuspensa em 2mL de metanol 50%. Esta fração foi filtrada em filtro de nylon (diâmetro de 13mm, poro de $0,45\mu\text{m}$) e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um aparelho Shimadzu com detector U. V. SPD-10A, bombas LC 10AT. As análises foram realizadas em condições isocráticas e fase reversa, sendo utilizada uma coluna analítica (Lickrospher 100 RP-18, 125mm x 4mm), com fase móvel de acetonitrila e acetato de amônio 20mM, pH 5,0 (28:72 v/v), com fluxo de 1mL min^{-1} e absorção a 238nm.

O espectro de absorção de cada pico foi analisado em uma faixa de 195 à 300nm, com auxílio de um fotodetector de diodo (SPD-M10A) Diode array (PDA), podendo-se comparar os espectros de absorção das amostras com o do padrão de microcistina-LR (Sigma). Este método apresenta um limite de detecção de $0,5\mu\text{g L}^{-1}$.

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

QUANTIFICAÇÃO DE COD

A concentração de COD foi determinada utilizando um volume de 25mL da amostra, seguindo a meto-

dologia por oxidação para combustão a alta temperatura, catalisada por platina, e posterior detecção em sensor de infra-vermelho, utilizando o aparelho Total Organic Analyzer – Shimadzu 5000.

QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

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

As colônias de bactérias com características diferentes (na coloração, no formato da colônia) foram isoladas em meio Muller Hinton Broth semi-sólido. Para classificar as bactérias como Gram negativa ou positiva foram feitos testes de coloração com cristal de violeta, fuxina e lugol, e posterior observação em microscópio óptico, o que permitiu também a classificação das mesmas em cocos ou bacilos. Testes de metabolismo fermentativo e oxidase também foram realizados utilizando kits comerciais apropriados (BR64A – Oxoid).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra que as concentrações de 43 e 60mg L⁻¹ de COD na presença de bactérias

favoreceram a degradação mais rápida das MCYSTs, a partir do 4º dia amostral, quando comparadas com a condição de 28mg L⁻¹ de COD.

Os resultados obtidos demonstram que as condições experimentais de 28, 43 e 60mg L⁻¹ de COD na presença de bactérias, até o 7º dia amostral, teve uma redução de 32, 78 e 85% nas concentrações iniciais de MCYSTs, respectivamente. A partir do 14º dia amostral não foram mais detectadas MCYSTs para as maiores concentrações de COD testadas, enquanto que na condição de 28mg L⁻¹ de COD foi possível detectar-se 12,8µg L⁻¹ de MCYSTs no último dia amostral (42 dias), o equivalente a 14% da concentração inicial (Figura 1). Cabe mencionar que embora tenha sido utilizado o mesmo volume de extrato de MCYSTs nas três condições de COD, as médias das concentrações iniciais de MCYSTs variaram de aproximadamente de 70 a 140µg L⁻¹.

A quantificação bacteriana mostrou que as maiores concentrações de COD propiciaram uma maior densidade bacteriana, atingindo a ordem de 10⁷ colônias mL⁻¹, a partir do 4º dia amostral, enquanto que na concentração de 28mg L⁻¹ de COD pode-se verificar que o crescimento das bactérias foi da ordem de 10⁵ colônias mL⁻¹, do primeiro ao último dia experimental (Tabela I).

O maior número de colônias de bactérias deter-

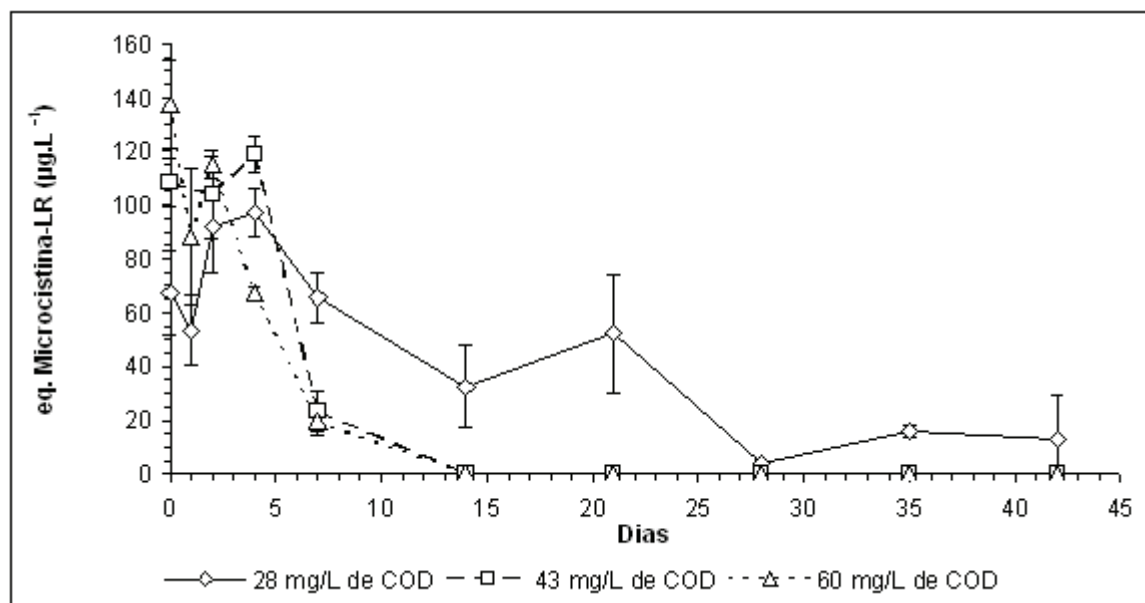


Figura 1. Variação das concentrações de microcistinas (µg L⁻¹) em diferentes concentrações de COD na presença de bactérias.

As barras representam o desvio padrão.

Figure 1. Concentration of microcystin (µg L⁻¹) in water with different concentrations of dissolved organic carbon and bacteria. Vertical bars indicate standard deviation.

minado nas concentrações de 43 e 60 mg L⁻¹ de COD provavelmente acelerou o processo de biodegradação das MCYSTs. Estudos anteriores sobre a persistência das MCYSTs também associaram a degradação de MCYSTs à presença de bactérias, mas não demonstraram esta relação diretamente (Watanabe *et al.* 1992, Kenefick *et al.* 1993, Jones & Orr 1994).

É importante ressaltar que nas condições analíticas utilizadas não foi possível verificar novos sinais nos cromatogramas que pudessem ser considerados produtos de degradação das MCYSTs. Desta forma, pode-se apenas dizer que ocorreu uma redução nas concentrações dessa molécula sem aparente formação de outros produtos. O mesmo não foi verificado por Matthiensen *et al.* (2000) que detectaram o aparecimento de outros compostos tóxicos a partir da biodegradação da molécula purificada de microcistina-LR pela atividade microbiana presente na água da lagoa dos Patos. Ishii *et al.* (2004) conseguiram observar nos cromatogramas de CLAE, a redução da área do pico da MCYST-LR e o surgimento de três novos picos ao longo do período experimental, sugerindo serem estes produtos de degradação da MCYST-LR por uma cepa de *Sphingomonas* sp. Estes mesmos autores sugerem que estes picos sejam os três produtos intermediários de degradação: MCYST linearizada, tetrapeptídeo e o Adda. Apesar do Adda ser essencial

para toxicidade e atividade inibitória da proteína fosfatase da molécula de MCYST, quando isolado, o mesmo não se apresenta tóxico (Harada *et al.* 1990). Também através da análise dos cromatogramas de CLAE, Amé *et al.* (2006) observaram o aparecimento de dois novos picos, conforme MCYST-RR foi sendo reduzida, através da biodegradação pela cepa de *Sphingomonas* sp. isolada do Reservatório de São Roque em Córdoba – AR. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Imanishi *et al.* (2005) e Tsuji *et al.* (2006), que observaram como produtos de degradação de MCYST-RR e MCYST-LR um tetrapeptídeo e o Adda.

Os resultados das análises de quantificação de MCYSTs em condições assépticas, contendo 43 e 60 mg L⁻¹ de COD, evidenciam um lento processo de degradação dessas moléculas, se comparado com os resultados obtidos no experimento na presença de bactérias. As MCYSTs não foram mais detectadas somente após 31 dias do início do experimento (Figura 2). Estes resultados estão de acordo com o relatado por Watanabe (1996) que verificou a degradação mais rápida das microcistinas LR e YR na presença de bactérias do que em água destilada.

Cousins *et al.* (1996) reportaram que a adição de sedimento rico tanto em matéria orgânica quanto em microrganismos, aumentou a taxa de

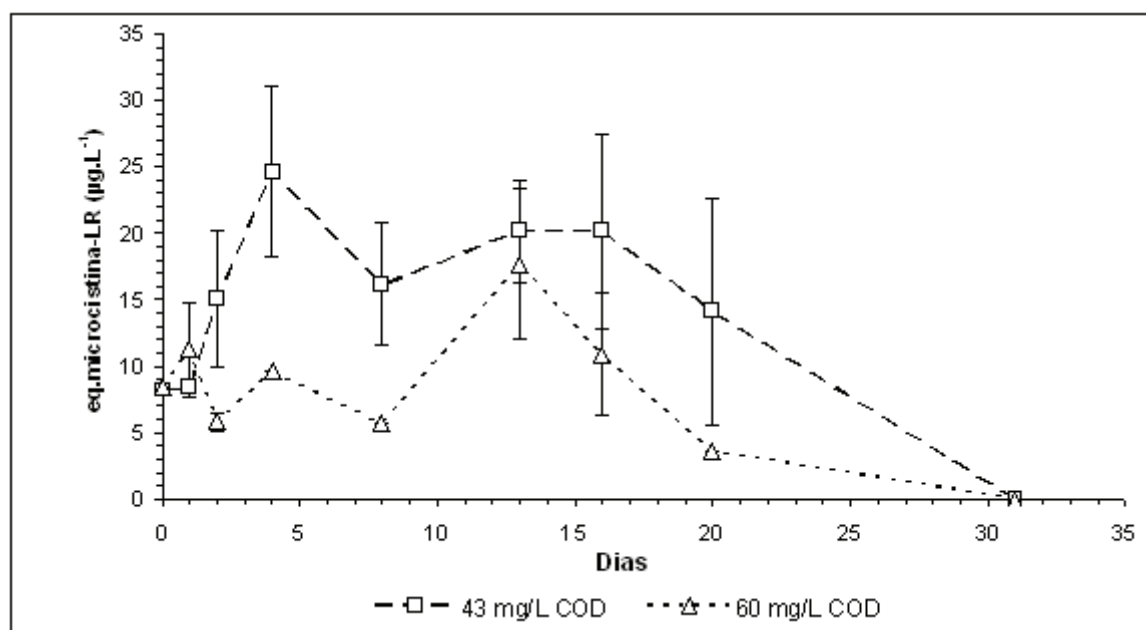


Figura 2. Variação das concentrações de microcistinas (µg L⁻¹) em diferentes concentrações de COD na ausência de bactérias.

As barras representam o desvio padrão.

Figure 2. Variation of microcystin concentration (µg L⁻¹) in water with different concentrations of dissolved organic carbon in the absence of bacteria. Vertical bars indicate standard deviation.

Tabela I. Quantificação das bactérias em diferentes concentrações de COD. * Tipos de bactérias encontradas em maior concentração.
Table I. Quantification of bacteria in different concentrations of dissolved organic carbon. * = types of bacteria found in greater concentrations

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	NÚMERO INICIAL DE BACTÉRIAS	NÚMERO FINAL DE BACTÉRIAS	TIPOS DE BACTÉRIAS *
28mg L ⁻¹ de COD	10 ⁵ colônias mL ⁻¹	10 ⁵ colônias mL ⁻¹	Bacilos gram-positivos (filamentos longos)
43mg L ⁻¹ de COD	10 ⁵ colônias mL ⁻¹	10 ⁷ colônias mL ⁻¹	Bacilos gram-negativos não fermentadores Bacilos gram-positivos (filamentos longos)
60mg L ⁻¹ de COD	10 ⁵ colônias mL ⁻¹	10 ⁷ colônias mL ⁻¹	Bacilos gram negativos não fermentadores Bacilos gram-positivos (filamentos longos)

biodegradação de MCYST-LR. Uma correlação entre decomposição do COD e a degradação de MCYSTs dissolvidas foi encontrada, indicando a importância da atividade bacteriana para degradação de MCYSTs na zona pelágica de um lago (Jones *et al.* 1994, Lathi *et al.* 1998).

É importante salientar que as concentrações iniciais de MCYSTs dissolvidas utilizadas nesse experimento em condições assépticas foram aproximadamente 11 vezes inferiores as concentrações do experimento realizado com bactérias. Mesmo assim, a degradação dessa molécula mostrou-se bastante lenta. Esse resultado evidencia a importância da comunidade bacteriana na velocidade do processo de degradação de microcistinas.

Durante o experimento realizado na presença de bactérias foi possível isolar 17 cepas de bactérias morfológicamente distintas. Destas somente quatro cepas Gram negativas isoladas foram testadas para verificar a capacidade de degradação das MCYSTs (Tabela I). A preferência por esse grupo de bactérias se deu devido aos relatos na literatura de degradação desta molécula pelas bactérias Gram-negativas (Takenaka & Watanabe 1997, Park *et al.* 2001).

No teste com as bactérias gram-negativas isoladas foi possível verificar que as bactérias selecionadas não degradaram as MCYSTs. A concentração dessa cianotoxina após 10 dias foi praticamente igual a concentração inicial de 40µg mL⁻¹. O mesmo foi determinado para a condição controle (dados não mostrados). Os resultados indicam que as bactérias testadas não utilizaram as MCYSTs como fonte de energia. Embora seja sugerido que as MCYSTs tenham um alto valor nutricional como fonte tanto de aminoácido quanto de energia para os microrganismos (Harada 1996).

As bactérias testadas não apresentaram o mesmo potencial para degradar MCYSTs que o observado por Park *et al.* (2001). Estes autores verificaram

a completa degradação de 20mg MCYST-LR ou -RR pela bactéria Gram negativa *Sphingomonas paueimobilis* em 6 dias. Segundo Takenaka & Watanabe (1997), bactérias do gênero *Pseudomonas* também são capazes de biodegradar essa molécula.

É importante ressaltar que as bactérias testadas foram seletivas ao meio de crescimento bacteriano Mueller Hinton Broth utilizado. Portanto, esse meio pode não ter favorecido o crescimento de outras bactérias presentes importantes no processo de degradação das microcistinas. Lathi *et al.* (1998) testaram a habilidade de um grande número de cepas de bactérias, isoladas de água e de sedimentos de lagoas, para degradação de MCYSTs em laboratório e verificou que somente 17% das cepas têm esta habilidade. Ame *et al.* (2006) também só conseguiu isolar 1 cepa de bactéria que fosse capaz de degradar MCYST-RR dentre as demais cepas isoladas.

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

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

REFERÊNCIAS

- ACERO, J.L.; RODRIGUEZ, E. & MERILUOTO, J. 2005. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. *Water Research* 39: 1628-1638.

- AMÉ, M.V.; ECHENIQUE, J.R.; PFLUGMACHER, S. & WUNDERLIN, D.A. 2006. Degradation of Microcystin-LR by *Sphingomonas sp.* CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba – Argentina). *Biodegradation*, 17: 447-455.
- AZEVEDO, S.M.F.O. 1998. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Consequências para a Saúde Pública. *Medicina on line*, 1: 1-22.
- BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J. & GORHAM, P.R. 1959. Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, 37: 453-471.
- BLOMQUIST, P.; PETTERSSON, A. & HYENSTRAND, P. 1994. Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv für Hydrobiologie*, 132: 141-164.
- BOURNE, D.G.; JONES, G.J.; BLAKELEY, R.L.; JONES, A.; NEGRI, A.P. & RIDDLES, P. 1996. Enzymatic pathway for bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin, microcystin-LR. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 4086-4094.
- CARACO, N. & MILLER, R. 1998. Direct and indirect effects of CO₂ on competition between a cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 55: 54-62.
- CARMICHAEL, W.W. 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78-86.
- CARMICHAEL, W.W.; MAHMOOD, N.A. & HYDE, E.G. 1990. Natural Toxins from Cyanobacteria (blue-green algae). Pp 87-106. In: S. Hall, & G. Strichartz, (eds), *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society, Washington, DC. 365p.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon on behalf of WHO. 416p.
- COUSINS, I.T.; BEALING, D.J.; JAMES, H.A. & SUTTON, A. 1996. Biodegradation of Microcystin-LR by Indigenous Mixed Bacterial Populations. *Water Research*, 30: 481-485.
- DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G. R. & CONNELL, D.W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue green algal) toxins in water. *Review of Environmental Contamination*, 163: 115-136.
- ESTEVEZ, F.A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. 2.ed. – Rio de Janeiro: Interciência. 575p.
- FALCONER, I.R. 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.
- FOOG, G.E. 1977. Excretion of organic matter by phytoplankton. *Limnology Oceanography*, 22: 576-577.
- FUJIKI, H. 1992. Is the inhibition of Protein Phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? *Molecular Carcinogenesis*, 5: 91-94.
- GANF, G.G. 1974. Diurnal mixing and the vertical distribution of phytoplankton in a shallow equatorial lake (Lake George) Uganda. *Journal of Ecology*, 62: 611-629.
- GIBSON C.E. & SMITH, R.V. 1982. Freshwater Plankton. Pp. 463-49. In: N.G. Carr, & B.A. Whitton, (eds), *The Biology of Cyanobacteria*. Botanical Monographs, Blackwell Scientific Publications, London. 688p.
- GORHAM, P. R., MCLACHLAV, J. R., HAMMER, V. T., KIM, W. K. 1964. Isolation na culture of toxic strains os *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 15: 796-804.
- HANEY, J.F. 1987. Field studies on zooplankton-Cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21: 467-475.
- HARADA, K-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F. OISHI, S.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R. & CARMICHAEL, W.W. 1990. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*, 28: 55-64.
- HARADA, K-I. 1996. Chemistry and detection for Microcystins. Pp. 103-148. In: M.F. Watanabe, K. Harada, W.W. Carmichael & H. Fujiki, (eds), *Toxic Microcystis*. CRC Press Boca Raton, MI USA. 272p.
- HAWSER, S.P.; CODD, G.A.; CAPONE, D.G. & CARPENTER, E.J. 1991. A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon*, 29: 277-278.
- HEMMING, J.; HOLOMBIM, B.; REUNANNEN, M & KRONBERG, L. 1986. Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichlor-omethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in the chlorinated drinking and humic waters. *Chemosphere*, 15:549-556.
- HUMPHRIES, S.E. & LYNE, V.D. 1988. Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. *Limnology and Oceanography*, 33: 79-91.
- HYENSTRAND, P.; ROHRLACK, T.R.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S.; CODD, G.A. & CHRISTOFFERSEN, K. 2003. Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystins-LR in lake water. *Water Research*, 37: 3299-3306.

- IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; TSUJI, K. & HARADA, K-C. 2005. Bacterial Degradation of Microcystins and Nodularin. *Chemical Research in Toxicology*, 18: 591-598.
- ISHII, H.; NISHIJIMA, M. & ABE, T. 2004. Characterization of degradation of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. *Water Research*, 38: 2667-2676.
- JENSEN, J.P.; JEPPESEN, E.; OLRİK, K. & KRISTENSEN, P. (1994) Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 51: 1692-1699.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, I.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, E.A.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O. & JAVIS, W.R. 1998. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 338: 873-873.
- JONES, G.J.; BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R.L. & DOELLE, H. 1994. Degradation of Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by Aquatic Bacteria. *Natural Toxins*, 2: 228-235.
- JONES, G.J. & ORR, P.T. 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research*, 28: 871-876.
- KENEFICK, S.L.; HRUDEY, S.E.; PETERSON, H.G. & PREPAS, E.E. 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Science and Technology*, 27: 433-440.
- KING, D.L. 1970. The role of carbon in eutrophication. *Journal of Water Pollution*, 42: 2035-2051.
- KIVIRANTA, J.K.; SIVONEN, K.; LAHTI, K.; LUUKKAINEN, R. & NIEMELA, S.I. 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins: a laboratory study. *Archiv für Hydrobiologie*, 121: 281-294.
- LAGOS, N.; LIBERONA, J.L.; ANDRINOLO, D.; ZAGATTO, P.A.; SOARES, R.M. & AZEVEDO, S.M.F.O. 1999. First evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon*, 37: 1359-1373.
- LAMBERT, T.W.; BOLAND, M.P.; HOLMES, C.F.B. & HRUDEY, S.E. 1994. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate biomass. *Environmental Science and Technology*, 28: 753-755.
- LATHI, K.; NIEMI, M.R.; RAPALA, J. & SIVONEN, K. 1998. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins-characterization of toxin degrading bacteria. Pp. 363-365. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt, (eds), UNESCO: Harmful Algae. 588p.
- LUUKKAINEN, R.; NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; RINEHART, K.L. & NIEMELÄ, S.L. 1994. Isolation and identification of 12 microcystins from strains and two bloom samples of *Microcystis* spp., structure of a new hepatotoxin. *Toxicon*, 32: 133-139.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMP, S.; COHEN, P. & CODD, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 264: 189-192.
- Mc QUEEN, D.J. & LEAN, D.R.S. 1987. Influence of water temperature and nitrogen to phosphorus ratios on the dominance of blue-green algae in lake St. George, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 44: 598-604.
- MAHMOOD, N.A. & CARMICHAEL, W.W. 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of American Chemical Society*, 111: 8021-8023.
- MATSUHIMA, R.; YOSHIGAWA, S.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; FURUSAWA, M.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. 1990. In vitro and in vivo effects of protein phosphatases inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 171: 867-874.
- MATTHIENSEN, A.; METCALF, J.S.; FERREIRA, A.H.F.; YUNES, J.S. & CODD, G.A. 2000. Biodegradation and biotransformation of microcystins by aquatic bacteria in estuarine waters from the Patos Lagoon, RS, Brasil. In: M. Sabino, D. Rodriguez-Amaya, B. Corrêa, (eds), X International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins. Organized by Instituto Adolfo Lutz, Guarujá. 208p.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGUNUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118: 420-424.
- PAERL, H.W. 2006. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. 215-141. In: H.K. Hudnell (ed): Proceedings of

- the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 952p.
- PARK, H-D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAIISHI, A. & KATO, K. 2001. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology*, 16: 337-343.
- PETTERSSON, K.; HERLITZ, E. & ISTVANOVICS, V. 1993. The role of *Gloeotrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. *Hydrobiologia*, 25: 123-129.
- REYNOLDS, C.S. 1987. Cyanobacterial water-blooms. *Advances in botanical research*, 13:67-143.
- REYNOLDS, C.S. 2006. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge. 535p
- ROBERTSON, P.K.J.; LAWTON, L.A.; CORNISH, B.J.P.A. 1999. The involvement of phycocyanin pigment in the photodecomposition of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 3: 544-551.
- ROOK, J.J. 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Journal of Water Treatment and Examination*, 23: 234-243.
- RUNNEGAR, M.T.C. & FALCONER, I.R. 1986. Effects of toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicology*, 4: 330-352
- SHAPIRO, J. 1990. Currents beliefs regarding dominance by blue-greens: the case of the importance of CO₂ and pH. *Verhandlungen des Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 24: 38-54.
- SIVONEN, K.; HIMBERG, K.; LUUKKAINEN, R.; NIEMELA, S.; POON, G.K. & CODD, G.A. 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*, 4: 339-352.
- SMITH, V. 1983. Low nitrogen to phosphorous ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, 221: 669-671.
- SMITH, V. 1986. Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 43: 148-153.
- SPOOF, L.; VESTERKVIK, P.; LINDHOLM, T. & MERILUOTO, J. 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, Including Electrophoresis, Mass Spectrometry and other Separation and Detection Methods*, 1020: 105-19.
- TAKENAKA, S. & WATANABE, M.F. 1997. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 34: 749-757.
- TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T. & HARADA, K-I. 2006. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. *Chemosphere*, 65: 117-124.
- TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; WATANABE, M.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; SHIMADA, T. & HARADA, K-I. 1994. A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxin*, 32:1251-1259
- YOSHIZAWA, S.; MATSUHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W. & FUJIKI, H. 1990. Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 116: 609-614.
- WATANABE, M.F.; TSUJI, K.; WATANABE, Y.; HARADA, K-I. & SUZUKI, M. 1992. Release of heptapeptide toxin (microcystins) during the decomposing process of *Microcystis aeruginosa*. *Natural Toxins*, 1: 48-53.
- WATANABE, M.F. 1996. Production of Microcystins. Pp. 35-56.01. In: M.F. Watanabe, K. Harada, W.W. Carmichael & H. Fujiki, (eds), *Toxic Microcystis*. CRC Press Boca Raton, MI USA. 262p.
- WATSON, S.B.; MC CAULEY, E. & DOWNING, J.A. 1997. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography*, 42: 487-495.
- ZEVENBOOM, W. & MUR, L.R. 1980. N₂-fixing cyanobacteria: Why they do not become dominant in Dutch, hypertrophic lakes. *Developments in Hydrobiology*, 2: 123-130.

Submetido em 31/10/2008.

Aceito em 28/01/2009.