



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELISABETE HIROMI HASHIMOTO

**AVANÇO METODOLÓGICO NO BIOCONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS TOXIGÊNICAS COM ÊNFASE A
DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR E BIOENSAIO NA
QUALIDADE DE ÁGUA E PISCICULTURA**

Londrina
2007

ELISABETE HIROMI HASHIMOTO

**AVANÇO METODOLÓGICO NO BIOCONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS TOXIGÊNICAS COM ÊNFASE A
DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR E BIOENSAIO NA
QUALIDADE DE ÁGUA E PISCICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Co-orientador: Prof. Dr. Ken-ichi Harada, PhD

Londrina
2007

ELISABETE HIROMI HASHIMOTO

**AVANÇO METODOLÓGICO NO BIOCONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS TOXIGÊNICAS COM ÊNFASE A
DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR E BIOENSAIO NA
QUALIDADE DE ÁGUA E PISCICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka – UEL

Prof. Dr. Eduardo Vicente ITAL

Profa. Dr. Dalva Trevisan Ferreira – UEL

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense – UEL

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho – UNESP

Suplentes

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho – UFSC

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus – UEL

Londrina, 27 de julho de 2007.

A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.

(Horácio)

Esta Tese de Doutorado não resultou de um ato solitário, contando ao longo do seu desenvolvimento com colaboradores e incentivadores que tornou possível, com a bênção de Deus a conclusão desta importante etapa de minha vida.

Agradeço aos meus pais, pelo amor incondicional, cuja certeza é essencial em minha vida.

Agradeço aos mestres sábios e experientes pela arte de formar recursos humanos.

Agradeço aos amigos de sempre, que dão brilho a minha vida com sorrisos simples, palavras de apoio, choros de alegria e risadas à toa.

Agradeço ao meu amor, que preenche meu coração, estando sempre presente.

Agradeço a Deus, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka, pelo incentivo, confiança, oportunidades, compreensão das minhas dificuldades e orientação proporcionando amadurecimento científico e profissional.

Ao Prof. Dr. Ken-Ichi Harada, da Universidade de Meijo do Japão, pelo incentivo, confiança e exemplo profissional.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na formação acadêmica.

À Chefia e Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, pela oportunidade de estágio no exterior através da bolsa sandwiche e apoio financeiro.

À Fundação Araucária, CNPq, JICA, FINEP, SIGEP e Fundo SETI pelo apoio financeiro.

À comissão examinadora pela disponibilidade e contribuição.

À Companhia de Saneamento do Paraná – SANEPAR, por disponibilizar a estação de tratamento de esgoto São Lorenço, Londrina-PR para coleta de amostras de água.

*À Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz – ESALQ/Piracicaba, por disponibilizar os cultivos de *Microcystis aeruginosa*.*

À Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL, pela colaboração e orientação nos ensaios de genotoxicidade.

À Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL, pelo incentivo, colaboração no ensaio imunoistoquímico.

Ao Mauro Caetano Filho e Heitor Frossard do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL, por disponibilizar os animais, instalações na piscicultura. Ao Jurandir Batista, Waldemar Ferreira da Silva, Valdenir da Silva pelo auxílio durante a execução do experimento.

À Profa Dra. Sandra Cesário, Prof Dr Fernando Fernandes e Dra Emília Kuroda do Depto de Engenharia Sanitária-CTU-UEL, pelas valiosas sugestões.

À Profa. Dra. Elisabete Y. Sataque Ono e Mário Augusto Ono, pelo incentivo e sugestões.

À Profa Dra Cláudia B. R. Martinez pelas sugestões e ensinamentos na área de fisiologia de peixes.

À Profa Dra Eiko Itano pelo incentivo e sugestões.

À Patrícia Sambatti e Sandra Rezende pela colaboração, auxílio e prontidão.

Aos amigos da Universidade de Meijo – Japão Yoshito Kawasaki, Hajime Kato, Masahiko Tachi, Masateru Hasegawa Tsuyoshi Mayumi, e tantos outros pela recepção, colaboração, abrigo e principalmente pela amizade.

A Dra Kiyomi Tsuji, Dra Emiko Ito, Dr Atsukabe pelo apoio, incentivo e valiosas sugestões.

À Profa Dra Tatsuko Sakai por disponibilizar o Centro de Análises da Faculdade de Farmácia, Universidade de Meijo para análise em LCMS.

À Anie Ieda Francabandiera, pela contribuição e colaboração no ensaio biológico e amizade.

À Ana Paula M. E. S. Trad, pela contribuição com a análise histológica, colaboração e amizade.

À Tatiana Perez Vanzela, pela colaboração nas análises de cometa e pela amizade.

À Letícia Schiavo pela amizade e colaboração nas coletas de amostras e processamento das análises de cometa, micronúcleo e histológica.

Aos Doutores e amigos Alexandre Rodrigo Coelho e Simone Fujii, pelo auxílio, dedicação, companheirismo e alegria durante todo o trabalho e, sobretudo amizade.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Luciana Hayashi, Márcia Kamogae, Luciana Bernd, Joice Sifuentes dos Santos, Cássia R. Takabayashi, Marcelo Silva, Ricardo Reche, Cleiton Ramos, Tatiane de Oliveira, Elaine Moreno, Alexandre Morey pela amizade e suporte.

Aos amigos sempre presentes, mesmo na distância, Caroline M. Caliari, Alessandra Braga Ribeiro, Cláudio Ueno, Camilla de Pádua, Edson Luiz Zangrando Figueira, Carlos José Ono, Natalia Dincao, Suzana Hashimoto, Neusa Seibel, Flávio H. Itano.

Aos amigos e colegas Rafael Dias, Luis Rodrigo, Marly Katsuda, Vanessa Dias, Rubia Casagrande, Valeria Garcia Pereira, Laisiane da Nóbrega, Lyssa Sakanaka, Elvis Perboni, Ana Augusta, Luciane Yoshiara, Michele Rossi, Denis Marchi, Marcos Giovanni Celli Alexandre Sasaki, Daniel, Josimeire, Fernando Fracão, Marcos, Heberty, pela alegria, companheirismo e momentos de descontração, tornando mais suaves os dias mais difíceis;

À Marli, Berenice, Elza Youssef, Nelson, Alessandra, D. Marília, Célia, Alice, Rubens, pela colaboração.

Aos meus pais Takashi Hashimoto e Kazue T. Hashimoto pela educação, incentivo e amor.

Aos meus familiares, principalmente aos irmãos Marisa T. Hashimoto Yamada, Eni Megumi Hashimoto, Jorge Minoru Hashimoto, Flávio Yuiti Hashimoto e a minha avó Matsuko Hashimoto pelo apoio e amor.

Aos meus queridos primos Wayner Hashimoto, Érica Hashimoto, Eliane Hashimoto, Kanji Takahashi, Helena Takahashi e tios Emília Kuriki, Mamoru Hashimoto, Michiko Hashimoto pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

Aos amigos que tornaram a saudades do Brasil mais amena D. Kajihara, Yoko Sakumoto, Ines Mari, Teruo e Masahiro Matsuda.

Aos meus avós (in memoriam) Toshio Hashimoto, Masuko e Katsuji Takahashi pelo exemplo de vida.

Ao Fernando Menegon Basso pelo amor, confiança, companheirismo e amizade sempre.

Aos peixes que literalmente deram a vida ao meu trabalho.

A todos que colaboraram afetiva e efetivamente para a realização deste trabalho.

HASHIMOTO, E.H. **Avanço Metodológico no Biocontrole de Cianobactérias Toxigênicas com Ênfase a Degradação de Microcistina-LR e Bioensaio na Qualidade de Água e Piscicultura**. 2007. 137f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A freqüente ocorrência de floração de cianobactéria toxigênica e a ineficiência do tratamento de água convencional para remoção de microcistina (MC) tornaram relevante o desenvolvimento de alternativa para prevenir ou diminuir o risco de contaminação. Rações utilizadas na piscicultura são compostas por grão susceptível à contaminação com aflatoxina B₁ (AFB₁) e seu manejo inadequado favorece a eutrofização da água. A interação de *Microcystis aeruginosa* e AFB₁ foi avaliada em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os ensaios de genotoxicidade cometa e micronúcleo (MN) e a imunistoquímica (IHQ) para detecção de MC em peixe foram aplicados, visando métodos adequados para o monitoramento destes contaminantes. Amostras de água foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE São Lourenço, Londrina-PR) com objetivo de isolar antagonistas contra cianobactéria. O mecanismo de biodegradação de MCLR pela cepa B9 foi investigado através do método avançado de Marfey e ESI-LCMS (*Electrospray Ionization – Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) para detecção dos produtos da biodegradação. O ensaio com tilápias (N=96) foi realizado através de exposição intraperitoneal (ip) de AFB₁ (10µg/Kg) e extrato celular de *M. aeruginosa* cepa CCBUSP262 nas doses de 2x10⁵, 4x10⁵ e 1x10⁶ céls/Kg (0,602, 1,204 e 3,011 µg/Kg de 7D-MCLR) e exposição por imersão em 1x10⁴ e 1x10⁵ céls/mL e em doses cumulativas de 1x10⁴, 2x10⁴ e 5x10⁴ céls/mL (30,1, 60,2, 150,5 e 301 µg/L de 7D-MCLR). Para seleção de microrganismos com atividade anti-cianobactéria, as cepas *Microcystis aeruginosa* NIES 298, *M. viridis* NIES 102, *Anabaena mendotae* NIES 808, *Phormidium tenue* NIES 611 foram inoculadas com cada isolado e após 0, 24, 48, 72 e 96 h a absorbância do extrato da biomassa foi medida em 405 e 665 nm. Uma colônia de cada isolado foi adicionada em 10 µg/mL de MCLR e após 0, 24, 48 e 72h foi analisado por CLAE. O método avançado de Marfey, utilizando derivatização com L-FDLA (L-1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-alaninamida) foi padronizado e aplicado para análise dos produtos de biodegradação de MCLR (1mg/mL) pela cepa B9. A freqüência de MN e escore de cometa mostraram efeito mutagênico e genotoxicidade sinérgica do extrato celular de *M. aeruginosa* com AFB₁ (ip). A IHQ detectou MC em todos os fígado de peixe ip inoculados e imersos a 1x10⁵cells/mL (301µg/L de 7D-MCLR). Embora MC não tenha sido detectada no músculo (comestível) a resistência dos peixes às doses mostrou possibilidade de contaminação e risco na cadeia alimentar. Entre os 35 isolados, apenas 7 microrganismos mostraram atividade antagônica contra *M. aeruginosa* NIES 298 e nenhum foi capaz de degradar MCLR. Os resultados indicaram potencial para isolamento de microrganismos antagonistas em pontos de ocorrência de florações. Peptídeos e aminoácidos derivatizados com L-FDLA foram detectados por ESI-LCMS. A biodegradação de MCLR pela cepa B9, inicia-se pela linearização de MCLR que é clivada formando Adda-Glu-Mdha-Ala e Arg-βMeAsp-Leu. O tetrapeptídeo é preferencialmente degradado em Adda e Glu-Mdha-Ala, sendo este degradado em Glu-Mdha e Mdha-Ala. A ligação βMeAsp-Leu é clivada cujo principal produto é Arg-βMeAsp. Entre os resíduos de aminoácido Arg, Adda e Mdha foram detectados como produtos finais da biodegradação. A identificação destes compostos é uma ferramenta importante para entender a atividade enzimática hidrolítica da cepa B9 nos processos de detoxificação de microcistina.

Palavras-chave: Microcistina. Biocontrole. Monitoramento. Piscicultura.

HASHIMOTO, E.H. **Methodological Advances in Biocontrol of Toxic Cyanobacteria with emphasis in Microcystin-LR Biodegradation and Bioassay on Water Quality and aquaculture**. 2007. 137p. Tesis (Doctor Degree in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The frequently toxic cyanobacteria bloom and inadequate removal of microcystin (MC) by conventional water treatment, the development of alternative to prevent and reduce contamination risk become a topic in concerning. Fish feed is composed by grains susceptible to aflatoxin B₁ (AFB₁) contamination and inadequate feeding management enhances water eutrophication. The interaction between *Microcystis aeruginosa* and AFB₁ was evaluated in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comet and micronucleous (MN) assay to evaluate effect of genotoxicity and immunohistochemistry (IHC) for MC detection in fish were applied to have in view suitable and profitable monitoring method. Water were sampled from Sewage treatment of Londrina (ETE São Lourenço, Londrina-PR) aiming to select antagonists against cyanobacteria. The MCLR biodegradation pathway by B9 strain was investigated using the advanced Marfey's method and ESI-LCMS (*Electrospray Ionization- Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) for biodegradation products detection. The bioassay with tilapia (N=96) was carried out with intraperitoneal (ip) exposure of AFB₁ (10 µg/Kg) and *M. aeruginosa* BCCUSP262 cellular extract at 2x10⁵, 4x10⁵ e 1x10⁶ cells/Kg (0.602, 1.204 and 3.011 µg/Kg of 7D-MCLR) and immersion exposure 1x10⁴ e 1x10⁵ cells/mL and cumulative doses at 1x10⁴, 2x10⁴ e 5x10⁴ cells/mL (30.1, 60.2, 150.5 and 301 µg/L of 7D-MCLR). To select microorganisms with anti-cyanobacteria activity the strains *Microcystis aeruginosa* NIES 298, *M. viridis* NIES 102, *Anabaena mendotae* NIES 808, *Phormidium tenue* NIES 611 were inoculated with each isolated and after 0, 24, 48, 72 and 96 h the absorbance of biomass extract was measured at 405 and 665 nm. One colony of each isolated was added to 10 µg/mL of MCLR and after 0, 24, 48 e 72 h was analyzed by HPLC. The advanced Marfey method with L-FDLA (L-1-fluor-2,4-dinitrophenyl-5-alaninamide) derivatization was standardized and applied for detection of biodegradation products of MCLR (1 mg/mL) by B9 strain. The MN frequency and comet score showed synergic mutagenic and genotoxic effects of *M. aeruginosa* cellular extract interaction with AFB₁ (ip). The IHC detected MC in all ip inoculated fish liver and immersed at 1x10⁵ cells/mL (301 µg/L de 7D-MCLR). Although MC has not been detected in edible muscle, fish doses resistance showed the possibility of contamination and risk in the food chain. Among 35 microorganisms isolated, only 7 microorganisms showed antagonistic activity against *M. aeruginosa* NIES 298 and none was able to degrade MCLR. The results indicated the potential of antagonist isolation at bloom occurrence point. L-FDLA derivatization detected amino acid residues and peptides. The biodegradation of MCLR by B9 strain begins by MCLR linearization that is degraded to Adda-Glu-Mdha-Ala and Arg-βMeAsp-Leu. The tetrapeptide is mainly degraded in Adda and Glu-Mdha-Ala, which is cleaved as Glu-Mdha and Mdha-Ala. The linkage between βMeAsp-Leu is cleaved, forming mainly dipeptide Arg-βMeAsp. Among amino acid residues we detected Arg, Adda and Mdha, as MCLR biodegradation final products. The identification of these compounds is an important tool to understand the hydrolytic enzymatic activity of B9 strain in the microcystin detoxification process.

Keywords: Microcystin. Biocontrol. Monitoring. Aquaculture.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Etapas para desenvolvimento de biocontrole de cianobactérias.....	23
Fluxograma 2 – Etapas de metodologia físico-química na análise de cianotoxinas	31
Fluxograma 3 – Delineamento experimental geral da pesquisa	56
Fluxograma 4 – Delineamento experimental do bioensaio com Tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas à extrato celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> e Aflatoxina B ₁	57
Fluxograma 5 – Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> , preparo do extrato celular, extração e análise de microcistina	58
Fluxograma 6 – Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa para avaliação de efeitos genotoxicológicos da interação Aflatoxina B ₁ e extrato celular de <i>Microcystis aeruginosa</i>	59
Fluxograma 7 – Ensaio imunistoquímico para detecção de microcistina em tecido hepático e muscular de Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	60
Fluxograma 8 – Seleção de microrganismos antagonicos contra cianobactérias toxigênica	61
Fluxograma 9 – Aplicação do método avançado de Marfey para elucidação do mecanismo de biodegradação de MCLR pela cepa B9	62

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Estrutura química de microcistina	18
Figura 2 – Estrutura química de 1-Flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-leucinaminamida (FDLA), ligação com L- aminoácido e representação da conformação	29
Figura 3 – Estrutura química de Aflatoxina B1	50
Figura 4 – Biotransformação de Aflatoxina B1 por reação de epoxidação	50

Artigo 1

Figure 1 – Chemical structure and mass spectra of 7D-MCLR analysed by LC/ITMS ²	72
Figure 2 – Comet class 0. 1. 2 and 3 in <i>O. niloticus</i> blood sample, exposed to AFB ₁ and <i>M. aeruginosa</i> cell extract	72
Figure 3 – Micronucleous in <i>O. niloticus</i> erythrocyte, exposed to AFB ₁ and <i>M. aeruginosa</i> cell extract	73
Figure 4 – Comet Score average in <i>O. niloticus</i> : ip AFB ₁ , immersion or ip EMC, and AFB ₁ +EMC interaction.....	74
Figure 5 – Micronucleus frequency (‰) average in <i>O. niloticus</i> : ip AFB ₁ , immersion or ip EMC, and AFB ₁ +EMC interaction.....	75
Figure 6 – Immunohistochemistry of Nile Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) <i>Microcystis aeruginosa</i> CCBUSP262 exposed, MC marcation in liver (in Brow, A) and negative immuno reaction (B)(100 X).....	76
Figure 7 – Immunohistochemistry of Nile Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) <i>Microcystis aeruginosa</i> CCBUSP262 exposed, negative immuno reaction in muscle (100 X)	76

Artigo 2

Figura 1 – Efeito antagônico de 7 isolados obtido de ETE contra <i>M. aeruginosa</i> NIES 298 (A); Isolado R2P5 inibindo <i>M. aeruginosa</i> NIES 298 (incolor) e respectivo controle negativo (verde) após 96h de cultivo (B).....	88
---	----

Figura 2 – Cromatografia em Camada Delgada de extrato celular do isolado R2P5, fase móvel isopropanol:água:amônia (80:15:5).....	88
Figura 3 – (a) Perfil cromatográfico do isolado EFA7 inoculado com MCLR em 0 e 72 h; (b) perfil cromatográfico e espectro de absorção máxima de Adda a partir da cepa B9 (controle positivo) inoculado com MCLR após 24 h; (c) perfil cromatográfico e espectro de absorção máxima dos picos A e B a partir do isolado R2P5 inoculado com MCLR em 0 h	89
 Artigo 3	
Figure 1 – Microcystin-LR structure	91
Figure 2 – MCLR Biodegradation process by B9 crude cell, B9 cell extract and B9 washed cell, analyzed by HPLC and confirmed with LCMS at 238 nm UV detector	100
Figure 3 – Selected ion chromatogram and mass spectra of MCLR degradation products: tetrapeptide and tripeptides derivatized with L-FDLA.....	101
Figure 4 – Selected ion chromatogram and mass spectra of MCLR degradation product: Adda and Glu-Mdha and Mdha-Ala derivatized with L-FDLA.....	102
Figure 5 – Selected ion chromatogram and mass spectra of N-Methyl derivatized with L-FDLA, from Mdha residue	103
Figure 6 – B9 strain biodegradation behavior of Adda-Glu-Mdha-Ala tetrapeptide from MCLR.....	103
Figure 7 – Selected ion chromatogram and mass spectra of MCLR degradation product tripeptide derivatized with L-FDLA	104
Figure 8 – B9 strain biodegradation behavior of Arg-βMeAsp-Leu tripeptide from MCLR.....	105
Figure 9 – MCLR biodegradation pathway using B9 washed cell	106

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Table 1** – Comet classification and damaged nuclei average in *Oreochromis niloticus* erythrocyte exposed to AFB₁ 10µg/Kg and *M. aeruginosa* BCCUSP 262 extract..... 77
- Table 2** – Immunohistochemistry reaction using avidin-biotin peroxidase and polymer peroxidase system 77
- Table 3** – Immunohistochemistry using M8H5-MAb and polymer peroxidase system in liver and muscle of tilapia exposed to *M. aeruginosa* BCCUSP 262 extract..... 78

Artigo 2

- Tabela 1** –Identificação (provável) dos microrganismos isolados em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto São Lorenço, Londrina-PR..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

% – Porcentagem	IL-1, -6 – interleucinas 1 e 6
‰ – Por mil	Kg – Quilograma
Adda – (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6- ácido dienóico.	Km – Quilômetros
AFB₁ – Aflatoxina B ₁	kV – Quilovolt
AFBO – epóxido de AFB ₁ -8,9B.	L – Litro
ABPx – Avidin biotin peroxidase	LCMS – Liquid chromatography-mass spectrometry
AFL – aflatoxicol	LC/ITMS – Liquid chromatography/ion trap mass spectrometry
AFLAs – aflatoxinas.	Leu – Leucina
Ala – alanina	L-FDLA – 1-Flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-leucinaminamida
ALT – alanina aminotransferase	LMP – Low melting point
API – <i>atmospheric pressure ionization</i>	LPS – lipopolissacarídeos
Arb – arbitrária	LR – leucina-arginina
Arg – arginina	LW – leucina-tirosina
AST – aspartame aminotransferase	m/z – massa/carga
C – coagulação	m – Metros
CAT – catalase	MAb – Monoclonal antibody
CB9 – crude B9 cell	MCLR – microcistina-LR
CCBUSP – Centro de ciências biológicas da Universidade de São Paulo	MCs – Microcistinas
CCD – cromatografia em camada delgada	Mdha – N-metildehidroalanina
céls – células	mg – Miligrama
CG – cromatografia gasosa	min – Minuto(s)
CIA – coluna de imunoafinidade	mL – Mililitro
CID – <i>collision induced dissociation</i>	MMPB – ácido 2 metil-3metoxi-4fenil-butírico.
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	MN – micronúcleo
D-βMeAsp – β-eritro-β-metil ácido aspártico.	MS – <i>Mass spectrometry</i>
DAB – dihydrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride	MS/MS – método de espectrometria por massa em tandem
D-Ala – D-alanina	n.d. – não detectável
DEN – dietilnitrosamina	NO – óxido nítrico
D-Glu – γ-ácido glutâmico	° C – Graus Celsius
DmAdda – ácido 3-amino-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E dienóico	ODS C₁₈ – <i>octadecyl silanized silica</i>
7D-MCLR – 7 desmethyl-MCLR	PBS – Phosphate Buffer Saline
EB9 – B9 cell extract	PCR – Polimerase Chain Reaction
EC – eletroforese capilar	PDA – <i>photo diode array</i>
ELISA – <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	PMSF – fenilmetil sulfonil fluoreto
EMC – extrato celular <i>Microcystis aeruginosa</i>	p-NPP – fosfato de <i>p</i> -nitrofenol
Eros – espécies reativas de oxigênio.	PP1 – proteína fosfatase 1
ESI – <i>electrospray ionization</i>	PP2A – proteína fosfatase 2A
ex. – exemplo	Px – peroxidase
F – floclulação	RR – arginina-arginina
FAB – <i>Fast Atomic Bombardment</i>	S – sedimentação.
FDAA – 1-Flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida	seg – Segundo (s)
g – grama	SIM – Selected ion monitoring
° GL – graus Gay Lussac	SOD – superóxido dismutase.
GSH – glutationa	TNFα – fator de necrose tumoral alfa
GSH-Px – peróxido de glutationa	TOF – Time-of-flight
GSTm – glutationa S transferase microsomal	UV – Ultravioleta
GSTs – glutationa S transferase solúvel	V – Volts
h – Hora(s)	YR – tirosina-arginina
i.e. – Isto é	WB9 – B9 washed cell
IHQ – imunoistoquímica	µg – Micrograma
IHC – imunohistochemistry	µL – Microlitro
ip : – Intraperitoneal	
IFN-γ – interferon gama	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 CIANOBACTÉRIA TOXIGÊNICA	17
2.2 MICROCISTINA	18
2.2.1 Mecanismo de ação de microcistina	18
2.2.2 Propriedades da Microcistina	20
2.3 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIA E MICROCISTINA.....	21
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE CIANOBACTÉRIA	22
2.5 BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA	25
2.5.1 Mecanismo de biodegradação de microcistina	27
2.6 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINA	29
2.6.1 Métodos físico-químicos para análise de microcistina	30
2.6.2 Ensaio biológicos para análise de microcistina.....	34
2.7 ENSAIO IMUNO-HISTOQUÍMICO NA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS.....	36
2.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE PARA MONITORAR CONTAMINANTES NA PISCICULTURA	37
2.9 RISCO DE MICROCYSTIS SPP. TOXIGÊNICA NO CENÁRIO DA PISCICULTURA BRASILEIRA	39
2.10 ASSOCIAÇÃO AFLATOXINA E MICROCISTINA.....	47
2.10.1 Aflatoxina na piscicultura.....	48
2.10.2 Estrutura química e atividade tóxica de aflatoxina.....	49
2.10.3 Efeito tóxico de Aflatoxinas em peixe	51
2.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
3 OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL.....	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 DELIMEAMENTO EXPERIMENTAL	54

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
Capítulo I – Biomonitoring assay in analysis of Co-occurring microcystin and Aflatoxin in Aquaculture	64
Capítulo II – Potencial Anti-Cianobactéria em Microbiota Pertecente ao Ecossistema de Estação de Tratamento de Esgoto	79
Capítulo III – Novel Microcystin-LR biodegradation products detected by Advanced Marfey’s Derivatization Method	90
5.1 PUBLICAÇÃO E TRABALHOS CIENTÍFICOS	107
6 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIA	110

1 INTRODUÇÃO

As microcistinas (MCs) são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias que compõem as comunidades fitoplanctônicas de ocorrência comum em ambientes aquáticos eutrofizados. A lixiviação de solo fertilizado pela agricultura, a contaminação ambiental através de esgotos, as atividades industriais e piscicultura contribuem para elevação de nutrientes nos corpos d'água.

O aumento da produção agrícola com vistas às exportações tem exigido maior rigor nos mecanismos de controle e fiscalização da cadeia produtiva de alimentos. O controle de qualidade deve prevenir ou diminuir o risco de contaminação, em especial de MCs presentes na água para consumo humano ou destinada à irrigação e produção de alimentos.

Quimicamente as MCs são muito estáveis devido a pequena estrutura cíclica. Os processos convencionais de tratamento de água mostraram-se ineficientes para remoção de MCs. Muitos métodos físicos e químicos foram desenvolvidos para sanar este problema. No entanto, o alto custo e problemas secundários de poluição representam o maior obstáculo para a generalização destes métodos. Desta forma dentre os métodos mais econômicos e menos agressivo ao meio ambiente, destaca-se o biocontrole.

Tendo em vista o aumento da demanda de produtos de pescado, a implementação de práticas capazes de assegurar a qualidade desde a água, composição de rações formuladas, aspectos sanitários do processamento à comercialização tornam-se fundamental. A produção brasileira deve seguir a tendência da piscicultura no agronegócio globalizado com implementação de processos de controle baseados em metodologias analíticas químicas e biológicas. O fato implica na inserção dos testes de toxicidade capazes de estabelecer limites visando avaliar o impacto de MCs sobre os organismos aquáticos e acumulação na cadeia alimentar.

Considerando a limitação dos métodos convencionais para remoção de MCs aliado ao alerta de contaminação na piscicultura, a seleção de antagonistas a cianobactérias toxigênicas e a aplicação de bioensaio visando o monitoramento em peixes são indispensáveis sob o ponto de vista de minimizar os riscos a saúde humana. Neste contexto, o estudo do mecanismo de biodegradação é essencial para aprofundar o conhecimento da complexa dinâmica de produção e detoxificação de microcistina no ecossistema.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIANOBACTÉRIA TOXIGÊNICA

As cianobactérias ou cianofíceas são microrganismos aeróbios fotoautotróficos, popularmente conhecidas como algas azuis. Os processos vitais desses microrganismos requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é o principal modo de obtenção de energia para o metabolismo de cianofíceas. A origem das cianobactérias foi estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica no planeta. Entretanto, a organização celular demonstra que estes organismos são procariontes e semelhantes bioquimicamente a bactérias (CHARMICHAEAL, 1992).

O fator preocupante referente a cianofíceas é freqüente ocorrência de florações tóxicas. A produção de cianotoxina depende do estágio da floração, linhagens e espécies envolvidas. A liberação da toxina ocorre durante a formação da floração, caracterizada por intensa proliferação de cianobactérias em lagos e reservatórios de água doce enriquecidos principalmente com nitrogênio e fósforo (YOO *et al.*, 1995). Existem aproximadamente 150 gêneros e 2000 espécies de cianobactérias, das quais 40 gêneros são toxigênicos com destaque para *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Aphanizomenon flos aquae*, *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., produtoras de microcistina (MC), uma classe de toxina hepatotóxica (CHARMICHAEAL *et al.*, 2001).

Muitos estudos avaliaram o efeito de fatores ambientais na produção de MCs, incluindo a disponibilidade de metais traços, nutrientes, luz, temperatura, pH, meio de cultura, estabilidade na coluna d'água e atividade de zooplâncton predador. No entanto, há muita controvérsia seja sobre os estudos laboratoriais ou de campo a respeito da dinâmica de produção de MCs (WANG *et al.*, 2007).

2.2 MICROCISTINA

As MCs constituem heptapeptídeos monocíclicos, compostos de três D-aminoácidos na porção invariável da molécula, além de dois L aminoácidos e dois aminoácidos raros. Os D-aminoácidos consistem de alanina, β -eritro- β -metil ácido aspártico e γ -ácido glutâmico (D-Ala, D- β MeAsp, D-Glu). Os dois aminoácidos raros correspondem a N-metildehidroalanina (Mdha) e a (2*S*,3*S*,8*S*,9*S*) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda) (BOTES *et al.*, 1982).

Os dois resíduos de L-aminoácidos variáveis e respectivas combinações incluem, por exemplo, leucina e arginina para MCLR. Estas diferenças estruturais dependem principalmente dos dois resíduos de aminoácidos variáveis e secundariamente, da presença ou ausência de grupamentos metil em β -Me-Asp e/ou Mdha (CARMICHAEL, 1992). Atualmente, já foram isolados mais de 80 análogos, sendo MCLR a mais tóxica e mais freqüente (FALCONER; HUMPAGE, 2005; HOEGER *et al.*, 2005).

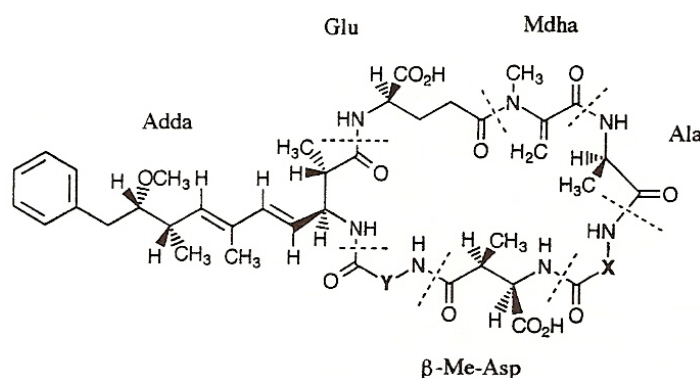


Figura 1 – Estrutura química de Microcistina.

2.2.1 Mecanismo de ação de microcistina

A evidência de propriedades toxicológicas de MCs em diversas espécies animais se deve a efeitos principalmente hepatotóxicos. Os mecanismos envolvidos decorrem da inibição específica da atividade da proteína fosfatase 1 (PP1) e 2A (PP2A) de células eucariontes, provocando subsequente acúmulo de fosfoproteínas, perda da integridade do

citoesqueleto e apoptose em hepatócitos (FUJIKI *et al.*, 1996; GOLDBERG *et al.*, 1995; MACKINTOSH *et al.*, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1990; YOSHIKAWA *et al.*, 1990).

O aminoácido Adda é capaz de se ligar covalentemente a um resíduo de cisteína da subunidade catalítica da PP1 e PP2A (MACKINTOSH *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1993), porém a inativação efetiva requer a introdução do grupamento Adda na cavidade hidrofóbica do sítio catalítico das PPs (GOLDBERG *et al.*, 1995, XING *et al.*, 2006). O aminoácido Adda, por estar presente intacto em todos os análogos de MCs, tem sido apontado como o principal responsável pela atividade biológica de MCs (HARADA *et al.*, 1990; NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992).

Nishiwaki-Matsushima *et al.* (1992) demonstraram inibição de proteína fosfatase 1 e 2A membranar e de frações citosólicas de hepatócitos por MCLR, YR (tirosina-arginina), e RR (arginina-arginina), com o aumento na fosforilação de proteínas em intensidade próxima ao ácido okadaico (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992). Estas potentes hepatotoxinas causam alteração estrutural na arquitetura hepática pelo rearranjo de organelas e reorganização de microfilamentos. A intoxicação aguda por MC caracterizou-se pelo aparecimento de pontos vermelho-escuro e hepatomegalia com acúmulo de sangue, com aumento do volume hepático de duas vezes em relação ao fígado de rato normal (HOOSER *et al.*, 1990).

A letalidade de MC se atribui a choque hipovolêmico, devido ao seqüestro de sangue pelo fígado (LeCLAIRE *et al.*, 1995). Pesquisas intensivas foram realizadas para explicar o mecanismo de ação destas hepatotoxinas, desencadeando seqüência de eventos até o choque hemorrágico. A toxina é absorvida no íleo através de carreadores bile-ácidos, que funcionam como transportadores das toxinas peptídicas através da membrana celular, preferencialmente para os hepatócitos (CARMICHAEL, 1992; DABHOLKAR; CARMICHAEL, 1987). A seguir, as MCs atuam sobre os microfilamentos de actina, componentes de citoesqueleto celular, causando uma agregação densa de microfilamentos próximos ao centro da célula. O fato pode ser interpretado como perda de suporte celular, conduzindo à destruição de sinusóides endoteliais. A destruição de parênquima celular e sinusóide hepático resultam em hemorragia intrahepática (após horas) e/ou insuficiência hepática (após dias) (HOOSER *et al.*, 1991).

Evidência da atividade promotora de tumor por MCLR foi apresentada em fígados de ratos iniciados com dietilnitrosamina (DEN), através da mesma via promotora de tumor do ácido okadaico (YOSHIKAWA *et al.*, 1990). A inibição da atividade de proteínas

fosfatases (PP) resulta no acúmulo de proteínas fosforiladas que provavelmente representam um papel significativo na expressão de genes envolvidos no crescimento celular (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992). O envolvimento MCs na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultando em danos oxidativos em hepatócitos, oxidação de pirimidinas e purinas, emerge como elemento contribuinte na genotoxicidade e indução de apoptose por MCLR (DING *et al.*, 1998; 2001; ZEGURA *et al.*, 2004).

A ingestão de água de valas e açudes contaminados com cianofíceas no Norte de Xangai - China foi relacionada à incidência de câncer hepático primário com frequência oito vezes superior a população abastecida com água de qualidade adequada (YU, 1989, NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992).

Baseado na toxicologia de MCLR e contaminação em reservatórios de água, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu o limite máximo de 1 µg/L de MCLR em água destinada ao consumo humano. Este limite é adotado pela legislação vigente na grande maioria dos países, inclusive no Brasil. A exposição humana decorre da exposição por inalação, via dérmica, intravenosa (diálise) e, principalmente, via oral, através da ingestão de água, alimentos irrigados com água contaminada, além do perigo de ingestão indireta por peixes contaminados. Assim, a ingestão diária tolerável de MCLR foi estabelecida em 0,04 µg/Kg de peso corpóreo (WHO, 1998).

2.2.2 Propriedades da Microcistina

Devido a sua estrutura peptídica cíclica, as microcistinas são muito estáveis à fervura e resistentes a hidrólise química e oxidação em pH próximo a neutralidade. As MCs podem persistir por meses ou anos em condições ambientais sem incidência de luz. Hidrólises lentas de MCs foram observadas em temperaturas próximas a 40° C e em condições de pH extremos, sendo necessário aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais 12 semanas em pH 9 para degradação de cerca de 90% da concentração total de MCs (HARADA; TSUJI, 1998).

Degradação fotoquímica lenta de MCs foi observada sob exposição solar. A taxa desta reação é aumentada pela presença de substâncias húmicas e de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis, provavelmente ficobiliproteínas. Nessas condições, o tempo para a degradação de 90% de MCs varia de 2 a 6 semanas, dependendo da concentração de toxina e de pigmentos (TSUJI *et al.*, 1995).

Chen *et al.* (2006) testaram a adsorção de MCs em 3 tipos de solos da China e verificaram correlação negativa entre a adsorção de MCs e a concentração de argila no solo. Portanto, solos compostos com menor teor de argila apresentam maior lixiviação de MCs. Os riscos da persistência de MCLR e outros análogos no solo foram alertados, inclusive o perigo de contaminação de aquíferos.

2.3 MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIA E MICROCISTINA

Os processos e seqüências de tratamento de água para abastecimento público devem ser analisados em função da sua capacidade de remover as células viáveis (biomassa fitoplancônica) e de não promover a lise dessas células, assim como a capacidade de remover a fração dissolvida da cianotoxina (SCHMIDT *et al.*, 2002).

Florações de cianobactérias tóxicas na piscicultura são freqüentemente tratadas com sulfato de cobre. Os algicidas em geral, são efetivos na lise celular, mas possuem o efeito negativo de liberar a toxina intracelular. Muitos métodos químicos foram desenvolvidos para sanar este problema (WETZEL, 2001). No entanto, o alto custo e problemas secundários de poluição representam o maior obstáculo para a generalização destes métodos (AHN *et al.*, 2003).

A combinação seqüencial de coagulação (C), floculação (F), sedimentação (S) e filtração são ineficientes para remoção de cianotoxinas (GRÜTZMACHER *et al.*, 2002). Estes processos apresentam elevada eficiência na remoção de células viáveis e conseqüentemente de toxina intracelular. No entanto, a promoção da fragilidade e conseqüente lise celular limitam a eficiência do processo (CHOW *et al.*, 1998).

A pré-oxidação melhora a eficiência da filtração direta e também da flotação por ar dissolvido. Por outro lado, o risco de liberação das cianotoxinas e compostos potencialmente carcinogênicos como trihalometanos originados em processos de cloração devem ser alertados (GEHR *et al.*, 1993).

Estudos intensivos visando a remoção de fitoplâncton abordam as mais variadas tecnologias, como procedimentos de filtração lenta, ultrafiltração, nanofiltração, flotação por ar dissolvido, radiação UV ou gama e oxidação utilizando ozônio (GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE *et al.*, 2005; GRUTZMACHER *et al.*, 2002; KAUR *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 2007; SAKAI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). A adsorção em

carvão ativado e a pós-oxidação combinados com tratamento de água convencional têm sido consideradas processos efetivos para remoção de cianotoxinas (FALCONER, 1999). Não obstante, o perigo de contaminação não deve ser descartado nos casos de florações tóxicas intensas.

Desta forma, o tratamento de água seja para consumo direto ou produção de alimentos requer tecnologias eficientes, ecologicamente corretas e com custo-benefício aplicável (HAIDER *et al.*, 2003).

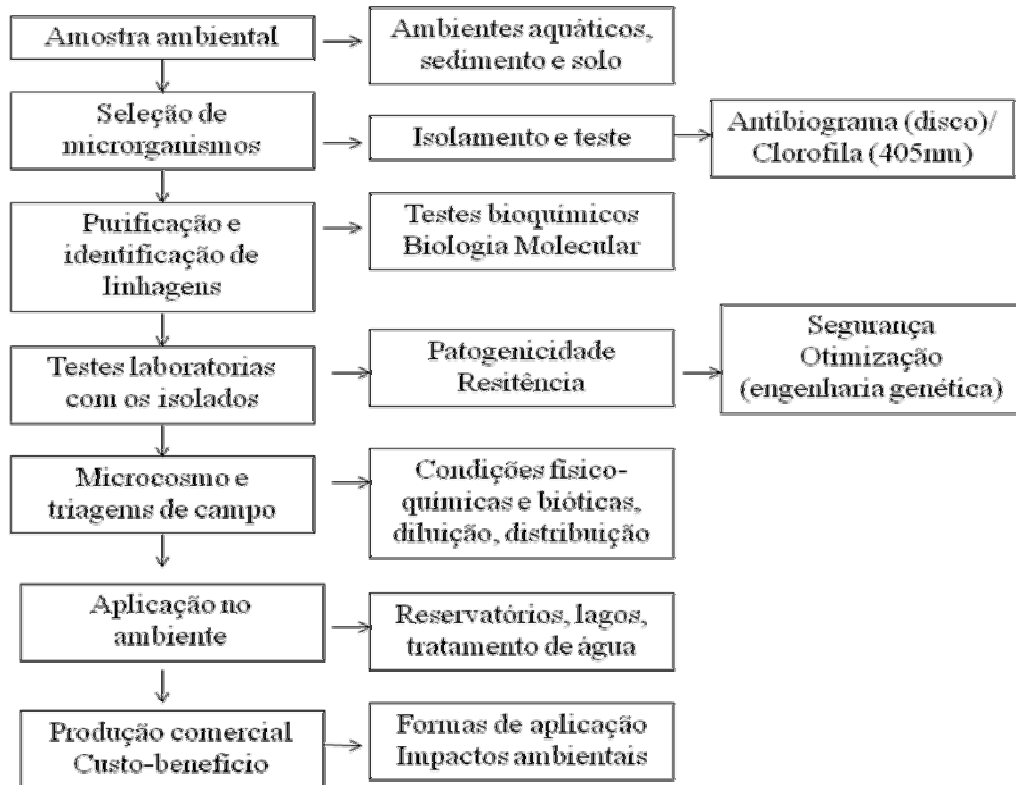
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE CIANOBACTÉRIA

O biocontrole destaca-se dentre os métodos mais econômicos e menos agressivos ao meio ambiente. Vírus, protozoários, fungos, actinomicetos e bactérias apresentam potencial antagonista promissor à cianobactérias. A ação dos organismos antagonistas engloba desde o parasitismo específico de contato celular ou captura até a produção não específica de enzimas extracelulares ou antibióticos capazes de lisar cianobactérias (WRIGHT; THOMPSON, 1985). O desenvolvimento destes organismos como controle biológico envolve o isolamento a partir de amostras ambientais, caracterização da atividade anti-cianobactéria, experimentos de campo em micro e macro-escala e o estudo final para aplicação do controle biológico na estratégia de manejo no ambiente (Fluxograma 1).

Ambientes aquáticos com florações de cianobactéria apresentam alto potencial para isolamento de antagonistas competitivos capazes de lisar células de cianofíceas (IMAMURA *et al.*, 2001). Em geral, técnicas de difusão em ágar e inibição da fotossíntese com degradação de clorofila, através da leitura da absorbância a 405 nm são aplicadas para seleção de microrganismos antagonistas (YAMAMOTO; SUZUKI, 1990). A produção de substâncias ativas pode ser otimizada através da engenharia genética com microrganismos que preencham requisitos como resistência a condições adversas e não patogenicidade. A extrapolação da atividade microbiana para o ambiente aquático deve considerar previamente a condições físico-químicas e efeito de diluição do corpo d'água. Na etapa final, a produção em larga escala e comercialização requer uma avaliação rigorosa do custo-benefício (SIGEE *et al.*, 1999).

Safferman e Morris (1963) isolaram um vírus que infecta cianobactéria (cianófago LPP) com ação direta no ciclo de florações de *Lyngbya*, *Plectonema* e *Phormidium*.

Porém, a complexidade da interação cianobactéria-fago devido ao alto grau de especificidade do hospedeiro, aliada ao surgimento de hospedeiros mutantes resistentes limitam a aplicação de vírus como biocontrole de cianobactérias (BARNET *et al.*, 1981).



Fluxograma 1 – Etapas para desenvolvimento de biocontrole de cianobactérias

Fonte: (SIGEE, *et al.*, 1999, modificado).

As cianobactérias representam uma fonte de alimentos para protozoários ciliados *Nassula*, flagelados *Ochromonas* e amebas *Achantomoeba*, *Mayorella* e *Nuclearia* (CANTER *et al.*, 1990; COLE; WYNNE, 1974; LAYBOURNE-PARRY *et al.*, 1987; WRIGHT *et al.*, 1981; YAMAMOTO, 1981). No entanto, a eficiência da aplicação de protozoários no biocontrole depende da especificidade de predação e ausência de predadores contra estes protozoários na cadeia trófica (BRABRAND *et al.*, 1983). Inamori *et al.* (1998), sugerem a aplicação de *Aeolosoma hemprichi* e *Philodina erythrophthalma* no controle de *Microcystis viridis* toxigênica em biofilme de reatores no tratamento de água. Neste processo, os protozoários após digerirem a cianobactéria, excretariam a toxina que por sua vez seria degradada por bactérias aderidas ao biofilme.

A atividade cianobacteriolítica por antibióticos fúngicos foi promovida por cefalosporina C purificado a partir de *Emericellopsis salmosynnemata* e *Acremonium kiliense*, cujo antibiótico β -lactama afetou diretamente a membrana celular de cianobactérias (REDHEAD; WRIGHT, 1980).

A atividade antagônica à cianobactéria é comum em actinomicetos isolados de solos ou ambientes aquáticos. Entre 83 espécies de actinomicetos isolados de sedimentos, 50% apresentou atividade cianobacteriolítica, com destaque para *Streptomyces phaeofaciens* S9. L-lisina, aminoácido secretado por S9, foi apontada como um dos fatores capazes de causar danos na parede celular de *M. aeruginosa* (YAMAMOTO *et al.*, 1998). Antagonismo por *Streptomyces* spp. foi relatado contra *Nostoc*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Microcystis* (SAFFERMAN; MORRIS, 1962; SIGEE *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1998). Choi *et al.* (2005), apontaram que o contato celular libera enzimas presentes no periplasma celular responsáveis pela atividade lítica de *S. neyagawaensis*.

A atividade antagônica de *Pseudomonas* contra *Anabaena*, *Phormidium* e *Oscillatoria* spp. foi atribuída a 1-metil- β -carbonila e a pigmentos fenazinas como 1-hidroxifenazina e oxiclrorafina (DAKHAMA *et al.*, 1993; KODANI *et al.*, 2002).

A lise de cianobactéria (*Anabaena* e *Microcystis*) por *Bacillus* sp. foi atribuído ao antibiótico gramicidina e compostos voláteis, como álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) (REIM *et al.*, 1974, WRIGHT *et al.*, 1991; WRIGHT; THOMPSON, 1985). Surfactina, um biosurfactante lipopeptídico cíclico produzido por *Bacillus subtilis* C1 apresentou inibição seletiva de crescimento contra cianobactérias (*Microcystis aeruginosa* e *Anabaena affinis*), sendo menos efetiva contra clorofíceas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp.) e diatomáceas (*Navicula* sp.), sugerindo um potencial para o biocontrole seletivo contra cianobactérias sem afetar outras espécies e minimizando o impacto no ecossistema (AHN *et al.*, 2003).

Sphingomonas M-17 isolada de amostras de florações de cianobactéria do lago Biwa-Japão, apresentou potente atividade lítica contra *M. aeruginosa* e *M. viridis* (IMAMURA *et al.*, 2001). A atividade de M-17 foi atribuída a um pentapeptídeo denominado argimicina A e aos análogos B e C, que são produzidos em menor quantidade (IMAMURA *et al.*, 2000, YAMAGUCHI *et al.*, 2003). A inibição da fotossíntese em cianobactérias é o principal mecanismo de ação de argimicina A, tal inibição não foi observada em fitoplâncton eucariótico, sugerindo atividade seletiva contra cianobactérias (HIBAYASHI; IMAMURA, 2003). Inibição da reação de transporte de elétrons na fotossíntese, inibição das enzimas

glicolato desidrogenase e nitrogenase de *Oscillatoria williamsii* também foram relatadas como antagonismo por *Flexibacter* (SALLAL, 1994).

Embora vários microrganismos com atividade anti-cianobactéria sejam citados, não foram encontradas informações sobre a aplicação de microrganismos *in situ*, provavelmente devido a dificuldade de prever os efeitos desses microrganismos em ecossistemas complexos (CHOI *et al.*, 2005).

2.5 BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA

Até o momento, poucos microrganismos com capacidade de remover efetivamente MCs foram relatados (SAITO *et al.*, 2003). As bactérias ácido-láticas e bifidobactérias geralmente são selecionadas devido às propriedades benéficas à saúde. Linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* capazes de remover MCs do meio através de propriedades de adsorção são sugeridas como base para tecnologia de tratamento de água (MERILUOTO *et al.*, 2005).

Maruyama *et al.* (2003) relataram a degradação de MC por um grupo de bactérias *Cytophaga/Flavobacterium* presentes em mucilagem de *Microcystis*. Uma protease alcalina isolada de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de degradar MCLR formando DmAdda (ácido 3-amino-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E dienóico). A aplicabilidade desta protease foi sugerida, pois a atividade máxima desta enzima ocorre em pH alcalino similar ao de ambientes eutrofizados (TAKENAKA; WATANABE, 1997). Recentemente, *Burkholderia* sp. capaz de degradar MCLR e D-Leu-MCLR foi isolada na Lagoa dos Patos- Rio Grande do Sul, com eliminação de aproximadamente 90% das MCs após 43 dias de monitoramento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e confirmado através de kits de ELISA (ensaio imunoenzimático) (LEMES *et al.*, 2007).

Jones *et al.* (1994) isolaram a linhagem MJ-PV na Austrália, inicialmente identificada como *Pseudomonas*, MJ-PV foi posteriormente classificada *Sphingomonas* sp. ACM3962 (BOURNE *et al.*, 1996). O extrato celular de *Sphingomonas* ACM3962 degradou MCLR e RR *in vitro*. No entanto, ACM 3962 não foi capaz de degradar nodularina, um pentapeptidíio que difere de MCs apenas pela ausência dos 2 aminoácidos variáveis e substituição de N-metil-deidro-alanina por N-metil-deidrobutilina (JONES *et al.*, 1994).

O isolamento de outras cepas fenotipicamente similares a ACM3962 e com capacidade de degradar MCs foi relatado principalmente no Japão (ISHI *et al.*, 2004; HARADA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001; SAITOU *et al.*, 2003), Austrália (HO *et al.*, 2007) e Argentina (AMÉ *et al.*, 2006).

A cepa Y2, capaz de degradar MCLR, RR e YR apresentou taxa de degradação máxima na temperatura de 30° C, degradando 13 e 5,4 mg/L/dia de MCRR e LR, respectivamente (PARK *et al.*, 2001). A degradação de MCRR e YR após a indução da atividade com MCLR foi relatada por Saitou *et al.* (2003), cuja atividade máxima da cepa MD ocorreu em pH neutro. A degradação induzida também foi comprovada pela cepa 7CY, que foi capaz de degradar, MCLR, RR, LY, LW e LF isoladamente, mas a degradação de nodularina-Har só foi possível em presença de MCRR (ISHI *et al.*, 2004). A degradação de nodularina através da cepa B9 é descrita por Imanishi *et al.* (2005), que relata também a degradação de MCLR, RR, 3-desmetil-MCLR, di-hidro-MCLR e MCLR-cisteína conjugada. A degradação de MCLA é relatada por Ho *et al.* (2007), que identificou *Sphingopyxis* LH21 capaz de degradar MCLR. Desmetilação de MCRR é relatada como a primeira etapa de degradação pela cepa CBA4, (AMÉ *et al.*, 2006).

Estas cepas pertencentes à família *Sphingomonadaceae*, de colônias amarelas, aeróbias e Gram negativas (MARUYAMA *et al.*, 2006) mostraram ser capazes de degradar análogos diferentes, embora a indisponibilidade de padrões de MCs seja fator limitante para avaliar o espectro de biodegradação de cada cepa.

A principal enzima envolvida na degradação de MCs é codificada pelo gene *mlrA*. Este gene isolado da cepa ACM3962 possui uma seqüência nucleotídica extremamente rara, sendo detectado também em outras cepas através de PCR *nested* (*Polimerase Chain Reaction*). Baseado na seqüência 16S rDNA. MD-1 e Y2 apresentaram similaridade a *Sphingomonas* ACM3962 de 98% e 84%, respectivamente (SAITO *et al.*, 2003). As linhagens B9 (HARADA *et al.*, 2004) e 7CY (ISHI *et al.*, 2004) apresentaram uma alta similaridade à linhagem Y2, que foi então denominada *Sphingosinicella microcystinivorans* (MARUYAMA *et al.*, 2006). Saito *et al.* (2003) verificaram que nem todas as espécies de *Sphingomas* são capazes de degradar MC. Por outro lado, o gene *mlrA*, presentes em todas as espécies com capacidade de degradar MC, apresentou-se conservado em pelo menos 3 espécies bacterianas, sugerindo que a capacidade de degradar MC tenha sido adquirida através da transferência de genes em algum ponto de evolução de *Sphingomonas* (SAITO *et al.*, 2003).

Recentente, a aplicação das cepas ACM3962 e B9 foram relatadas. Em escala piloto de reservatório de água em filtros de areia de filtração lenta, ACM3962 mostrou-

se efetiva na eliminação de mais de 80% de MCLR em reservatórios inoculados com 1×10^6 céls/mL (BOURNE *et al.*, 2006). A imobilização de $7,9 \times 10^6$ céls/mL da cepa B9 em resinas de poliéster de biorreatores mostrou eliminação completa de MCLR após 1 dia de tratamento. A adição continuada de MCRR (600 µg) eliminou 80% da toxina, cuja eficiência persistiu durante 2 meses em plantas de tratamento de água (TSUJI *et al.*, 2006).

2.5.1 Mecanismo de biodegradação de microcistina

A quebra da ligação peptídica em MCs requer proteases com estruturas específicas, pois a toxina apresentou estabilidade contra várias proteases, tripsina, quimiotripsina, elastase, trombina, papaína, colagenase, carboxipeptidase e pepsina. *Sphingomonas* ACM3962 apresentou cluster de genes A, B, C e D que codificam enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica entre Adda-Arg (gene *mlrA*) abrindo a estrutura cíclica do heptapeptídeo. MCLR linear é facilmente degradada pelas peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC*. O gene *mlrD* possivelmente codifica a proteína transportadora que carrega a MC para dentro da célula. MlrA, supostamente uma metaloprotease foi considerada a enzima mais importante do mecanismo de metabolização de MC, pois a estrutura cíclica promove estabilidade contra outras proteases e outros fatores químicos (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

Bourne *et al.* (1996), utilizando ACM3962, testaram uma série de inibidores enzimáticos visando o acúmulo dos compostos intermediários da biodegradação de MCs e posterior identificação por espectrometria de massas. A aplicação de EDTA resultou no acúmulo de MCLR linear *m/z* (massa/carga) 1013,5 (H-Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-βMeAsp-Arg-OH). Na etapa seguinte, a aplicação de 1mM de PMSF (fenilmetil sulfonil fluoreto) resultou no acúmulo de tetrapeptídeo *m/z* 615 (H-Adda-Glu-Mdha-Ala-OH). A porção Adda (*m/z* 332) foi isolada intacta, purificada e caracterizada após biodegradação pela cepa B9 inoculada com 40 mg de MCLR. A toxina linear, tetrapeptídeo e Adda apresentaram menor atividade tóxica em camundongos e menor capacidade de inibir proteínas fosfatases que MCLR, indicando a eficiência de detoxificação deste microrganismo (BOURNE *et al.*, 1996, HARADA *et al.*, 2004, HO *et al.*, 2007). No entanto, os demais produtos de biodegradação, peptídeos e aminoácidos ainda não foram detectados (BOURNE *et al.*, 2001, HARADA *et al.*, 2004).

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector UV (238nm) têm sido amplamente utilizada para avaliar a biodegradação de MCs. Devido ao principal cromóforo dieno conjugado que permite a detecção de produtos de degradação de MCs que contém Adda na estrutura.

Em 1984, Marfey propôs um método para determinação da configuração absoluta de aminoácidos, separando aminoácidos enantiômeros após derivatização com um reagente quiral, no caso 1-Flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (FDAA). Os aminoácidos derivatizados são separados por CLAE e detectados a 340 nm. Este método utilizado para caracterização estrutural de compostos peptídicos devido à sensibilidade e capacidade de identificar corretamente aminoácidos na configuração absoluta (FUJII *et al.*, 1997). A combinação do método de Marfey com a espectrometria de massas foi denominada Método Avançado de Marfey. Após a derivatização com L-FDLA (1-Flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-leucinaminamida), os aminoácidos foram identificados baseados no tempo de retenção e espectro de massas dos derivados. Neste método, a ordem de eluição de enantiômeros D e L aminoácido foi elucidada pela comparação da hidrofobicidade entre o grupo α -carbonil e a cadeia lateral do aminoácido na conformação tipo *cis* e *trans*, para D e L aminoácido, respectivamente. Em geral, L-aminoácido é eluído da coluna cromatográfica antes do correspondente enantiômero D-aminoácido (FUJII *et al.*, 1997).

Desta forma, o método avançado de Marfey com ESI-LCMS para identificação de aminoácidos e peptídeos representa uma alternativa promissora para o estudo do mecanismo de biodegradação de MCs.

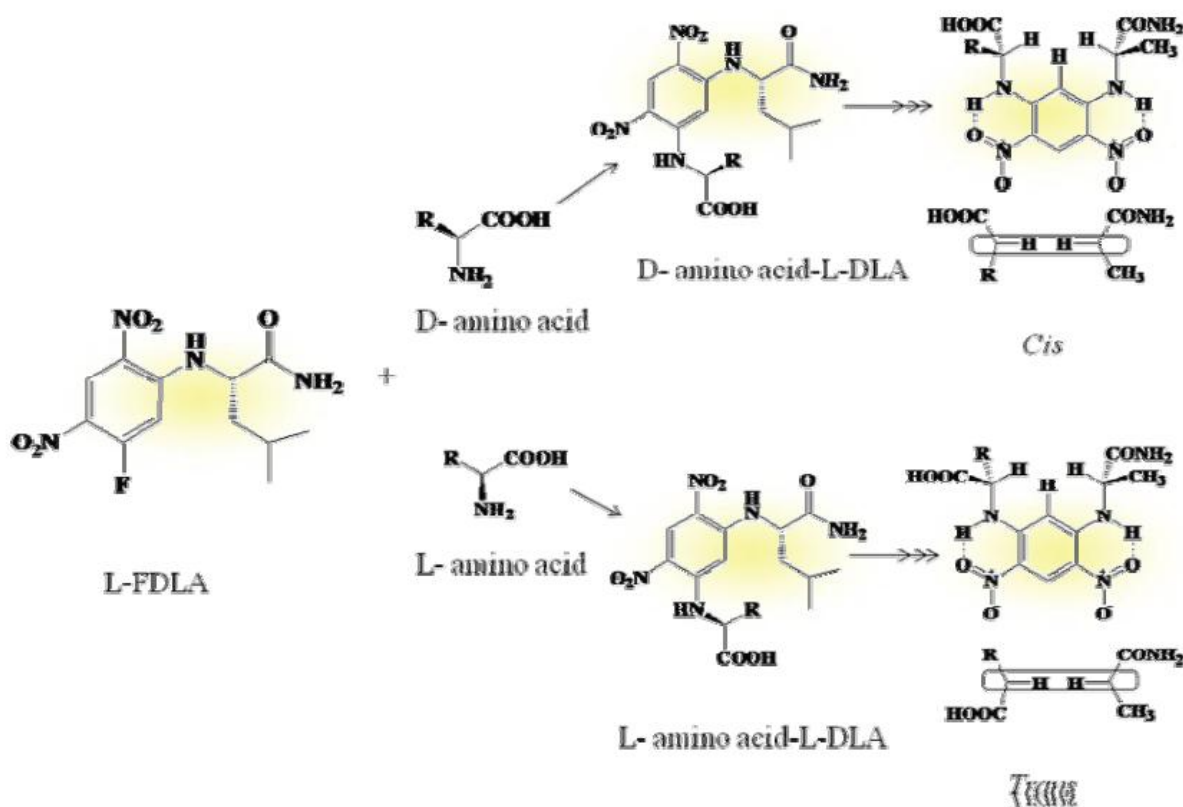


Figura 2 – Tipo de conformação de D e L aminoácidos derivatizados com L-FDLA.

2.6 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE MICROCISTINA

A conscientização dos riscos da exposição de MCs à saúde humana culminou no desenvolvimento de métodos para a análise dessa classe de toxinas. Para minimizar os perigos de contaminação e intoxicação por MCs são necessários métodos sensíveis e confiáveis, capazes de detectar um amplo espectro de toxinas em matrizes diversas e capazes de monitorar MCs na faixa da concentração mínima permitida em água de 1 $\mu\text{g/L}$ e dose diária tolerável de 0,04 $\mu\text{g/Kg /dia}$, estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Entre os métodos desenvolvidos para proceder à análise quantitativa e qualitativa de MCs destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) combinada com detector ultra violeta –UV e foto-diodo (PDA- *photo diode array*) (LAWTON *et al.*, 1994, MERILUOTO, 1997). Preconizada para a separação com alta eficiência de uma extensa variedade de compostos químicos e biológicos, a CLAE permite análise quantitativa com

eficiência e sensibilidade, embora a detecção por espectrometria de massas (MS - *Mass spectrometry*) forneça uma identificação mais exata dos análogos (ZWEIGENBAUM *et al.*, 2000). Ainda assim, nenhuma metodologia isolada, entre as disponíveis, é suficiente para analisar precisamente a toxicidade e exato perfil dos diferentes análogos de MCs (HARADA *et al.*, 1999).

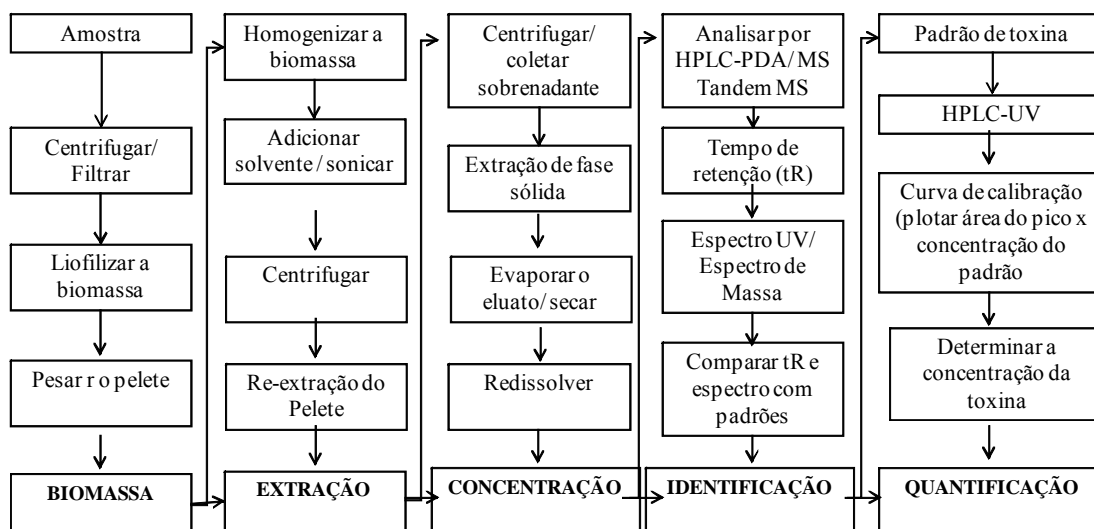
2.6.1 Métodos físico-químicos para análise de microcistina

O fluxograma 2 apresenta as etapas da metodologia analítica de cianotoxinas. Frascos de vidro são recomendados para coleta de amostras, devido ao risco de falsos-negativo decorrente da adsorção de MCs em materiais plásticos (CODD; BELL, 1996). Em amostras de floração ou cultivo, a centrifugação permite a concentração da biomassa, além de reservar o sobrenadante para análise da toxina extracelular remanescente. De forma geral, têm-se utilizado biomassa amostral de 1 mg a 26 g (peso seco). A determinação da massa inicial é etapa primordial para quantificação exata da concentração de cianotoxinas (DELL AVERSANO *et al.*, 2004; MERILUOTO; ERIKSSON, 1988; MOOLLAN *et al.*, 1996; SAITO *et al.*, 2002).

A extração da toxina pode ser realizada através da agitação *overnight* da biomassa em solvente, mas comumente realiza-se o rompimento celular por métodos físicos como sonicação, agitação mecânica (*vortex*) e processos de congelamento/descongelamento. O sonicador é amplamente empregado, no entanto o uso prolongado em pequenas amostras pode elevar a temperatura do extrato, resultando em evaporação e/ou degradação, além disso, pode ocorrer a desintegração de membranas de filtro de vidro utilizados na etapa de concentração da biomassa, inteferindo na quantificação de MCs (SPOOF *et al.*, 2003).

A escolha do solvente para extração deve considerar a polaridade dos diferentes análogos de MCs. A recuperação da toxina é melhorada por re-extrações, em geral 3 vezes com o mesmo solvente ou extração sequencial (combinações de solventes). Os principais solventes utilizados consistem de soluções de metanol, água e combinação de metanol-água. A solução aquosa de metanol 75% (v/v) é considerada a mais apropriada para extração de MCs com polaridade variada (FASTNER *et al.*, 1998). MCs hidrofílicas, como MCLR, RR e YR, apresentam melhor recuperação na extração com ácido acético 5% aquoso (v/v), seguida de metanol (90%, v/v) (LAWTON; EDWARDS, 2001). EDTA pirofosfato de

sódio é recomendado para extração de MCs em solos e sedimentos (CHEN *et al.*, 2006). Metcalf e Codd *et al.* (2000) propuseram o uso de microondas ou fervura para extração de MCs, evitando-se o uso de solventes orgânicos, que interferem em métodos sensíveis como o imunoensaio.



Fluxograma 2 – Etapas de metodologia físico-química na análise de cianotoxinas

Fonte: (SANGOLKAR *et al.*, 2006)

Pré-limpeza e pré-concentração de MCs em minicolunas (*cartridge*) é requisito indispensável em análises que exigem baixo limite de detecção, constituindo fator fundamental na proteção de coluna cromatográfica utilizada em CLAE. Minicolunas de pré-limpeza ODS (*octadecyl silanized C₁₈ silica gel*) amplamente empregadas, retêm MCs através de interações hidrofóbicas (RAPALA; LAHTI, 2002). As colunas de imunoafinidade (CIAs) representam uma alternativa a minicolunas de fase sólida C₁₈ para remoção de interferentes de matriz e concentração de amostras com uso mínimo de solventes orgânicos (KONDO *et al.*, 2000). Apesar da recuperação ser comparável a minicoluna C₁₈, o alto custo da produção de anticorpos é a principal limitação das CIAs (ARANDA-RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

Para evitar a degradação fotoquímica, hidrolítica ou oxidação o extrato deve ser seco e conservado em frascos âmbar. O liofilizador, fluxo de gás nitrogênio ou argônio acoplado a rotavapor a 40-60° C têm sido utilizados para remoção total do solvente (LAWTON *et al.*, 1994; SPOOF *et al.*, 2003).

Entre as diversas fases estacionárias de CLAE aplicáveis na separação de MCs destaca-se as colunas de fase reversa C₁₈, além de colunas de amida C₁₆ e colunas de

troca iônica. A escolha apropriada da fase móvel permite uma boa resolução do analito, sendo empregados principalmente metanol ou acetonitrila (LAWTON *et al.*, 1994).

Medidas de absorvância de UV é a técnica mais comum na detecção de MCs após separação por CLAE. A maioria das MCs possuem absorção máxima de UV em 238 nm atribuído ao principal cromóforo, o dieno conjugado na porção Adda, comum em todos os análogos. Com exceção dos análogos contendo triptofano, como MCLW que apresentam absorção máxima no comprimento de onda de 222 nm (LAWTON *et al.*, 1994). No entanto, a co-eluição de interferentes de matriz com absorção em comprimento de onda próxima a 238 nm resultando em falsos-positivo devem ser considerados (MOOLLAN *et al.*, 1996). A comparação com o tempo de retenção, espectro UV e área do pico de padrões de toxinas é a base para identificação e quantificação de MCs (RAPALA *et al.*, 2002). Assim, o principal obstáculo na análise de MCs é a falta de padrões de toxinas, entre os 80 análogos identificados, apenas alguns possuem padrões comercialmente disponíveis. Na ausência de padrões, muitos análogos são quantificados e a concentração expressa em MCLR-equivalente (McELHINEY; LAWTON, 2005).

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS) tem sido empregada para análise qualitativa de MCs. Na espectrometria de massa, as moléculas são ionizadas e um analisador de massas separa os íons formados de acordo com a razão massa/carga (m/z), detector que quantifica os íons e transforma o sinal em corrente elétrica, onde a magnitude do sinal elétrico em função da m/z é convertida por um processador de dados representando um espectro de massa correspondente (GAVES; HAYSTEAD, 2002).

A exatidão de determinações de MCs tem sido relatadas em análises por cromatografia líquida acoplada a diferentes métodos de espectrometria de massas, tais como bombardeamento atômico rápido (*Fast Atomic Bombardment* – FAB), massa em tandem (MS/MS) técnicas de ionização em pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization* – API) e ionização por eletrôn-spray (*electrospray ionization*-ESI) (EDWARDS *et al.*, 1993; KONDO; HARADA, 1996; NAMIKOSHI *et al.*, 1992; OTT; CARMICHAEL, 2006; SIVONEN *et al.*, 1992). Análogos de MCs apresentam diferentes padrões de fragmentação ($[M+H]^+$, $[M+2H]^+$ íons) dependendo do resíduo de aminoácido presente (PÉREZ; AGA, 2005). Na indisponibilidade de padrões de MCs comerciais, a toxina pode ser identificada por tentativa comparando-se espectros de massas descritos na literatura.

A cromatografia líquida acoplada a MS com interface ESI é uma técnica simples, sensível e apropriada para o monitoramento e identificação de uma ampla variedade de MCs. Metodologia baseada em LC-MS-ESI tem sido desenvolvida possibilitando a

detecção simultânea de várias cianotoxinas como microcistinas, saxitoxinas, anatoxina e nodularina em uma única corrida cromatográfica (DAHLMANN *et al.*, 2003).

Espectrometria de massas em tandem (MS/MS) identifica compostos desconhecidos com mais exatidão. MS/MS é usado para fragmentar um peptídeo específico em peptídios menores no qual a seqüência aminoacídica é deduzida (GAVES; HAYSTEAD, 2002).

Na ausência de informações sobre a massa do analito, o perfil de fragmentação fornecido por MS/MS tem sido uma ferramenta para identificar análogos de MCs em matrizes complexas (LAWTON *et al.*, 1995). Fragmentos ionizados gerados pela dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) tem mostrado grande potencial para confirmação da presença de MCs em amostras ambientais (ZHANG *et al.*, 2004). Em especial, o fragmento íon m/z 135 característico, derivado de Adda, fornece um diagnóstico útil para identificar a presença de MCs mesmo em amostras ambientais com grande número de interferentes (HARADA *et al.*, 1999).

Fastner *et al.* (2001) identificaram MCs e outros oligopeptídeos em colônias de *Microcystis* empregando ionização por MALDI com analisador de TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of flight*). No método de MALDI-TOF MS, a amostra contendo a espécie de interesse é misturada com uma matriz (geralmente ácido α -ciano hidroxicinâmico-CHCA, ácido sináptico-SA ou ácido 2,5-dihydroxidobenzóico-DBH) formando uma mistura sólida. Um pulso de laser, com comprimento de onda próximo ao UV, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz, que evapora e o analito se dispersa na fase gasosa altamente energética. A ionização ocorre através da transferência de carga das moléculas da matriz para o composto que fica na forma de $[M+H]^+$. Os íons formados recebem uma alta energia cinética inicial que os impulsiona para o analisador de massas *Time-of-flight* (TOF), onde são separados de acordo com o tempo de vôo, considerando a distância na qual o íon se movimenta até atingir o detector. A principal vantagem de MALDI-TOF é a possibilidade de analisar pequenas amostras sem necessidade de pré-limpeza. A análise direta de colônias simples de *Microcystis* é uma ferramenta para prevenir com antecedência floração de espécies toxigênicas (SANGOLKAR *et al.*, 2006).

Outras alternativas analíticas para análise de MCs inclui a cromatografia em camada delgada (CCD), eletroforese capilar (EC), cromatografia gasosa (CG) entre outros. CCD constitui técnica conveniente para detecção de MCs. Devido à facilidade e rapidez na execução, análise de extratos brutos, baixo custo, detecção múltipla de compostos e visualização direta do perfil cromatográfico baseado na cor, fluorescência e aspecto da corrida

(fator de retenção do analito - fr) é aplicável para triagem e apresenta boa correlação com ELISA e ensaio de inibição de proteínas fosfatases (McELHINEY; LAWTON, 2005). A EC separa a toxina por diferenças de tamanho e carga da molécula. Apesar da baixa sensibilidade a EC pode ser melhorada acoplando-se detectores de fluorescência ou ESI-MS (SIRÈN *et al.*, 1999). A CG pode ser aplicada para separar MMPB (ácido 2 metil-3metoxi-4fenil-butírico) formado pela oxidação de Adda através de ozônio, permanganato ou periodato (HARADA *et al.*, 1996, KAYA; SANO, 1999). Apesar de consumir tempo e não apresentar especificidade, a análise de MMPB têm se mostrado útil na detecção de MCs em amostras complexas como as de sedimentos (TSUJI *et al.*, 2001).

Atualmente, biosensores têm se destacado como ferramenta promissora no monitoramento contínuo, *in situ* e em tempo real. Biosensores são dispositivos que transformam uma informação química em um sinal analítico, como a variação da concentração de um componente específico de uma amostra. Estes sistemas contêm duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. A portabilidade e simplicidade de análise são as principais vantagens dos biosensores eletroquímicos. No entanto, a necessidade de re-utilização através de várias etapas de lavagens é um dos maiores obstáculos no desenvolvimento de biosensores como método rápido. Biosensores imunoenzimáticos, com anticorpos anti-MCs acoplados apresentam mais sensíveis que os biosensores enzimáticos com proteínas fosfatases com limite de detecção de 100 ng/L e 37 µg/L, respectivamente (CÂMPAS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

2.6.2 Ensaios biológicos para análise de microcistina

Até recentemente, o bioensaio com camundongo foi aplicado em muitos laboratórios como método de triagem para determinar a presença de hepatotoxinas em amostras de água. Porém, o ensaio apresenta baixa sensibilidade e especificidade. Além disso, o uso de animais em testes de toxicidade tem sofrido implicações éticas com oposições públicas (MOUNTFORT *et al.*, 2005). O emprego de animais invertebrados tais como *Daphnia* sp., *Drosophila melanogaster* e larvas de mosquitos foi investigado, no entanto não foram validados para monitoramento de rotina. O bioensaio com camarões (*Artemia salina*) tem se mostrado aplicável, no entanto não apresenta especificidade e sofre interferências de matriz (McELHINEY; LAWTON, 2005).

O ensaio de inibição de proteínas fosfatases (PP) é baseado na capacidade de MCs inibir PP. Este ensaio bioquímico fornece uma indicação da atividade da toxina, além de ser rápido e a enzima ser comercialmente disponível. O método detecta MCs na faixa de concentração limite (1 µg/L) permitida pela OMS, embora a inibição enzimática varie entre os análogos de MCs (RAPALA *et al.*, 2002; WHO, 1998). A reação pode ser quantificada por substratos ³²P (fósforo) marcado ou substratos cromogênicos como fosfato de *p*-nitrofenol (*p*-NPP) com boa correlação com HPLC (RIVASSEAU *et al.*, 1999). O método PP utilizando substratos fluorescentes como 4-metilumbeliferil fosfato e 6,8-difluor-4-metilumbelirefil fosfato foi 2 vezes mais sensível que *p*-NPP (BOIAICHA *et al.*, 2002).

O imunoenensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é promissor para triagem e detecção de MCs em rotina laboratorial de controle de qualidade e monitoramento ambiental. ELISA utilizando anticorpos anti-MCs policlonais e monoclonais (METCALF *et al.*, 2000; NAGATA *et al.*, 1995, ZECK *et al.*, 2001) são sensíveis o suficiente para monitorar MCs de acordo com os limites da OMS (WHO, 1998). Atualmente, vários kits de ELISA são disponíveis comercialmente (Abraxis LLC, Pensilvania Inc, USA; EnviroLogix Inc., Portland, ME, USA; Strategic Diagnostic Inc, Newark, DE, USA e WAKO Chemicals, Osaka, JP). Apesar da praticidade, estes kits apresentam baixa reatividade cruzada contra diferentes análogos de MCs. Na maioria dos casos os anticorpos são produzidos a partir de imunização de animais com um análogo específico, geralmente MCLR. Uma inovação recente é o uso de anticorpos anti-Adda, o resíduo de β-aminoácido presente em todos os análogos (ZECK *et al.*, 2001). Além da possibilidade de resultados falsos-positivo em matrizes complexas, os kits de ELISA podem superestimar a concentração de MCs, o uso de anticorpos anti-Adda não referencia o grau de toxicidade, pois impossibilita a distinção entre os análogos de MCs.

O anticorpo monoclonal de melhor performance (M8H5) possui limite de detecção de 0,025 µg/L, sendo capaz de detectar 5 variantes de MCs (MCLR, MCRR, MCYR, 3-desmetil MCLR e 7-desmetil MCLR) e nodularina. M8H5 foi utilizado para desenvolvimento de coluna de imunoafinidade (CIA) para pré-limpeza de amostras de material biológico (tecido animal) e para concentração de amostras com quantidade traços de toxina (KONDO *et al.*, 2002; TSUTSUMI *et al.*, 2000).

O tempo e alto custo inicial requerido na produção de anticorpos a partir de hibridomas são as principais desvantagens dos métodos imunológicos. O uso da tecnologia de anticorpos recombinantes tem sido proposto como uma alternativa a produção de hibridomas.

Esta inovação utiliza fragmentos de anticorpos selecionados a partir de biblioteca de fagos. Os fagos são expostos na superfície de bacteriófagos filamentosos, e em seguida são selecionados através da exposição ao antígeno. Os fragmentos selecionados são expressos em *Escherichia coli* com um maior rendimento e custos consideravelmente menores que anticorpos gerados por métodos tradicionais. Anticorpo de cadeia simples 3A8 clonado de biblioteca de anticorpos humano semi-sintético naïve (não imunizado) apresentou aplicabilidade em CIA e em biosensores. Selecionados contra MCLR, 3A8 é o fragmento de anticorpo mais sensível, possuindo limite de detecção de 0,8 µg/L para ELISA, sendo capaz de detectar MCRR, MCLW, MCLF e nodularinas na faixa de nM (McELHINEY *et al.*, 2000, 2002).

Embora células produtoras e não produtoras de toxinas não apresentem diferenças fenotípicas, o uso de técnica como PCR (*polimerase chain reaction*) vem sendo aplicada para detecção de cluster de gene *mcy* que codificam microcistinas sintetases para análise da ocorrência de espécies toxigênicas de *M. aeruginosa* (DITTIMAN *et al.*, 1997).

2.7 ENSAIO IMUNOISTOQUÍMICO NA DETECÇÃO DE MICROCISTINAS

Pela combinação de técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas a imunoistoquímica permite localizar toxinas em componentes tissulares definidos (GIMENO *et al.*, 1997). A metodologia baseia-se na reação antígeno-anticorpo, visualizada por anticorpo marcado em tecidos fixados, processados por métodos histológicos convencionais. Devido a especificidade a técnica se tornou crucial e largamente empregada em laboratórios médicos e diagnósticos clínicos.

Inicialmente foram utilizados anticorpos marcados com substâncias fluorescentes (COONS *et al.*, 1941) com a expansão da imunoistoquímica, foi introduzido anticorpo marcado como peroxidase (AVRAMEAS; URIEL 1966; NAKANE; PIERCE, 1966) e fosfatase alcalina (MASON; SAMMONS, 1978). Sistema peroxidase aplicado diretamente nos tecidos animais pode resultar em falsos-positivo, devido à presença de peroxidases endógenas. O bloqueio prévio de peroxidase endógena com soluções de peróxido de hidrogênio melhorou a performance desse sistema (MALORNY, *et al.*, 1988). Ouro coloidal foi introduzido e aplicado para análises em microscópio óptico e eletrônico (FAULK; TAYLOR, 1971).

Dados de experimentos *in vivo* sobre a biocumulação de MCs e transferência na cadeia alimentar humana não têm sido relatadas, portanto técnicas capazes de localizar MCs em tecidos animais representam uma ferramenta importante para marcar o percurso de MCs e prever os riscos de contaminação na cadeia alimentar. Patogenia, hepatotoxicidade e marcação de MCLR foram observadas em tecidos de camundongos (YOSHIDA *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 2000). A distribuição de MCLR foi observada em intestino, plasma, fígado, pulmão, coração e em capilares do corpo todo em ratos oralmente administrados com 500 µg/Kg de MCLR (ITO *et al.*, 2000).

Em peixes MCLR foi detectada em hepatócitos de trutas (*O. mykiss*) após 3 h da administração *gavage* de 5,7 mg/Kg da toxina. A investigação através de anticorpo M8H5, utilizando doses letais (2 mg/Kg) de MCs em tilápias (*O. niloticus*) permitiu a detecção de MC somente no fígado (FISHER; DIETRICH, 2000; HITSFELD *et al.*, 2000; KAMOGAE *et al.*, 2002).

2.8 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Ensaio de toxicidade e citotoxicidade são empregados para avaliar a qualidade da água em estudos de biomonitoramento de rios e na avaliação da genotoxicidade de poluentes em ensaios de laboratório ou no campo (BICKHAM *et al.*, 2000; HOUK, 1992).

O alimento é a principal rota de exposição a substâncias químicas tóxicas. Peixes e crustáceos são freqüentemente apontados como vetores na transmissão de contaminantes aos humanos. Por outro lado, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o perigo potencial de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (POWERS, 1989). Além disso, os peixes podem indicar o potencial de exposição das populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água, sendo um excelente modelo para estudos carcinogênicos e mutagênicos em amostras de água (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Ensaio do cometa

O Teste do Cometa ou Ensaio de Eletroforese em Microgel é um teste sensível e com grande potencial para a detecção de danos no DNA. Este ensaio avalia quebras primárias na fita de DNA em células individuais e é relativamente rápido, simples e de baixo custo (BELPAEME *et al.*, 1998; LOVELL *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 1988).

No teste do Cometa, células são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão sobre uma lâmina de vidro para microscopia. As lâminas são colocadas em solução de lise para permitir o relaxamento do DNA e em seguida é realizada a eletroforese. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA danificados migram para além do core nuclear, formando um cometa com cauda; os fragmentos danificados migram mais rapidamente do que as moléculas de DNA intactas e as células que não foram expostas a um agente genotóxico não formam cauda (PANDRANGI *et al.*, 1995). Assim, quanto maior o dano, maior a cauda do cometa.

O ensaio conduzido sob condições alcalinas (pH = 13) mede quebras de fita simples e lesões em sítios álcali – lábeis (SINGH *et al.*, 1988; LEE; STEINERT, 2003). O Teste do Cometa mede danos genotóxicos, cujo efeito pode ser transitório, ou seja, reparáveis (DEARFIELD *et al.*, 2002; LOVELL *et al.*, 1999). A sensibilidade aliada à aplicabilidade em diversos tipos celulares e a necessidade de baixo número de células para a realização do teste são as principais vantagens do ensaio (LEE; STEINERT, 2003; TICE, 1995).

Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) é um ensaio citogenético rápido e serve tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas, i.e., efeitos mutagênicos persistentes (HEDDLE *et al.*, 1983). O teste do micronúcleo é comumente usado em vários sistemas biológicos para o monitoramento de genotoxicidade ambiental (DEARFIELD *et al.*, 2002; MERSCH; BEAUVAIS, 1997).

Os micronúcleos são massas de cromatina citoplasmática com a aparência de pequenos núcleos que surgem da condensação de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos acêntricos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, perdidos na anáfase (AL-SABTI; METCALFE, 1995; HEDDLE *et al.*, 1983). Os micronúcleos se assemelham ao núcleo principal e podem ser observados facilmente em vários tipos celulares após um ciclo de divisão celular (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000). O MN representa um indicativo de danos citogenéticos de curta duração e promovem a evidência de quebras cromatídicas ou cromossômicas e de disfunção nas fibras do fuso causada por clastógenos e venenos do fuso, respectivamente (MINISSI *et al.*, 1996).

O teste do micronúcleo em peixes é um teste promissor nas investigações de mutagênese ambiental, a frequência de micronúcleos parece estar fortemente relacionada com a qualidade da água dos diferentes ambientes examinados (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001).

2.9 RISCO DE *MICROCYSTIS* SPP. TOXIGÊNICA NO CENÁRIO DA PISCICULTURA BRASILEIRA

Hashimoto, E.H. Bittencourt-Oliveira, M.C, Hirooka, E.Y. Risco de *Microcystis* spp. Toxigênica no Cenário da Piscicultura Brasileira. Revista Biosáude, 1/2 (5),69-81, 2003. (Atualizado)

Abstract

Aquaculture has been a growing affair in the recent Brazilian agribusiness, stimulated by adequate climate condition and abundant supply of water reservoir. Nevertheless, an uncontrolled fish harvest activity can result in deleterious impact in environment caused by increasing nutrient level in water due to feed input, mainly of nitrogen and phosphorus, and consequent eutrophication and toxic cyanobacteria bloom. The fish places in the top of aquatic food chain system, which exposes directly to toxic cyanobacteria. Experimental studies reported the toxicity of microcystins (MCs) and others toxic components of *Microcystis* sp. cells, such as fat acids and lipopolysaccharides (LPS). General acute toxicity and death caused by MCs were associated with symptoms include damages in heart, kidney, gills, and spleen, as progressive and chronic hepatocyte injury and necrosis. However, further systematic studies are required concerning tumor-promoting effect of some cyanotoxins. This review compiles the information about toxicity of *Microcystis* sp. in fish and its implication in the aquaculture system.

Keywords: *Microcystis*. Aquaculture. Fish and toxicity.

Introdução

O uso de recursos hídricos para a criação de peixe experimentou um crescimento substancial nos últimos anos, cujo sistema de policultivo aliado ao incremento de ração resultou na eutrofização nos tanques. O acúmulo de nutrientes no ambiente aquático, principalmente de nitrogênio e fósforo resulta na queda da qualidade de água, constituindo em causa mais comum de floração de cianofíceas toxigênicas, onde *Microcystis* spp. destacam-se pela floração cosmopolita e produção de microcistina (MC). A intoxicação e letalidade em peixe devido à floração de cianofíceas (exposição aguda) decorrem da hepatotoxicidade desencadeada pela MC, e/ou diminuição dos teores de oxigênio dissolvido, decorrente de crescimento microbiano.

Os peixes predominantemente cultivados no Brasil são tilápias e carpas pela excelência na rusticidade, rápido ganho de peso e habilidade de aproveitar resíduos agropecuários. Ocupando o topo da cadeia alimentar no ambiente aquático, o peixe, principalmente de espécies fitoplanctófagas como tilápia e carpa, expõe-se diretamente às cianotoxinas seja por contato ou ingestão.

As cianofíceas, além de causarem prejuízos econômicos na piscicultura, podem afetar a qualidade da carne pela bioacumulação de cianotoxina, atingindo indiretamente a saúde humana. Conseqüentemente, a produção de peixe requer rigoroso controle de qualidade desde a água, composição de rações e aspecto sanitário no manejo, processamento e comercialização. No contexto, a inserção dos testes de toxicidade capazes de

estabelecer limites permissíveis perante contaminantes químicos, assim como caracterizar as injúrias teciduais, constituiria em ferramenta primordial na segurança e qualidade da carne de peixe.

Considerando as atribuições crescentes na piscicultura, a revisão discerne sobre o efeito de *Microcystis* spp. toxigênica em peixe e o impacto na piscicultura brasileira no cenário de agronegócio globalizado.

Panorama sobre Piscicultura Brasileira

A piscicultura tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos, constituindo na alternativa eficaz na obtenção de proteína nobre de baixo custo. A atividade consiste na produção comercial em cativeiro, cujos aspectos inerentes dependem de rigoroso controle de qualidade em todas as etapas de cultivo e produção (SEAB, 2003).

O fator climático brasileiro favorece a competitividade comercial de peixe, permitindo produção com o custo quatro vezes inferior à Europa. Tradicionalmente, o país exporta pescado para os EUA (70 %), Japão (20 %), Argentina (2 %), com perspectiva de ampliação no Mercosul e Comunidade Econômica Européia (CEE). Uma análise comparativa do crescimento da aquicultura com outros setores produtores de proteína no Brasil, revelou uma taxa anual média, entre 1990 e 2003, de 23,3 % para a aquicultura, frente às taxas de crescimento do setor de aves (10 %), bovinos (4 %), suínos (7,9 %) e soja (8,6 %). A aquicultura atualmente representa 5% da produção animal nacional (SEAP, 2007).

No Paraná, cerca de 20 mil produtores dedicam-se à atividade, o que representa 5,7% do total de propriedades rurais no estado, responsáveis pela produção de aproximadamente 18 mil toneladas por ano. A piscicultura paranaense destaca-se entre os três maiores produtores nacionais, sendo 62 % destinada ao pesque-pague, 26 % às indústrias, 10 % ao consumo direto e 2 % comercializadas em feiras. Entre as principais espécies produzidas, destaca-se a tilápia com participação de 64,9 % e carpas, 15,5 % na produção estadual (AEN, 2007; ANDRADE *et al.*, 2005; ARAGÃO, 2003; SEAB, 2003).

O requisito básico da água para o cultivo aquático depende da perfeita interação entre oxigênio disponível, temperatura, matéria orgânica, nutrientes, espécie e densidade mantida no sistema. A quantidade excedente de ração resulta em desequilíbrio ecológico, alterando parâmetros físico-químicos do meio aquático. Salienta-se que 80 % do nitrogênio de ração são excretados como amônia, cuja elevada concentração provoca desde atraso no crescimento até intoxicação letal em peixe. Em síntese, por mais que se

desenvolvam rações balanceadas, estas podem comprometer o meio ambiente por lixiviação de nutrientes. (TABOLT; HOLE, 1994).

A introdução excessiva de matéria orgânica acelera o crescimento de microalgas e plantas superiores, perturbando o balanço de biota aquática. A conseqüente floração algal diminui níveis de oxigênio e resulta na liberação de cianotoxinas e morte de peixes (CARMICHAEL, 1992). *Microcystis aeruginosa*, espécie unicelular de distribuição universal, é a principal produtora de MCs durante floração em meses favorecidos com temperatura da água em torno de 22° C (REYNOLDS *et al*, 1981).

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) determina que águas destinadas à criação natural e/ou intensiva na aqüicultura devem preencher requisitos para classe 2, perante limites de nutrientes e características físicas e químicas (CONAMA, 2002). O limite máximo permitido de MCLR em água potável é de 1 µg/L (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; WHO, 1998).

A análise físico-química de águas de piscicultura da região de Londrina-PR (Julho/2001) mostrou alteração marcante nos níveis de alcalinidade, condutividade, nitrogênio total, nitrito, nitrato e amônia, possivelmente devido ao incremento de rações. O teor de nitrogênio total apresentou-se elevado (41,63 a 83,26 mg/L) principalmente em tanques com alta densidade de peixe, indicando que a atividade propicia a eutrofização e condições para a floração de cianofíceas (HASHIMOTO, 2002).

Eler *et al.* (2001) relacionaram a mortalidade de peixes em pesque-pague (Descalvado-SP) a floração de *Anabaena spiroides* e *Microcystis aeruginosa*. O monitoramento durante um ano de fitoplâncton em um pesqueiro de São Paulo-SP identificou 112 táxons compostos principalmente por Cholorophyceae (52,7%) e Cyanophyceae (17,9%) (MATSUZAKI *et al.*, 2002).

Tamanaha *et al.* (2002), monitorando seis tanques de piscicultura (Agosto–Outubro/2000) no Alto Vale do Itajaí-SC, onde predomina o cultivo de tilápia (80%), carpa (15%) e bagre africano (5%), detectaram fitoplâncton composto de 51 espécies, com floração predominante de *Microcystis* spp. atingindo densidade máxima de $5,12 \times 10^6$ céls/mL. Segundo os autores, o modelo de policultivo aplicado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI integrava a atividade de suinocultura, visando diminuição do impacto ambiental, i.e. os dejetos constituíam fonte alimentar direta (resíduos) e indireta (crescimento de fitoplâncton e zooplâncton) na produção de pescado. Todavia, a piscicultura como alternativa para o aproveitamento de dejetos e sobras afeta a qualidade

sanitária de peixe (ZOCCARATO *et al.*, 1995), além da conseqüência indesejada de eutrofização (GOWEN, 1994).

Mais recentemente, em 2007, no Rio de Janeiro, noticiou-se a proibição da pesca e venda de pescado no complexo lagunar da Barra da Tijuca. A presença de MC, produzida por *M. aeruginosa* foi confirmada na água, em concentração 6 vezes acima da tolerável e nas vísceras e carne de tilápia superando 0,06 µg/Kg (O GLOBO, 2007).

Efeito tóxico de microcistina em peixe

Estudos demonstram o acúmulo de MCs em tecidos, incluindo fígado e músculo de organismos aquáticos (FISCHER; DIETRICH, 2000; LI *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2001, 2003; SOARES *et al.*, 2004). Portanto, a saúde humana pode ser afetada pela ingestão indireta de MCs, cujos riscos depende de toxicidade de florações na área de pesca.

Inicialmente, a letalidade de peixes devido a florações tóxicas foi correlacionada com a hipóxia, causada pela alta demanda bioquímica de oxigênio no ambiente aquático. Todavia, Rodger *et al.* (1994) observaram dano hepático similar em truta tratada com *Microcystis* spp. toxigênica *in vitro*, indicando que o efeito ocorreu principalmente pela ação direta de MC e não pela redução de oxigênio dissolvido (PHILIPS *et al.*, 1985; RABERGH *et al.*, 1991; SUGAYA *et al.*, 1990).

Os peixes apresentaram maior sobrevivência e tolerância a altas doses de MCs, se comparados a ratos e camundongos com LD₅₀ de 122 e 72 µg/Kg (massa corpórea), respectivamente (MIURA *et al.*, 1991). A cinética de absorção da toxina parece ser mais lenta no hepatócito de peixe (ANDERSEN *et al.*, 1993), devido à possibilidade de adaptação ecológica dos animais que compartilham o mesmo habitat de florações de cianofíceas. A dose letal (LD₅₀) intraperitoneal (ip) de MCLR varia entre as espécies de peixes, sendo considerada 550 µg/Kg (de massa corpórea) para carpa (RABERGH *et al.*, 1991), 2,6 mg/Kg para “goldfish” (SUGAYA *et al.*, 1990), 1,6 mg/Kg para Salmão (ANDERSEN *et al.*, 1993) e 2 mg/Kg para tilápia do nilo (KAMOGAE *et al.*, 2002).

Efeito agudo de MCs em peixe resulta principalmente em danos hepáticos (PHILIPS *et al.*, 1985; RABERGH *et al.*, 1991; SUGAYA *et al.*, 1990). Além de necrose tecidual, a exposição crônica da toxina reduz a taxa de crescimento em trutas, devido ao estresse comprometendo a absorção e eficiência na conversão de alimentos (BURY *et al.*, 1996).

As principais alterações histológicas por MC em peixe ocorrem no fígado, rim e brânquias. O salmão (*Salmo salar*) submetido à dose cumulativa ip 1,66 mg/Kg de MCLR apresentou alteração hepática após 36 dias da injeção ip, sendo observado necrose difusa e megalocitose hepática (ANDERSEN *et al.*, 1993).

Em carpa, as doses ip de 130-250 µg/Kg de MCLR causaram dano hepático com dissociação de hepatócitos e degeneração hidrópica, enquanto que no rim ocorreram dilatação da cápsula de Bowman e glomérulo. A administração ip de 550 µg/Kg causou perda total da arquitetura de parênquima hepático com degeneração de túbulos renais (RABERGH *et al.*, 1991). A partir de 400 µg/Kg (ip), além de danos no hepatopâncreas e rim, foi possível detectar MC procedendo marcação imunohistoquímica, após 1 hora da aplicação da dose (FISCHER; DIETRICH, 2000).

Em truta administrada com 5,7 mg/Kg (massa corpórea) por *gavage*, o pico (517 ng/mL) máximo de MC-LR* (marcada) no plasma ocorreu após 3hrs, reduzindo ao nível de 6,0 ng/mL (limite de detecção) após 48hrs. No fígado, a detecção de MC-LR* ocorreu em 1 hora após a administração, com o pico máximo após 3hrs da administração (524 ng/g de tecido) e permaneceu detectável mesmo após 72 horas (TENCALLA *et al.*, 1997).

Os parâmetros bioquímicos de toxidez de MCs baseados na análise de enzimas hepáticas e íons plasmáticos foram avaliados em carpas submetidas a diferentes vias de administração (injeção ip, imersão e ingestão forçada – ‘*gavage*’ de extratos semi-purificados de *M. aeruginosa* toxigênica). Nas doses ip de 2,5 a 50 mg/Kg ocorreu aumento na atividade de aspartame e alanina aminotransferase (AST e ALT), indicando dano hepático. O aumento na concentração de ácidos biliares e bilirrubinas foram correlacionados com a excreção da toxina. O decréscimo de Na⁺ e Cl⁻ plasmático ocorreu em todas as vias: *gavage* de 2,5- 250 µg/Kg (massa corpórea) e imersão em aquário com 1,7 µg/mL, resultado similar foi observado em carpas coletadas em lago contaminado com MCs (CARBIS *et al.*, 1996; 1997). A redução de Na⁺ e Cl⁻ plasmático indicaram excreção desses íons em nível excedente a absorção, levando a alterações metabólicas e estresse (CARBIS *et al.*, 1996; 1997).

As lesões em brânquias por MCLR foram avaliadas em tilápia, truta e em carpa, observando-se necrose e estrutura vacuolar, ponta lamelar dobrada e esfoliação do epitélio lamelar (CARBIS *et al.*, 1997). Lesões brânquiais podem ocorrer devido ao alto pH resultante de atividade fotossintética e excesso de amônia procedente da decomposição de cianofíceas, aumentando a absorção de MC e incrementando necrose hepática (RODGER *et al.*, 1994).

Em peixes de água doce, o sistema renal elimina a água, enquanto que o sódio e cloro são mantidos pelas células clorídricas e células respiratórias do epitélio branquial na lamela secundária. As células clorídricas inibem a saída de sais, enquanto as células respiratórias realizam a troca de metabólitos por sódio e cloro na água (ex.: $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$). A depressão na atividade da bomba iônica afeta o movimento de amônia e dióxido de carbono corporal, conduzindo a depressão respiratória pela redução da afinidade de hemoglobina pelo oxigênio (efeito Bohr) (CARBIS *et al.*, 1997). Os distúrbios na homeostase iônica diminuem a capacidade de regulação da pressão osmótica, balanço de água e equilíbrio ácido-base, influenciando a irritabilidade muscular, permeabilidade de membrana, manutenção do potencial de membrana, transmissão de impulso nervoso e produção de secreção contendo sódio ou cloro (ex: KCl, HCl, NaCl) (CARBIS *et al.*, 1996; 1997).

A hiperfosforilação de proteína celular pela inibição de proteína fosfatase PP1 e PP2A por MCs (MACKINTOSH *et al.*, 1990) pode afetar as enzimas Na^+/K^+ ATPase e Ca^{2+} ATPase Mg^{2+} dependente. A mortalidade em massa repentina foi inicialmente atribuída a efeitos inibitórios nas bombas de íons das brânquias (GAETE *et al.*, 1994). Posteriormente, Bury *et al.* (1998) constataram que na verdade, a inibição de bombas iônicas seja devido a determinados ácidos graxos, que extraídos de *M. aeruginosa* inibem a absorção de Ca^{2+} e atividade de paranitrofenolfosfatase-potássio-dependente em tilápia (*O. mossambicus*). Pois, o mesmo efeito inibitório não foi demonstrado por MCLR *in vitro* (BURY *et al.*, 1996; 1998).

Em peixe saudável, a maior parte da toxina é absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo a absorção branquial ou dérmica desprezível (TENCALLA *et al.*, 1997). No entanto, o extrato lisado de *M. aeruginosa* contém uma variedade de substâncias tóxicas como ficocianinas, capazes de causar reações inflamatórias na superfície epitelial ou mucosa. Uma reação inflamatória moderada a severa pode aumentar a permeabilidade superficial, inclusive perante MCs (JUBB *et al.*, 1985).

Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram negativas, incluindo cianofíceas, são tóxicos e altamente inflamatórios, estimulando a liberação de fatores inflamatórios, como: fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) e interleucinas 1 e 6 (IL-1, -6) (BEST *et al.*, 2002). LPS também estimulam a produção de óxido nítrico (NO), agente de vasodilatação, hipotensão, ativando o sistema renina-angiotensina (HEWETT *et al.*, 1993). O aumento nos níveis de angiotensina II circulante estimula a ingestão de água, conduzindo a maior exposição intestinal a componentes presentes como microrganismos e toxinas e consequente absorção e danos em outros órgãos (FUENTES *et al.*, 1998).

A exposição de peixes ao extrato de cianofíceas promove desbalanço osmorregulatório, com aumento na ingestão e incapacidade de remover o excesso de água. O aumento da massa hepática resultante decorre da exposição e absorção da toxina no intestino e efeito no fígado. Florações de cianofíceas não são axênicas e tipicamente contêm bactérias heterotróficas (FUENTES *et al.*, 1998), portanto os LPS de florações podem ser originários da própria cianofíceas, ou de bactérias associadas (BEST *et al.*, 2002; 2003).

A biotransformação de MC ocorre através da bile, através da conjugação com glutathione via glutathione S-transferase (GST) (BEATTIE *et al.*, 2003). As preparações de LPS de cianofíceas (*Microcystis* CYA43, bloom de *Microcystis* e *Glutrichia*) reduziram a atividade de GST microsomal (GSTm) e solúvel (GSTs) em carpa. A tolerância de tilápias a MCs correlacionada com a alta expressão de GSTs induzida (biotransformação fase II) indicou que a fase II da biotransformação é mais importante que a fase I, pois alterações em enzimas de fase I (CYP1A) não foram significativas após exposição a MCs (WANG *et al.*, 2006). A redução da atividade GST compromete severamente a capacidade de detoxicação, aumentando a susceptibilidade a outras toxinas de cianofíceas, assim como outros contaminantes presentes no corpo d'água (BEST *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado que extratos de cianobactérias e MC pura induzem o estresse oxidativo e produtos de danos oxidativos como peróxidos de lipídio em muitos organismos inclusive peixes (DING *et al.*, 1998, 2001, LI *et al.*, 2007). A exposição de 10 µg/L MCLR em carpas (*C. Carpio* L.) aumentou enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peróxido de glutathione (GSH-Px). A elevação enzimática indica a importância destas na eliminação de espécies de oxigênio reativo (EROs) e regeneração de GSH, devido ao estresse oxidativo resultante de exposição à MC. A continuidade de estresse induzido pela toxina (exposição crônica) pode resultar em danos a hepatócitos como apoptose e necrose celular (LI *et al.*, 2003).

Espécies que se alimentam de fitoplâncton são denominadas fitoplanctófagas. Estas espécies apresentam uma rápida capacidade de depurar MCs, provavelmente devido a freqüente exposição a cianobactérias tóxicas na história natural (XIE *et al.*, 2004).

As cianofíceas são componentes regulares na dieta de peixes ciclídeos e ciprinídeos (Cichlidae e Cyprinidae). Não obstante, tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*) expostas a cianofíceas tóxicas demonstram redução na ingestão na presença de células tóxicas (BEVERIDGE *et al.*, 1993). A correlação significativa ($r = -0.98$) indicou que maior proporção de células toxigênicas (toxina intracelular) resultou

em menor consumo de células por carpas e tilápias, sugerindo capacidade de distinção entre linhagens tóxicas e não tóxicas (BEVERIDGE *et al.*, 1993; KESHAVANATH *et al.*, 1994).

A carpa prata (*H. molitrix*) nativa do leste da Ásia consiste de herbívoros adaptados a filtrar o alimento constituído de fitoplâncton. O aumento numérico de carpas prata no Lago Donghu (China) eutrofizado com *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. e *Oscillatoria* spp. eliminou completamente as florações, indicando a sua aplicação para conter a contaminação de cianotoxinas em águas eutrofizadas (XIE, 2001).

Moriaty e Moriaty (1973) afirmaram que o suco gástrico estomacal de *O. niloticus* atinge pH<1 e facilita a digestão, podendo assimilar de 70-80% de carbono oriundo de *Microcystis* spp. e *Anabaena* spp. Em contraste, baixa digestibilidade e eficiência de conversão de *M. aeruginosa* no estômago de *H. molitrix* foram relatadas por Beveridge, *et al.* (1993). Carpas e tilápias possuem um mecanismo de filtração envolvendo revestimento mucóide produzido pelo filamento branquial. Este mecanismo interrompido retém as cianofíceas através do revestido mucóide, sendo então eliminadas praticamente intactas (BEVERIDGE *et al.*, 1993). Desta forma, a aplicação de peixes fitoplanctófagos para o controle de floração toxigênicas foi sugerida. No entanto mesmo que o as cianobactérias sejam eliminadas praticamente intactas, contaminação secundária no ambiente pode ocorrer através da ressuspensão das fezes de peixes contendo cianobactérias na água (KE *et al.*, 2007).

O monitoramento da Lagoa de Jacarepaguá-RJ (Agosto/1996 a Novembro de 1999) mostrou contaminação de MC em praticamente todos os períodos, com nível máximo de 980 µg/L. MCs foram detectadas em 75% das tilápias (*Tilapia rendalli*) coletadas na lagoa, com positividade no fígado (nd - 31,1 µg/g), vísceras (nd - 67,8 µg/g) e tecido muscular (nd- 26,4 ng/g), porém sem mortalidade, indicando que os peixes embora resistentes não evitaram a ingestão de cianofíceas tóxicas. Em novembro de 1996, a concentração de MCs em tecido muscular atingiu 16,2 ng/g, representando ingestão de 0,081 µg/Kg de MC. Considerando a ingestão de 300 g de peixe por indivíduo de 60 Kg, a concentração detectada representa o dobro da dose diária tolerável por peso corpóreo para MCLR (0,04 µg/Kg) em humano (MAGALHÃES *et al.*, 2001; WHO, 1998).

2.10 ASSOCIAÇÃO AFLATOXINA E MICROCISTINA

Existem poucos relatos acerca de prováveis efeitos tóxicos desencadeados pela associação entre micotoxina e microcistina. Atualmente, tem se mostrado possível a ocorrência de sinergismo entre substâncias tóxicas quando da exposição de um iniciador a um promotor tumoral.

Estudos com populações de Haimen e Fusui, regiões de alta incidência de câncer hepático na China, demonstrou freqüente ocorrência de aductos de AFB₁-albumina em soro humano, sugerindo AFB₁ como um importante agente iniciador de hepatocarcinomas (KAWAMURA *et al.*, 1996; YU, 1995). Salienta-se que nestas regiões freqüente contaminação da água de abastecimento por MCs também foi correlacionado com alta incidência de câncer hepático primário, sugerindo o sinergismo tóxico dessas duas toxinas (SEKIJIMA *et al.*, 1999).

Ueno *et al.* (1992) demonstraram que nivalenol e fumonisinas elevaram expressão de glutathione S-transferase placentar (GST-P) em ratos iniciados com aflatoxina B₁ (AFB₁), sugerindo que co-exposição de um iniciador potente com agentes promotores poderia conduzir ao aumento de incidência de câncer hepático primário. Tal fato torna-se mais preocupante à medida que a co-ocorrência de aflatoxina e outras micotoxinas, como fumonisina, em cereais é rotineiramente verificada (HIROOKA *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 1999; 2002; ONO; HIROOKA, 2002; UENO, 1991).

O processo de carcinogênese envolve geralmente duas etapas distintas, a iniciação e a promoção da neoplasia. A fase de iniciação é resultante de mutação, marcada por alterações na seqüência de bases nitrogenadas do DNA celular, ao passo que a promoção relaciona-se com a expressão fenotípica da mutação ocorrida na primeira fase. Mutações provocadas por exposição à aflatoxina representam alterações genéticas permanentes nas células afetadas, possibilitando a iniciação do processo de carcinogênese (FERREIRA *et al.*, 2006).

MCLR, considerada agente promotor tumor, aumentou sinergicamente o desenvolvimento de focos positivos de GST-P em ratos iniciados com AFB₁, indicando capacidade de induzir hepatocarcinogenicidade modulada por AFB₁ (SEKIJIMA *et al.*, 1999).

2.10.1 Aflatoxina na piscicultura

A expansão da piscicultura no Brasil tem sido acompanhada pela produção industrial de ração, considerada o principal elemento de custo da atividade (CARNEIRO, 1999). O setor classifica-se como o sexto maior consumidor nacional de ração, apresentando crescimento anual médio de 24,1% na demanda entre 1998 e 2001, em que foram consumidas 80 mil e 152,8 mil toneladas, respectivamente (PADILHA, 2001).

A contaminação por micotoxinas atinge 25% do suprimento alimentar mundial, constituindo-se no grupo de compostos tóxicos mais frequentes em cereais e sementes oleaginosas. Fungos micotoxigênicos crescem sob condições favoráveis nos mais variados substratos durante a colheita, armazenamento e industrialização (BALDISSERA *et al.*, 1993; EPPLEY, 1968). Entre os fatores ambientais que determinam a contaminação destacam-se o excesso de umidade no campo e no armazenamento, temperaturas extremas, estiagem, práticas de colheita e infestação por insetos (COULOMB JR, 1993, ONO *et al.*, 2000).

As aflatoxinas (AFLAs) são micotoxinas provenientes do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que contaminam as culturas desde o campo (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). As AFLAs são responsáveis por graves intoxicações em doses elevadas, em adição ao efeito mutagênico e teratogênico em animais, inclusive ao ser humano (WOGAN, 1992).

Entre as AFLAs, a AFB₁ caracteriza-se por ser hepatocarcinógeno mais potente, sendo que “International Agency For Research on Cancer” alocou AFB₁ no grupo de carcinogênicos de Classe 1 – carcinógeno primário (IARC, 1993). AFB₂, AFG₁ e AFG₂ derivam da AFB₁ e caracterizam-se pela menor toxicidade, porém acarretam sinergismo tóxico (SMITH; MOSS, 1985).

A contaminação por aflatoxinas em rações e matérias-primas destinados ao consumo animal tem sido relatada mundialmente (MADHUSUDHANAN, 2004; RAMOS; HERNÁNDEZ, 1997; SCUDAMORE *et al.*, 1997). Entre os produtos agrícolas com maior risco de contaminação por aflatoxina distinguem-se os grãos, como amendoim, milho, trigo e arroz, componentes da maioria das rações para animais, incluindo para peixes, assim como da dieta humana.

A análise de AFLAs, por cromatografia em camada delgada, em 42 amostras de rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina-PR, detectou níveis de não

detectado até 15,60 ng/g. Entre as AFLAs, AFB₁ apresentou maior frequência e concentração (n.d. a 13,13 ng/g). Os níveis de AFLAs nas rações apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, conforme a Portaria n^o. 183 de 21/3/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), que estabelece níveis de AFLAs (B₁+B₂+G₁+G₂) em 20 ng/g. No entanto, considerando-se o limite de 10 ng/g de ração, imposto pela maioria dos membros da comunidade importadora da União Européia (FAO, 2001), 88,1% dos valores estiveram acima de 10 ng/g (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

2.10.2 Estrutura química e atividade tóxica de aflatoxina

As aflatoxinas são difurocumarolactonas, pertencentes ao grupo de furocumarinas. A AFB₁ apresenta atividade hepatocarcinogênica comprovada, cuja característica heterocíclica confere degradação lenta pelo sistema microsomal hepático (EATON, 1994). O problema se agrava, já que o sistema monoamino-oxidase, normalmente destinado a biotransformação, executa reação indesejável de ativação metabólica de AFB₁; o resultado é a formação de aductos de DNA, conduzindo à mutagenicidade, carcinogenicidade e efeitos teratogênicos (LOTLIKAR, 1989)

O mecanismo sobre genotoxicidade de AFB₁ tem sido parcialmente elucidado, baseado no metabolismo hepático de sistema microsomal de citocromo P450 (CYP450). A reação produz um intermediário altamente reativo constituído de epóxido de AFB₁-8,9B (AFBO), um composto altamente eletrofílico capaz de reagir covalentemente com sítios nucleofílicos de macromoléculas, seja DNA, RNA ou proteínas, formando aductos (ABD-ALLAH *et al.*, 1999). O evento representa etapa inicial importante no processo de iniciação da carcinogênese (NAKATSURU *et al.*, 1989).

As espécies animais diferem significativamente quanto à sensibilidade perante AFB₁. Entre os mais diversos mecanismos, o grupo de enzimas citosólicas constituídas de glutathione S transferases (GSTs) desempenham papel importante na modulação de ligação AFB₁-DNA e carcinogenicidade, através da inativação de epóxido-AFB₁ por conjugação com glutathione (GSH) (EATON; GALLAGHER, 1994; LOTLIKAR, 1989).

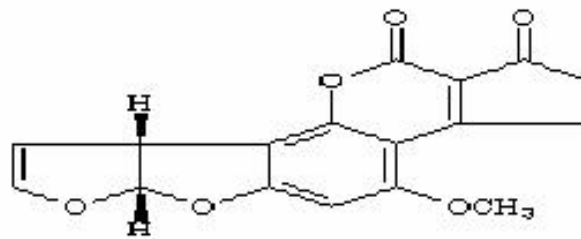


Figura 3 – Estrutura química de aflatoxina B₁.

AFB₁ encontra-se entre os mais potentes agentes genotóxicos, capaz de induzir formação de micronúcleo entre outras alterações genéticas. Aproximadamente 1% da dose de aflatoxina administrada via ip em ratos forma ligação covalente com DNA, atingindo seu pico após 2 h da inoculação. A formação de aductos parece ser dependente da dose bem como do número de exposições (WOOGAN, 1992).

A AFB₁ induz aberrações cromossômicas, micronúcleo, troca de cromátides irmãs e quebras cromossômicas (WANG; GROOPMAN, 1999). Além da formação de aductos de AFB₁-DNA, espécies de oxigênio reativo (EROs) e danos oxidativos no DNA também contribuem para a genotoxicidade de AFB₁ (SHEN *et al.*, 1994; 1995). As EROs oxidam ácidos graxos polinsaturados iniciando uma cadeia de reações levando a peroxidação de ácidos graxos causando danos em membrana fosfolipídica celular e desregulando funções celulares (MADHUSUDHANAN *et al.*, 2004).

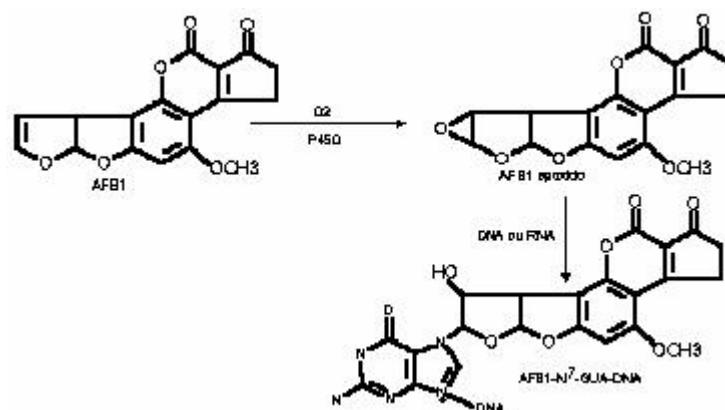


Figura 4 – Biotransformação de Aflatoxina B₁ por reação de epoxidação.

2.10.3 Efeito tóxico de Aflatoxinas em peixe

Micotoxicoses em peixes representam um problema de difícil diagnóstico, devido a confusão de síndromes induzidas com infecções e desequilíbrios/deficiências nutricionais (SMITH; MOSS, 1985). A hepatocarcinogenicidade da AFB₁ foi demonstrada em peixes (HENDRICKS, 1982; SINNHUBER *et al.*, 1977), embora a toxicidade aguda e o potencial carcinogênico varie amplamente entre as espécies (PLAKAS *et al.*, 1991). Nestes animais, o principal metabólito da biotransformação da AFB₁ é o aflatoxicol (AFL), formado pela redutase citosólica NADPH-dependente, o qual representa um mecanismo de detoxicação, quando conjugado com ácido glucurônico e excretado, mas também de reserva de AFB₁, quando re-convertido a AFB₁ por oxidação microsomal (GALLAGHER; EATON, 1995).

A contaminação da ração com AFB₁ pode acarretar em perdas econômicas consideráveis na produção de peixes. Estudos demonstraram que tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo AFB₁ apresentaram menor ganho de peso e comprimento, pior conversão alimentar (TUAN *et al.*, 2002). Em carpas (*Labeo rohita*) foi demonstrada imunossupressão, favorecendo o aparecimento de doenças (SAHOO; MUKHERJEE, 2001). Baixo peso e qualidade sanitária de peixe afetada são causas de perdas econômicas significativas na piscicultura.

Halver (1969) relatou que a ingestão prolongada de 0,4 µg/g de AFB₁ causou neoplasmas hepáticos, necrose de hepatócitos e mudanças degenerativas em tecidos pancreáticos e renais de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Neste animal extremamente sensível, a dose letal efetiva média (DL₅₀) intraperitoneal de 0,81 mg/Kg de peso corpóreo elegeu-o como modelo de estudo metabólico de AFB₁ (BAILEY *et al.*, 1984).

Em contraste, o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) requereu DL₅₀ intraperitoneal de 11,5 mg/Kg de AFB₁ durante 10 dias (ASHLEY, 1970; JANTRAROTAI; LOVELL, 1990), sendo mais resistentes do que as tilápias (ABDELHAMID; KHALIL, 1994). Plakas *et al.* (1991) procedendo a administração oral de AFB₁-C¹⁴ 250 µg/Kg de peso corpóreo em bagre de canal, detectaram a concentração máxima (40 µg/Kg) no músculo após 4 horas. Alta concentração na bile foi observada após 24 horas, reduzindo bastante a concentração no plasma e demais tecidos, demonstrando baixo potencial de acumulação de AFB₁ e metabólitos em bagre de canal. No entanto, risco potencial deve ser advertido, considerando que a bioacumulação varia entre espécies de peixes, frequência e níveis de exposição, taxa e extensão da absorção e metabolização.

A genotoxicidade induzida por AFB₁ foi demonstrada através do teste de micronúcleo em eritrócito de ciprinídeos (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* e *Ctenopharyngodon idella*). A truta arco-íris (*O. Mykiss*) inoculadas ip com AFB₁ (0,5 mg/Kg) apresentaram, após 4h, danos intensos no DNA de sangue total e rim com reparação após 24h, enquanto no fígado os danos foram progressivos. Em constraste o bagre de canal (*I. punctatus*) igualmente exposto à AFB₁ não apresentou aumento de danos no DNA, quando comparados com controle (ABD-ALLAH *et al.*, 1999).

2.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da escassez de informação sobre efeito tóxico de cianofíceas na piscicultura brasileira, assim como a falta de monitoramento nesta atividade em ascensão, investigações abrangentes devem objetivar amplo controle de qualidade, envolvendo desde qualidade da água a produto final, evitando a bioacumulação e risco à saúde humana.

Desta forma, a etapa inicial deste trabalho objetivou a aplicação de imunistoquímica para detecção de MCLR e ensaios genotóxicos para avaliar a interação entre *Microcystis aeruginosa* e aflatoxina B₁ em tilápias, espécie amplamente cultivada no Brasil.

Na etapa seguinte, considerando a necessidade de métodos alternativos para controle de cianobactéria toxigênicas, foram isolados microrganismos da Estação de Tratamento de Esgoto São Lourenço de Londrina-PR com intuito de selecionar microrganismos antagonistas.

Na etapa avançada do experimento o método avançado de Marfey e ESI-LCMS foram aplicados para investigação de aminoácidos e peptídeos, como produtos ainda não identificados da biodegradação de MCLR utilizando a cepa B9, visando à qualidade de água e o estudo dos mecanismos de biodegradação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor o biocontrole de cianofíceas toxigênicas, utilizando microrganismo antagonista diante da limitação dos métodos convencionais na remoção de microcistinas. Paralelamente, avaliar a aplicabilidade de métodos biológicos visando monitoramento de *Microcystis aeruginosa* toxigênica na piscicultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a aplicabilidade de ensaios de genotoxicidade micronúcleo e cometa, para o monitoramento de *Microcystis aeruginosa* e aflatoxina B₁ e ensaio imunoistoquímico para detectar microcistina em fígado e músculo de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*);
- Avaliar o potencial da Estação de tratamento de esgoto São Lorenço de Londrina-PR para isolamento e seleção de microrganismos com atividade anti-cianobactéria e/ou capacidade de degradar microcistina-LR;
- Detectar peptídeos e aminoácidos derivatizados com reagente de Marfey (L-FDLA), visando elucidar o mecanismo de biodegradação de microcistina-LR pela cepa B9.

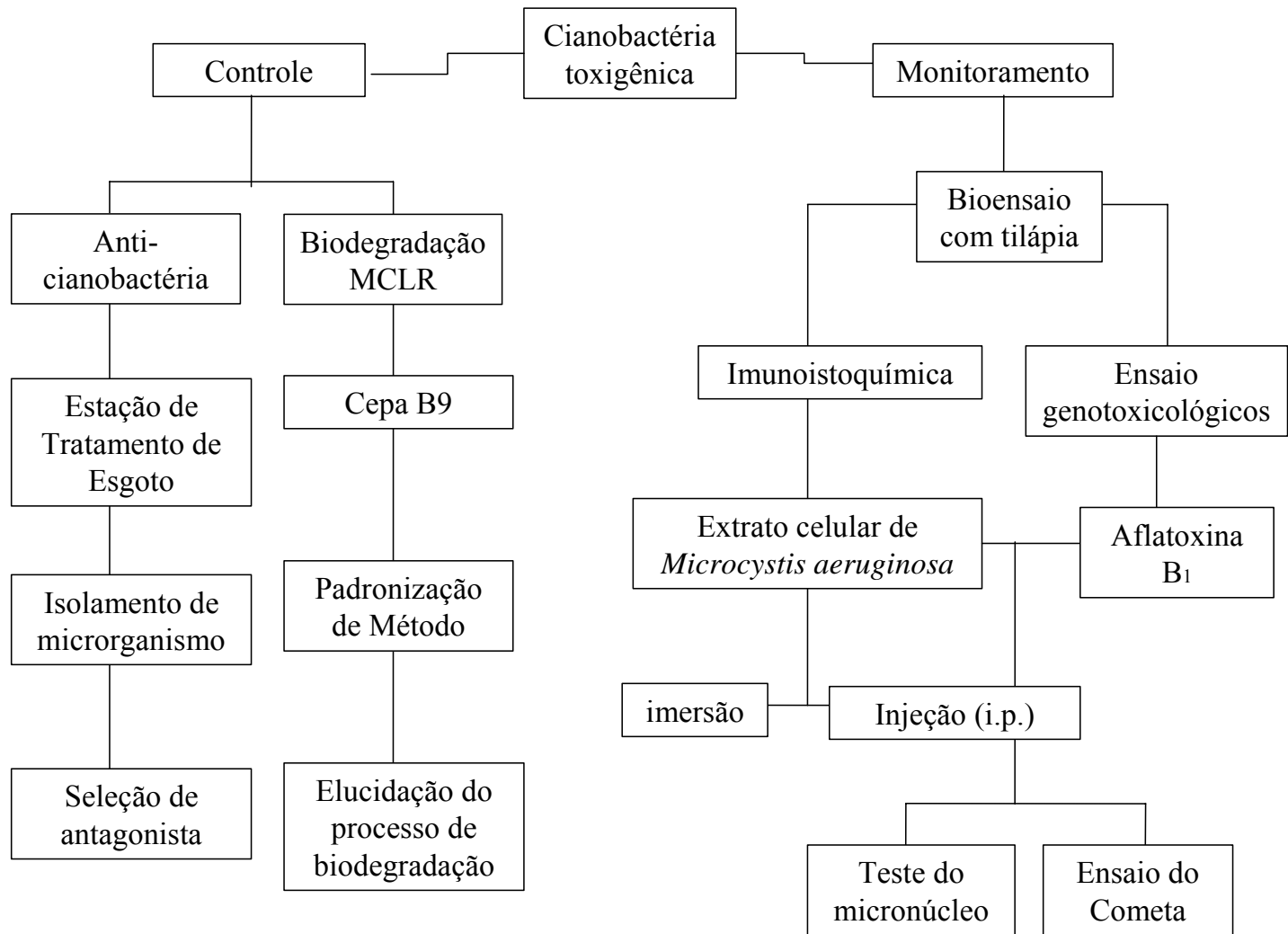
4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia executada no transcurso da pesquisa foi esquematizada sob forma de fluxograma no tópico Delineamento Experimental, conforme abaixo apresentado. O procedimento técnico, redigido em detalhes, foi inserido em cada capítulo descrito no item Resultados e Discussão, visando posterior publicação.

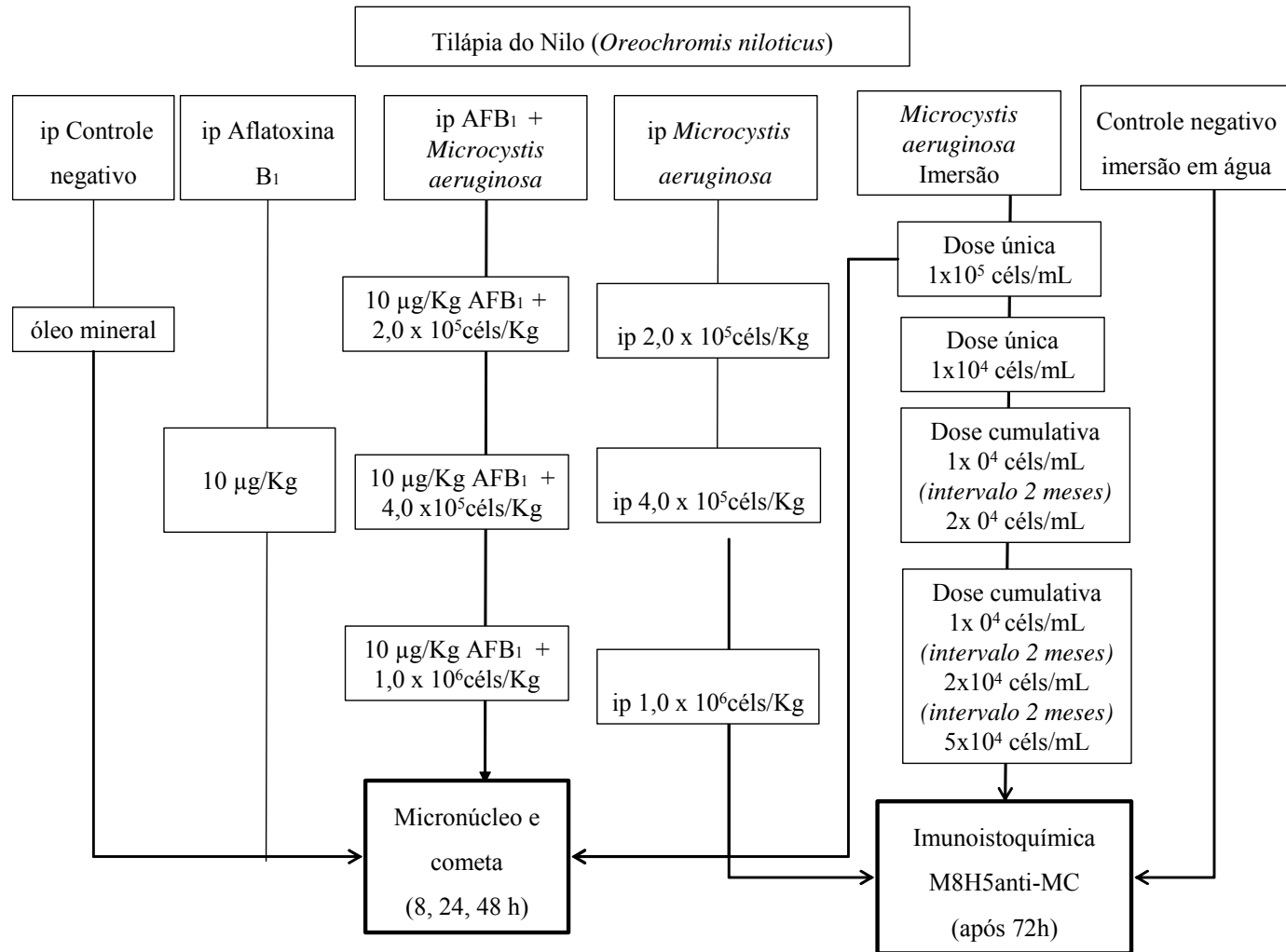
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Tendo como metas a aplicação de métodos biológicos para monitoramento e controle de cianobactéria toxigênica na piscicultura e para o tratamento de água, o delineamento experimental (Fluxograma 3) foi baseado no fluxograma iniciado no ano de 2001 com a dissertação de Mestrado e a partir da integração de grupos de pesquisas a nível nacional e internacional. O Fluxograma 3 ilustra o delineamento geral do experimento envolvendo o bioensaio com tilápias e interação de *Microcystis aeruginosa* e aflatoxina B₁ e controle de cianofíceas toxigênicas, através do isolamento e seleção de microrganismos com atividade antagônica a cianobactéria e biodegradação de MCLR. Na etapa inicial, o bioensaio com tilápias (Fluxograma 4) foi realizado na Estação de Piscicultura (EPUEL-CCB-UEL) sob responsabilidade do Dr. Heitor Frossard e Mauro Caetano Filho, para este bioensaio foi utilizado a cepa *Microcystis aeruginosa* CCBUSP262 (Fluxograma 5) cuja a produção e o cultivo foi realizado no Laboratório de Cianobactérias CCB-ESALQ/USP sob supervisão da Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira, a análise de MCs no extrato celular de *M. aeruginosa* foi realizada através de Cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas; A aplicação de métodos de genotoxicidade cometa e micronúcleo para avaliar o efeito do extrato celular *M. aeruginosa* e aflatoxina B₁ (Fluxograma 6) foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Ilce M. S. Cólus do Laboratório de Mutagênese-CCB-UEL e para a análise do acúmulo de MCs em fígado e tecido muscular dos peixes expostos ao extrato celular de *M. aeruginosa*, foi aplicado o ensaio imunoistoquímico (Fluxograma 7), executado sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva-CCA-UEL. Na etapa seguinte, amostras de água de esgoto foram coletadas na Estação de esgoto São Lorenço, Londrina-PR de acordo com a sugestão da Profa. Dra. Sandra

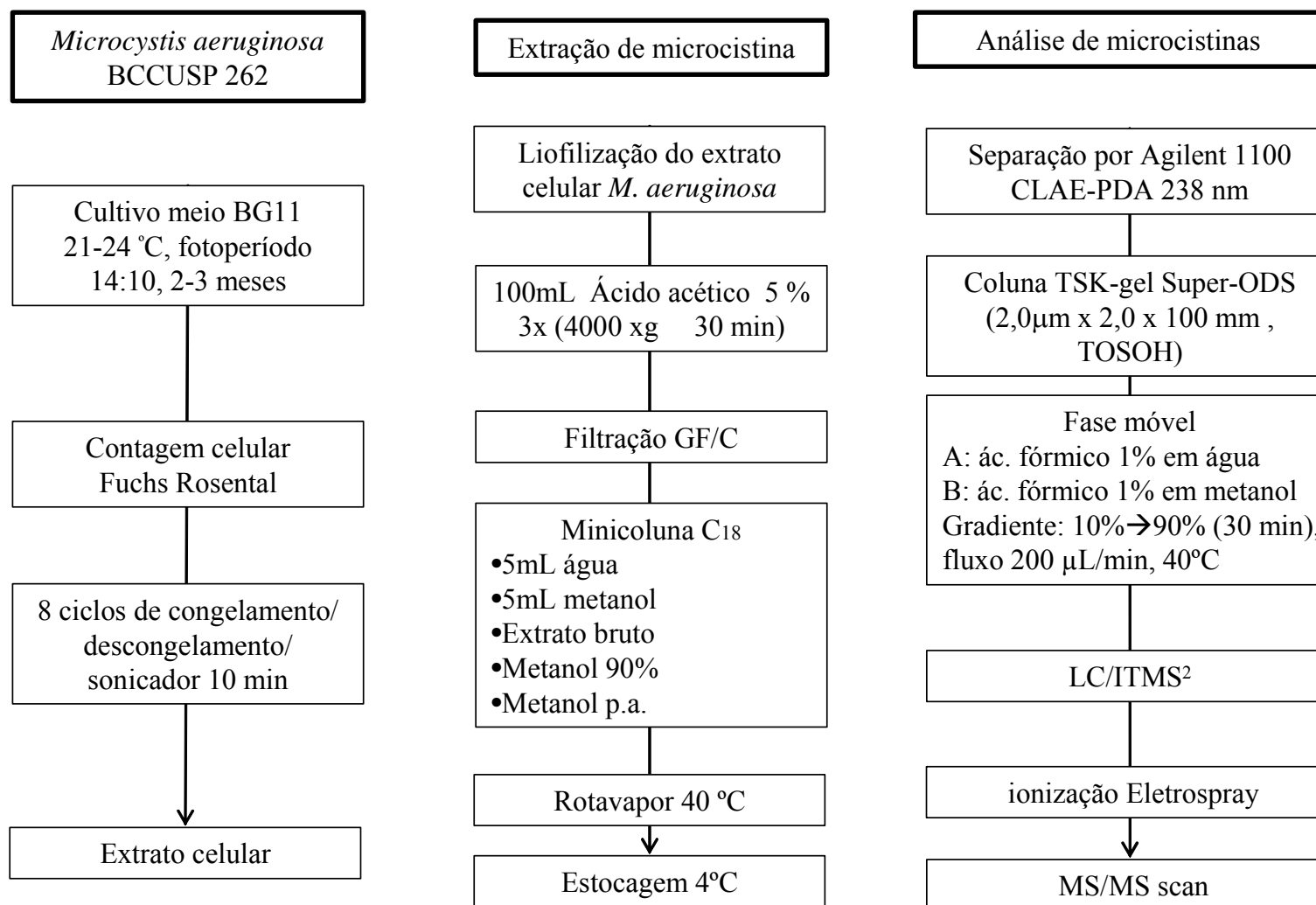
Cesário do Depto de Engenharia Sanitária – CTU-UEL, sendo coletadas 29 amostras de água no: afluente, reator 1 e 2, lagoa de estabilização e efluente. A atividade anti-cianobactéria e a capacidade de degradar MCLR de microrganismos isolados nestas amostras foram testadas na etapa avançada do experimento (Fluxograma 8). A biodegradação de MCLR foi investigada utilizando a cepa B9 e aplicando-se o método de derivatização com o reagente de Marfey (Fluxograma 9). A análise de microcistina (Fluxograma 5), seleção de microrganismo antagonista (Fluxograma 8) e investigação do processo de biodegradação de MCLR (Fluxograma 9) foram realizadas a partir de intercâmbio com o suporte do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDDE) da CAPES. O trabalho foi realizado no *Laboratory of Environmental Science, Faculty of Pharmacy, University of Meijo* – Nagoya, Japão, sob orientação do Prof. Dr. Ken-ichi Harada.



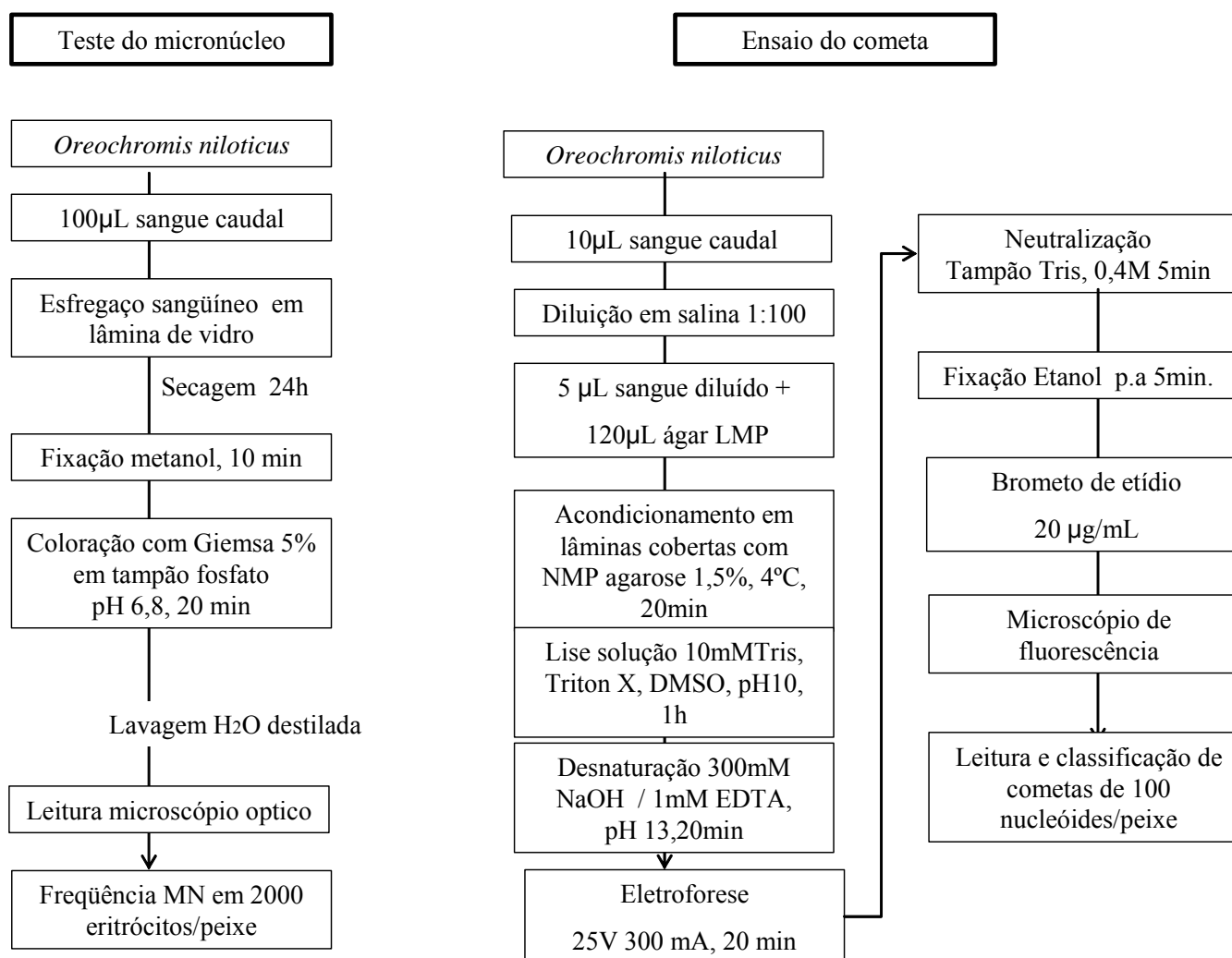
Fluxograma 3 – Delineamento experimental geral da pesquisa.



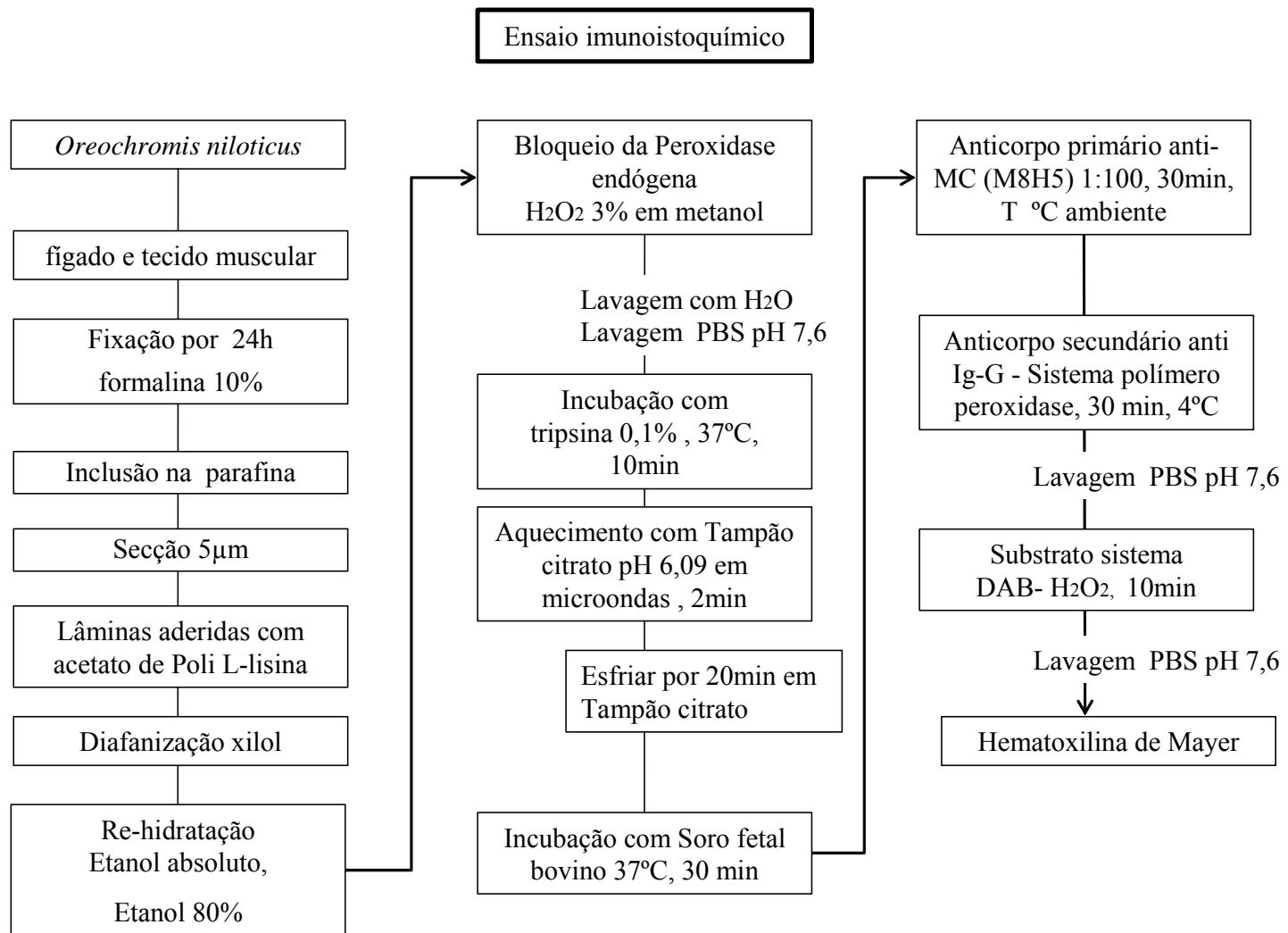
Fluxograma 4 – Delineamento experimental do bioensaio com Tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas à extrato celular de *Microcystis aeruginosa* e Aflatoxina B₁.



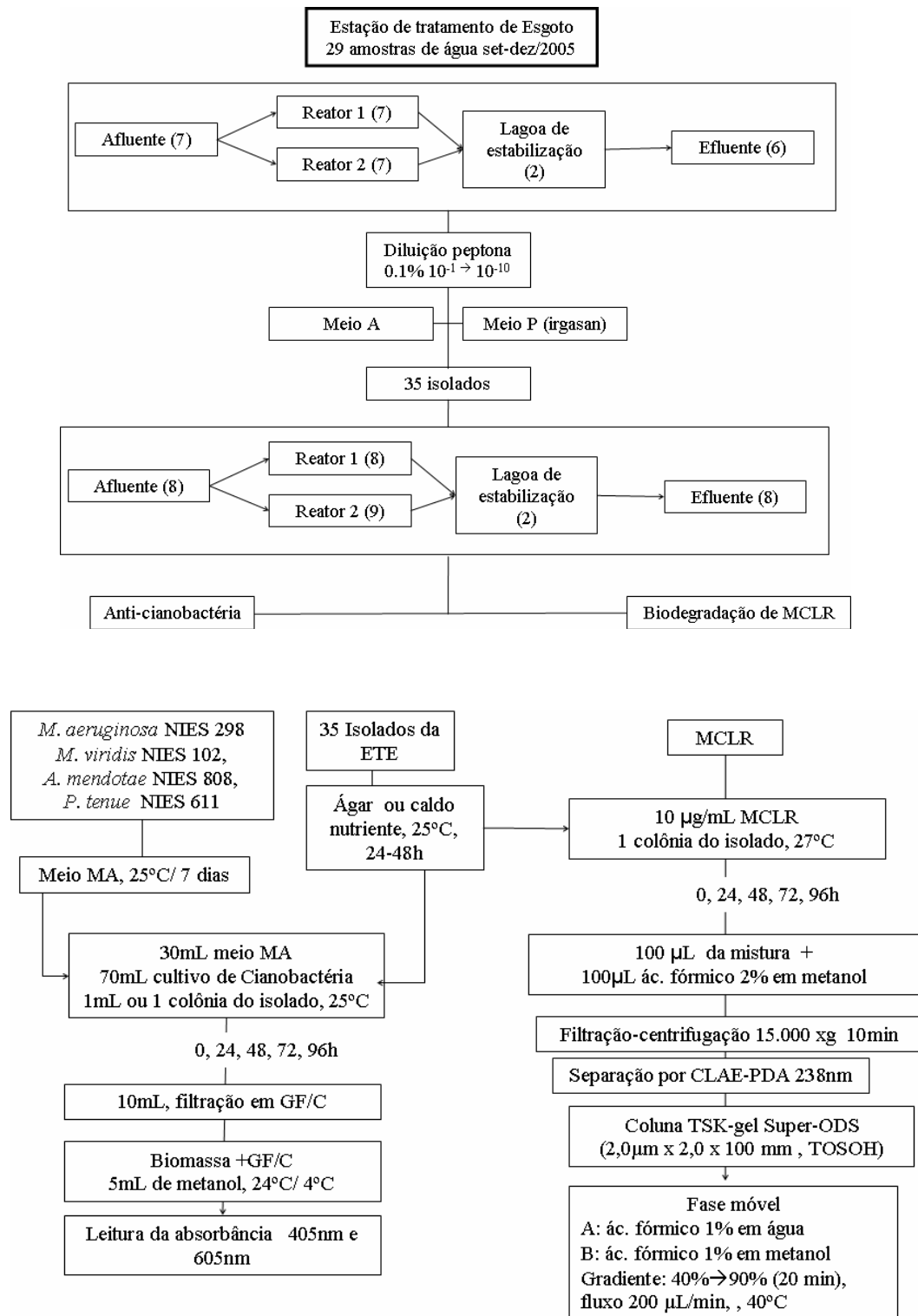
Fluxograma 5 – Cultivo de *Microcystis aeruginosa*, preparo do extrato celular, extração e análise de microcistina.



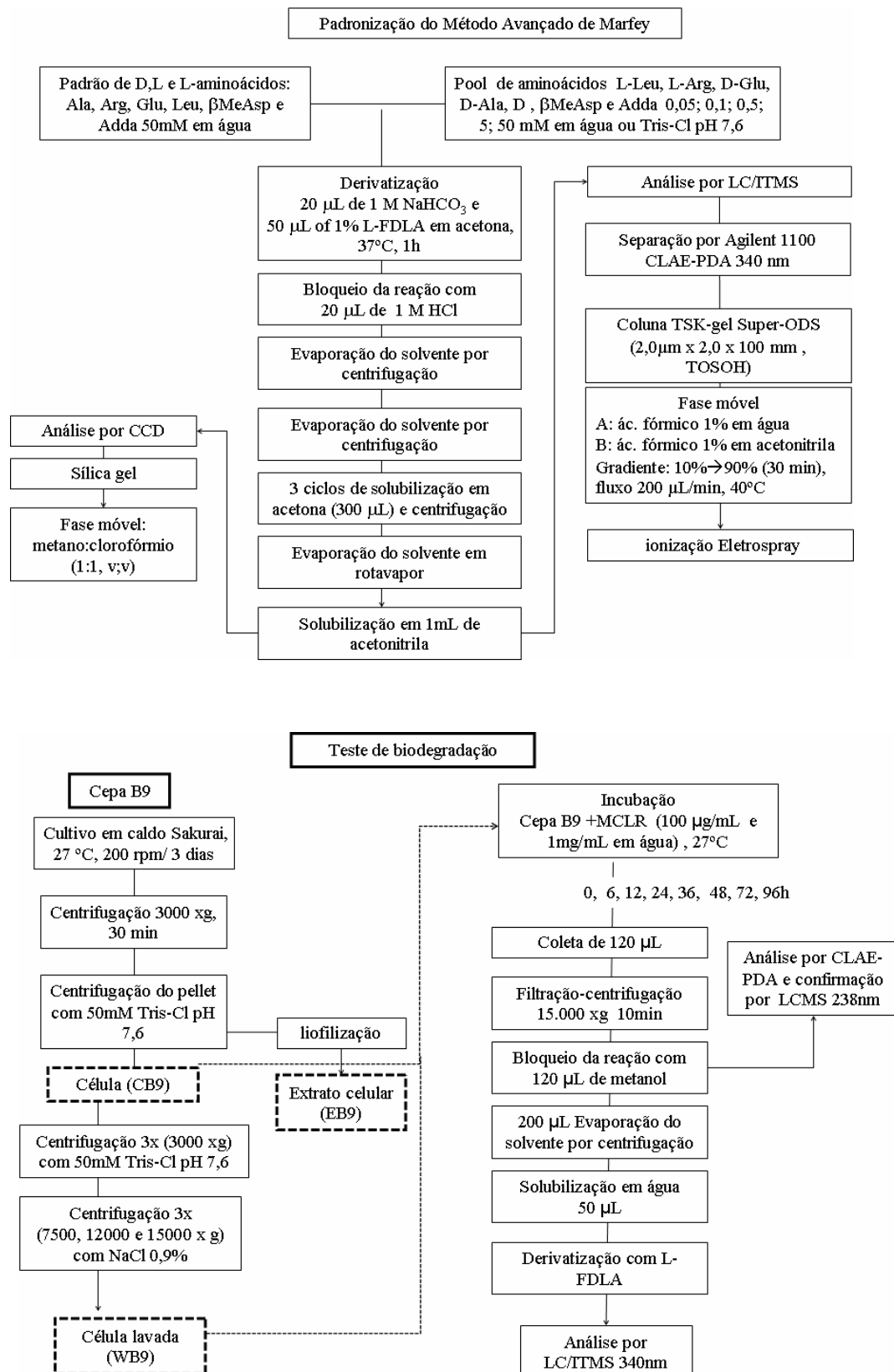
Fluxograma 6 – Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa para avaliação de efeitos de genotoxicidade da interação Aflatoxina B₁ e extrato celular de *Microcystis aeruginosa*.



Fluxograma 7 – Ensaio imunistoquímico para detecção de microcistina em tecido hepático e muscular de Tilápia (*Oreochromis niloticus*).



Fluxograma 8 – Seleção de microrganismos antagonistas contra cianobactérias toxigênicas.



Fluxograma 9 – Aplicação do método avançado de Marfey para elucidação do mecanismo de biodegradação de MCLR pela cepa B9.

5 RESULTADOS E DISCUSSAO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de capítulos para publicação, listados abaixo:

Capítulo I:

- **BIOMONITORING ASSAY IN ANALYSIS OF CO-OCCURRING MICROCYSTIN AND AFLATOXIN IN AQUACULTURE**

Capítulo II:

- **POTENCIAL ANTI-CIANOACTÉRIA EM MICROBIOTA PERTENCENTE AO ECOSISTEMA DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO**

Capítulo III:

- **NOVEL MICROCYSTIN-LR BIODEGRADATION PRODUCTS DETECTED BY ADVANCED MARFEY'S DERIVATIZATION METHOD**

BIOMONITORING ASSAY IN ANALYSIS OF CO-OCCURRING MICROCYSTIN AND AFLATOXIN IN AQUACULTURE

Abstract

Aquaculture has been a recent growing affair in the Brazilian agribusiness, with successful goal dependent on quality of water and feed supply. Aflatoxin B₁ (AFB₁) in vegetable origin feed is a topic of concern, where the overfeeding in fishpond can cause bloom of *Microcystis aeruginosa* producing microcystin (MC). Exposure of *Oreochromis niloticus* (N = 96) to AFB₁ and crude-extract of *M. aeruginosa* strain CCBUSP262 (MC analyzed by ESI-LCMS) was carried out, and designed as ^(EMC): intraperitoneal *M. aeruginosa* cell extract injected at 0.602 ^(EMC1), 1.204 ^(EMC2) and 3.011 ^(EMC3) µg/Kg of 7D-MCLR; ^(AFB1+EMC): AFB₁ ^(ip10 µg/Kg) and three ip *M. aeruginosa* ^(AFB1+EMC1, AFB1+EMC2, AFB1+EMC3) doses; ^(i-EMC): immersion in unique *M. aeruginosa* dose at 1x10⁴ ^(i-EMC1) and 1x10⁵ ^(i-EMC2) cells/mL, and two months intervals cumulative doses at 1x10⁴, 2x10⁴ ^(i-EMC3) and 1x10⁴, 2x10⁴ and 5x10⁴ ^(i-EMC4) cells/mL, corresponding: 30.1, 60.2, 150.5 and 301 µg/L of 7D-MCLR. Blood sample was collected after 8, 24 and 48 h to analyze micronucleus (MN) frequency and comet score. Immunohistochemistry in tissues was carried out with M8H5 monoclonal antibody by polymer peroxidase system. Comparing the ip EMC and ip AFB₁+EMC group, higher MN frequency at ^(AFB1+EMC1, AFB1+EMC2, AFB1+EMC3) than ^(EMC1, EMC2, EMC3) showed mutagenic response of this synergism. Slight genotoxic synergism was also observed in comet score average comparing ^(EMC1, EMC2, EMC3) and ^(AFB1+EMC1, AFB1+EMC2, AFB1+EMC3). Immunohistochemistry detected MC in all fish liver treated with ip *M. aeruginosa* cell extract, but immersed group showed positive only at 301 µg/L ^(i-EMC3) concentration, indicating lower contamination of immersion route. Although MC was not detected in edible meat (muscle), sensitive immunoassay combined with genotoxicity assay could be an attractive biomonitoring tool.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*. Aflatoxin and biomonitoring.

INTRODUCTION

Microcystins (MCs) are hepatotoxic cyclic heptapeptides produced by cyanobacteria of the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* and *Oscillatoria*, which cause bloom in eutrophied fresh water lakes and reservoirs (CARMICHAEL, 2002). The MCLR is one of the most toxic in the group, where a single intraperitoneal dose (ip) can cause hemorrhagic and coagulative necrosis in liver. MCLR inhibits activity of protein phosphatase 1 (PP1) and 2A (PP2A) by covalent binding, and leads to hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins, rearrangement of intermediate actin filaments, and microtubules with alteration of cell structure (HOOSER *et al.*, 1991).

Aquaculture has been a recent growing affair in the Brazilian agribusiness, stimulated by adequate climate and abundant supply of water reservoir. Inadequate management in fish farming can cause deleterious environmental impact, regarding the fish placed on top of aquatic food chain to toxic cyanobacteria (MAGALHÃES *et al.*, 2001). The hazard due to intake of such fish meat has been unknown. Monitoring of aquaculture ponds in Northern Parana state-Brazil showed eutrophication and Cyanophyceae bloom along October 2002 to October 2003. MC was detected in 95 % of samples, but at low concentration (mean: 0.275 µg/L, range: not detected to 3.13 µg/L). However, the aquaculture samples collected at

December/2002 and January/2003 showed $>1 \mu\text{g/L}$ levels (KAMOGAE *et al.*, 2006), i.e. higher than WHO Drinking Water Guideline (1998).

Additional hazard can be incorporated from fish feed, as the aflatoxin B₁ (AFB₁) has been a topic of concern in vegetable origin ingredients (GOURAMA; BULLERMAN, 1995). Aflatoxin B₁ is classified as group 1 carcinogen by International Agency for Research on Cancer and it is hepatotoxic, hepatocarcinogenic and mutagenic in human and several animal species (IARC, 1993). The industries supply aquaculture with a variety of feeds, where the main ingredient is mycotoxin susceptible grain. The survey of 42 commercial fish feed in Northern Parana state detected aflatoxin in levels ranging from non-detectable to $15.60 \mu\text{g/Kg}$, and 61.90% were $< 4 \mu\text{g/Kg}$ (HASHIMOTO *et al.*, 2003). The Brazilian guideline settled the limit in $20 \mu\text{g/Kg}$ for feed (BRASIL, 1996).

The aquaculture activity is stimulated in tropical countries, whereas the same condition favors fungal growth and mycotoxin production. The inadequate management due to overfeeding exposes the fish simultaneously to carcinogen aflatoxin (EATON & GROOPMAN, 1994) and tumor promoting MC (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 2002). The MC bioaccumulation was evaluated by immunohistochemistry, as well as AFB₁ and MC synergism was monitored by micronucleus and comet assay in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

MATERIAL AND METHODS

Toxins, reagents and M. aeruginosa cell extract

Aflatoxin (AFB₁) purchased from Sigma-USA (approx. 98% purity) was subdivided into $100 \mu\text{g}$ each vial. The injection solution was prepared with sterile mineral oil to reach final concentration of $25 \mu\text{g/mL}$. Aflatoxin B₁ (molar absorptivity, 21,800) was previously dissolved in methanol and calibrated at 360 nm (UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Australia).

MCLR and 7desmethyl-MCLR (7-D-MCLR) standards were isolated from lyophilized cyanobacterial cells collected from Laguna Bay-Philippines and Lake Suwa-Japan, respectively. The toxins were purified ($> 95\%$ purity) according with Harada *et al.* (1996).

M. aeruginosa CCBUSP262 isolated from Lago das Garças- Sao Paulo, Brazil was cultivated in BG11 medium at $21-24^\circ \text{C}$ with 14:10 hours light:dark photoperiod (irradiance $30-40 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) for 2-3 months. The concentration (cells/mL) was determined in Fuchs-Rosental chamber (Nikon E200, Melville, NY, USA). Crude extract was obtained

disrupting the cells by 8 cycles of freeze-thawing and 10 min sonication process. The MCs in lyophilized samples (1 g) was extracted with 5% acetic acid (4000 x g/30 min), filtrated (GF/C) and cleaned up in ODS cartridge. The residue was dried and stored at 4 °C until analysis by LC/IT-MS² (liquid chromatography/ ion trap mass spectrometer, Agilent 1100 HPLC system, Palo Alto, CA, USA). Five microliters of sample was submitted to LC separation using TSK-gel Super-ODS column (2 µm, 2.0 x 100 mm, TOSOH) at 40 °C. The mobile phase was water containing 0.1 % formic acid (A); methanol containing 0.1 % formic acid (B) under gradient elution from 10 % B to 90 % B at 30 min. The flow rate was 200 µL/min, with PDA detector at 238 nm. MS analysis was performed by Finnigan LCQ Deca XP plus IT mass spectrometer equipped with an ESI interface (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Scan ranges were selected according to the molecular *m/z* of analytes (HARADA *et al.*, 1996).

Exposure protocol

Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) of 40-60 g weight (N = 96) were cultivated in Fish Hatchery Station at the State University of Londrina – Brazil. The fish were acclimatized during 2 week in well-aerated water (dissolved oxygen > 4 mg/L), pH 6.5 ± 1, temperature at 25 ± 1 °C (500 L tanks). Daily feeding was carried out with AFB₁ negative pellet feed, which was withdrawn 24 h before exposure. The fish were exposed to *M. aeruginosa* CCBUSP262 cell extract by two routes: intraperitoneal (ip) injection and immersion in tank containing cell-extract. The aflatoxin (AFB₁) was ip injected (single dose of 10 µg/Kg).

Intraperitoneal exposure was carried out in groups divided in 8 tanks with 6 fish each. Three groups were injected ip with a single dose of *M. aeruginosa* CCBUSP262 cell extract at 2.0x10⁵ (EMC1), 4.0x10⁵ (EMC2) and 1.0x10⁶ cells/Kg (EMC3). AFB₁ and *M. aeruginosa* CCBUSP262 cell extract interaction test was carried out in 3 groups injected with ip AFB₁ (10 µg/Kg), and after 2 h, injected ip with *M. aeruginosa* CCBUSP262 cell extract: AFB₁ (10 µg/Kg) + 2.0x10⁵ cells/Kg (AFB₁+EMC1), AFB₁ (10 µg/Kg) + 4.0x10⁵ cells/Kg (AFB₁+EMC2) and AFB₁ (10 µg/Kg) + 1.0x10⁶ cells/Kg (AFB₁+EMC3). The (AFB₁) control was 6 fish with ip AFB₁ (10 µg/Kg), while negative control was 6 fish ip injected with sterile mineral oil.

Immersion exposure in 3 tanks resulted in 4 experimental groups. Negative control was carried out in tank A (18 fish), while the fish was immersed in tank B and C with increasing concentration of *M. aeruginosa* CCBUSP262 cell extract during 72h each exposure,

replacing the water immediately after fish sampling. Fish in tank B (n = 18) were exposed at 1×10^4 cells/mL, and 6 fish sampled at 72h^(i-EMC1); after 2 months, remained 12 fish were exposed at 2×10^4 cells/mL/72h and 6 fish were sampled^(i-EMC3); after 2 months, the last 6 fish were exposed at 5×10^4 cells/mL/72h^(i-EMC4). Fish in tank C (n=6) were exposed once at 1×10^5 cells/mL/72h^(i-EMC2). The negative control in tank A was sampled following the same protocol.

Genotoxicity tests (micronucleus and comet assay) were carried out in ip AFB₁, ip *M. aeruginosa* cell extract, ip AFB₁+cell extract interaction assay and fish immersed at 1×10^5 cells/mL, collecting the blood at 8, 24 and 48h after exposure. The immunohistochemistry was carried out in liver and muscle, after 72 h of ip and immersion in *M. aeruginosa* cell extract^(EMCs) assay.

MC Immunohistochemistry

The M8H5 anti-MC monoclonal antibody (MAb) was used as primary antibody (NAGATA et al., 1995). MC immunohistochemistry assay was performed with paraffin-embedded tissues (5 μm) (liver and muscle of fish exposed to CCBUSP262^(EMCs)) adhered onto 5% poly-L-Lysine acetate-coated glass slides, deparaffinized in xylene, and routinely hydrated in ethanol series. Endogenous peroxidase was denatured with 3% H₂O₂ in methanol (5 min), and washed with PBS (pH 7.2). Tissue was incubated with 0.1% trypsin (10 min) and fetal bovine serum (30 min) at 37° C. M8H5 MAb diluted in PBS (1:10, 1:100 and 1:1000) was added, and after incubation (30 min), unbound antibodies were removed by washing sections in PBS (pH 7.2). Then, the slides were incubated at 4° C with secondary antibody, comparing two peroxidase systems: avidin-biotin peroxidase (ABPx) overnight, and polymeric peroxidase (polymer-Px) system for 30 min (Dako Envision System, Carpinteria, USA). After washing with PBS, the slides were incubated with dihydrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB-substrate system, Sigma, St. Louis USA) and H₂O₂ solution for 3 min. The slides were washed with distilled water, counterstained with Mayer hematoxylin, dehydrated in ethanol and cover slips applied onto aqueous mounting medium for microscopy (Leica Microscopy, Wetzlar, Germany).

Genotoxicity tests

The micronucleus (MN) test was carried out in blood (two-smears each fish) under ip AFB₁, ip *M. aeruginosa* cell extract^(EMCs) and ip AFB₁+EMC interaction assay. After 24 h, smear slide were fixed with absolute methanol and stained with Giemsa (in phosphate

buffer 1:20). The frequency of micronucleated erythrocytes was analyzed in 2000 cells per fish. Scoring criteria was oval shaped cell and nuclei with intact membrane; non-refrangent and clearly separated micronuclei of $\leq 1/3$ the main nuclei size (MATSUMOTO; CÓLLUS, 2000).

Comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) and modified by Speit and Hartmann (1999). A 10 μ L aliquot of blood sample (diluted 1:100 in saline), was mixed with 120 μ L LMP agarose (0.5% in PBS), spread on slides (coated with normal agarose) and then conditioned at 4 $^{\circ}$ C for 10 min. In the following step, cells were lysed for 60min at 4 $^{\circ}$ C and slides were immersed in a solution of 10N NaOH and 200 mM EDTA, pH>13. The DNA was denaturated for 20min and the nuclei electrophoresed at 300 mA and 25V (~1.5V/cm). The slides were neutralized in Tris buffer and fixed in ethanol for 10min. Finally, the samples were stained with ethidium bromide (200 μ g/mL) and examined by fluorescence microscopy (EX 420-490, BA 520, Melville, NY, USA). Analysis of the slides involved 100 nuclei per fish, utilizing the visual classification from the nucleus of class 0 (no damage), class 1 (mild damage), 2 (moderate damage) and 3 (severe damage), according to DNA migration (SPEIT; HARTMANN, 1999). The data are presented as the frequency of cells with and without damage, score and distribution of classes. The score was calculated by multiplying the number of nuclei found in a class times the class number.

Statistical analysis

The frequency of MN and comet data from *M. aeruginosa* cell extract^(EMCs), AFB₁-cell extract interaction^(AFB₁+EMCs) assays and negative control group were compared by one way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test for multiple comparison of averages (p=0.05) by System for Statistical Analysis (Statistica 6.0, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The cell extract was prepared with *M. aeruginosa* strain CCBUSP262 isolated from *Lago das Garças*, Sao Paulo-Brazil, located in a region characterized by intensive development of aquaculture. Both immersion and ip *M. aeruginosa* cell extract concentrations were based on cell counting.

The higher immersion exposure simulated the alert level 2 (contamination with risk for human health) of Alert Framework of Guidance in Drinking Water (WHO,

1998). Strain produced 1054.75 and 8.65 $\mu\text{g/g}$, respectively of 7D-MCLR and MCLW per liophylized biomass. Main MC detected in cell extract was 7D-MCLR ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 981) by LC/ITMS (Figure 1). The ip doses at 2×10^5 , 4×10^5 and 1×10^6 cells/Kg corresponded respectively to 0.602, 1.204 and 3.011 $\mu\text{g/Kg}$ of 7D-MCLR. Immersion doses at 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 and 1×10^5 cells/mL corresponded to 30.1, 60.2, 150.5 and 301.0 $\mu\text{g/L}$ of 7D-MCLR. Desmethylation of Mdha residue in MCLR (as 7-DMCLR) decreased the toxicity to intermediate level in mice (HARADA et al., 1991).

This experiment used *M. aeruginosa* cell extract (Table 3), because cyanobacterial cell components as lipopolysaccharide (LPS) can also be involved in toxicity. LPS indirectly activates the rennin-angiotensin system, increasing MC uptake in immersion assays. LPS also reduces the GST (glutathione S transferase) activity of biotransformation pathways, including MC detoxication (BEST et al., 2003).

Liver and kidney are the main targets of MC in fish (FISCHER; DIETRICH, 2000). Regarding that fish erythropoieses take place in kidney, peripheral blood proved to be adequate for biomonitoring purpose (PALHARES; GRISOLIA, 2002). Therefore the genotoxicity effects (comet and micronucleus) were evaluated in tilapia's blood (Figures 2 - 5). Immunohistochemistry was carried out in liver and edible portion of fish muscle (Tables 2 and 3, Figures 6 and 7). No fish death was observed during ip or immersion assay, and the visual behavior was similar with control group throughout the experiment, except by erratic swimming at EMC3, but without macroscopic alterations.

Table 1 and Figure 4 detache the genotoxicity in all treatments ($p < 0.005$). The class 0 (non-damage) predominated in all group, while class 3 frequency was higher in EMC ip group (1×10^6 cells/Kg, 3.011 $\mu\text{g/Kg}$ of 7D-MCLR), increasing the comet score independently on AFB₁ (10 $\mu\text{g/Kg}$) contamination. This AFB₁ dose was chosen based on previous survey of fish farming feed monitoring, and fixed as a half concentration of Brazilian guideline for feed (BRASIL, 1996). Comparing ip AFB₁ with non-ip AFB₁ data (EMC versus AFB₁+EMC), the AFB₁ increased the genotoxicity in lower EMC dose at 8 h (2×10^5 cells/Kg) (Figure 4, data $\blacklozenge p < 0.005$), and mutagenicity in all EMC doses at 24h (2×10^5 to 1×10^6 cells/Kg) (Figure 5, data $\blacklozenge p < 0.05$).

Concerning AFB₁, no difference was detected in MN frequency at 8h treatment, but high MN frequency occurred in all treatments after 24 h, when compared with negative control ($p > 0.05$, Figure 4 and 5). Such a delay may be related with variable response of *O. niloticus* to genotoxic agents (PALHARES; GRISOLIA, 2002), as well as the maximum

MN induction normally occurred one to five day post-exposure of toxins (AL-SABTI; METCALFE, 1995). The MN is chromosome fragment or whole chromosome lost during anaphase, and then MN frequency depends on kinetic of cell cycle in a population (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

In the other hand, the EMC dose-response was not significant ($p > 0.05$) in both MN and comet data, but EMC addition increased AFB₁ mutagenicity (Figure 4, data ■ $p < 0.05$). MC is a potent tumor promoter (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992), which can also act as tumor initiator (ITO *et al.*, 1997), with increasing evidence of genotoxicity. High MC dose was involved in clastogenic chromosome breakage (REPAVICH *et al.*, 1990).

Non-significant difference (Figure 4, data ▲ $p > 0.05$) was found between comet score of fish immersed at 1×10^5 cells/mL (alert level 2 of Alert Levels Framework, WHO guideline, 1993) and two lowest dose of EMC or AFB₁+EMC interaction. Immersion concentration was as genotoxic as ip dose at 0.602 - 1.204 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. However, the spontaneous MN frequency (negative control) did not differ from MN frequency in fish immersed at 1×10^5 cells/mL with 300 $\mu\text{g}/\text{L}$ 7D-MCLR ($p > 0.05$). Comparing the comet score and MN frequency in all treatments (Figures 4 and 5), apparently the comet assay was more sensitive than MN test regarding this dose-concentration range (Figures 4 and 5). Lankoff *et al.* (2004) reported negative correlation between apoptotic cell frequency and level of DNA-damage. I.e., MCLR-induced DNA-damage in comet assay may indicate earlier stage of apoptosis, which triggers cytotoxicity without genotoxicity.

Summarizing, reversible capacity of alkaline comet assay allows measuring of DNA repair kinetic, while an impaired repair of DNA-damage may be detected by micronucleus assay, i.e. mutagenicity (LANKOFF *et al.*, 2004).

The effectiveness of avidine-biotine-peroxidase versus polymeric-peroxidase system in immunohistochemistry was compared using anti-MC M8H5-MAb at 1:10 to 1:1000 dilutions (Table 2). Polymeric-peroxidase system showed higher performance for marking of MC in fish liver using M8H5-MAb diluted at 1:10 and 1:100; therefore 1:100 was chosen for further immunohistochemical assay. This technology uses an enzyme-labelled inert *spine* molecule of dextran, where approximately 70 enzymes and 10 antibodies can be attached, increasing signal response (Dako Envision System, Carpinteria, USA). This staining with polymeric peroxidase system also reduces the 24 h analysis-time to 12 h.

Concerning the liver and muscle tissues, only the liver was immunohistochemically MC-positive with polymeric-peroxidase system (Table 2), suggesting

the target specificity. Unique organotropy of MC in liver has been reported in both intraperitoneal and oral administration in mice and rat, with immediate massive intra-hepatic hemorrhage and cellular necrosis (TENCALLA; DIETRICH, 1997). However, residual MC in muscle tissue was observed in fish collected in highly natural contaminated lagoon in Jacarepaguá Lagoon, Rio de Janeiro-Brazil (MAGALHÃES *et al.*, 2003).

All ip EMC fish showed positive MC marking in liver (Figure 6A), but in immersion test only higher dose was positive (1.0×10^5 cells/mL, 300 μ g/L of 7D-MCLR). MC was not detected in muscle tissue (Figure 7), as well as in liver of animals immersed in $<1.0 \times 10^5$ cells/mL (Figure 6B, Table 3). Gill and skin epithelia of freshwater fish have a barrier against MC transport, therefore ingestion is the main route of MC uptake. Fish immersed several days in dense culture of toxigenic *M. aeruginosa* remained unaffected, but i.p. injection of extract from same strain or purified MC caused rapid severe liver damage and kidney degeneration, and death within hours (CARBIS *et al.* 1996). MC was detected in liver of tilapia exposed at the concentration equivalent to *alert level 2* (WHO, 1993), indicating possibility of further contamination of edible meat.

Immunohistochemical analysis performed with M8H5- MAb detected MCLR in cytoplasm and some nuclei of fish hepatocyte. This finding suggested modulation of nucleolar phosphatase affecting cellular growth and differentiation (YOSHIDA *et al.*, 1998). AFB₁-initiated hepatocyte nuclei showed affinity for MCs, the combined effects of these natural toxins in the development of tumor promotion can be expected (SEKIJIMA *et al.*, 1999).

Attending the request of sensitive method to detect contamination *in situ*, the immunochemistry would be an ideal direct assay in fish, which combined with genotoxicity tests could compose an efficient quality control tool intended for profitable biomonitoring alternative in aquaculture.

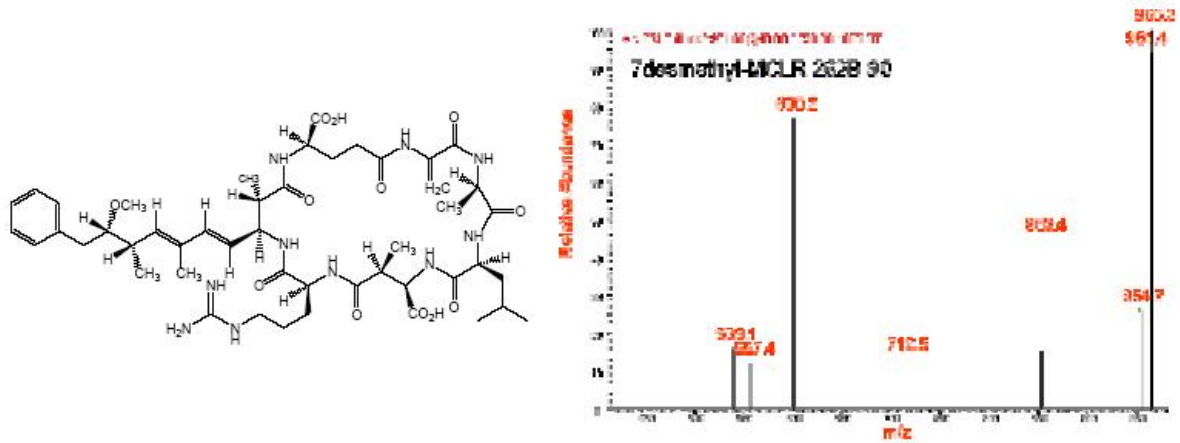


Figure 1 – Chemical structure and mass spectra of 7D-MCLR analysed by LC/ITMS².

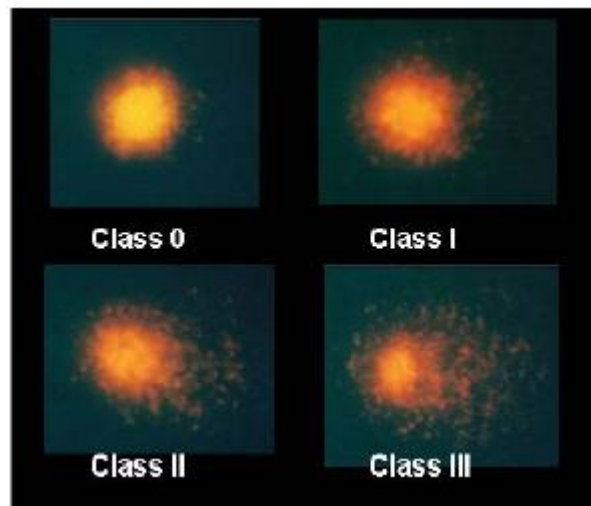


Figure 2 – Comet classification: Class 0 - no damage 0, Class 1 – mild damage (\leq than to the diameter of one nucleus), Class 2 - moderate damage ($>$ than the diameter of one nucleus and \leq to the diameter of two nuclei) and Class 3 – severe damage ($>$ than two times the diameter of one nucleus) in *O. niloticus* blood sample, exposed to AFB₁ and *M. aeruginosa* cell extract.

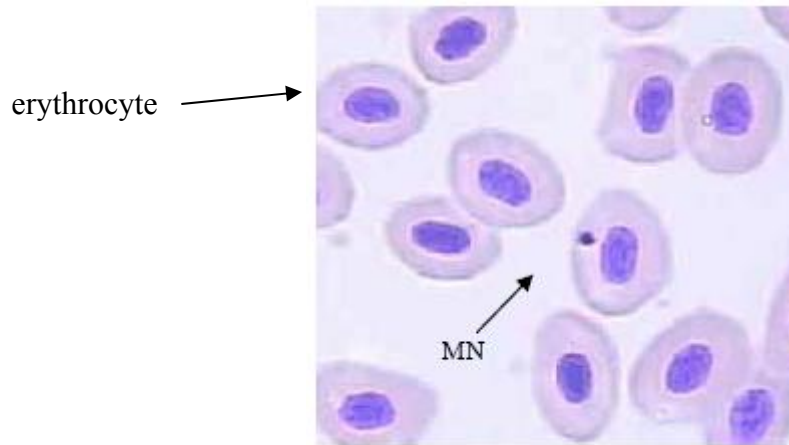
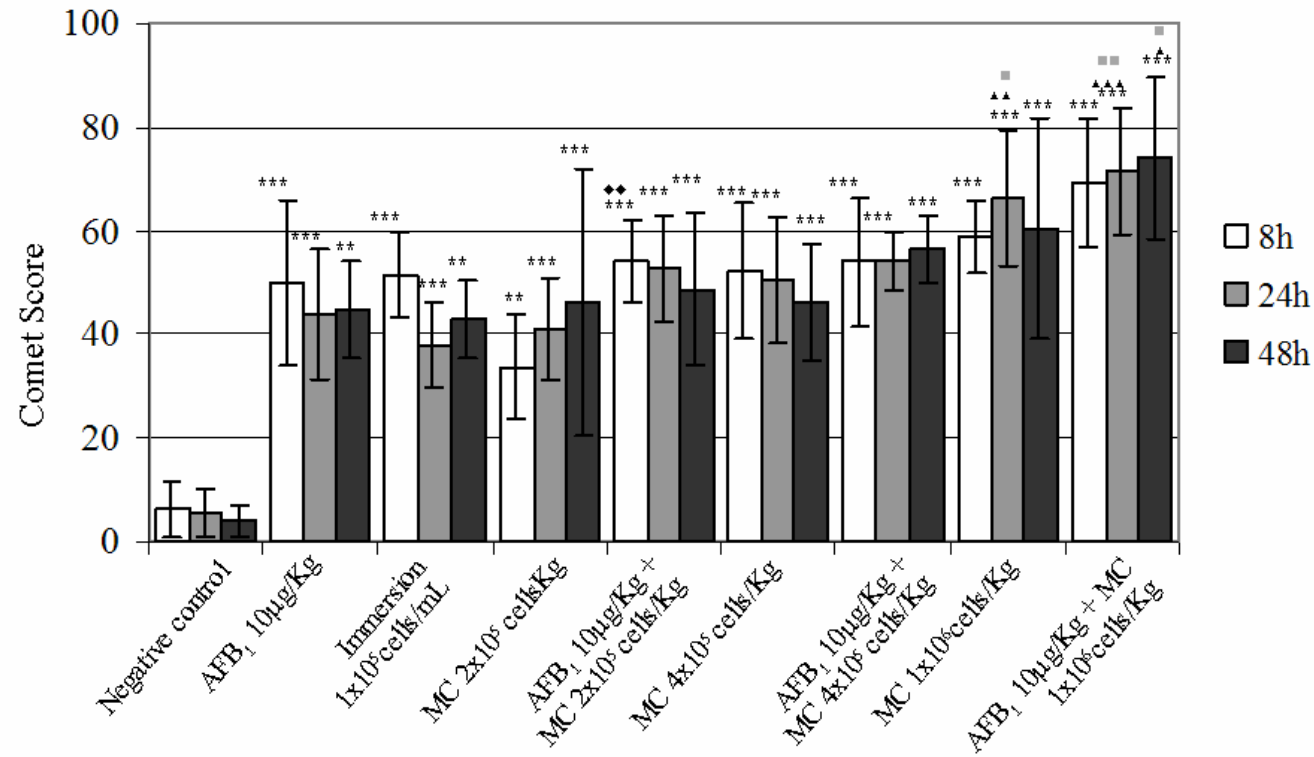


Figure 3 – Micronucleous in *O. niloticus* erythrocyte, exposed to AFB₁ and *M. aeruginosa* cell extract.



Comet score: (0 x A)+(1xB)+(2xC)+(3xD)

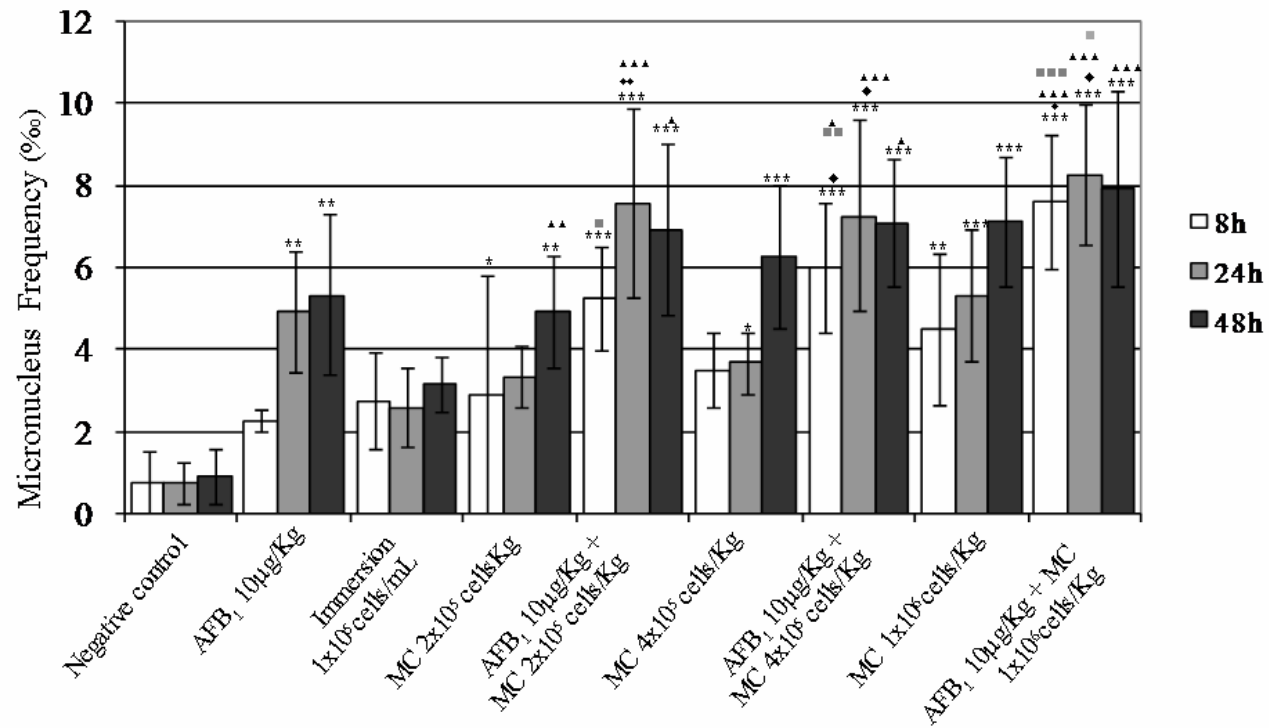
* Score > than negative control (**p<0.005, ***p<0.0005)

■ Score > than AFB₁ (10µg.Kg⁻¹) (■ p<0.05, ■■ p<0.005)

▲ Score > than immersion group (▲ p<0.05, ▲▲ p<0.005, ▲▲▲ p<0.0005)

◆ Score > than the correspondent MC dose, AFB₁ (10µg.Kg⁻¹) additional effect (◆◆p<0.005)

Figure 4 – Comet Score average in *O. niloticus*: ip AFB₁, immersion or ip EMC, and AFB₁+EMC interaction.



* MN frequency > than negative control (*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005%)

■ MN frequency > than AFB₁ (10µg.Kg⁻¹) (■ p<0.05, ■■ p<0.005, ■■■ p<0.0005%)

▲ MN frequency > than immersion group (▲ p<0.05, ▲▲ p<0.005, ▲▲▲ p<0.0005)

◆ MN frequency > than the correspondent MC dose, AFB₁ (10µg.Kg⁻¹) additional effect (◆ p<0.05, ◆◆ p<0.005)

Figure 5 – Micronucleus frequency (%) average in *O. niloticus*: ip AFB₁, immersion or ip EMC, and AFB₁+EMC interaction.

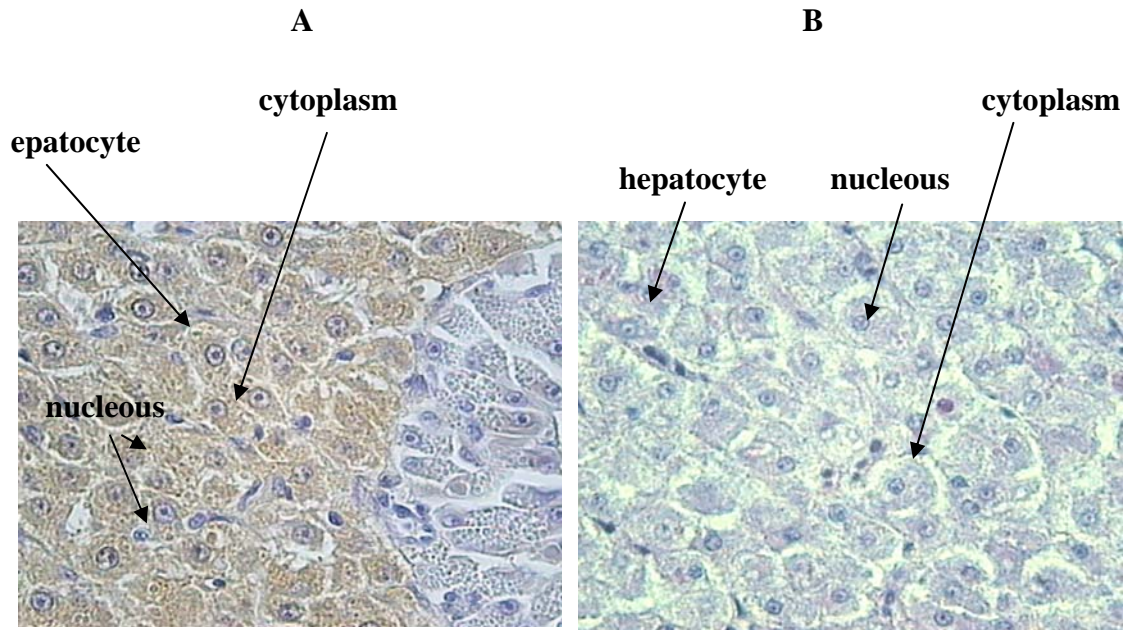


Figure 6 – Immunohistochemistry of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Microcystis aeruginosa* CCBUSP262 exposed, MC marcation in liver (in Brow, A) and negative immuno reaction (B)(100 X).

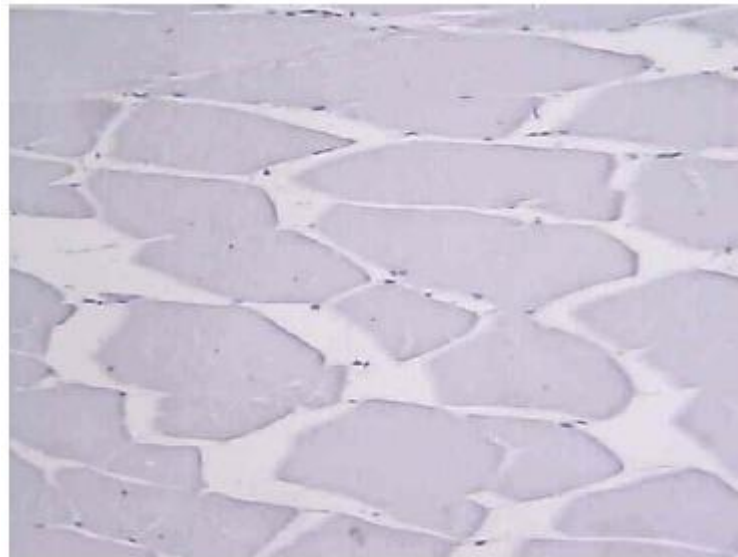


Figure 7 – Immunohistochemistry of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Microcystis aeruginosa* CCBUSP262 exposed, negative immuno reaction in muscle (100 X).

Table 1 – Comet classification and damaged nuclei average in *Oreochromis niloticus* erythrocyte exposed to AFB₁ 10µg.Kg⁻¹ and *M. aeruginosa* BCCUSP 262 extract

Time	Treatments	Comet Class					Damaged nuclei (Class 1+2+3 Average± SD)
		N	0	1	2	3	
8h	Negative control	6	567	28	5	0	5.5±5.2
	AFB ₁ 10µg/Kg (ip)	6	403	118	49	28	32.5±7.55****
	MC Immersion 301µg/L	6	389	144	48	23	35.83±4.79****
	MC 0.602µg/Kg (ip)	6	449	109	32	10	25.16±6.76****
	AFB ₁ 10 + MC 0.602µg/Kg (ip)	6	390	110	67	27	34.0±4.09****
	MC 1.204µg/Kg (ip)	6	422	80	60	38	29.66±8.80****
	AFB ₁ 10 + MC 1.204µg/Kg (ip)	6	399	112	55	34	31.5±6.09****
	MC 3.011µg/Kg (ip)	6	393	102	64	41	34.5±3.61****
24h	AFB ₁ 10 + MC 3.011µg/Kg(ip)	6	349	116	75	50	40.16±7.256****
	Negative control	6	574	17	8	0	4.16±3.76
	AFB ₁ 10µg/Kg (ip)	6	402	137	39	16	32.0±6.75****
	MC Immersion 301µg/L	6	419	134	39	7	30.0±4.97****
	MC 0.602µg/Kg (ip)		428	116	37	19	28.66±6.47****
	AFB ₁ 10 + MC 0.602µg/Kg (ip)	6	402	112	53	33	33.0±4.93****
	MC 1.204µg/Kg (ip)	6	382	156	39	23	36.33±8.16****
	AFB ₁ 10 + MC 1.204µg/Kg (ip)	6	382	136	36	39	35.16±6.43****
48h	MC 3.011µg/Kg (ip)	6	349	126	73	42	40.16±6.21****
	AFB ₁ 10 + MC 3.011µg/Kg(ip)	6	348	121	84	47	43.0±6.89****
	Negative control	6	579	18	3	0	3.50±2.88
	AFB ₁ 10µg/Kg (ip)	6	405	138	37	19	32.3±5.54****
	MC Immersion 301µg/L	6	413	136	30	21	31.16±5.1****
	MC 0.602µg/Kg (ip)	6	432	95	61	22	29.66±15.42****
	AFB ₁ 10 + MC 0.602µg/Kg (ip)	6	406	116	54	23	32.16±4.791****
	MC 1.204µg/Kg (ip)	6	425	102	44	29	29.16±7.41****
	AFB ₁ 10 + MC 1.204µg/Kg (ip)	6	393	108	66	33	34.5±2.58****
	MC 3.011µg/Kg (ip)	6	363	142	58	35	39.16±10.08****
	AFB ₁ 10 + MC 3.011µg/Kg(ip)	6	349	102	98	49	41.6±6.83****

Statistically different from negative control: level **** 0.005%

Table 2 – Immunohistochemistry reaction using avidin-biotin peroxidase and polymer peroxidase system in tilapia liver ip exposed to *Microcystis aeruginosa* CCBUSP262extract

Immunohistochemistry (System)	Monoclonal antibody (M8H5) dilution	Reactivity
Avidin-Biotin peroxidase	1:1000	-
	1:100	-
	1:10	-
Polymer peroxidase	1:1000	-
	1:100	+
	1:10	+

Microcystin immunostaining: (+) positive, (-) negative

Table 3 – Immunohistochemistry using M8H5-MAb and polymer peroxidase system in liver and muscle of tilapia exposed to *Microcystis aeruginosa* CCBUSP262extract

	<i>M. aeruginosa</i>	7desmethyl- MCLR	Reactivity	
			liver	muscle
(ip)	Dose (cells/Kg)	($\mu\text{g/Kg}$)		
EMC1	2.0×10^5	0.602	+	-
EMC2	4.0×10^5	1.204	+	-
EMC3	1.0×10^6	3.011	+	-
immersion	Concentration (cells/mL)	($\mu\text{g/L}$)		
i-EMC1	1.0×10^4	30	-	-
i-EMC2	1.0×10^5	300	+	-
i-EMC3	$1.0 \times 10^4 + 2.0 \times 10^4$	30 + 60	-	-
i-EMC4	$1.0 \times 10^4 + 2.0 \times 10^4 + 5.0 \times 10^4$	30 + 60 + 150	-	-

Microcystin immunostaining: (+) positive, (-) negative

POTENCIAL ANTI-CIANOACTÉRIA EM MICROBIOTA PERTENCENTE AO ECOSISTEMA DA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO

Resumo

A intensa atividade agrícola e industrial, sem consciência logística e sustentável, causa impacto negativo aos recursos hídricos devido à eutrofização e deterioração da água. A poluição aquática se agrava pela ocorrência de floração de cianobactérias, com destaque a *Microcystis aeruginosa*, produtora de hepatotoxina, pertencente ao grupo de microcistinas. Com o intuito de obter nova alternativa no controle de cianobactérias e remoção de cianotoxinas, amostras de água da Estação de esgoto (ETE São Lourenço de Londrina-PR) foram coletadas, para isolar microrganismos antagonistas. Entre os 35 isolados obtidos do afluente, reatores 1 e 2, efluente e lagoa de estabilização, nenhum apresentou capacidade de degradar microcistina-LR (MCLR). Não obstante, 7 isolados apresentaram atividade anti-*M. aeruginosa*, com destaque a *Pseudomonas* spp. (R2P5 e R2P8), sendo estes obtidos no reator 2. O isolamento de antagonistas, em ambiente com freqüente floração (reator 2 e lagoa de estabilização), indicou o potencial de ETE como ambiente altamente competitivo para obter antagonistas contra cianobactérias; soma-se ainda, o potencial direcionado ao emprego da própria microbiota presente no ecossistema, para o controle natural de floração toxigênica.

Palavras-chaves: Cianobactéria. Microcistina. Biocontrole.

INTRODUÇÃO

As microcistinas (MCs) são hepatotoxinas produzidas principalmente por *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., sendo estas cianobactérias pertencentes à comunidade fitoplânctônica de ocorrência comum em ambientes aquáticos eutrofizados (CHARMICHAEEL, 2001).

Em 1996, a notificação pela comunidade científica internacional da intoxicação por MCs em sessão de hemodiálise em Caruaru-PE, (JOCHIMSEN *et al.*, 1998), repercutiu diretamente sobre a necessidade de constante vigilância na qualidade da água brasileira. A ocorrência de cianobactérias toxigênicas, em reservatório de água, tem sido confirmada nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Paraná, Bahia, Pernambuco e Distrito Federal (FUNASA, 2003).

Os registros refletem estudo sobre o tema concentrado na região Centro-Sul do Brasil, porém certamente a ocorrência de cianobactérias toxigênicas não se restringe a esses Estados (FUNASA, 2003). Salienta-se ainda, a extensa atividade agrícola e industrial em plena ascensão no país, em resposta ao competitivo agronegócio globalizado. O desenvolvimento acelerado, sem consciência logística e sustentável, tem sido motivo preocupante perante impacto negativo aos recursos hídricos, conduzindo à eutrofização e deterioração da água. O Estado do Paraná ocupa somente 2,3 % do território nacional e está estrategicamente posicionado no Mercosul, posicionando-se em primeiro lugar na produção de grãos e de frango (ONO *et al.*, 2000). No entanto, a lixiviação de solo fertilizado pela

agricultura, contaminação ambiental através de esgoto, atividade industrial e piscicultura contribuem para elevação de nutrientes nos corpos d'água, gerando impactos ambientais e deterioração da qualidade e disponibilidade de água (CHARMICHAEL, 2002).

A aplicação de algicidas químicos para o controle de fitoplâncton na piscicultura representa um problema sério ao ecossistema, já que provoca lise celular e liberação de cianotoxinas (AHN *et al.*, 2003). Soma-se ainda, o alerta da comunidade científica perante uso indiscriminado de cloro nos sistemas de tratamento de água, devido à liberação de carcinógenos potenciais, a exemplo de trihalometanos no ambiente (GEHR *et al.*, 1993). Na tentativa de obter alternativas eficientes, microrganismos com atividade antagônica, cuja ação engloba desde o parasitismo específico de contato celular ou captura, até a produção inespecífica de enzimas extracelulares ou antibióticos líticos, constituem alvo de constante investigação (WRIGHT; THOMPSON, 1985).

Entre os primeiros estudos, Jones *et al.* (1994) demonstraram a eficiência de uma cepa inicialmente identificada como *Pseudomonas* MJ-PV na degradação de MCLR, posteriormente classificada como *Sphingomonas* sp. Microrganismos similares, apresentando colônias amarelas, aeróbios e Gram negativos têm sido isolados e com capacidade de degradar MCs em produtos com toxicidade reduzida no fator de 20 a 160 vezes em relação a MCLR (BOURNE *et al.*, 1996; ISHI *et al.*, 2004; HARADA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001; SAITOU *et al.*, 2003; HO *et al.*, 2007; AMÉ *et al.*, 2006).

Considerando a ineficácia de métodos convencionais e impactos negativos de agentes químicos ao meio ambiente, o biocontrole com microrganismos capazes de controlar a proliferação de cianobactérias e/ou degradar MC demonstra perspectiva promissora no controle de qualidade de água (AHN *et al.*, 2003). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da Estação de tratamento de esgoto (ETE São Lourenço, Londrina-PR) para isolamento e seleção de microrganismo antagônico contra cianobactéria toxigênica.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrão de Microcistina-LR e Adda

MCLR foi obtida de cultivo liofilizado de *Microcystis aeruginosa* TAC 95 (Tsukuba Algal Collection, Tsukuba, Japan). O β -aminoácido Adda [(2S,3S,8S,9S) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6, 8-trimetildeca-4,6- ácido dienóico] foi isolado e purificado a partir da

biodegradação de MCLR com cepa B9. A pureza (mínimo 95%) de MCLR e Adda foi analisada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e Espectrometria de massas (MS) no Laboratório de Ciências Ambientais - Centro de Análises, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Meijo, Nagoya – Japão.

Isolamento de microrganismos antagônicos

Entre setembro a dezembro/2005, amostras de água foram coletadas, na estação da Estação de Tratamento de Esgoto de Londrina, Empresa de Saneamento e Esgoto do Paraná (ETE- São Lourenço-SANEPAR, Londrina-PR). O isolamento de microrganismos foi realizado em 29 amostras de água coletadas a cada 2 semanas em 5 pontos distintos: afluente - AF (7), Reator 1 - R1 (7), Reator 2 - R2 (7), Efluente - EF (6), floração na lagoa de estabilização- B (2). Para o isolamento procedeu-se a técnica de diluição seriada com água peptonada 1% (m/v) estéril até o fator de 10^{10} . Três diluições de cada amostra foram plaqueadas em 2 tipos de meio de cultura: meio A contendo 2 % de peptona de gelatina, 0,14 % de cloreto de magnésio, 1 % de sulfato de potássio e 1,36 % de ágar ou meio P, composto de meio A adicionado de irgasan (0,0025 % - Meio seletivo para *Pseudomonas* – Acumedia Manufactures, Ltd). As placas foram incubadas a 25° C por 24 a 48 h. As colônias com aspecto diferente de cada diluição foram isoladas e mantidas em ágar nutriente, procedendo caracterização preliminar por testes bioquímicos (VM, VP, nitrato, citrato, motilidade e indol).

A cepa B9, (99% geneticamente similar a *Sphingosinicella microcystivorans*) (MARUYAMA *et al.*, 2006) foi utilizada como controle positivo da biodegradação de MCLR. Esta cepa foi isolada do Lago Tsukui, Kanagawa-Japão (TSUJI *et al.*, 1997). A cepa foi cultivada em caldo (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%) sob agitação a 200 rpm a 27° C/48 h e mantida em ágar nutriente após incubação a 25° C / 48-72 h.

Cianobactéria-teste

As cepas *Microcystis aeruginosa* NIES 298, *M. viridis* NIES 102, *Anabaeba mendotae* NIES 808 e *Phormidium tenue* NIES 611 gentilmente cedidas pelo *National Institute of Environmental Studies* (NIES) de Tsukuba-Japão, constituíram organismo-teste para seleção de isolados anti-cianobactéria. Estas linhagens foram mantidas em meio MA (pH 8,6 contendo 50 mg de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de KNO_3 , 50 mg de NaNO_3 , 40 mg de

Na₂SO₄, 50 mg de MgCl₂ 6H₂O, 100 mgd e β-sodioglicerofosfato, 5 mg de Na₂EDTA, 0,5 mg de FeCl₃.6H₂O, 5 mg de MnCl₂.4H₂O, 0,5 mg de ZnCl₂, 5 mg de CoCl₂.6H₂O, 0,8 mg de Na₂MoO₄ H₂O, 20 mg de H₃BO₃, 50 0mg de bicina em 1L de água purificada) a 25° C e luz constante no Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade de Meijo, Nagoya-Japão.

Seleção de microrganismos com atividade anti-cianobactéria

As cianobactérias NIES 102, 298, 611 e 808 foram cultivadas em meio MA (300 mL) a 25 °C / 7 dias sob luz constante e agitação a 80 rpm. Paralelamente, os isolados da estação de esgoto foram cultivados em ágar nutriente (0,2 % de peptona de caseína) a 25° C / 24 a 48 h. O cultivo de cada cianobactéria (70 mL) foi adicionado em 30 mL de meio MA, seguida de inoculação de 1 mL da cultura ou 1 colônia de cada isolado. Após 0, 24, 48, 72 e 96 h, 10 mL da mistura foi filtrada (membrana GF/C, Whatman®, Maidstone, England) e a membrana com biomassa foi acondicionada em tubos de 15 mL (17x120 mm, DB Falcon, NJ, USA) contendo 5 mL de metanol p.a. Os tubos foram incubados sob ausência de luz a 4° C / 24 h. A leitura da absorbância do extrato metanólico foi realizada em microplacas tipo ELISA (96 poços, Nalgen Nunc International, USA) e espectrofotômetro em 405 e 665 nm (Biocrhom Ltd, Cambridge, UK). O controle negativo consistiu do cultivo de cianobactéria adicionado de 1 mL de caldo nutriente. Realizou-se uma triagem com todos os isolados, com 3 repetições para as cepas que apresentaram atividade antagônica.

Análise da biodegradação de microcistina por CLAE-PDA

Uma colônia de cada isolado foi introduzida em solução aquosa com 10 µg/mL de MCLR e incubada a 27 °C sob ausência de luz. Após 0, 24, 48 e 72 h, uma alíquota de 50 µL do cultivo foi transferida em microtubo (Eppendorf, Hamburg, Germany). Uma solução de ácido fórmico 0,2 % em metanol (50 µL) foi adicionada ao microtubo para o bloqueio da reação de biodegradação. A mistura foi centrifugada (15.000 x g /10 min) e filtrada (membrana hidrofílica 0,2 µm PTFE, Millipore®, Bedford, MA, USA). O controle negativo consistiu de isolado-teste sob as mesmas condições, sem a adição de MCLR.

MCLR e produtos de biodegradação (MCLR linear, tetrapeptídeo e Adda) no sobrenadante foram analisados por CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector PDA (*photodiode-array*) a 238 nm. O sistema gradiente consistiu de duas bombas (LC-10AVP), coluna TKS-gel-ODS (5 µm, 2,0 x 150 mm, TOSOH, Tokyo, Japan) a 40° C. A fase móvel

foi composta de (A) ácido fórmico 0,1% em água e (B) ácido fórmico 0,1% em metanol, sendo o gradiente inicial de 40 a 90% de B em 20 min. O fluxo foi de 200 µL/min.

Cromatografia em camada delgada de extrato celular de isolado anti-cianobactéria

A cepa com melhor performance anti-cianobactéria foi inoculada em 300 mL de caldo nutriente estéril (peptona de caseína 2 %) por 27 °C/ 48 h a 80 rpm (*shaker* orbital). O cultivo foi centrifugado (3.000 x g por 15 min) e o sobrenadante descartado. O pelete obtido foi lavado duas vezes, procedendo ressuspensão em tampão Tri-Cl (50 mM, pH 7,6) e centrifugação (3.000 x g / 15 min). O pelete lavado foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de clorofórmio p.a. e, o extrato celular obtido concentrado a 40 °C (rotavapor). O extrato bruto foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio e submetido a cromatografia em camada delgada (20 x 20 cm Sílica gel 60F254 1mm, Merck, Frankfurter, Germany) procedendo corrida com isopropanol:água:amônia (80:15:5) como fase móvel (DAKHAMA *et al.*, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a alta contagem microbiana em amostras de esgoto, os fatores de diluição de 10^3 , 10^5 e 10^{10} foram selecionados para a escolha dos isolados. Trinta e cinco microrganismos foram selecionados e isolados, sendo 8 do afluente (AF), 8 do reator 1 (R1), 9 do reator (2), 8 do efluente (EF) e 2 de floração na lagoa de estabilização (Tabela 1).

O uso de meio de cultura específico para *Pseudomonas*, foi considerado devido aos relatos da literatura da atividade antagônica *Pseudomonas aeruginosa* e da similaridade bioquímica com *Sphingomonas* sp. capaz de degradar MCs (TAKENAKA; WATANABE, 1997; JONES *et al.*, 1994). Porém, a adição de irgasan (agente bactericida) no meio seletivo (P) para *Pseudomonas* sp. não inibiu o crescimento de outros microrganismos (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra a identificação provável dos microrganismos isolados nos diferentes pontos e data de coleta. De forma geral, em todos os pontos de coleta observou-se uma predominância de Enterobacteriaceae, principalmente no afluente e efluente, com presença de *Pseudomonas* sp. nos reatores 1, 2 e lagoa de estabilização, principalmente no período de floração (5ª coleta). A co-ocorrência de *Pseudomonas* e a floração de fitoplâncton em R2 e lagoa de estabilização, sugeriu a interação entre esses organismos. A análise microscópica destas florações indicou a presença de cloroflagelados (*Euglena*), clorofíceas,

cianofíceas e protozoários ciliados (não identificados). Considerando o fluxo do esgoto a partir do afluente (AF) → reator R1 e R2 → lagoa de estabilização → efluente (EF), a presença de floração na lagoa de estabilização indica a sobrecarga da ETE na primeira quinzena de novembro/2005. Por outro lado, a atuação de organismos na cadeia trófica, principalmente protozoários e zooplâncton, reduziu a carga de cianobactérias e *Pseudomonas* sp., não detectadas no efluente (EF). Estas informações apontam a dinâmica do ecossistema microbiano no processo de tratamento de água. Inamori *et al.* (1998), sugerem a aplicação de protozoários como *Aeolosoma hemprichi* e *Philodina erythropthalma* no controle de *Microcystis viridis* toxigênica em biofilme de reatores no tratamento de água. Neste processo, os protozoários após digerirem a cianobactéria, excretariam a toxina que por sua vez seria degradada por bactérias aderidas a biofilme.

Apenas 7 microrganismos mostraram atividade somente contra *M. aeruginosa* NIES 298, observados quando comparados com controle negativo (C-) (Figura 1A). Após 96 h, *M. aeruginosa* NIES 298 (C-) apresentou crescimento (Figura 1B) com aumento na absorbância (405 nm) o que não ocorreu com *M. aeruginosa* NIES 298 inoculadas com *Pseudomonas* sp. (BP5, R2P5 e R2P8), *Serratia* sp. (EFP3B e R2A8) e *Enterobacter* sp. (EFP8 e AFP1) (Figura 1A).

Os isolados que apresentaram maior atividade antagônica foram R2P5 (Figura 1B) e R2P8 ambos isolados do Reator 2 da ETE. No entanto, esse resultado só foi possível com *M. aeruginosa* NIES 298 em concentração inicial (0 h) entre DO 0,15 - 0,20 em concentração inicial superior a 0,25 (DO), os isolados não apresentaram efeito antagônico.

Enfatizamos que esses dados foram obtidos após 3 repetições inoculando os 7 isolados com cultura de *M. aeruginosa* NIES 298 toxigênica. A aplicação de caldo nutriente (1 mL com 0,2 % de peptona de caseína) apresentou lise celular de *M. aeruginosa* NIES 298 (controle negativo), fato este justificado pela presença de L-Lisina proveniente do meio de cultura. A adição de 50 µM de L-Lisina resultou em perda da capacidade de flutuação, redução da concentração de clorofila *a* e morte celular em cultivo de *Microcystis* sp (TAKAMURA *et al.*, 2004). A análise do caldo nutriente estéril por LCMS detectou tanto D como L-Lisina em sua composição (dados não apresentados). Portanto, para confirmação da atividade cianobacteriolítica dos 7 isolados ativos, estes foram plaqueados e 1 colônia foi adicionada ao cultivo de cianobactéria, utilizando como controle negativo 1 gota de água estéril.

Dakhama, *et al.* (1993) separaram por cromatografia em camada delgada 4

frações com pigmentos fluorescentes de extrato de *Pseudomonas aeruginosa*. As frações apresentaram pigmentos fluorescente azul, azul-palha, amarelo e alaranjado, posteriormente identificados como piocianina, ácido fenazina-1-carboxílico, oxiclorafina e 1-hidroxifenazina, respectivamente. Oxiclorafina e 1-hidroxifenazina apresentaram atividade cianobacteriolítica contra *Anabaena* sp., *Phormidium bohneri* e *Oscillatoria agardhii*.

A cromatografia em camada delgada do extrato celular de R2P5 separou compostos com Rf e fluorescência semelhantes aos pigmentos descritos por Dakhama *et al.* (1993), inclusive de 1-hidroxifenazina (fator de retenção - Rf 0,72) no entanto o efeito antagonico de cada fração não foi testado (Figura 2).

Em geral, a seleção de microrganismos com atividade anti-cianobactéria envolve triagens com número extensivo de microrganismos. Yoshikawa *et al.* (2000) selecionaram 37 microrganismos com atividade anti-cianobactéria a partir de 2594 bactérias isoladas no mar em Okinawa, Japão. Enquanto que o isolamento de 510 espécies no Lago Biwa, também no Japão, selecionou 17 microrganismos ativos (IMAMURA *et al.*, 2001). Comparando-se o isolamento de microrganismos a partir de amostras de água com florações e diretamente de florações de cianobactéria, as florações apresentaram maior frequência de microrganismos antagonicos (IMAMURA *et al.*, 2001).

Entre os 35 microrganismos isolados na Estação de Tratamento de Água de Londrina-PR, nenhum apresentou capacidade de degradar microcistina, mantendo a concentração de MCLR constante mesmo após 72h. A Figura 3a exemplifica a persistência de MCLR inoculada com a cepa EFA7 no tempo 0 e 72 h.

Por outro lado, a cepa B9 (controle positivo) reduziu significativamente o pico MCLR após 24 h, além de apresentar 2 picos de produto de biodegradação (A e B, Figura 3b). Posteriormente, o produto B foi identificado como Adda, cujo padrão apresentou tempo de retenção similar ao produto B (R.T.= 10 min) e o produto A provavelmente o tetrapeptideo Adda-Glu-Mdha-Ala.

Os produtos de degradação de MCLR inoculada com a cepa B9 foram confirmados pela análise do espectro de absorção máxima dos picos detectados no cromatograma em 238 nm, atribuído ao dieno conjugado presente em Adda (em azul, Figura 3b). Perfil cromatográfico com 3 picos (MCLR, A e B) foi observado no tempo 0 h com as cepas R2P5 (Figura 3c) e R2P8. No entanto o espectro de absorção máxima em 248-250 nm dos picos A e B nas cepas R2P5 e R2P8, descartou a hipótese de formação de produtos de biodegradação por estes microrganismos (em azul e verde, Figura 3c).

A caracterização bioquímica de R2P5 e R2P8 identificou estes microrganismos como *Pseudomonas* sp. A análise por CCD detectou pigmentos fluorescentes, provavelmente responsáveis pelos picos de absorção de 248-250 próximos a MCLR (238 nm). Os pigmentos fluorescentes isolados por Dakhama, *et al.* (1993) a partir de extrato celular de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram espectros de absorção máxima em metanol de 238 nm para piocianina, 264-265 nm para 1-hidroxi-fenazina, este último com capacidade de lisar cianobactéria.

Os resultados preliminares mostraram correlação positiva entre florações de cianobactéria e presença de *Pseudomonas* sp. antagonista. Os dados indicam o potencial do reator 2 (R2P5 e R2P8) e a lagoa de estabilização (BP5) para o isolamento de microrganismos adaptados às condições tropicais e com potencial de controlar cianofíceas toxigênicas.

Salienta-se que na ETE, o esgoto tratado sai do efluente e é gradativamente diluído em córregos, cujo destino são corpos d'água utilizados para captação de água para abastecimento público. Portanto, assumindo-se que a qualidade de água é um fator limitante para o desenvolvimento social e econômico do país, verifica-se que várias lacunas precisam ser preenchidas para que possamos garantir, de forma segura e confiável, a qualidade de água em nossos mananciais e nos sistemas de abastecimento público.

Tabela 1 – Identificação (provável) dos microrganismos isolados em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto São Lourenço, Londrina-PR.

Data da coleta	Ponto de coleta	Meio de cultura	Isolado	spp. (provável)
	Afluente	P	AFP1	<i>Enterobacter</i>
19/09/05	Reator 1	A	R1A1	<i>Enterobacter</i>
1ª coleta	Reator 2	A	R2A1	<i>Proteus</i>
	Efluente	A	EFA1	<i>Proteus</i>
03/10/05	Afluente	A	AFA2	<i>Yersinia</i>
2ª coleta	Reator 1	P	R1P2	<i>Enterobacter</i>
	Reator 2	A	R2A2	<i>Enterobacter</i>
	Efluente	A	EFA2	<i>Citrobacter</i>
17/10/05	Afluente	P	AFP3A	<i>Enterobacter</i>
	Afluente	P	AFP3B	<i>Enterobacter</i>
	Reator 1	A	R1A3	<i>Klebsiella</i>
	Reator 2	A	R2A3	<i>Proteus</i>
	Reator 2	P	R2P3	<i>Enterobacter</i>
	Efluente	A	EFA3A	<i>Enterobacter</i>
	Efluente	A	EFA3B	<i>Serratia</i>
	Efluente	P	EFP3	<i>Enterobacter</i>
01/11/05	Afluente	A	AFA4	<i>Proteus</i>
	Reator 1	P	R1P4	<i>Klebsiella</i>
	Reator 2	A	R2A4	<i>Klebsiella</i>
	Efluente	P	EFP4	<i>Enterobacter</i>
14/11/05	Floração lagoa	P	BP4	<i>Proteus</i>
	Afluente	P	AFP5	<i>Enterobacter</i>
	Reator 1	P	R1P5	<i>Pseudomonas</i>
	Reator 2	P	R2P5	<i>Pseudomonas</i>
	Floração lagoa	P	BP5	<i>Pseudomonas</i>
29/11/05	<i>As amostras foram acidentalmente descartadas</i>			
05/12/05	Afluente	P	AFP7	<i>Enterobacter</i>
	Reator 1	A	R1A7	<i>Yersinia</i>
7ª coleta	Reator 2	P	R2P7A	<i>Enterobacter</i>
	Efluente	A	EFA7	<i>Shiguella</i>
19/12/05	Afluente	P	AFP8	<i>Enterobacter</i>
	Reator 1	A	R1A8	<i>Citrobacter</i>
	Reator 1	P	R1P8	<i>Pseudomonas</i>
	Reator 2	A	R2A8	<i>Serratia s</i>
	Reator 2	P	R2P8	<i>Pseudomonas</i>
8ª coleta	Efluente	P	EFP8	<i>Enterobacter</i>

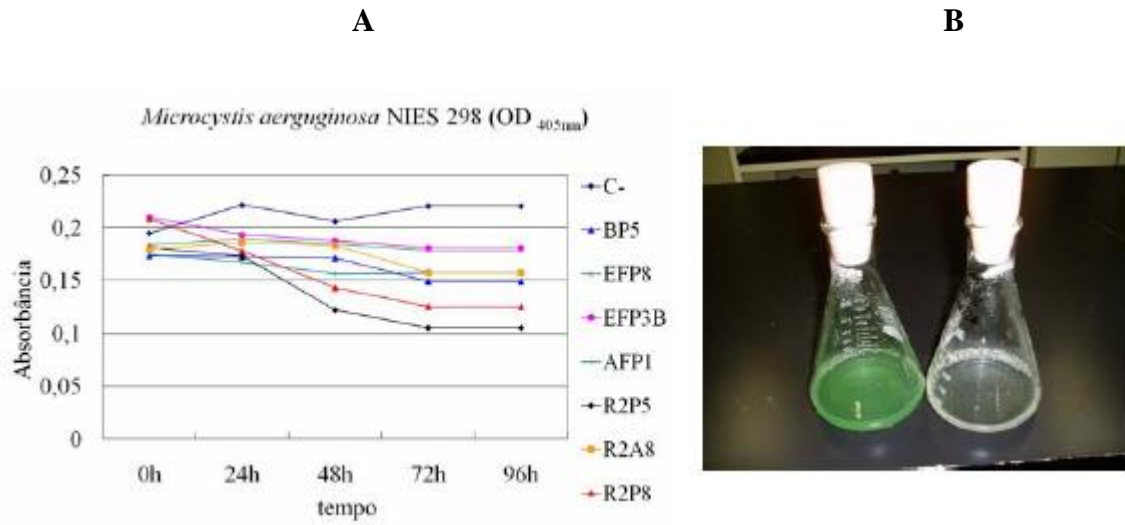


Figura 1 – Efeito antagônico de 7 isolados obtidos de ETE contra *M. aeruginosa* NIES 298 (A); Isolado R2P5 inibindo *M. aeruginosa* NIES 298 (incolor) e respectivo controle negativo (verde) após 96h de cultivo (B).

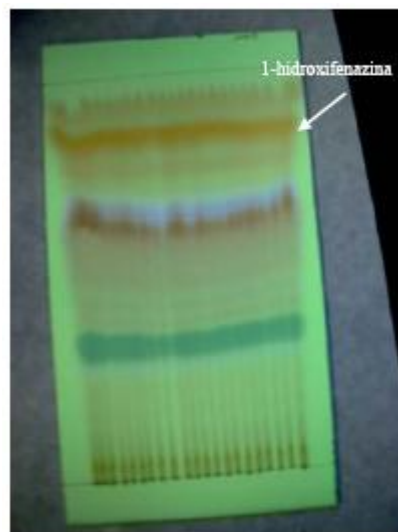


Figura 2 – Cromatografia em Camada Delgada de extrato celular do isolado R2P5, fase móvel isopropanol:água:amônia (80:15:5).

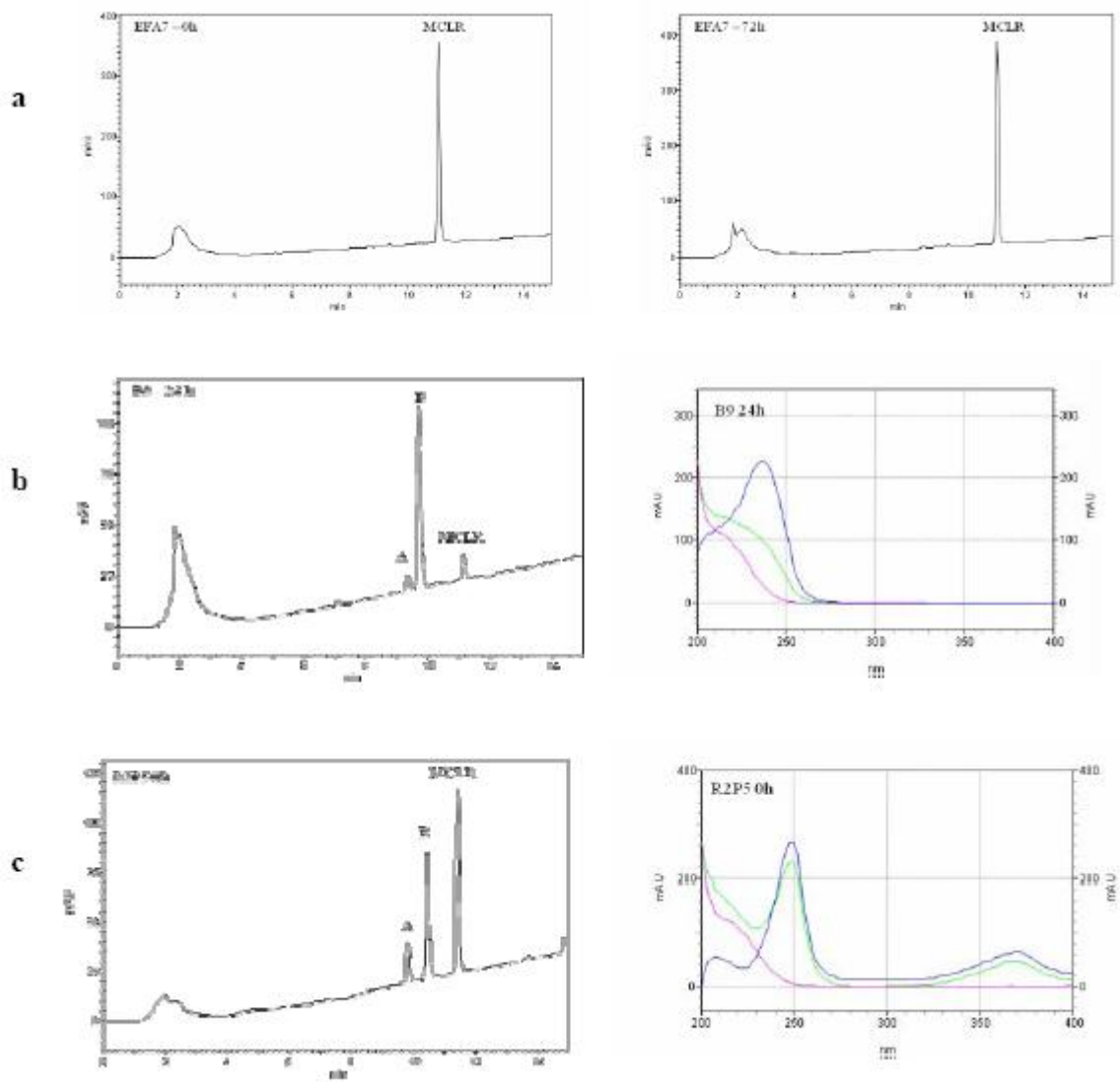


Figura 3 – (a) Perfil cromatográfico do isolado EFA7 inoculado com MCLR em 0 e 72 h; (b) perfil cromatográfico e espectro de absorção máxima de Adda a partir da cepa B9 (controle positivo) inoculado com MCLR após 24 h; (c) perfil cromatográfico e espectro de absorção máxima dos picos A e B a partir do isolado R2P5 inoculado com MCLR em 0 h.

NOVEL MICROCYSTIN-LR BIODEGRADATION PRODUCTS DETECTED BY ADVANCED MARFEY'S DERIVATIZATION METHOD

Abstract

The development of safe tool in cyanobacterial control has been a topic in concern due to increased frequency of cyanobacterial toxic blooms. Biocontrol as an economical and environment-friendly solution has pointed as the most promising option of detoxification process in aquatic ecosystem. Taking into account the enzymatic hydrolysis activity of bacterial strain B9 on structurally different cyanobacterial cyclic peptides, the mechanism of MCLR degradation, which outcome peptides and amino acids were investigated by advanced Marfey's method. MCLR (1.0 mg/mL) degradation by strain B9 cell was carried out, and 120 μ L was sampled at 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The reaction was stopped adding 120 μ L of methanol, and the mixture was derivatized with 1% 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamide (L-FDLA) in acetone prior to analysis by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry (LC/ITMS). Novel L-FDLA derived amino acids and peptides were detected at respective m/z values: [Arg-L-DLA+H]⁺ m/z 468.9; [N-methyl-L-DLA+H]⁺ m/z , 325.7, from Mdha; [Arg- β MeAsp-L-DLA+H]⁺ m/z 598; [Mdha-Ala-L-DLA+H]⁺ m/z 467.0; [Glu-Mdha-L-DLA+H]⁺ m/z 524.7; [Arg- β MeAsp-Leu-L-DLA+H]⁺ m/z 711.0; [Glu-Mdha-Ala-L-DLA+H]⁺ m/z 595.6; [Adda-Glu-Mdha-L-DLA+H]⁺ m/z 839.0, in addition to [Adda-L-DLA+H]⁺ m/z 625.8 and [Adda-Glu-Mdha-Ala-L-DLA+H]⁺ m/z , 908.9. The detection of novel products fulfilling the biodegradation metabolites would be essential to complete the elucidation of very unique hydrolytic microcystin detoxification by B9 strain.

Keywords: Microcystin. Biodegradation. B-9 strain. ADVANCED Marfey's Method.

INTRODUCTION

Microcystins (MCs) are a group of hepatotoxins and protein phosphatase inhibitors, produced by cyanobacteria of the genera *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* and *Planktrotrix* (CHARMICHAEL, 1992). These structures are cyclic heptapeptides consisting of D-Ala-R¹-D-MeAsp(iso)- R²-Adda-D-Glu(iso)-Mdha. Among the 80 variants fully identified, MCLR (R¹: Leu, R²: Arg) is the most toxic(Figure 1) (BOTES *et al.*, 1984; HOEGER *et al.*, 2005).

Following, the first isolation of a MC-degrading bacteria was an *Sphingomonas* sp. strain (ACM-3962) by Jones *et al.* (1994); phenotypically similar bacteria capable to degrade MC were reported (PARK *et al.*, 2001, SAITOU *et al.*, 2003, ISHI *et al.*, 2004, HARADA *et al.*, 2004, RAPALA *et al.*, 2005, AMÉ *et al.*, 2006). In pilot-scale study, the ACM-3962 effectively degraded MCLR in slow sand-filtration (BOURNE *et al.*, 2006), as well as a feasible bioreactor with B9 strain immobilized in polyester resin removed MC of lake water (TSUJI *et al.*, 2006).

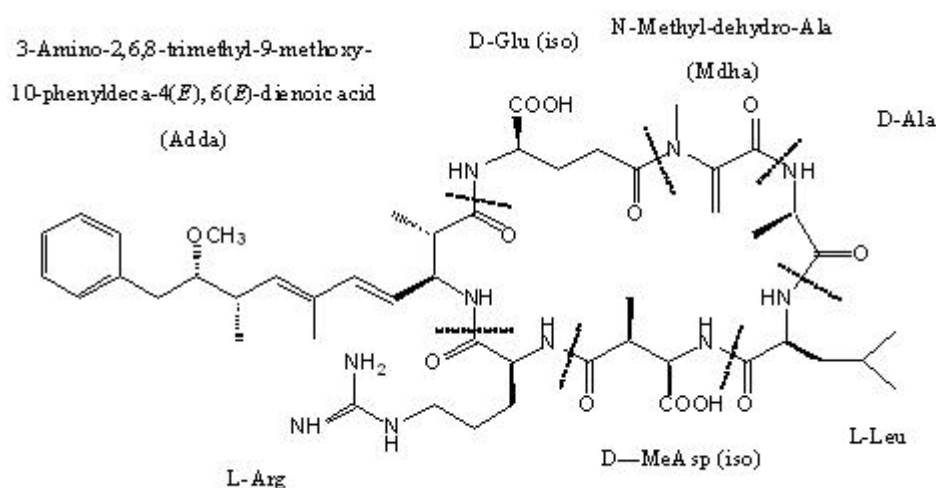


Figure 1 – Microcystin-LR

The molecular study of *Sphingomonas* strain ACM-3962 revealed three hydrolytic enzymes involved in MCLR degradation. Microcistinase MlrA catalyzes the initial ring opening of MCLR at Adda-Arg peptide bond to give linearized MCLR, which is further degraded to a tetrapeptide by MlrB. The third enzyme MlrC hydrolyzes tetrapeptide to smaller peptides and amino acids. The putative protein MlrD provided the transport of MCLR and its degradation products across the bacterial cell wall (BOURNE *et al.* 1996; 2001). Intact Adda was first isolated from MCLR by degradation using strain B9, as a final product (HARADA *et al.*, 2004).

Further use of classic protease inhibitor as EDTA accumulated linear (Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-βMeAsp-Arg) and (Adda-Glu-Mdha-Ala) tetrapeptide, which allowed classification of these enzymes as MlrA and MlrC metallopeptidases, whereas 1,10-phenanthroline characterized MlrB as a possible serine peptidase (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

Liquid chromatography (LC) coupled with photodiode (PDA), and mass spectrometry (MS) detection has been widely used in screening of MC-degrading microorganism. The linear MC and tetrapeptide intermediates also contain Adda portion, with a diene as the main chromophore and maximum absorption spectra at 238 nm (LAWTON *et al.*, 1994; MCELHINEY; LAWTON, 2005).

The restriction of chromatographic methods concerning complete identification of degradation products is the lack of unusual amino acid and/or peptide

standards. Fujii *et al.* (1997) proposed advanced Marfey's method as a nonempirical liquid chromatography/mass spectrometry (LCMS) to determine the absolute configuration of amino acid in a peptide without standard. Marfey (1984) using liquid chromatography at 340 nm, separated by D and L- amino acid enantiomers derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-alaninamide (FDAA), a chiral chromogenic reagent. The elution order of a desired amino acid can be elucidated from the comparison of hydrophobicity of the two more hydrophobic substituent at α -carbons and the side chain of the amino acid in FDLA, which are arranged as *cis* or *trans* type conformation. The L-amino acid derivative is usually eluted from the column before its correspondent D-amino acid derivative (FUJII *et al.*, 1997).

The strain B9, which is 99% similar with *Sphingosinicella microcystinivorans* strain Y2 (GenBank accession no. AB084247) (MARUYAMA *et al.*, 2006) showed promising potential concerning degradation of MCLR, MCRR 3-desmethyl-MCLR, dihydro-MCLR and nodularin (IMANISHI *et al.*, 2005). In this study, the MCLR degradation behavior of strain B9 was carefully investigated monitoring its products by HPLC-PDA and LC/MS, as well as Marfey's derivatization coupled with LC/ITMS (liquid chromatography/ion trap mass spectrometry).

MATERIAL AND METHOD

Chemicals

The NaCl, Tris-Cl buffer (pH 7.6), HPLC grade methanol, acetonitrile and formic acid were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). The ultra-pure (distillated) water used in mobile phases was purchased from Kanto Chemical (Tokyo, Japan). As derivatization reagent, 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamide (L-FDLA) was purchased from Kokusan Chemicals (Tokyo, Japan). Amino acids standard (D-Ala, L-Arg, D-Glu, L-Leu, D- β MeAsp) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), Wako (Osaka, Japan), Tokyo Kasei Kokyo (Tokyo, Japan), or Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Purified Adda was produced by MCLR degradation using the cell extract of B9 strain (HARADA, *et al.*, 2004). MCLR was isolated and purified (>95% on HPLC) from lyophilized cyanobacterial cells collected from Laguna de Bay, Philippines.

MC-degrading bacterium

The bacterial strain B9 (isolated from Lake Tsukui, Kanagawa, Japan) was inoculated in 100 mL of Sakurai medium (0.2 g peptone, 0.1 g yeast extract and 0.05 g

glucose), and incubated at 27° C / 3 days at 200 rpm. The cells were harvested (3,000 x g / 30 min, room-temperature), and the pellet was suspended in 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.6), and again centrifuged (3,000 x g / 30 min). The degradation assay was carried out with cell pellet as: (1) crude B9 cell, named CB9, was MCLR added directly into freshly harvested pellet; (2) washed B9 cell, named WB9, was MCLR added into pellet previously rinsed three times with 50 mM Tris-Cl buffer (3,000 x g / 30 min), followed by sequential rinsing with 0.9% NaCl at 7,500, 12,000 and 15,000 x g / 5 min (three repetitions each one); (3) B9 cell extract named EB9, MCLR added into crude B9 cell pellet lyophilized and dissolved in water. The viability of CB9 and WB9 was checked inoculating 10 µL of cell suspension in 10 mL of Sakurai medium at 27° C for 24-48h. Negative biodegradation control was performed with CB9, WB9 and EB9 without MCLR.

Advanced Marfey's method

The advanced Marfey's method was calibrated testing 50 mM of each pure D, L and D-L amino acid (Ala, Arg, Glu, Leu, βMeAsp) and Adda (FUJII, *et al.*, 1997). The detection limit was established comparing 0.05, 0.1, 0.5, 5, 50 mM of amino acids pool (D-Glu, D-Ala, D-βMeAsp, L-Arg, L-Leu and Adda) in 50 mM Tris-Cl buffer or H₂O. Each amino acid pool concentration was added with 20 µL of 1 M NaHCO₃ and 50 µL of 1% L-FDLA in acetone, followed by vortexing and incubating at 37° C / 60 min. The reaction was quenched adding 20 µL of 1 N HCl and dried-centrifuged. The residue was dissolved in 300 µL of acetone, centrifuged to precipitate the NaHCO₃ (three repetitions, 15,000 x g, 2 min). The collected supernatant (900 µL) was dried, and the residue was dissolved in acetonitrile (1 mL). Five microliter was screened by TLC (thin layer chromatography, 20 x 20 cm Sílica gel 60F254 1mm, Merck, Frankfurter, Germany) with chloroform:methanol (1:1) as the mobile phase, while 5µL was analyzed by LC/ITMS (liquid chromatography / ion trap mass spectrometry). The performance of Advanced Marfey's method in the analysis of MCLR biodegradation products was evaluated testing 100 µg/mL and 1 mg/mL of MCLR incubated with B9 cell extract (EB9) at 27° C in the dark. The 120 µL of mixture was sampled after 0, 24, 48 and 72 h, followed by addition of 120 µL of methanol to quench the degradation reaction and stored at -20° C. Forty microliter was used for HPLC-PDA analysis at 238 nm, while the remaining 200 µL was dried, dissolved in 50 µL of H₂O, derivatized with L-FDLA and analyzed by LC/ITMS as described.

MCLR-biodegradation assay

Biodegradation of 1 mg/mL of MCLR in H₂O was carried out adding 200 µL of bacterial strain B9 (crude, CB9; washed, WB9; extract cell, EB9), and incubated at 27° C in the dark. An aliquot of 120 µL was sampled after 0, 6, 12, 24, 36, 48 72 and 96 h, and filtrated by Ultrafree-MC membrane centrifuge filtration unit (hydrophilic PTFE, 0.20 µm, Millipore, Bedford, MA, USA). Biodegradation reaction was quenched adding 120 µL of methanol. Forty microliter was analyzed by HPLC-PDA (238 nm) for biodegradation monitoring, followed by biodegradation products identification by LC/ITMS (238 nm). The remained 200µL was dried and dissolved in 50 µL of H₂O to perform advanced Marfey's derivatization with L-FDLA as previously described. The derivatized residue was dissolved in acetone, centrifuged, and the dried supernatant residue was dissolved in 100 µL of acetonitrile for LC/ITMS analysis (340 nm).

High-Performance Liquid Chromatography

MCLR degradation process was monitored by HPLC-PDA (238 nm). The system consisted of a pair of LC 10A VP pumps, DGU 12A degasser, CTO 6A column oven, SPD 10A VP photodiode array detector, and SCL 10A VP system controller (Shimadzu, Kyoto, Japan). Five microliter of filtrated sample (hydrophilic PTFE, 0.20 µm, Millipore, Bedford, MA, USA) was loaded onto TSK-gel Super ODS column (2.0 µm, 2.0 X 100 mm, TOSOH, Tokyo Japan) at 40° C. The mobile phase was 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in methanol (B). The gradient conditions were initially 40 to 90% B at 20min, and the flow rate was 200 µL/min.

Liquid Chromatography/ Ion Trap Mass Spectrometry

Prior L-FDLA derivatization, MCLR cyclic, MCLR linear, tetrapeptide (Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala) and Adda were confirmed by LCMS (238 nm). The sample, column, mobile phase and gradient conditions were the same of HPLC analysis. L-FDLA derivatized sample was analyzed by LC/ITMS. The LC separation was performed by Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Five microliter of the sample was filtrated through Ultrafree-MC membrane centrifuge-filtration unit (hydrophilic PTFE, 0.20 µm, Millipore, Bedford, MA, USA) and loaded onto TSK-gel Super ODS column (2.0 µm, 2.0 X 100mm, TOSOH, Tokyo Japan) at 40° C. The mobile phase was 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The flow rate was 200µL/min with

UV detection at 340 nm. The gradient conditions were initially 10-90% B at 40min. The entire eluate was directed into the mass spectrometer where it was diverted to waste for 2.5 min after injection to avoid any introduction of salts into ion source. The MS analysis was accomplished by Finnigan LCQ Deca XP plus ITMS (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with electrospray ionization (ESI) interface. The ESI conditions in the positive ion mode were as follows: capillary temperature, 300° C, sheat gas flow rate, 35 (arbitrary unit), ESI source voltage, 5000V, capillary voltage, 43V, tube lens offset, 15V. Various scan ranges were used according to the molecular weights of possible amino acid and peptides from MCLR biodegradation.

RESULTS AND DISCUSSION

LCMS detected all pure amino acids in pool derivatized with L-FDLA, including the lower concentration tested (0.05 mM, corresponding about 50 µg/mL of MCLR), while the detection limit of TLC was 0.5 mM. Amino acids pool dissolved in both water and Tris-Cl buffer showed no interference in the L-FDLA derivatization and LCMS detection performance.

In a preliminary test prior to L-FDLA derivatization, the intermediate products (linear, tetrapeptide and Adda) arisen from EB9 in 100 µg/mL of pure MCLR could be monitored from 0 to 48 h at 238 nm. However, only Adda-L-DLA was detected by LC/ITMS (340 nm), when the sample was derivatized with L-FDLA. Regarding that MCLR is degraded in different products (tetrapeptide, tripeptides, dipeptides and amino acids), probably the concentration of each product was below the threshold of LCMS detection. In addition, L-FDLA derivatization is better performed with small peptide and amino acid, i.e. it does not react with linear MCLR.

Therefore the test was performed with 1mg/mL of MCLR, and the degradation process was monitored by HPLC-PDA and confirmed by LCMS analysis in both pre and post-L-FDLA derivatization. Figure 2 shows MCLR biodegradation carried out with CB9 (B9 crude cell), EB9 (B9 cell extract) and WB9 (B9 washed cell), analyzed by LCMS at 238 nm. Intermediate products as linear MCLR, Adda-Glu-Mdha-Ala and Adda were detected in all reaction, but at different degradation rate and profile. EB9 (12 h) degraded MCLR faster than CB9 and WB9 (18 h). The EB9 and CB9 showed similar MCLR biodegradation profile, with a tetrapeptide peak at 24h, followed by its rapid degradation, in contrast of slow tetrapeptide degradation observed in WB9.

Advanced Marfey's derivatization was carried out in all MCLR biodegradation test, as well as the corresponding negative control, i.e. B9 cell incubated in water without MCLR. Due to unavailability of unusual small peptide standards, biodegradation products were tentatively identified comparing ion chromatogram and selected ion monitoring (SIM) of negative control (B9) versus B9 strain+MCLR (Figure 3, 4, 5 and 7). Only the data from WB9 was feasible for further study, as in CB9 and EB9 negative control, the LCMS analyses showed ion chromatogram with various peaks with closed m/z of investigated peptide and amino acid (data not shown). These interferences probably were trace peptide from medium (casein hydrolyzed peptone and yeast extract), which was remained around B9 cell and contaminated the microtube with MCLR in water. I.e., *Sphingomonas* sp. usually produces a mucilaginous exopolysaccharide biopolymer, which can adsorb culture components even though after once Tris-Cl buffer centrifugation.

MCLR as the sole carbon and nitrogen source has been used to select MCLR-degrading *Sphingomonas* sp., but microcystinase could be expressed in absence of MCLR, indicating induction by other oligopeptides (BOURNE *et al.*, 1996). Therefore, this oligopeptide enzymatic cleavage can accumulate low molecular weight peptides similar with these ones investigated. Such interference was overcome by repetitive washing. The cell viability checking demonstrated B9 washed cells (WB9) growth after 24 h. Then, WB9 was chosen for the follow experiment. In addition, other advantage of WB9 was the slower behavior of MCLR degradation than CB9 and EB9, which improved monitoring of biodegradation process. Probably the repetitive washing process retarded the transportation of biodegradation products into the cell, mainly for tetrapeptide (Figure 2). EDTA, an ion chelator, has been applied as protease inhibitor to improve tetrapeptide detection (Bourne *et al.*, 1996). In our experiment we did not use protease inhibitor, but washing process could affect ion availability for metalloprotease activity.

Figures 3, 4, 5 and 7 show ion chromatogram and mass spectra of MCLR biodegradation products arisen from the tetrapeptide Adda-Glu-Mdha-Ala (Figure 3-5) and tripeptide Arg- β MeAsp-Leu (Figure 7), while Figure 6 and 8 show their biodegradation behavior along 0 to 96h.

Concerning amino acid, all 7 residue of MCLR were investigated. Due to the closed chemical structure between D-Glu and D- β MeAsp a very carefully condition control of the liquid chromatography was required to standardize the retention time of each analyte. In this way, the initial pressure of LC was standardized at 90 ± 1.0 Pa. After

derivatization with L-FDLA, [L-Leu-L-DLA+H]⁺ m/z 425.8 and both D and L [Ala-LDA+H]⁺ m/z 383.7 were detected in B9 (negative control) and B9+MCLR without quantitative difference (data not shown). Fujii *et al.* (1997) used MCLR hydrolyzed with 6.0 N HCl and established advanced Marfey's method for determination of the absolute configuration of constituent amino acid in a peptide. The authors distinguished D-Glu and β MeAsp residue with the same molecular weight and similar hydrophobicity. However, in our data no difference between B9 (negative control) and B9+MCLR in m/z 441.8 ion chromatogram was observed due to the closed retention time. The [Adda-L-DLA+H]⁺ m/z 625.8 was detected only in B9+MC (Figure 4). Though [L-Arg-L-DLA+H]⁺ m/z 468.9 (Figure 7) was detected in both B9 (negative control) and B9+MCLR, the addition of MCLR increased its concentration after 48h, indicating as MCLR biodegradation product (Figure 6). Regarding the unstable characteristic of Mdha residue, which is spontaneously converted to methylamine (HARADA, *et al.*, 1990), its concentration was monitored (Figure 5 and 6). Methylamine [CH₃NH-L-DLA+H]⁺ m/z 325.7 was detected from 48 to 96 h.

Figure 6 summarizes the MCLR biodegradation behavior of the tetrapeptide (Adda-Glu-Mdha-Ala) with peak at 36 to 48 h (Figure 6A), and further its cleavage in Adda (Figure 6C) and tripeptide Glu-Mdha-Ala (Figure 6D) as the major degradation route. This tripeptide (Figure 6D) was cleaved to dipetides Glu-Mdha (Figure 6E) and Mdha-Ala (Figure 6F). The last dipetide [Mdha-Ala-L-DLA+H]⁺ m/z 467.0 was the major component with peak at 24 h, followed by decrease due to Mdha appearance (Figure 6F), indicated by methylamine increase from 48 to 96h (Figure 6G).

Regarding that [Adda-Glu-Mdha-L-DLA+H]⁺ m/z 839.0 was detected at low concentration (Figure 6 B), and its putative dipeptide [Adda-Glu-L-DLA+H]⁺ was not detected, the main tetrapeptide cleavage route would be at Adda-Glu peptide bond in B9 strain.

We first detected the tripeptide [Arg- β MeAsp-Leu-L-DLA+H]⁺ m/z 711.1 as one of direct biodegradation product from MCLR (Figure 7A and 8A), and its dipeptide [Arg- β MeAsp- L-DLA+H]⁺ m/z 597.8 (Figure 7B and 8B), while the β MeAsp-Leu was not detected. Therefore, the B9 strain hydrolyses the β MeAsp-Leu peptide bond, followed by immediate intake of L-Leu as nitrogen and carbon source. Even though negative control showed same [Arg- β MeAsp- L-DLA+H]⁺ ion peak at m/z 597.8, its intensity was lower (7.38E6) than B9+MCLR (4.34E8) (Figure 7B). This peak was not detected in the previous

ion chromatogram of negative control, and then the possibility of equipment contamination should not be discarded.

Concerning the tripeptide Arg-βMeAsp-Leu, its putative βMeAsp-Leu was not detected, therefore Arg-βMeAsp arisen was the major route, with its peak at 24 h, followed by decrease due to [L-Arg L-DLA+H]⁺ *m/z* 468.9 (Figure 7C) increase from 48h to 96h (Figure 8C).

Summarizing, biodegradation kinetics indicated that both tetrapeptide and tripeptide were synchronically arisen with higher detection at 24 h. Afterward, the succeeding enzymatic cleavage released free unusual and L- amino acid residues, which can be used as N and C source.

The breakdown of cyclic MCLR decreased the toxicity in 160-fold (linear MCLR) and 20-fold (tetrapeptide) and the protein phosphatase inhibition activity was preserved by the interaction involving Adda side chain, glutamate and covalent bind between Mdha and cysteine residue of protein phosphatase (BOURNE *et al.*, 1996; 2001). Our data demonstrated the MCLR degradation until non-toxic amino acids residue by B9 strain, where the initial pathway was similar with *Sphingomonas* ACM-3962 (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

Figure 9 summarizes the sequential cyclic MCLR breakdown started at Adda-Arg peptide bond cleavage, with opening of the ring producing a linear MCLR (Adda-Glu-Mdha-Ala-Leu-βMeAsp-Arg). Rupture at Ala-Leu linkage provides tetrapeptide (Adda-Glu-Mdha-Ala) and tripeptide (Arg-βMeAsp-Leu). The first mainly products of tetrapeptide are Adda and Glu-Mdha-Ala tripeptide, which is cleaved to dipeptides (Glu-Mdha and Mdha-Ala). The main biodegradation product from the tripeptide (Arg-βMeAsp-Leu) was the Arg-βMeAsp dipeptide. Detection of methylamino-L-LDA and L-Arg-L-DLA in the later stage settled up the MCLR degradation pathway.

The *mlrA* gene, which codifies the enzyme MlrA synthesis is conserved at least three different bacterial species, and it has been detected in MC degraders but not to the all *Sphingomonas*, suggesting that MC degradation gene was acquired during evolution of *Sphingomonas* (SAITO *et al.*, 2003).

The *mlrA* gene was confirmed in B9 strain, the identification of complete cluster involved in MCLR degradation must be confirmed. B9 strain hydrolyzes toxic MCs as well as non-toxic cyanobacteria peptide (KATO *et al.*, 2006). The identification of intermediated and final products of MCLR would be an important tool to understand a very unique hydrolytic activity. In order to understand the MCLR degrading ability of B9 strain,

the isolation of the MC degrading enzymes is also in course, to complete this study. The explanation of the B9 and other MC-degrading microorganism function and role in the natural environment is required. Bacteria, as B9 strain may contribute to the detoxification of the ecosystem, and the understanding of the mechanism for this process would facilitate overcoming pollution problems.

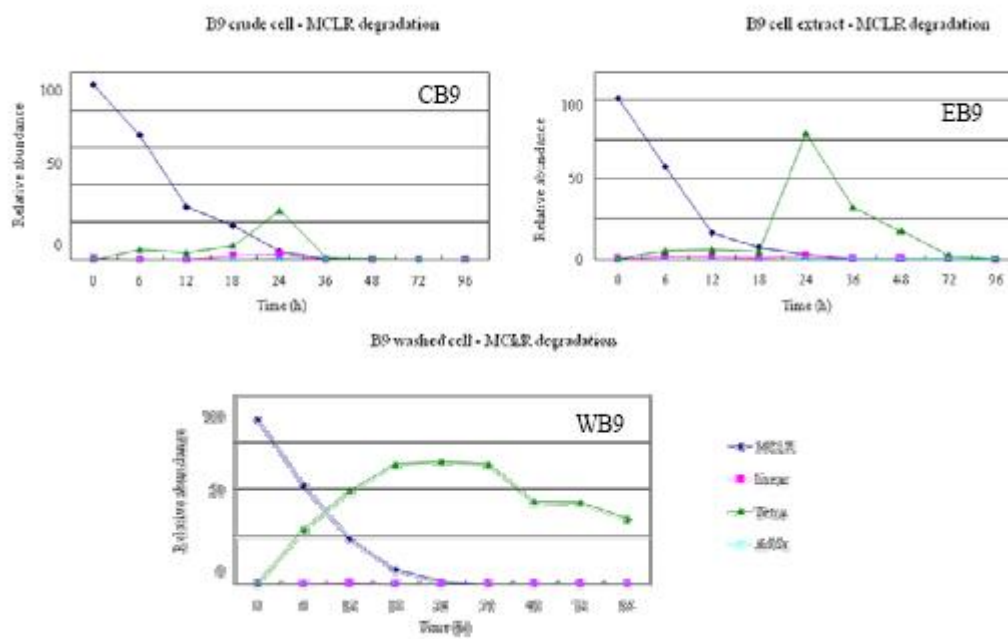


Figure 2 – MCLR Biodegradation process by B9 crude cell, B9 cell extract and B9 washed cell, analyzed by HPLC and confirmed with LCMS at 238 nm UV detector.

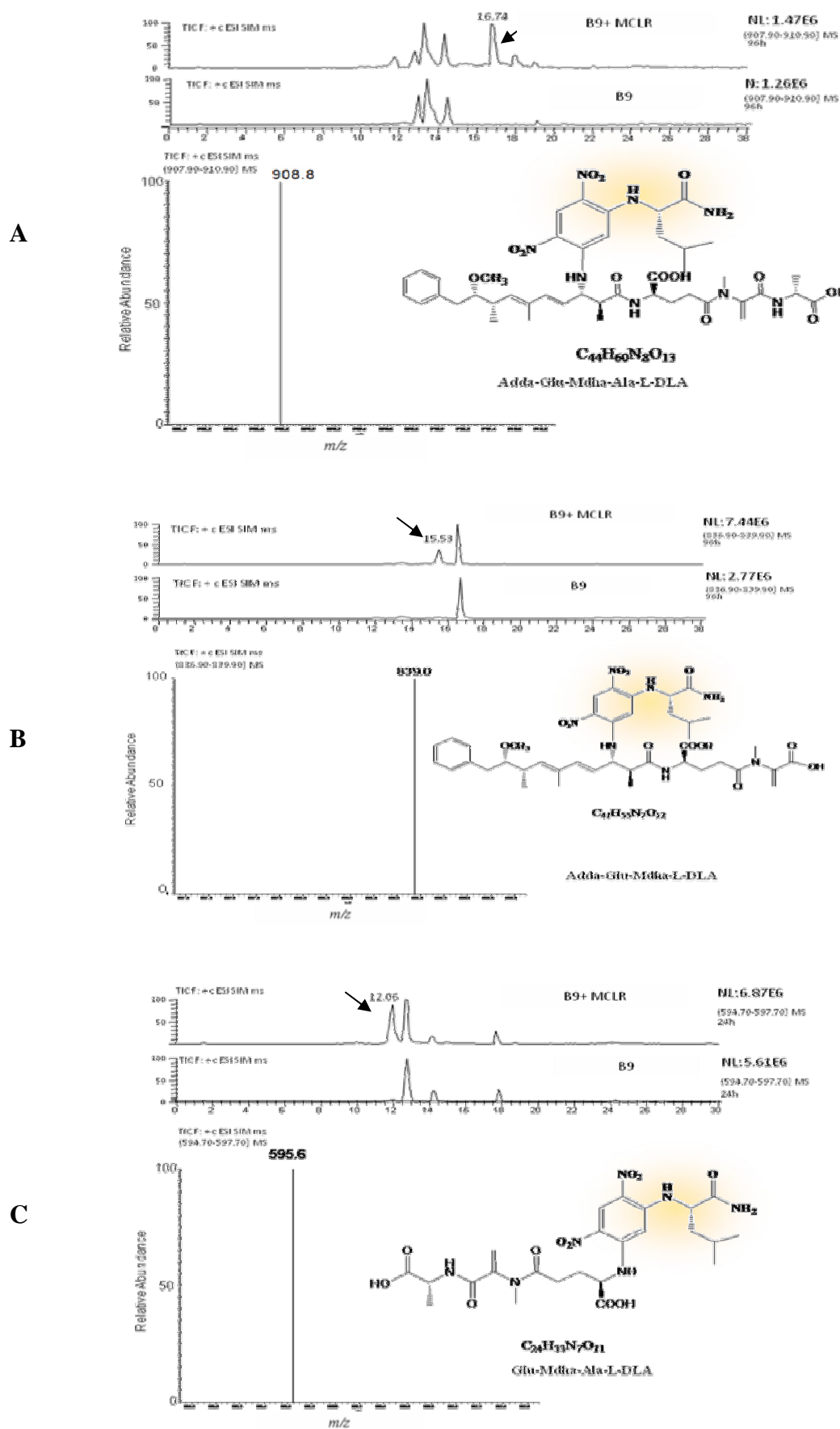


Figure 3 – Selected ion chromatogram and mass spectra of MCLR degradation products: tetrapeptide and tripeptides derivatized with L-FDLA.

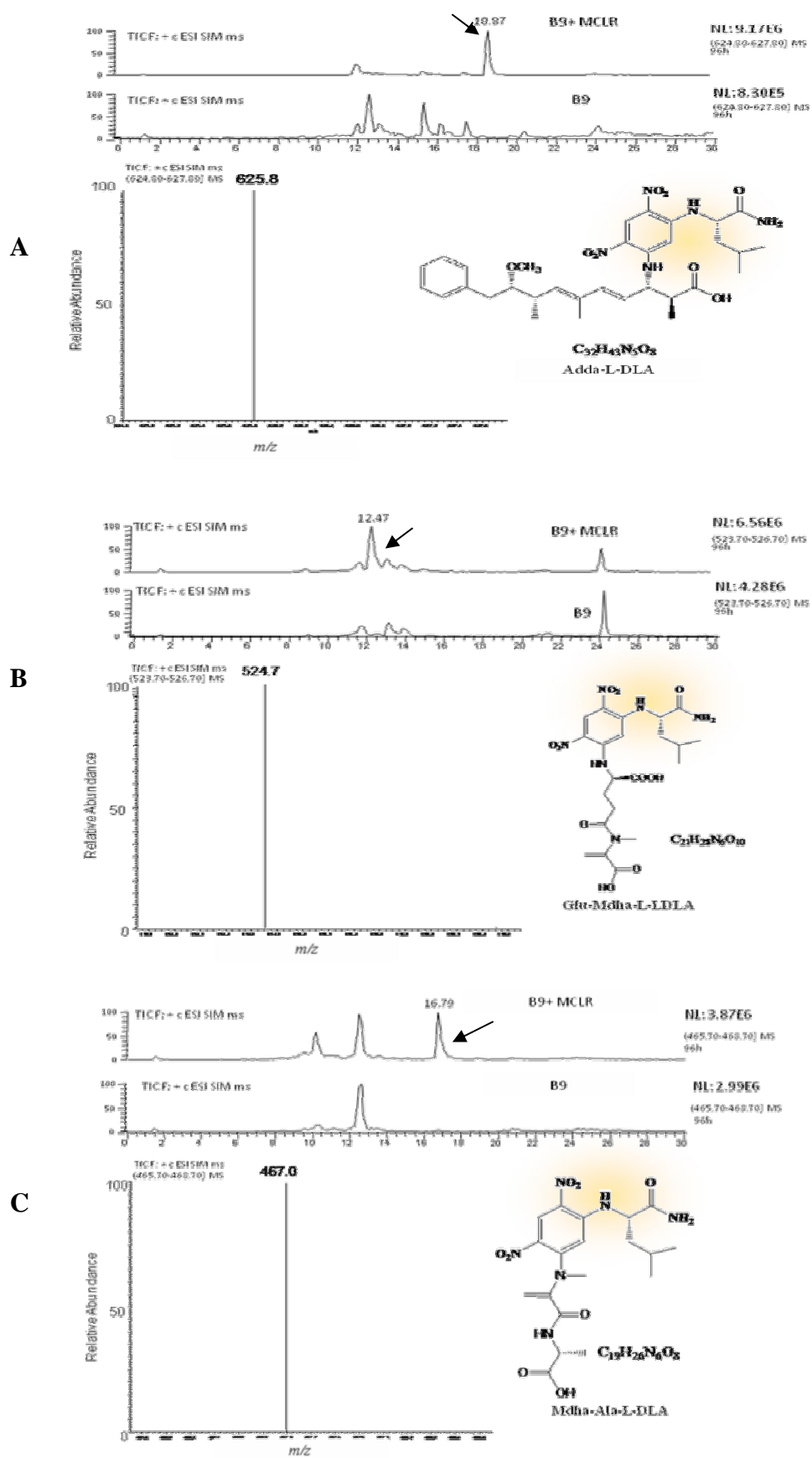


Figure 4 – Selected ion chromatogram and mass spectra of MCLR degradation product: Adda and Glu-Mdha and Mdha-Ala derivatized with L-FDLA.

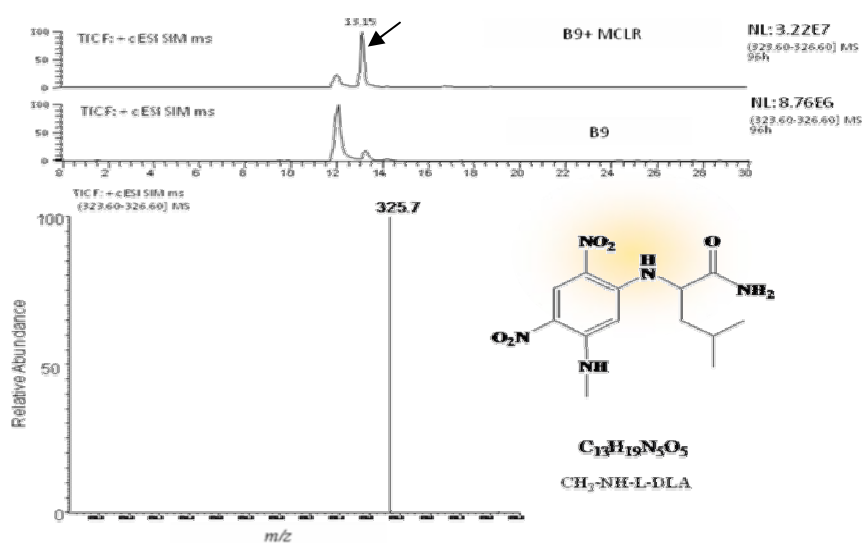


Figure 5 – Selected ion chromatogram and mass spectra of N-Methyl derivatized with L-FDLA, from Mdha residue.

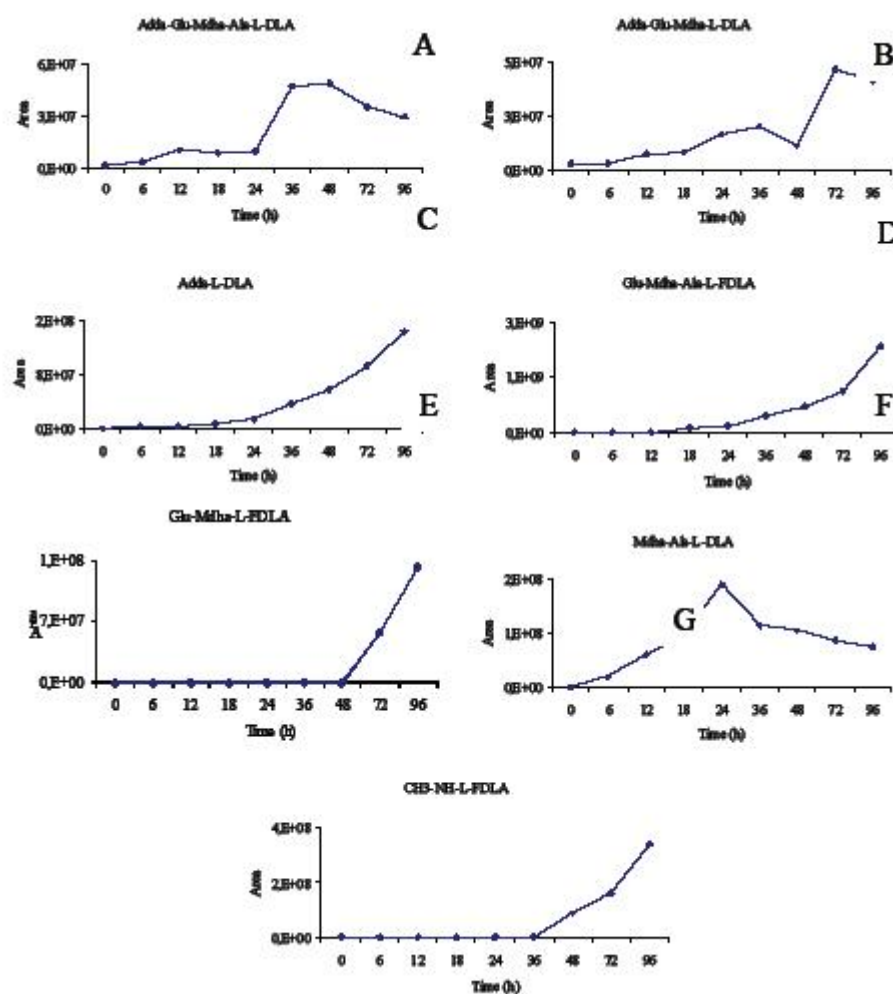


Figure 6 – B9 strain biodegradation behavior of Adda-Glu-Mdha-Ala tetrapeptide from MCLR.

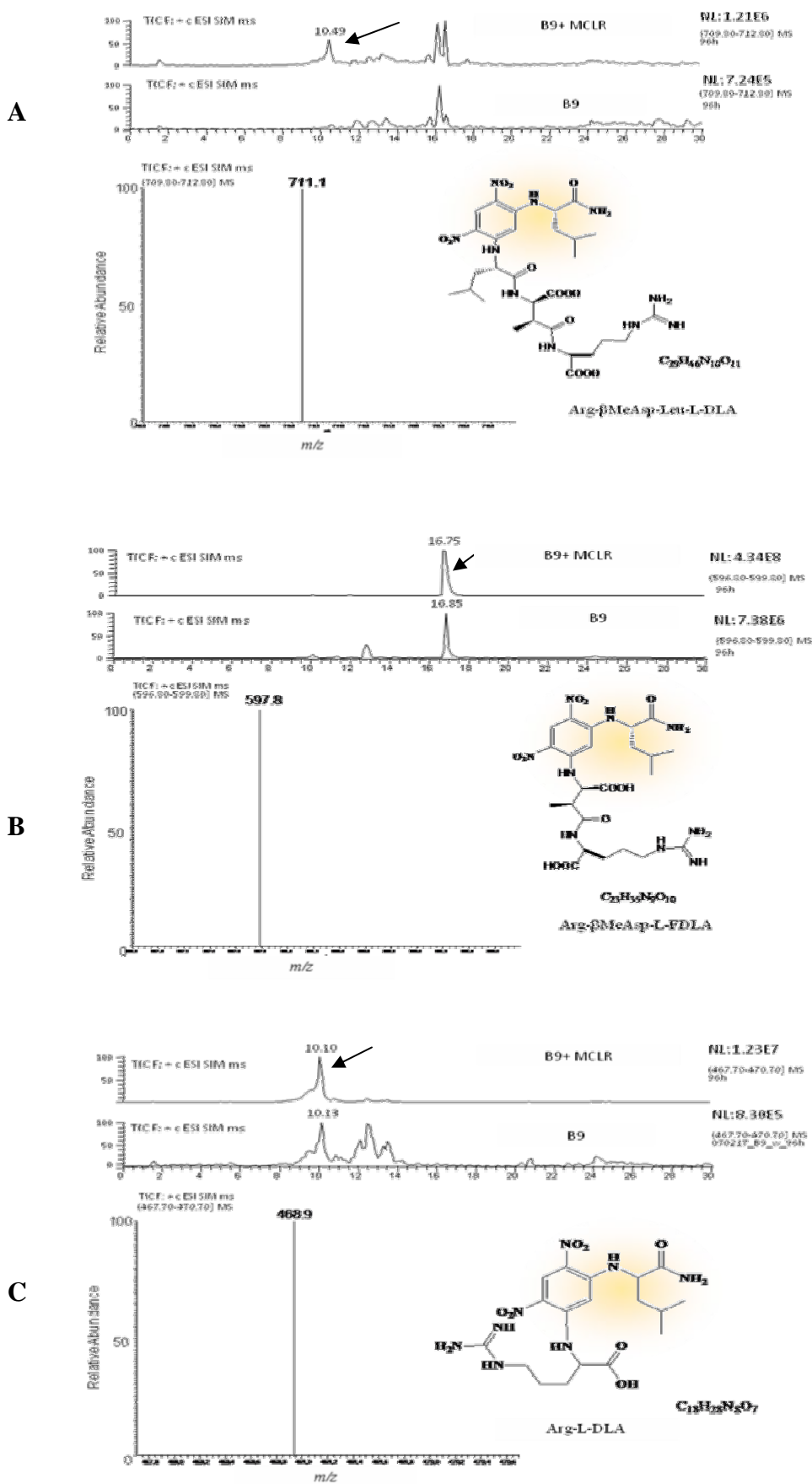


Figure 7 – Selected ion chromatogram and mass spectra of Arg-βMeAsp-Leu, Arg-βMeAsp and Arg derivatized with L-FDLA.

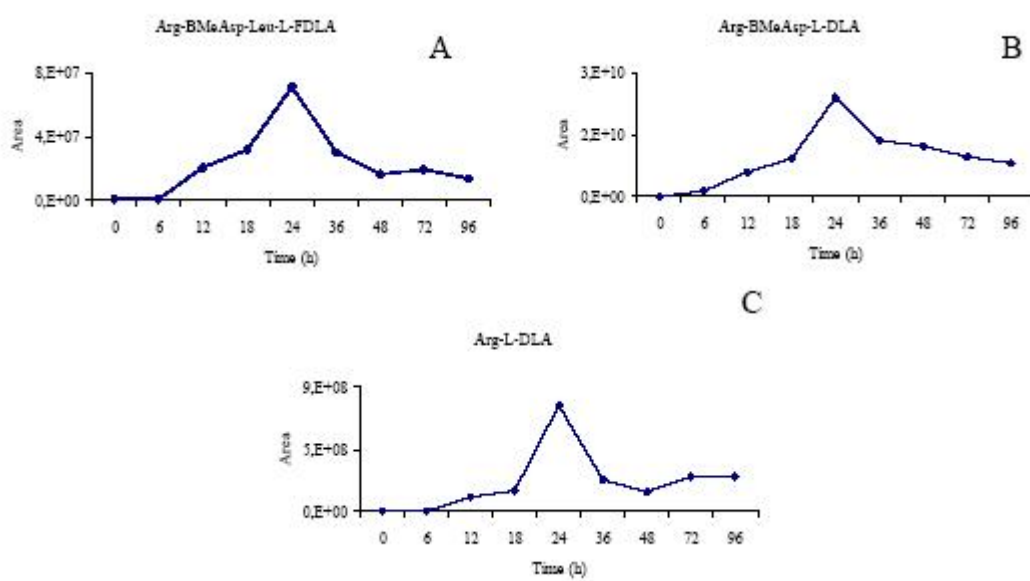


Figure 8 – B9 strain biodegradation behavior of Arg-βMeAsp-Leu tripeptide from MCLR.

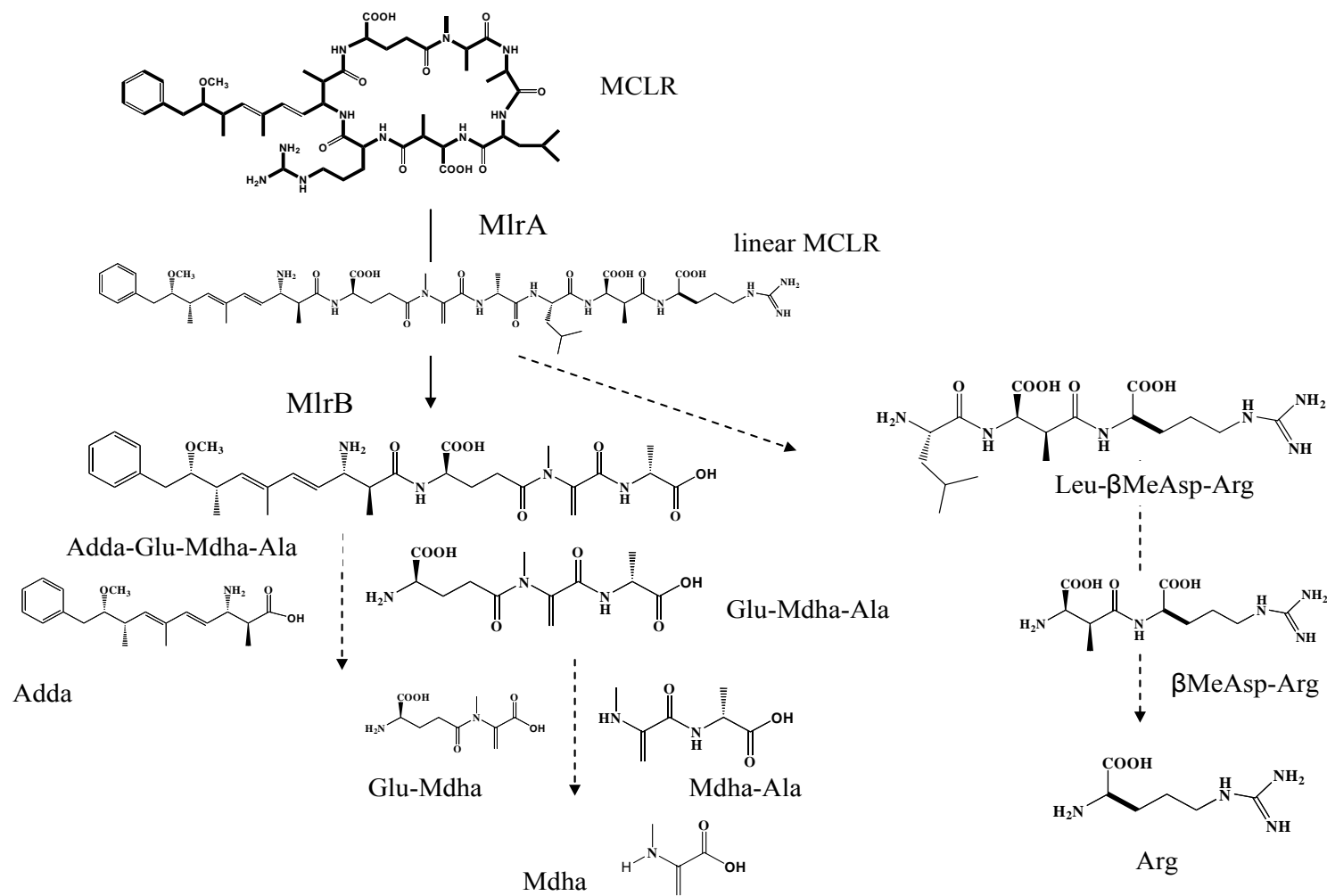


Figure 9 – MCLR biodegradation pathway using B9 washed cell.

5.1 PUBLICAÇÃO E TRABALHOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos no transcurso da pesquisa foram apresentando em eventos, visando publicação na forma de artigo científico, revisão, capítulo de livro listados abaixo:

Publicação de revisão:

HASHIMOTO, E. H., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., HIROOKA, E. Y. Risco de *Microcystis* spp toxigênica no cenário de piscicultura brasileira. **Biosaúde**. 1/2 (5), 69-81, 2003.

Capítulo de livro

HASHIMOTO, E.H.; COLUS, I.M.S; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C; ITANO, E.; BRACARENSE, APFL; UENO, Y., HARADAK-I; HIROOKA, E.Y. Biomonitoring assay in analysis of Co-occurring Microcystin and Aflatoxin in Aquaculture. **Proceeding of XII International IUPAC Mycotoxins and Phycotoxins** ed. Istambul- Turkey : IUPAC, 2007, v.1. (enviado)

Apresentação oral:

HASHIMOTO, E.H., Biodegradação de microcistina-LR: elucidação de mecanismo e caracterização de metabólitos intermediários. **XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 03-06 de outubro de 2007. Brasília-DF. Convite para participação em Mesa redonda sobre Ficotoxinas.

HASHIMOTO, E.H.; COLUS, I.M.S; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C; ITANO, E.; BRACARENSE, APFL; UENO, Y., HARADA, K-I; HIROOKA, E.Y. Biomonitoring assay in analysis of Co-occurring Microcystin and Aflatoxin in Aquaculture. In: **XII International IUPAC Mycotoxins and Phycotoxins** ed. Istambul- Turkey : IUPAC, 2007.

HASHIMOTO, E.H., TRAD, A.P.M.S., KAMOGAE, M., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., BRACARENSE, A.P.F.R.L., KAWAMURA, O., TSUTSUMI, T., NAGATA, S., HARADA, K-I, UENO, Y., HIROOKA, E.Y., Detecção de microcistina em tilápias expostas a extrato de *Microcystis aeruginosa*. **XI Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia**, Itajai-SC, 2006.

HASHIMOTO, E.H., PÁUDA, C.G, BRACARENSE, A.P.F.R., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., ONO, E.Y.S. HARADA, K-I, HIROOKA, E.Y. . Interação Aflatoxinas-Fumonisinás e Microcistinas. **XI Encontro Nacional de Micotoxinas**. Piracicaba-SP, 2004.

Apresentação de Poster:

HASHIMOTO, E. H., KATO, H. TSUJI, K, KAWASAKI, Y., HIROOKA, E.Y., HARADA, K.-I. Elucidation of a Biodegradation Mechanism of Microcystin-LR Using Advanced Marfey's Method. **7th ICTC International Conference on Toxic Cyanobacteria**. 5-10 August 2007. Angra dos Reis-RJ, Brasil..

HASHIMOTO, E.H., VANZELLA, T.P., SCHIAVO, L., SANTOS, A.P.M., FRANCOBANDIERA, A.I., BRACARENSE, A.P.F.R., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., CAETANO FILHO, M., FROSSARD, H., HARADA, K-I., UENO, Y., COLLUS, I. M. S., HIROOKA, E.Y. Genotoxicidade de *Microcystis aeruginosa* em Tilápia. **XI Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia**, Itajaí-SC, 2006.

HASHIMOTO, E.H., VANZELLA, T.P., SCHIAVO, L., SANTOS, A.P.M., FRANCOBANDIERA, A.I., BRACARENSE, A.P.F.R., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., HARADA, K-I., UENO, Y., COLLUS, I. M. S., HIROOKA, E.Y. Análise da genotoxicidade oriunda da interação aflatoxina e *Microcystis aeruginosa* em tilápias (*Oreochromis niloticus*). **IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 2006, São Pedro/SP.

HASHIMOTO, E. H., KAMOGAE, M., BRACARENSE, A. P. F. R. L., LONCAR, M., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., HIROOKA, E. Y. Marcação imuno-histoquímica de microcistina em fígado de tilápia (*Oreochromis niloticus*) In: **VI Congresso Londrinense de Biologia Aplicada a Saúde**, 2004, Londrina-PR. Revista Biosaúde. 2004.

HASHIMOTO, E. H., PADUA, C. G., KAMOGAE, M., YABE, M. J. S., IMANISHI, S., UENO, Y., HARADA, K- I., HIROOKA, E. Y. Monitoramento de microcistinas e eutrofização em águas de pesqueiros na região de Londrina, Norte do Paraná In: **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2003, Florianópolis-SC.

6 CONCLUSÃO

O ensaio de cometa e micronúcleo e imunistoquímica mostraram-se favoráveis e aplicáveis para monitoramento de efeitos de genotoxicidade e detecção de AFB₁ e *Microcystis aeruginosa* em tilápias (*O. niloticus*). A combinação desses ensaios biológicos sem a necessidade de equipamentos sofisticados se mostrou adequada e vantajosa para monitorar e minimizar os riscos de contaminantes na cadeia alimentar.

O isolamento de microrganismos com atividade anti-cianobactéria apontou as florações de cianobactéria na ETE - São Lourenço Londrina, como ambiente favorável para seleção de antagonistas, devido à alta competitividade e carga microbiana deste meio. O trabalho preliminar abriu perspectivas para seleção de um potente antagonista adaptado às condições tropicais com requisitos adequados para aplicação em biocontrole.

A detecção de aminoácidos e peptídeos, como produtos de biodegradação de MCLR pela cepa B9, representa uma ferramenta importante para o estudo de degradação de cianotoxinas. Este estudo contribui para compreensão da complexa dinâmica de produção e detoxificação de microcistina no ecossistema.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, G.A., EL-FAYOUMI, R., SMITH, M.J., HECKMANN, R.A., O'NEILL, K., A Comparative Evaluation of Aflatoxin B₁ Genotoxicity In Fish Models Using The Comet Assay. **Mutation Research**, 446, 181-188, 1999.
- ABDELHAMID, A.M., KHALIL, F.F., Problem of Mycotoxin in Fish Production. **Egyptian Journal Of Nutrition And Feeds**, 1, (1), 63-71, 1998.
- AEN- AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS., Emater Propõe Ampliação de Produção e Lucratividade da Piscicultura.
Acesso: <<http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=943>> em 28 de abril de 2007.
- AHN, C-Y., JOUNG, S-H., JEON, J-W., KIM, H-S., YOON, B-D., OH, H-M., Selective Control Of Cyanobacteria By Surfactin-Containing Culture Broth Of *Bacillus subtilis* C1. **Biotechnology Letters**, 25, 1137-1142, 2003.
- AL-SABTI, K., METCALFE, C.D., Fish Micronuclei for Assessing Genotoxicity in Water. **Mutation Research**, 343, 121-135, 1995.
- AMÉ, V., ECHENIQUE, R., PFLUGMACHER, S., WUNDERLIN, A., Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 Isolated from San Roque Reservoir (Cordoba - Argentina). **Biodegradation**, 17, (5), 447-455, 2006.
- ANDERSEN, R.J., LUU, H.A., CHEN, D.Z.X., HOLMES, C.F.B., KENT, M.L., LeBLANC, M., TAYLOR, F.J.R., WILLIAMS, D.E., Chemical and Biological Evidence Links Microcystins to Salmon 'Netpen Liver Disease'. **Toxicol**, 31, 1315-1323, 1993.
- ANDRADE, R.L.B., WAGNER, R.L., MAHL I., MARTINS, R.S., Custos de Produção de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) em Um Modelo de Propriedade da Região Oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, 35, (1), 198-203, 2005.
- ARAGÃO, W., Gazeta do Povo- Matérias.
Acesso: <<http://tudoparana.globo.com/gazetadopovo/arquivo>> Acesso em 21/04/2002.

ARANDA-RODRIGUEZ, R., KUBWABO, C., BENOIT, F.M., Extraction of 15 Microcystins and Nodularin Using Immunoaffinity Columns. **Toxicon**, 42, (6), 587–599, 2003.

AVRAMEAS, S., URIEL, J., Methode de Marquage D'Antigenes et D'Anticorps Avec Des Enzymes et Son Application en Immunodiffusion. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 262, 2543-2545, 1966.

AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E., Induction of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in European Minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an Assessment of The Fish Micronucleus Test. **Mutation Research**, 467, 177-186, 2000.

BAILEY, G.S., HENDRICKS, J.E., NIXON, N.E., The Sensitivity of Rainbow Trout and Other Fish to Carcinogens. **Drug Metabolism Reviews**, 15, 415-419, 1984.

BALDISSERA, M.A., SANTURIO, J.M., CANTO, S.H., PRANKE, P.H., ALMEIDA, C.A.A., SCHIMIDT, C., Aflatoxinas, Ocratoxina e Zearalenona em Alimentos para Consumo Animal no Sul do Brasil – Parte II. Ver. **Instituto Adolfo Lutz**, 53, (1 e 2), 5-10, 1993.

BARBRAND, A., FAAGENG, A., KALLQUIST, T., NILSSEN, J.P., Biological Control of Undesirable Cyanobacteria in Culturally Eutrophic Lakes. **Oecologia**, 60, (1-5), 1983.

BARNET, Y.M., DAFT, M.J., STWART, W.D., Cyanobacterial-Cyanophage Interactions in Continuous Culture. **Journal Applied Bacteriology**, 51, 541-552, 1981.

BEATTIE, K.A., RESSLER, J., WIEGAND, C., KRAUSE, E., STEINBERG, C. E., PFLUGMACHER, S., Comparative Effects and Metabolism of Two MCYSTs and Nodularin in the Brine Shrimp *Artemia salina*. **Aquatic toxicology**, 62, 219-226, 2003.

BELPAEME, K., DELBEKE, L., ZHU, L., KIRSCH-VOLDERS, M., Cytogenetic Studies of PCB77 on Brown Trout (*Salmo trutta fario*) Using the Micronucleus Test and the Alkaline Comet Assay. **Mutagenesis**, 11, 485-492, 1996.

BERTOLETTI, E., Ensaio Biológicos com Organismos Aquáticos e Sua Aplicação no Controle da Poluição. **CETESB**. São Paulo, 1990.

BEST, J.H., EDDY, F.B., CODD, G.A., Effects of *Microcystis* Cells, Cell Extracts and Lipopolysaccharide on Drinking and Liver Function in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic toxicology**, 64, 419-426, 2003.

BEST, J.H., EDDY, F.B., CODD, G.A., Effects of *Microcystis* Cells, Cell Extract and Lipopolysaccharide on Drinking and Liver Function in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic Toxicology**, 64, 419-426, 2003.

BEST, J.H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F.B., METCALF, J.S., CODD, G.A., Effects of Enteric Bacterial and Cyanobacterial Lipopolysaccharides, and of Microcystin-LR, on Glutathione S Transferase Activities in Zebra Fish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, 60, 223-231. 2002.

BEVERIDGE, M.C.M., BAIRD, D.J., RAHMATULLAH, S.M., LAWTON, L.A., BEATTIE, K.A., CODD, G.A., Grazing Rates on Toxic and Non-Toxic Strains of Cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, 43, 901-907, 1993.

BICHKHAM, J.W., SANDHU, S., HEBERT, P.D.N., CHIKHI, L., ATWHWAL, R., Effects of Chemical Contaminants on Genetic Diversity in Natural Populations: Implications for Biomonitoring and Ecotoxicology. **Mutation Research**, 463, 33-51, 2000.

BOTES, D.P., KRUGER, H., VILJOIN, C.C., Isolation and Characterization of Four Toxins from the Blue-green Algae, *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, 20, 945-954, 1982.

BOUAICHA, N., MAATOUK, I., VINCENT, G., LEVI, Y., A Colorimetric and Fluorometric Microplate Assay for the Detection of Microcystin-LR in Drinking Water Without Preconcentration. **Food Chem. Toxicol**, 40, 1677-1683, 2002.

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**, 40, (6), 1294-1302, 2006.

BOURNE, D.G., JONES, G.J., BLAKELEY, R.L., JONES, A., NEGRI, A.P., RIDDLES, P., Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. **Applied Environmental Microbiology**, 62, 4086-4094, 1996.

BOURNE, D.G., RIDDLES, P., JONES, G.J., SMITH, W., BLAKELEY, R.L. Characterization of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR. **Environmental Toxicology**, 16, 523-534, 2001.

BRASIL. Portaria MAARA No. 183 de 21 de março de 1996. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 25 mar 1996. Seção I. 4929.

BRASIL. Portaria MAARA No. 183 de 21 de março de 1996. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 25 mar 1996. Seção I. 4929. 1996.

BURY, N.R., CODD, G.A., WEDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G., Fatty Acids from Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with Potent Inhibitory Effects on Fish Gill Na^+/K^+ -ATPase Activity. **The Journal of Experimental Biology**, 201, 81-89, 1998.

BURY, N.R., FLIK, G., EDDY, F.B., CODD, G.A., The Effects of Cyanobacteria and the Cyanobacterial Toxin Microcystin –LR on Ca^{2+} Transport and Na^+/K^+ -ATPase in Tilapia Gills. **The Journal of Experimental Biology**, 199, 1319-1326, 1996.

CAMPAS, M., SYDŁOWSKA, D., TROJANOWICZ, M., MARTY, J-L., Enzyme Inhibition-Based Biosensor for the Electrochemical Detection of Microcystins in Natural Blooms of Cyanobacteria. **Talanta**, 72, 179–186, 2007.

CARBIS, C.R., MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W., McCAULEY, The Effects of Microcystins on the Serum Biochemistry of Carp, *Cyprinus carpio* L., When Toxins Are Administered by Gavage, Immersion and Intraperitoneal Routes. **Journal of Fish Disease**, 19, 151-159, 1996.

CARBIS, C.R., RAWLIN, G.T., GRANT, P., MITCHELL, G.F., ANDERSON, J.W., MacCAULEY, A Study of Feral Carp *Cyprinus carpio* L., Exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and Possible Implication on Fish Health, H. **Journal Fish Disease**, 20, 81-91, 1997.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINHEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K., Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, 109, 663-668, 2001.

CARMICHEL, W.W., Cyanobacteria Secondary Metabolites – the Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, 72, 445-459, 1992.

CARNEIRO, P.C.F. Estudo de Caso de Criação Comercial de Tilápia Vermelha em Tanques-Rede – Avaliação Econômica. **Inf. Econ.**, 29, (3), 52-61, 1999.

CHEN, W., LI, L., GAN, N., SONG, L., Optimization of an Effective Extraction Procedure For the Analysis of Microcystins in Soils and Lake Sediments. **Environ. Pollut**, 143, (2), 241–246, 2006.

Chen, W., Song, L., Gan, N., Li, L., Sorption, Degradation and Mobility of Microcystins in Chinese Agriculture Soils: Risk Assessment for Groundwater Protection. **Environmental Pollution**, 144, 752-758, 2006.

CHOI, H-J., KIM, B-H., KIM, J-D., HAN, M-S., *Streptomyces neyagawaensis* as a Control for the Harzardous Biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in Eutrophic Freshwaters. **Biological Control**, 33, 335-343, 2005.

CHOW, C.W.K., HOUSE, J., VELZEBOER, R.M.A., DRIKAS, M., BURCH, M.D., STEFFENSEN, D.A. The Effect of Ferric Chloride Flocculation on Cyanobacterial Cells. **Water Research**, 32, (3), 808-814, 1998.

CODD, G.A., BELL, S.G., The Occurrence and Fate of Blue-Green Algal Toxins in Freshwaters, **National Rivers Authority, R&D Report 29**, Her Majesty's Stationary Office, London, 26, 1996.

COLE, G.T., WYNNE, M.J., Endocytosis of *Microcystis aeruginosa* by *Ochromonas danica*. *Journal of Phycology*, 10, 397-410, 1974.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio ambiente, RESOLUÇÃO CONAMA N° 20, de 18 de junho de 1986/ D.O.U. de 30/7 /86, **CONAMA**. Acesso: <<http://www.agricultura.gov.br/dpa/decreto/resolucao020.htm> > em 30 de março de 2002.

COONS, A.H., CREECH, H.J., JONES, R.N., Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. **Proc. Sot. Exp. Biol. Med**, 47, 200-202, 1941.

COULOMB JR, R.A, Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, 76, 880-891, 1993.

DABHOLKAR, A.S., CARMICHAEL, W.W., Ultra-Structural Changes in the Mouse Liver Induced by Hepatotoxin from Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Strain 7820. **Toxicon**, 25, 285-292, 1987.

- DAHLMANN, J., BUDAKOWSKI, W.R., LUCKAS, B., Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry Based Method For the Simultaneous Determination of Algal and Cyanobacterial Toxins in Phytoplankton from Marine Waters and Lakes Followed by Tentative Structural Elucidation of Microcystins. **J. Chromatogr. A** 994, 45–57, 2003.
- DAKHAMA, A., NOUE, J.L, LAVOIE, M.C. Isolation and Identification of Antialgal Substances Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, 5, 297-306, 1993.
- DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., MCCARROLL, N.E., MAUER, I., VALCOVIC, L.R. Genotoxicity Risk Assessment: a Proposed Classification Strategy. **Mutation Research**, 521, 121- 135, 2002.
- DELL' AVERSANO, C., EAGLESHAM, G.K., QUILLIAM, M.A., Analysis of Cyanobacterial Toxins by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy. **J. Chromatogr.** 1028, 155–164, 2004.
- DING, W-X., SHEN, H-M., ONG, C-N., Critical Role of Reactive Oxygen Species Formation in Microcystin-Induced Cytoskeleton Disruption in Primary Cultured Hepatocytes. **Journal of Toxicology Environmental Health, Part A** 64, 507-519, 2001.
- DING, W-X., SHEN, H-M., ZHU, H-G., LEE, B-L., ONG, C-N., Genotoxicity of Microcystic Cyanobacteria Extract of a Water Source in China. **Mutation Research**, 442, 69-77, 1999.
- DING, W-X., SHEN, H-M., ZHU, H-G., ONG, C-N., Studies on Oxidative Damage Induced by Cyanobacteria Extract in Primary Cultured Rat Hepatocytes. **Environmental Research**, 78, 12-18, 1998.
- DITTMANN, E., NEILAN, B., ERHARD, M., VON DÖHREN, H., BÖRNER, T., Insertional Mutagenesis of a Peptide Synthetase Gene Which is Responsible for Hepatotoxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. **Mol. Microbiol**, 26, 779-787, 1997.
- EATON, D.L., GALLAGHER, E.P., Mechanism of Aflatoxin Carcinogenesis. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, 34, 135-172, 1994.
- EDWARDS, C., LAWTON, L.A., BEATTIE, K.A., PLEASANCE, S., CODD, G.A., Analysis of Microcystins from Cyanobacteria by Liquid Chromatography With Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Ionization. **Rapid Commun. Mass Sp.**, 7, 714–721, 1993.

ELER, M.N., CECCARELLI, P.S., BUFON, A.G.M., ESPÍNDOLA, E.L.G., Mortandade de Peixes (Matrinxã, *Brycon cephalus*, e Pacu, *Piaractus mesopotamicus*) Associada a uma Floração de Cianobactérias em Pesque-Pague, Município de Descalvado, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga**, 14, 35-45, 2001.

EPPLEY, R.M., Screening method for Zearalenone, Aflatoxin and Ochratoxin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 51, (1), 74-78, 1968.

FALCONER, I.R., An Overview of Problems Caused by Toxic Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Drinking Water and Recreational Water. **Environmental Toxicology**, 1, (14), 5-12, 1999.

FALCONER, I.R., HUMPAGE, A.R., Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Drinking Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2, (1), 43–50, 2005.

FALCONER, I.R., Measurement of Toxins from Blue-Green Algae in Water and Foodstuffs. In: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. **Academic Press, London**, 165– 175, 1993.

FASTNER, J., ERHARD, M., DOHREN, H., Determination of Oligopeptide Diversity Within a Natural Population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrixassistedlaser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67, (11), 5069–5076, 2001.

FASTNER, J., FLIEGER, I., NEUMANN, U., Optimized Extraction of Microcystins from Field Samples a Comparison of Different Solvents and Procedures. **Water Res.** 32, (10), 3177–3181, 1998.

FAULK, W.P., TAYLOR, G.M., An Immunocolloid Method for the Electron Microscope . **Immunochemistry**, 8 ,1081, 1971.

FERREIRA, H., PITTNER, E., SANCHES, H.F., MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: Um Risco A Saúde Humana e Animal. *Ambiência*. **Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, 2, (1), 2006.

FISCHER, W.J., DIETRICH, D.R., Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, 167, 73-81, 2000.

FUENTES, J., EDDY, F.B., Cardiovascular Responses in Vivo to Angiotensin II and the Peptide Antagonist Saralasin in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal Experimental Biology**. 201, 267-272, 1998.

FUJII, K., IKAI, Y., MAYUMI, T., OKA, H., SUZUKI, M., HARADA, K-I., A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Elucidation of Limitations of Marfey's Method and of Its Separation Mechanism. **Analytical Chemistry**, 69, (16), 3346-3352, 1997.

FUJII, K., IKAI, Y., OKA, H., SUZUKI, M., HARADA, K-I., A Nonempirical Method Using LC/MS for Determination of the Absolute Configuration of Constituent Amino Acids in a Peptide: Combination of Marfey's Method With Mass Spectrometry and its Practical Application. **Analytical Chemistry**, 69, (24), 5146-5151, 1997.

FUJIKI, H., SUEOKA, E., SUGANUMA, M., Carcinogenesis of Microcystins. In: WATANABE, M.F., HARADA, K., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H. (Eds.): **Toxic Microcystis**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 203-232, 1996.

GAETE, V., CANELO, E., LAGOS, N., ZAMBRANO, F., Inhibitory Effects of *Microcystis aeruginosa* Toxin on Ion Pumps of the Gill of Freshwater Fish. **Toxicon**, 32, 121-127, 1994.

GAVES, P.R., HAYSTEAD, T.A.J., Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 66, (1), 39-63, 2002.

GAVES, P.R., HAYSTEAD, T.A.J., Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 66, (1), 39-63, 2002.

GEHR, R., SWATZ, C., OFFRINGAM O., Removal of Trihalomethane Precursors from Eutrophic Water by Dissolved Air Flotation. **Water Research**, 27, (1), 41-49, 1993.

GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE, A.J., SCHMIDT W., CHORUS I., HEIJMAN, S.G.J., Removal of Cyanotoxins by Ultrafiltration and Nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, (1-2), 252-259, 2005.

- GIMENO, E.J., MASSONE, A.R., PORTIANSKY, E.L., Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica y Aplicaciones en Patología Veterinaria. Octavo Curso Internacional de PosGrado em Técnicas e Inmunohistoquímica, lectinohistoquímica y Microscopia Eletronica. **La Plata**, 45-77, 1997.
- GOLDBERG, J., HUANG, H., KWON, Y., GREENGARD, P., NAIRN, A.C., KURIYAN, J., Three Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Proteinserine/Threonine Phosphatase-1. **Nature**, 376, 745–753, 1995.
- GOURAMA, H., BULLERMAN, L.B., *Aspergillus flavus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Food and Feed. **Journal of Food Protection**, 58, 1395-1404, 1995.
- GOWEN, R J., Managing Eutrophication Associated With Aquaculture Development. **Journal of Applied Ichthyology**, 10, 245-257, 1994.
- GRISOLIA, C.K., STARLING, F.L.R.M. Micronuclei Monitoring of Fishes from Lake Paranoá, under Influence of Sawage Treatment Plant Discharges. **Mutation Research**, 491, 39-44, 2001.
- GRUTZMACHER, G., BO TTCHER, G., CHORUS, I., BARTEL, H., Removal of Microcystins by Slow Sand Filtration. *Environ. Toxicol.*, 17, (4), 386–394, 2002.
- HAIDER, S., NAITHANI, V., VISWANATHAN, P.N., KAKKAR, P., Cyanobacterial Toxins: a Growing Environmental Concern. **Chemosphere**, 52, 1-21, 2003.
- HALVER, J.E., Aflatoxicosis and Trout Hepatoma. In Goldblatt, Ia. (Ed). Aflatoxin Scientific Background, Control, and Implications. **Academic Press**, New York., 265-306, 1969.
- HARADA, K., MURATA, H., QIANG, Z., SUZUKI, M., KONDO, F., Mass Spectrometric Screening Method for Microcystins in Cyanobacteria. **Toxicon**, 34, (6), 701-710, 1996.
- HARADA, K.I., KONDO, F., LAWTON, L., Laboratory Analysis of Cyanotoxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water. **E&FN Spon, London**, 369–405, 1999.
- HARADA, K-I., IMANISHI, S., KATO, H., MIZUNO, M., ITO, E., TSUJI, K., Isolation of Adda from Microcystin-LR by Microbial Degradation. **Toxicon**, 44, 107-109, 2004.

HARADA, K-I., MATSUURA, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., OISHI, S., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R., CARMICHAEL, W.W., Isolation and Characterization of the Minor Components Associated with Microcystin LR and RR in the Cyanobacterium (Blue-green Algae). **Toxicon**, 28, 55-64, 1990.

HARADA, K-I., OGAWA, K., MATSUURA, K., MURATA, H., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., ITEZONO, Y., AND NAKAYAMA, N., Isolation of Two Toxic Heptapeptide Microcystins from an Axenic Strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. **Toxicon**, 29, 479-489, 1991.

HARADA, K-I., TSUJI, K., Persistence and Decomposition of Hepatotoxic Microcystins Produced by Cyanobacteria in Natural Environment. **J. Toxicol. Toxin Ver**, 17, (3), 385-403, 1998.

HASHIMOTO, E H. Interação Microcistina-Fumonisina-Aflatoxina e o Impacto na Piscicultura. Londrina –2002. Tese de Mestrado. Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos. **Universidade Estadual de Londrina**. 2002.

HASHIMOTO, E.H., SANTOS, M.A., ONO, E.Y.S., BRACARENSE, A.P.F.R.L., HIROOKA, E.Y., Bromatology and Fumonisin/Aflatoxin Contamination in Aquaculture Feed of the Region of Londrina, State of Parana, Brazil. **Semina**. 24 (1), 123-132, 2003.

HEDDLE, J. A., HITE, M., JRKHART, B., MACGREGOR, J. T., SALAMONE, M. F. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research**, 123, 61-118, 1983.

HENDRICKS, J.D., Chemical Carcinogenesis in Fish. In Aquatic Toxicology. Ed. Weber, L.J. **Raven Press**. New York, 149-211,1982.

HEWETT, J.A., ROTH, R.A., Hepatic and Extra-Hepatic Pathobiology of Bacterial Lipopolysaccharides. **Pharmacology**, 45, 381-411,1993.

HIBAYASHI, R., IMAMURA, N., Action Mechanism of a Selective Anti-Cyanobacterial Compound, Argimicin A. **The Journal of Antibiotics**, 56, (2), 154-159, 2003.

HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S., UENO, Y. The Natural Occurrence of Fumonisin in Brazilian Corn Kernels. **Food Additives and Contaminants**, New York ,13, 173-183, 1996.

HITZFELD, B., FISCHER, W., EROKSSON, J., MIKHAILOV, A., DIETRICH, D.,
Immunochemical Localization of Microcistina-LR Associated Pathological Changes in Rainbow
Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Abstracts. **Harmful algal blooms**, Ninth Conference Tasmania,
2000.

HOEGER, S.J., HITZFELD, B.C., DIETRICH, D.R., Occurrence and Elimination of
Cyanobacterial Toxins in Drinking Water Treatment Plants. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 203,
231–242, 2005.

HOOSER S.B., BEASLEY V.R., BASGALL, E.J., CARMICHAEL, W.W., HASCHEK W.M.,
Microcystin-LR- Induced Ultra-Structural Changes in Rats. **Veterinary Pathology**, 27, 9-15,
1990.

HOOSER, S.B, BEASLEY, V.R., WAITE, L.L., KUKLENSCHMIDT, M.S., CARMICHAEL,
W. W., HASCHEK, W. M., Actin Filament Alterations in Rat Hepatocytes Induced *in vivo* and *in*
vitro by Microcystin-LR, a Hepatotoxin from the Blue-Green Algae *Microcystis aeruginosa*.
Veterinary Pathology, 28, 259-266, 1991.

HOUK, V.S., The Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents: A Review. **Mutation
Research**, 277, 91-138, 1992.

HUNTER, S A., BURSTEIN, S., SEDOR, C., Stimulation of Prostaglandin Synthesis in WI-38
Human Lung Fibroblasts Following Inhibition of Phospholipid Acylation by p-hydroxy
Mercurebenzoate. **Biochemistry Biophysics Acta**, 793, 202, 1984.

IARC., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human: Some Naturally
Occuring Substances. In: Food Items and Constituents Heterocyclic Aromatic Amines and
Mycotoxins. 56. **IARC, Lyon, France**, 245-395, 1993.

IMAMURA, N., MOTOIKE, I., NODA, M., ADACHI, K., KONNO, A., FUKAMI, H.,
Argimicin A, a Novel Anti-Cyanobacterial Coumpound Produced by an Algal-Lysing Bacterium.
The Journal of antibiotics, 53, (11), 1317-1319, 2000.

IMANISHI, S., KATO, H., MIZUNO, M., TSUJI, K., HARADA, K.-I., Bacterial Degradation of
Microcystins and Nodularin. *Chem.Res.* **Toxicol**, 18, (3), 591–598, 2005.

INAMORI, Y., SUGIURA, N., IWAMI, N., MATSUMURA, M., HIROKI, M., WATANABE, M.M., Degradation of the toxic Cyanobacterium *Microcystis viridis* Using Predaceous Micro-Animals Combined with Bacteria. **Phycological Research**, 46, 37-44, 1998.

ISHII, H., NISHIJIMA, M., ABE, T., Characterization of Degradation Process of Cyanobacterial Hepatotoxins by a Gram-Negative Aerobic Bacterium. **Water Research**, 38 (11), 2667–2676, 2004.

ITO, E., KONDO, F., TERAOKA, K., HARADA, K-I., Neoplastic Nodular Formation in Mouse Liver Induced by Repeated Intraperitoneal Injections of Microcystin-LR. **Toxicol**, 35, (9), 1453-1457, 1997.

JANTRAROTAI W., LOVELL, R.T., Subchronic Toxicity of Dietary Aflatoxin B1 to Channel Catfish. **J. Aquatic Animal Health**, 2, 248-254, 1990.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, 338 (13), 873-878, 1998.

JONES, G.J., BOURNE, D., BLAKELEY, R.L., DOELLE, H., Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by Aquatic Bacteria. **Natural Toxins**, 2, 228–235, 1994.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N.; Chronic Inflammation of the Intestine May Render the Mucosa Permeable to Antigen Present in the Lumen. In: Pathology of Domestic Animals. **Academic Press**, Fl., 39,1985.

KAMOGAE, M., HASHIMOTO, E.H., PÁDUA, C.G., SOARES, F.S., BRACARENSE, A.P.F.L., YABE, M.J.S., ONO, E.Y.S., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., SANT'ANA, C.L., TSUTSUMI, T., NAGATA, S., UENO, Y., HARADA, K-I., HIROOKA, E.Y., Monitoring Microcystin and Physicochemical Parameters: Role of Agricultural-Aquaculture Activity in the Water Quality. In: Mycotoxins and Phycotoxins – Advances in Determination, Toxicology and Exposure Management. Eds. Njapau, H., Trujillo, S., Van Egmond, H.P., Park, D.L., **Wageningen Academic Publishers**, 321-331, 2006.

KAMOGAE, M., Monitoramento de Microcistinas e Estudo de Parâmetros que Favorecem o Seu Desenvolvimento nas Rrepresas de Itaipu, Capivara e Três Bocas. Dissertação de Doutorado Apresentado ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos-CCA-TAM, **Universidade Estadual de Londrina- Londrina-PR**,111, 2002.

KATO, H., IMANISHI, S., TSUJI, K., HARADA, K-I. Microbial Degradation of Cyanobacteria Cyclic Peptides. **Water Research**, 41 (8), 1754-1762, 2007.

KAUR, K., BATT, T.R, HEALTHCOTE, G.R, KEAY, G., LEADBEATER, B.S.C., Treatment of Algal-Laden Water: Pilot Plant Experiences. **Journal IWEM**, 8, 22-32, 1994.

KAWAMURA, O., LIM, J., UENO, Y., Analysis of Aflatoxin B1-Human Serum Albumin Adducts by a Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Mycotoxins**, 43, 43-46, 1996.

KAYA, K., SANO, T., Total Microcystin Determination Using Erythro-2- Methyl-3- (Methoxy-3)-4-Phenylbutyric Acid (MMPB-(3)) as the Internal Standard. **Anal. Chim. Acta**, 386, 107–112, 1999.

KE, Z., XIE, P., GUO, L., LIU, Y., YANG, H., *In situ* Study on the Control of Toxic *Microcystis* Blooms Using Phytoplanktivorous Fish in the Subtropical Lake. Taihu of China: A large Fish Pen Experiment. **Aquaculture**, 265, 127-138, 2007.

KESHAVANATH, P., BEVERIDGE, C.M., BAIRD, D.J., LAWTON, L.A., NIMMO, A., CODD, A., The Functional Grazing Response of a Phytoplanktivorous Fish *Oreochormis niloticus* to Mixtures of Toxic and Non-Toxic Strains of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Fish Biology**, 45, 123-129, 1994.

KODANI, S., IMOTO, A., MITSUTANI, A., MURAKAMI, M., Isolation and Identification of the Antialgal Compound, Harmane (1-Methyl- β -Carbonile), Produced by the Algicidal Bacterium, *Pseudomonas* sp. K44-1. **Journal of Applied Phycology**, 14, 109-114, 2002.

KONDO, F., IKAI, Y., OKA, H., OKAMURA, M., ISHIKAWA, N., HARADA, K-I., MATSUURA, K., MURATA, H., SUZUKI, M., Formation, Characterization and Toxicity of the Gluthatione and Cystine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins. **Chemical Research Toxicology**, 5, 591-596, 1992.

KONDO, F., ITO, Y., OKA, H., YAMADA, S., TSUJI, K., IMOKAWA, M., NIIMI, Y., HARADA, K., UENO, Y., MIYAZAKI, Y., Determination of Microcystins in Lake Water Using Reusable Immunoaffinity Column. **Toxicon**, 40, 893–899, 2002.

LANKOFF, A., KRZOWSKI, L., GLAB, J., BANASIK, A., LISOWSKA, H., KUSZEWSKI, T., GOZDZ, S., WOJCIK, A., DNA Damage and Repair in Human Peripheral Blood Lymphocytes Following Treatment with Microcystin-LR, *Mutation Research*, 559, 131-142, 2004.

LAWTON, L.A., BEATTIE, K.A., HAWSER, S.P., CAMPBELL, D.L., CODD, G.A., Evaluation of Assay Methods for the Determination of Cyanobacterial Hepatotoxicity. In: Codd, G.A., Jeffries T.M., Keevil, C.W., Potter, E. (Eds.), Special Publication - Detect Methods Cyanobacterial Toxins, vol. 149. **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 111–116, 1994.

LAWTON, L.A., EDWARDS, C., Purification of Microcystins - **Review. J. Chromatogr. A**, 912, 191–209, 2001.

LAYBOURN-PARRY, J., JONES, K., HOLDICH, J.P. Grazing by *Mayorella* sp (Protozoa: Sarcodina) on Cyanobacteria. **Functional Ecology**, 1, 99-104, 1987.

LeCLAIRE, R.D., PARKER, G.W., FRANZ, D.R., Hemodynamic and Colorimetric Changes Induced by Microcystin -LR in the Rat. **Journal Applied Toxicology**, 15, 4, 303-311, 1995.

LEE, R. F., STEINERT, S., Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (Marine and Freshwater) Animals. **Mutation Research**, 544, 43-64, 2003.

LEMES, G.A.F., KERNSANACH, R., PINTO, L.S., DELLAGOSTIN, O.A., YUNES, J.S., MATTHIENSEN, A., Biodegradation of Microcystin by Aquatic *Burkholderia* sp. From a South Brazilian Coastal Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi:10.1016/j.ecoenv.2007.03.013, 2007.

LI, L., XIE, P., CHEN, J., Biochemical and Ultrastructural Changes of the Liver and Kidney of the Phytoplanktivorous Silver Carp Feeding Naturally on Toxic *Microcystis* Blooms in Taihu Lake, China. **Toxicol**, 49, 1042-1053, 2007.

LI, X., LIU, Y., SONG, L., LIU, J., Response of Antioxidant Systems in the Hepatocytes of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) to the Toxicity of Microcystin-LR. **Toxicol**, 42, 85-89, 2003.

LI, X-Y., CHUNG, I-K., KIM, J-I., LEE, J-A., Subchronic Oral Toxicity of Microcystin in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Exposed to *Microcystis* Under Laboratory Conditions. **Toxicol**, 44, 821-827, 2004.

LOTLIKAR, P.D., Metabolic Basis Susceptibility and Resistance to Aflatoxin B₁ Hepatocarcinogenesis in Rodents. **J. Toxicol. Toxin Ver.**, 9, 97-109, 1989.

LOVELL, D. P., THOMAS, G., DUBOW, R., Issues Related to the Experimental Design and Subsequent Statistical Analysis of In Vivo and In Vitro Comet Studies. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 19, 109-119, 1999.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K.A., KLUMPP, S., COHEN, P., COOD, G.A., Cyanobacterial Microcystin LR is a Potent and Specific Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A. **Febs Letters**, 264, 187-192, 1990.

MACKINTOSH, R.W., DALBY, K.N., CAMPBELL, D.G., COHEN, P.T.W., COHEN, P., MACKINTOSH, C., The Cyanobacterial Toxin Microcystin Binds Covalently to Cysteine-273 on Protein Phosphatase 1. **FEBS Lett.**, 371, 236– 240, 1995.

MADHUSUDHANAN, N., KAVITHALAKSHMI, S.N., SHANMUGASUNDARAM, K.R., SHANMUGASUNDARAM, E.R.B., Oxidative Damage to Lipids and Proteins Induced by Aflatoxin B₁ in Fish (*Labeo rohita*) – Protective Role of Amrita Bindu. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 17, 73-77, 2004.

MAGALHÃES, V.F., MARINHO, M.M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA, A.C., COSTA, S.M., AZEVEDO, L.O., AZEVEDO, S.M.F.O., Microcystins (Cyanobacteria hepatotoxins) Bioaccumulation in Fish and Crustaceans from Sepetiba bay (Brazil, RJ). **Toxicon**, 42, 289-295, 2003.

MAGALHÃES, V.F., SOARES, R.M., AZEVEDO, S.M.F.O., Mycrocystin Contamination in Fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brasil): Ecological Implication and Human Health Risk. **Toxicon**, 39, 7, 1077-85, 2001.

MALORNY, U., BILDAU, H., SORG, C., Efficient Inhibition of Endogenous Peroxidase without Antigen Denaturation in Immunohistochemistry. **J. Immunol Methods**, 111, (1), 101-107, 1988.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Pesca e Aqüicultura - DPA. Acesso: <<http://www.agricultura.gov.br/dpa>> Em 10 de outubro de 2002.

MARFEY, P., Determination of D-amino Acids, II. Use of a Bifunctional Reagent, 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzene. **Carlsberg Res. Commun**, 49, 591-596,1984.

MARUYAMA, T., KATO, K., YOKOYAMA, A., TANAKA, T., HIRAISHI, A., PARK, H.D., Dynamicis of Microcystin-Degrading Bacteria in Mucilage of *Microcystis*. **Microbial Ecology**, 46, (2), 279-288, 2003.

MARUYAMA, T., PARK, H.D., OZAWA, K., TANAKA, Y., SUMINO, T., HAMANA, K., HIRAISHI, A., KATO, K., *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a Microcystin-Degrading Bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 56, (1), 85–89, 2006.

MASON, D.Y. Immunoenzymatic Labelling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP Complexes). **J. Histochem. Cytochem.**, 32, (2), 219-229, 1984.

Matsumoto, F.E. and Cólus, I.M.S., Micronucleus frequencies in *Astynax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (2), 489-492. 2000.

MATSUMOTO, F.E., CÓLLUS, I.M.S., Micronucleus Frequencies in *Astynax bimaculatus* (Characidae) Treated with Cyclophosphamide or Vinblastine Sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, 23, (2), 489- 492, 2000.

MATSUZAKI, M., MUCCI, J.L.N., SANT'ANNA, C.L., Comunidade Fitoplanctônica de um Pesqueiro no Município de São Paulo: Aspectos Ecológicos e Sanitários. IX Reunião Brasileira de Ficologia. Algas – Biodiversidade e Exploração Racional. **Sociedade Brasileira de Ficologia**.p.159. Fundação Ecosistemas do Espírito Santo, Santa Cruz, Aracruz, ES. 02-06/03/2002.

McELHINEY, J., DREVER, M., LAWTON, L.A., PORTER, A.J., Rapid Isolation of a Single Chain Antibody Against the Cyanobacterial Toxin Microcystin- LR Using Phage Display, and Its Use in the Immunoaffinity Concentration of Microcystins from Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 5288– 5295, 2002.

McELHINEY, J., LAWTON, L.A., Detection of the Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 203, (3), 219–230, 2005.

McELHINEY, J., LAWTON, L.A., PORTER, A.J.R., Detection and Quantification of Microcystins (Cyanobacterial Hepatotoxins) with Recombinant Antibody Fragments Isolated from a Naive Human Phage Display Library. **FEMS Microbiol. Lett.**, 193, 83– 88, 2000.

MERILUOTO, J., GUEIMONDE, M., HASKARD, C.A., SPOOF, L., SJÖVALL, O., SALMINEN, S., Removal of the Cyanobacterial, Toxin Microcystin-LR by Human Probiotics. **Toxicon**, xx, (1-4), 2005.

MERILUOTO, J.A.O., Chromatography of Microcystins. **Anal.Chim. Acta**, 352, 277–298, 1997.

MERILUOTO, J.A.O., ERIKSSON, J.E., Rapid Analysis of Peptide Toxins in Cyanobacteria. **J. Chromatogr**, 438, 93–99, 1988.

MERSCH, J., BEAUVAIS, M-N., The Micronucleus Assay in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, to in Situ Monitor Genotoxicity in Freshwater Environments. **Mutation Research**, 383, 141-149, 1997.

METCALF, J.S., BELL, S.G., CODD, G.A., Production of Novel Polyclonal Antibodies Against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR and Their Application for the Detection and Quantification of Microcystins and Nodularin. **Water Res**, 34, 2761–2769, 2000.

METCALF, J.S., BELL, S.G., CODD, G.A., Production of Novel Polyclonal Antibodies Against the Cyanobacterial Toxin Microcystin- LR and Their Application for the Detection and Quantification of Microcystins and Nodularin. **Water Res**, 34, 2761–2769, 2000.

MINISSI, S., CICCOTTI, E., RIZZONI, M., Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei Pisces) from to Natural Environments: A Bioassay for the *in situ* Detection of Mutagens in Freshwater. **Mutation Research**, 367, 245-251, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 1469 - Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. **Ministério da Saúde**. 29/12/2000.

MIURA, G.A., ROBINSON, N.A., LAWRENCE, W.B., PACE, J.C., Hepatotoxicity of Microcystin-LR in Fed and Fasted Rat. **Toxicon**, 29, 337, 1991.

MOOLLAN, R.W., RAE, B., VERBEEK, A., Some Comments on the Determination of Microcystin Toxins in Waters by High Performance Liquid Chromatography. **Analyst**, 121, 233–238, 1996.

MOUNTFORT, D.O., HOLLAND, P., SPROSEN, J., Method for Detecting Classes of Microcystins by Combination Protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. **Toxicon**, 45(2), 199-206, 2005.

NAGATA, S., SOUTOME, H., TSUTSUMI, T., HASEGAWA, A., SEKIJIMA, M., SUGAMATA, M., HARADA, K.-I., SUGANUMA, M., UENO, Y., Novel Monoclonal Antibodies against Microcystin and Their Protective Activity for Hepatotoxicity. **Nat. Toxins**, 3, 78-86, 1995.

NAKANE, P.K., PIERCE, G.B., Enzyme Labelled Antibodies: Preparation and Application for the Localization of Antigens. **J. Histochem. Cytochem**, 14, 929-931, 1966.

NAKATSURU, Y., QIN, X., MASAHITO, P., ISHIKAWA, T., Immunological Detection of *in vitro* Aflatoxin B₁-DNA Adduct Formation in Rats, Rainbow Trout and Coho Salmon. **Carcinogenesis**, 11, (9), 1523-1526, 1989.

NAMIKOSHI, M., RINEHART, K. L., SAKAI, R., SCOTTS, R.R., DAHLEN, A.M., BEASLEY, V.R., CARMICHAEL, W.W., EVANS, W.R., Identification of 12 Hepatotoxins from Homer Lake Bloom of Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*: nine New Microcystins. **Journal Organic Chemistry**, 57, 866-872, 1992.

NASSEM, S.M., HINES, H.B., CREASIA, D.A., Inhibition of Microcystin-Induced Release of Cyclooxygenase Products from Rat Hepatocytes by Anti-Inflammatory Steroids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 195, 345-399, 1990.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H., Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, 118, 420-424, 1992.

O GLOBO. Análise da Feema Revela: Peixes das Lagoas da Barra estão Contaminados. Tilápias, Vendidas na Ceasa, têm Toxina acima do Recomendado para Consumo. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.

ONO, E.Y.S., HIROOKA, E.Y., Hazards of *Fusarium verticillioides*, a Mycotoxigenic Fungus. In: KUSHWAHA, R.K.S. (Ed.) *Fungi in Human and Animal Health*. **Índia: Scientific Publishers**, 355-385, 2002.

ONO, E.Y.S., KAWAMURA, O., ONO, M.A., UENO, Y., HIROOKA, E.Y., A Comparative Study of Indirect Competitive ELISA and HPLC for Fumonisin Detection in Corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, 12, (1), 5-14, 2000.

ONO, E.Y.S., SASAKI, E.Y., HASHIMOTO, E.H., HARA, L.N., CORRÊA, B., ITANO, E.N., SUGIURA, Y., UENO, Y., HIROOKA, E.Y., Post-Harvest Storage of Corn: Effect of Beginning Moisture Content on Mycoflora and Fumonisin Contamination. **Food Additives and Contaminants**, 19, (11), 1081-1090, 2002.

ONO, E.Y.S., SUGIURA, Y., HOMECHIN, M., KAMOGAE, M., UENO, Y., HIROOKA, E.Y., Effect of Climatic Condition on Natural Mycoflora and Fumonisin in Freshly Harvested Corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, 147, (3), 139-148, 1999.

OTT, J.L., CARMICHAEL, W.W., LC/ESI/MS Method Development for the Analysis of Hepatotoxic Cyclic Peptide Microcystins in Animal Tissues. **Toxicol**, 47, (7), 734-741, 2006.

PADILHA, J.B., Rações: Consumo Deverá Crescer 7% em 2002. **Folha rural, Folha de Londrina**, 29/11/2001.

PALHARES, D., GRISOLIA, C.K., Comparison Between the Micronucleus Frequencies of Kidney and Gill Erythrocyte in Tilapia Fish, Following Mitomycin C Treatment. **Genetic Molecular Biology**, 25, 281-284, 2002.

PANDRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M., Alkaline Single Cell Gel (Comet) Assay and Genotoxicity Monitoring Using Bullheads and Carp. **Environmental Molecular Mutagenesis**, 26, 345-356, 1995.

PARK, H.D., SASAKI, Y., MARUYAMA, T., YANAGISAWA, E., HIRAISHI, A., KATO, K., Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by a New Bacterium Isolated from a Hypertrophic Lake. **Environ. Toxicol**, 16, (4), 337-343, 2001.

PEREZ, S., AGA, D.S., Recent Advances in the Sample Preparation, Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Analysis and Environmental Fate of Microcystins in Water. **TrAC Trends Anal. Chem.**, 24, (7), 658-670, 2005.

PHILIPS, M.J., ROBERTS, R.J., STEWART, J.A., CODD, G.A., The Toxicity of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Rainbow Trout, Saomogairderi Richardson. **Journal Fish Disease**, 8, 339-344, 1985.

PLAKAS S.M., LOVELAND, P.M., BAILEY, G.S., WILSON, G.L. Tissue Disposition and Excretion of C14-Labelled Aflatoxin B1 After Oral Administration in Channel Catfish. **Food Chem. Toxic.**, 29, (12), 805-808, 1991.

RABELLO-GAY, M.N., RODRÍGUEZ, M.A.R., MONTELEONE-NETO, R., Testes com Organismos Superiores. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, **Revista Brasileira de Genética**, 59 e 75, 1991.

RABERGH, C.M.I., BYLUND, G., ERIKSSON, J. E., Histopathological Effects of Microcystin-LR, a Cyclic Peptide Toxin from the Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Microcystis aeruginosa*, on Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, 20, 131-146, 1991.

RAMOS, A.J., HERNÁNDEZ, E., Prevention of Aflatoxicosis in Farm Animals by Means of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate Addition to Feedstuffs: a Review. **Animal Feed Science Technology**, 65, 197-206, 1997.

RAPALA, J., KIRSTI, E., JAANA., SIVONEN, K., LAHTI, K., Detection of Microcystins with Protein Phosphatase Inhibition Assay, High-Performance Liquid Chromatography–UV Detection and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Comparison of Methods. **Anal. Chim. Acta**, 466, (2), 213–231, 2002.

RAPALA, J., LAHTI, K., Methods for Detection of Cyanobacterial Toxins. In: Franca, Palumbo, Giuliano Zigli, Andre' Van der Beken (Eds.), Detection Methods for Algae, Protozoa and Helminthes in Fresh and Drinking Water. **Water Quality Measurement Series. Wiley, New York**, 107–128, 2002.

REDHEAD, K., WRIGHT, S.J. Lysis of the Cyanobacterium *Anabaena flos-acquae* by Antibiotic Producing Fungi. **Journal of Microbiology**, 119, 95-101, 1980.

REIM, R.L., SHANE, M.S., CANNON, R.E., The Characterization of a *Bacillus* Capable of Blue-Green Bactericidal Activity. **Canadian Journal of Microbiology**, 20, 981-986, 1974.

Repavich, W.M., Sonzogni, W.C., Standridge, J.H., Wedepohl, R.E., Meisner, L.F., 1990. Cyanobacterial (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. **Water Research**. 24, 225-231.

REPAVICH, W.M., SONZOGONI, W.C., STANDRIDGE, J.H., WEDEPOHL, R.E., MEISNER, L.F., CYANOBACTERIAL (Blue-Green Algae) in Wiscosin Waters: Acute and Chronic Toxicity. **Water Research**, 24, 225-231, 1990.

REYNOLDS, C.S., JAWORSKI, G.H.M., CMIECH, H.A., LEEDALE, G.F., On the Annual Cycle of the Blue-Green Algae *Microcystis aeruginosa* Kütz Elekin. Proceedings and Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **Biological Sciences**, 293, 1068, 419-477, 1981.

RINEHART, K.L., NAMIKOSHI, M., CHOI, B.W., Structure and Biosynthesis of Toxins from Blue-Green Algae (Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, 6, 159-176, 1994.

RIVASSEAU, C., RACAUD, P., DEGUIN, A., HENNION, M.-C., Development of a Bioanalytical Phosphatase Inhibition Test for the Monitoring of Microcystins in Environmental Water Samples. **Anal. Chim. Acta**, 394, 243– 257, 1999.

RODGER, H.D., TURNBULL, T., EDWARDS, C., CODD, G.A., Cyanobacterial Bloom Associated Pathology in Brown Trout *Salmo trutta* L. **Journal Fish Disease**, 17, 117-181, 1994.

RODRIGUEZ, E., ONSTAD, G.D., KULL, T.P.J., METCALF., J.S. Acero, J.L., Gunten., U.V. Oxidative Elimination of Cyanotoxins: Comparison of Ozone, Chlorine, Chlorine Dioxide and Permanganate, *Water Research*, doi:10.1016/j.watres.2007.03.033, 2007.

RUNNEGAR, M.T.C., GERDES, R.G., FALCONER, I.R., The Uptake of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by Isolated Rat Hepatocytes. **Toxicon**, 29, 43-51, 1991.

SAFFERMAN, R.S., MORRIS, M., Evaluation of Natural Products for Algicidal Properties. **Applied Microbiology**, 10, 289-292, 1962.

SAITO, K., ISHII, H., NISHIDA, F., SAITO, H., ABE, T., TOYOTA, Y., Purification of Microcystins by DEAE and C18 Cartridge Chromatography. **Toxicon**, 40, (1), 97–101, 2002.

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**, 229, 271-276, 2003.

SAITOU, T., SUGIURA, N., ITAYAMA, T., INAMORI, Y., MATSUMURA, M., Degradation Characteristics of Microcystins by Isolated Bacteria from Lake Kasumigaura. **J. Wat. Supply Res. Technol. Aqua**, 52, (1), 13–18, 2003.

SAKAI, H., OGUMA, K., KATAYAMA, H., OHG, S., Effects of Low or Medium-Pressure UV Irradiation on the Release of Intracellular Microcystin Water Research., doi:10.1016/j.watres.2007.04.031, 2007.

SALLAL, A.K., Lysis of Cyanobacteria with *Flexibacter* spp Isolated from Domestic Sewage. **Microbios**, 77, 57-67, 1994.

SANGOLKAR, L.N., MASKE, S.S., CHAKRABARTI, T., Methods for Determining Microcystins (Peptidehepatotoxins) and Microcystin-Producing Cyanobacteria. **Water Research**, 40, 3485 – 3496, 2006.

SCHIMIDT, W., WILMITZER, H., BORNMANN, K., PIETSC, J., Production of Drinking Water from Raw Water Containing Cyanobacteria-Pilot Plant Studies for Assessing the Risk of Microcystin Breakthrough. **Environmental Toxicology**, 17, 375-385, 2002.

SCUDAMORE, K.A., HETMANSKI, M.T., CHAN, H.K., COLLINS, S., Occurrence of Mycotoxins in Raw Ingredients Used for Animal Feeding Stuffs in the United Kingdom in 1992. **Food Addit Contam**, 14, (2), 157-73, 1997.

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. **Aspectos da Agropecuária Paranaense Piscicultura**. Acesso:<: <http://www.pr.gov.br/seab/aspectos/piscicu.html/>>. Acesso em: 01/09/2003.

SEAP – SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA. Diretoria de Desenvolvimento da Aqüicultura, Aqüicultura no Brasil. Acesso:<http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/aqui/> em 28 de abril de 2007.

SEKIJIMA, M., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, T., HARADA, T., TASHIRO, F., CHEN, G., YU, S-Z., UENO Y., Enhancement of Glutathione S-Transferase Placental-Form Positive Liver Cell Foci Development by Microcistin-LR in Aflatoxin B₁-Initiated Rats. **Carcinogenesis**, 20, (1), 161-165, 1999.

SHEN, H.M., SHI, C.Y., LEE, H.P., ONG, C.N., Aflatoxin B₁-Induced Peroxidation in Rat Liver. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 127, (1), 145-150, 1994.

SIGEE, D.C., GLENN, R., ANDREWS, M.J., BELLINGER, E.G., BUTLER, R.D., EPTON, H.A.S., HENDRY, R.D., Biological Control of Cyanobacteria: Principle and Possibilities. **Hydrobiologia**, 395/396, 161–172. 1999.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L., A Single Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, 175, 184-191, 1988.

SINNHUBER, R.O., WALES, J.H., HENDRICKS, J.D., PUTNAM, G.B., NIXON, J.E. PAWLOWSKI, N.E., Trout Bioassay of Mycotoxins. In Mycotoxins. **In: Human and Animal Health (RODRICKS, J.D., Ed.) Pathotox**, 731-744, 1977.

SIREN, H., JUSSILA, M., LIU, H., PELTONIEMI, S., SIVONEN, K., RIEKKOLA, M.L., Separation, Purity Testing and Identification of Cyanobacterial Hepatotoxins with Capillary Electrophoresis and Electrospray Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 839, 203–215, 1999.

SIVONEN, K., CARMICHAEL, W.W., NAMIKOSHI, M., RINEHART, K., DAHLEM, A .M., NIEMELA, S.I., Isolation and Characterization of Hepatotoxic Microcystin Homologs from the Filamentous Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp Strain 152. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56, 2650-57, 1990.

SIVONEN, K., JONES, G., IN: I. CHORUS, J. BARTRAM (Eds.), Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. **E&FP Spon, London**, 41–112, 1999.

SMITH J.E., MOSS, M.O. (ed)., Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance, **John Wiley & Sons Ltd**, 148, 1985.

SOARES, R.M., MAGALHAES, V.F., AZEVEDO, S.M., Accumulation and Depuration of Microcystins (Cyanobacteria Hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (*Cichlidae*) Under Laboratory Conditions. **Aquat. Toxicol.**, 70, (1), 1-10, 2004.

SPEIT, G., HARTMANN, A., The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A Sensitive Genotoxicity Test for Detection of DNA Damage and Repair. *Methods in Molecular Biology, DNA-Repair Protocols: Eucaryotic Systems*. New York, Henderson, D. S. Human Press Inc.: Totowa, 113, 1999.

SPOOF, L., VESTERKVIST, P., LINDHOLM, T., MERILUOTO, J., Screening for Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins and Nodularin in Environmental Water Samples by Reversed-Phase Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1020, (1), 101–115, 2003.

STOTTS, R R., NAMIKOSHI, M., HASCHEK, W.M., RINEHART, K.L., CARMICHAEL, W.W., DAHLEN, A.M., BEASLEY, V.R., Structural Modifications Imparting Reduced Toxicity in Microcystins from *Microcystis* sp. **Toxicon**, 31, 783-793, 1993.

SUGAYA, Y., YASUNO, M., YANAI, T., Effect of Toxic *Microcystis viridis* and Isolated Toxins on Gold Fish. **Japan Journal Limnology**, 51, 149 - 153, 1990.

TABOLT, C., HOLE, R., Fish Diets and the Control of Eutrophication Resulting from Aquaculture. **Journal of Applied Ichthyology**, 10, 258-270, 1994.

TAKAMURA, Y., YAMADA, T., KIMOTO, A., KANEHAMA, N., TANAKA, T, NAKADAIRA, S., YAGI, O. Growth Inhibition of *Microcystis* Cyanobacteria by L-Lysine and Disappearance of Natural *Microcystis* Blooms with Spraying. **Microbes Environ.** 19 (1), 31-39, 2004.

TAKENAKA, S., WATANABE, M.F., Microcystin-LR Degradation by *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. **Chemosphere**, 34, (4), 749-757, 1997.

TAMANAH, M.S., GARCIA, M., RÖRIG, L.R., TAMASSIA, S.T.J., SCHAPPO, C.L., Modelo Alto do Itajaí de Piscicultura Integrada: (4) Composição Qualitativa e Quantitativa do Fitoplâncton. IX Reunião Brasileira de Ficologia. Algas – Biodiversidade e Exploração Racional. **Sociedade Brasileira de Ficologia**.p.185. Fundação Ecosistemas do Espírito Santo, Santa Cruz, Aracruz, ES. 02-06/03/2002.

TENCALLA, F., DIETRICH, D., Biochemical Characterization of Microcystin Toxicity in Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**, 35, 583-595, 1997.

TENCALLA, F.G., DIETRICH, D.R., Biochemical Characterization of Microcystin Toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicon**, 35, 583-595, 1997.

TICE, R., The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D. H., VENNIT, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK, 315-339, 1995.

- TSUJI, K., ASAKAWA, M., ANZAI, Y., SUMINO, T., HARADA, K.-I., Degradation of Microcystins Using Immobilized Microorganism Isolated in an Eutrophic Lake. **Chemosphere**, 65, (1), 117–124, 2006.
- TSUJI, K., MASUI, H., UEMURA, H., MORI, Y., HARADA, K.I., Analysis of Microcystins in Sediments Using MMPB Method. **Toxicon**, 39, 687–692, 2001.
- TSUJI, K., WATANUKI, T., KONDO, F., WATANABE, M.F., SUZUKI, S., NAKAZAWA, H., SUZUKI, M., UCHIDA, H., HARADA, K.-I., Stability of Microcystins from Cyanobacteria—II. Effect of UV Light on Decomposition and Isomerization. **Toxicon**, 33, 1619–1631, 1995.
- TSUTSUMI, T., NAGATA, S., HASEGAWA, A., UENO, Y., Immunoaffinity Column as Clean-up Tool for Determination of Trace Amounts of Microcystins in Tap Water. **Food Chem. Toxicol**, 38, 593– 597, 2000.
- TUAN, N.A., GRIZZLE, J.M., LOVELL, R.T., MANNING, B.B., ROTTINGHAUS, G.E., Growth and Hepatic Lesions of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Diets Containing Aflatoxin B₁. **Aquaculture**, 212, 311-319, 2002.
- UENO, Y., Mycotoxins in Food. In: KROGH, P. (Ed.). *Toxicological Aspects on Food*. **Elsevier Science**, 139-204, 1991.
- UENO, Y., YABE, T., HASHIMOTO, H., SEKIJIMA, M., MASUDA, T., KIM, D.J., HASEGAWA, R., Enhancement of GST-P Positive Liver Foci by Nivalenol, a Trichotecene Mycotoxin. **Carcinogenesis**, 13, 787-791, 1992.
- WANG, J., PANG, X., GE, F., MA, Z. An Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Microcystins Occurrence in Surface Water in Zhejiang Province, China. **Toxicon**, 49, 1120–1128, 2007.
- WANG, J-S., GROOPMAN, J.D., DNA Damage by Mycotoxins. **Mutation Research**, 424, 167–181, 1999.
- WANG, L., LIANG, S-F., LIAO, W-Q., LEI, L-M., HAN, B-P., Structural and Functional Characterization of Microcystin Detoxification-Related Liver Genes in a Phytoplanktivorous Fish Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 144, 216-227, 2006.

WETZEL, R G., Limnology: Lake and River Ecosystems, 3rd edn. San Diego: Academic Press.

WHO- World Health Organization., **Guidelines for Drinking-Water Quality**. Volume 1, Recommendations. Geneva, 1993.

WHO- World Health Organization., **Guidelines for Drinking-Water Quality**. 2nd ed. Addendum to Volume 2. Geneva, 1998.

WHO- World Health Organization. Health Criteria and Other Supporting Information **Guidelines for Drinking water Quality**: Second Edition, Addendum to Volume 2. WHO, Geneva, 1998.

WILLIAMS, D.E., CRAIG, M., DAWE, S.C., KENT, M.L., ANDERSEN, R.J., HOLMES, C.F.B., 14C Labeled Microcystin-LR Administered to Atlantic Salmon Via Intraperitoneal Injection Provides in vivo Evidence for Covalent Binding of Microcystin-LR in Salmon Livers. **Toxicol**, 35, 6, 985-989, 1997.

WOOGAN, G.N., Aflatoxins as Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in Humans. **Cancer Research**, 52, 2114-2118, 1992.

WRIGHT, S.J., LINTON, C.J., EDWARDS, R.A., DRURY, E., Isoamyl Alcohol (3-Methyl-1-Butanol), a Volatile Anti-Cyanobacterial and Phytotoxic Product of Some *Bacillus* spp. **Letter Applied Microbiology**, 13, 130-132, 1991.

WRIGHT, S.J., REDHEAD, K., MAUDSLEY, H., *Acanthamoeba castellanii*, a Predator of Cyanobacteria. **Journal of Genetic Microbiology**, 125, 293-300, 1981.

XIE, L., XIE, P., OZAWA, K., HONMA, T., YOKOYAMA, A., PARK, H.D., Dynamics of Microcystins-LR and RR in the Phytoplanktivorous Silver Carp in a Sub-Chronic Toxicity Experiment. **Environmental Pollution**, 127, 431-439, 2004.

XIE, P., Gut Contents of Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) and the Processing and Digestion of Algal Cells in the Alimentary Canal. **Aquaculture**, 195, 149-161, 2001.

XING, Y. XU, Y., CHEN, Y., JEFFREY, P.D., CHAO, Y., LIN, Z., LI, Z., STRACK, S., STOCK, J.B., SHI, Y., Structure of Protein Phosphatase 2A Core Enzyme Bound to Tumor-Inducing Toxins. **Cell**, 127, (2), 341-353, 2006.

YAMAGUCHI, T., KOBAYASHI, Y., ADACHI, K., IMAMURA, N., Argimicin B and C, New Anti-Cyanobacterial Compounds Produced by *Sphingomonas* sp. M-17. **The Journal of Antibiotics**, 56, (7), 655-657, 2003.

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**, 10, 391-397, 1998.

YAMAMOTO, Y., Observations on the Occurrence of Microbial Agents which Cause Lysis of Blue-Green Algae in Lake Kasumigaura. **Japan Journal of Limnology**, 42, 20-27, 1981.

YAMAMOTO, Y., SUZUKI, K., Distribution and Algal-Lysing Activity of Fruiting Myxobacteria in lake Suwa. **Journal of Phycology**, 26, 457-462, 1990.

YOO, S.R., CARMICHAEL, W.W., HOEHN, N., HURDEY, R.C.S.E., Cyanobacterial (Blue-Green Algae) Toxins: a Resource Guide. **AWWA Research Foundation and American Water Works Association**, USA1995.

YOSHIDA, T., MAKITA, Y., TSUTSUMI, T., NAGATA, S., TASHIRO, F., YOSHIDA, F., SEKIJIMA, M., TAMURA, S-I., HARADA, T., MAITA, K., UENO, Y., Immunohistochemical Localization of Microcystin-LR in the Liver of Mice: a Study of Pathogenesis of Microcystin-LR-Induced Hepatotoxicity. **Toxicol Pathology**, 26(3):411-8.

YOSHIZAWA, S., MATSUSHIMA, R., WATANABE, M.F., HARADA, K-I., ICHIHARA, A., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H., Inhibition of Protein Phosphatases by Microcystin and Nodularin Associated with Hepatotoxicity. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, 116, 609-614, 1990.

YU, S-Z., Drinking Water and Primary Liver Cancer. In: TANG, Z.Y., WU, M.C., XIA, S.S. (Eds.): Primary Liver Cancer. **China Academic Publishers**, Beijing Springer-Verlag, Berlin, 30-37, 1989.

YU, S-Z., Primary Prevention of Hepatocellular Carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 10, 674-682, 1995.

ZECK, A., EIKENBERG, A., WELLER, M.G., NIESSNER, R., Highly Sensitive Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody Specific for [4-Arginine] Microcystins. **Anal. Chim. Acta**, 441, 1-13, 2001.

ZEGURA, B., LAH. T.T., FILIPIC, M., The Role of Reactive Oxygen Species in Microcystin-LR Induced DNA Damage. **Toxicology**, 200, 59-68, 2004.

ZHANG, J.B., ZHENG, Z., YANG, G.J., ZHAO, Y.F. Degradation of Microcystin by Gamma Irradiation. *Nucl. Instr. and Meth. A*, doi:10.1016/j.nima.2007.05.109, 2007.

ZHANG, L., PING, X., YANG, Z., Determination of Microcystin- LR in Surface Water Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Electrospray Ionisation Mass Detector. **Talanta**, 62, 193–200, 2004.

ZHANG, L., ZHAO, S., DEANS ZIRATTU, S., LEE, E.Y.C. Mutagenesis of the Catalytic Subunit of Rabbit Muscle Protein Phosphatase-1. *Mol. Cell. Biochem.*, 127, 113– 119, 1993.

ZOCCARATO, I., BENATTI, G., CALVIS, S.L., Use of Pig Mature as Fertilizer with and without Supplement Feed in Pond Carp Production in Northern Italy. **Aquaculture**, 29, 387-390, 1995.

ZWEIGENBAUM, J.A., HENION, J.D., BEATTIE, K.A., CODD, G.A., POON, G.K., Direct Analysis of Microcystins by Microbore Liquid Chromatography Electrospray Ionization Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 23, 723–733, 2000.