



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA DE ÁVILA MIGUEL

MICROCISTINA:
PROSPECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO, LEVEDURAS
BIOATIVAS E GENES DE BIODEGRADAÇÃO EM
Sphingosinicella microcystinivorans B9

TATIANA DE ÁVILA MIGUEL

MICROCISTINA:
PROSPECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO, LEVEDURAS
BIOATIVAS E GENES DE BIODEGRADAÇÃO EM
Sphingosinicella microcystinivorans B9

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Miguel, Tatiana de Ávila.

Microcistina : prospecção de contaminação, leveduras bioativas e genes de biodegradação em *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 / Tatiana de Ávila Miguel. - Londrina, 2014.

109 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Cianobactéria - Tese. 2. Água - Bacteriologia - Tese. 3. Biodegradação - Tese. 4. Contaminação - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

TATIANA DE ÁVILA MIGUEL

MICROCISTINA:

PROSPECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO, LEVEDURAS BIOATIVAS E
GENES DE BIODEGRADAÇÃO EM *SPHINGOSINICELLA*

MICROCYSTINIVORANS B9

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gisele Maria Andrade de Nóbrega
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Emília Kiyomi Kuroda
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 04 de setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka pela oportunidade, compreensão e auxílio.

À Profa. Dra. Gisele Maria Andrade de Nóbrega pela colaboração e incentivo.

À Profa. Dra. Emília Kiyomi Kuroda pela colaboração e incentivo.

Ao Prof Dr Ken-Ichi Harada pela concessão de materiais.

Ao Prof Dr Fernando Pagnocca pelo auxílio e concessão de materiais.

A Dra. Marcia Kamogae pela colaboração.

À chefia e coordenação do curso de pós-graduação em ciência de alimentos pela colaboração.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado.

À CAPES, Fundação Araucária, SETI e CNPq pelo apoio financeiro.

À Daiane Dias Lopes, Catia Lie Yokoyama, Herrison Yoshiki, Cássia Reika Takabayshi, Ana Lúcia Felício Souza e Yumi Tabuchi pelo auxílio na execução do trabalho e pela amizade.

Aos funcionários do departamento de ciência e tecnologia de alimentos (UEL) pelo auxílio e prontidão.

Aos funcionários do departamento de biologia (UEL) pelo auxílio e prontidão.

Aos meus pais, irmãos, amigos e marido pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

MIGUEL, T. A. **Microcistina**: prospecção de contaminação, leveduras bioativas e genes de biodegradação em *sphingosinicella microcystinivorans* B9. 2014. 109 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

As mudanças climáticas, o crescimento urbano desordenado e a intensa atividade agroindustrial sem a consciência logística e sustentável causam impacto negativo ao recurso hídrico devido à eutrofização, favorecendo florações de cianofíceas toxigênicas. O aumento da frequência e intensidade de cianobactérias, acarretando em produção de microcistinas (MC), é um problema global, sendo o monitoramento da qualidade da água e o desenvolvimento de metodologias para tratamento e remoção de toxina dissolvida de fundamental importância. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi monitorar a contaminação de água por MC no estado do Paraná, bem como avaliar o potencial de biodegradação da toxina por leveduras selvagens, além de isolar, sequenciar e clonar os genes para degradação de MCs de *S. microcystinivorans* B9. Em relação ao monitoramento, os níveis de MC variaram de 0,02 a 240,00 µg/L, com média geral 13,62 µg/L para a bacia hidrográfica do Paraná III, e 0,15 µg/L para a bacia do Tibagi. A região de Foz do Iguaçu na bacia do Paraná III apresentou maior contaminação (83,3% de positividade) em relação a região de Londrina, na bacia do Tibagi (53,3% de positividade). Na análise de biodegradação de MC por leveduras selvagens a maioria das cepas apresentou bioatividade contra MC após 96h, porém apenas 3 removeram mais de 50% da concentração inicial. *Saccharomyces cerevisiae* VI08R removeu 70,3% da concentração inicial de MC, com maior atividade nas primeiras 24h de cultivo. A levedura também apresentou potencial para biocontrole de *Synechocystis* spp. e *Anabaena* spp. Foi realizada detecção, isolamento e caracterização dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9, bem como clonagem em *Escherichia coli*. As análises de similaridade confirmaram identidade dos genes com aqueles de outras bactérias, em especial *Sphingomonas* spp. Os resultados obtidos salientam a necessidade de programas de monitoramento e tratamento de água, e fornecerem informações importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de água contaminada com cianotoxinas.

Palavras-chave: Microcistina. Biodegradação. Monitoramento. Gene *mlrA*. *Sphingomonas* spp.

MIGUEL, T. A. **Microcystin**: prospecting contamination, bioactive yeasts and biodegradation genes in *sphingosinicella microcystinivorans* B9. 2014. 109 p. Thesis (Doctor's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Climate change, urban sprawl and agroindustrial activity without consciousness and sustainable logistics cause negative impacts to water resource due to eutrophication, favoring blooms of toxigenic cyanobacteria. The increased frequency and intensity of cyanobacteria, resulting in production of microcystins (MC), is a global problem. Monitoring of water quality and the development of methodologies for treatment and removal of dissolved toxin are, therefore, crucial. In this sense, the objective was to monitor the contamination of water by MC in the State of Paraná, as well as assessing the potential biodegradation of the toxin by wild yeasts; and also detect, clone and sequence genes for biodegradation of *Sphingosinicella microcystinivorans* B9. Regarding monitoring, the levels of MC ranged from 0.02 to 240.00 mg/L. Average levels were 13.62 g/L for Paraná III watershed, and 0.15 mg/L for Tibagi watershed. The region of Foz do Iguaçu in Paraná III presented higher contamination by microcystin (83.3% positivity) over the region of Londrina, in the Tibagi watershed (53.3% positive). When examining MC biodegradation, most of the wild yeast strains showed bioactivity against MC after 96h, however only 3 removed more than 50% of the initial concentration. *Saccharomyces cerevisiae* VI08R removed 70.3% of the initial concentration of MC, with most of the activity occurring in the first 24 hours of cultivation. The yeast also showed potential for biocontrol of *Synechocystis* spp. and *Anabaena* spp. Detection, isolation and characterization of the *mlrA*, *mlrB* and *mlrC* genes of *S. microcystinivorans* B9 were performed, along with cloning in *Escherichia coli*. The similarity analysis confirmed the identity of the genes to those of other bacteria, in particular *Sphingomonas* spp. The results highlight the need for monitoring and water treatment programs, and provide important information for the development of new technologies for the treatment of water contaminated with cyanotoxins.

Keywords: Microcystin. Biodegradation. Monitoring. Gene *mlrA*. *Sphingomonas* spp.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1.	CIANOBACTÉRIAS TOXIGÊNICAS E CIANOTOXINAS	5
2.2.	FLORAÇÕES E EXPOSIÇÃO À CIANOTOXINAS	6
2.3.	MICROCISTINAS	9
2.4.	TOXICIDADE E MECANISMO DE AÇÃO DE MICROCISTINAS	11
2.5.	ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE E OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA ÁGUA CONTAMINADA COM CIANOBACTÉRIAS E MICROCISTINAS	14
2.6.	BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS	17
2.7.	VIA DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS POR <i>SPHINGOMONAS SPP</i>	18
3.	JUSTIFICATIVA	22
4.	OBJETIVOS	23
4.1.	OBJETIVO GERAL	23
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5.	MATERIAL E MÉTODOS	24
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
	CAPÍTULO 1 – PROSPECÇÃO DE MICROCISTINA NO PARANÁ – CONTAMINAÇÃO, QUALIDADE DA ÁGUA E DEGRADAÇÃO DO MEIO AMBIENTE	30
	CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ANTICIANOBACTÉRIA E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR LEVEDURAS SELVAGENS	47

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO E CLONAGEM DOS GENES PARA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA DE <i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> B9	70
ANEXO 1 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrA F e mlrA R. A análise por BLAST indica similaridade com gene para DNA topoisomerase IV subunidade A	88
ANEXO 2 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrA 164 F e mlrA 164 R. A análise por BLAST indica similaridade com gene para DNA topoisomerase IV subunidade A	89
ANEXO 3 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrA F, mlrA F2 e mlrA R (PCR Semi-Nested). A análise por BLAST indica similaridade com gene <i>mlrA</i>	90
ANEXO 4 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrB F e mlrB R. A análise BLAST indica similaridade com gene <i>mlrB</i>	91
ANEXO 5 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrC F e mlrC R. A análise BLAST indica similaridade com gene <i>mlrC</i>	92
7. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas é comum em ambientes eutrofizados, podendo afetar reservatórios de água de abastecimento, águas recreacionais e pisciculturas, comprometendo a qualidade da água, impactando diretamente em fatores econômicos e na saúde humana e animal, uma vez que pode haver produção de substâncias indesejáveis e/ou tóxicas.

Os metabólitos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são denominados cianotoxinas, sendo que os peptídeos cíclicos das famílias da microcistina (MC) e nodularina são os de maior ocorrência natural, e representam o principal desafio para a saúde pública.

O tratamento de água por ciclo completo (coagulação, floculação, sedimentação, filtração) pode remover células intactas de cianobactérias, entretanto é ineficiente para a remoção de toxinas dissolvidas na água. O controle biológico é uma alternativa interessante, uma vez que os métodos utilizados são, geralmente, mais econômicos e menos agressivos ao meio ambiente.

Os estudos sobre biodegradação de MC comumente focam na utilização de bactérias isoladas de ambientes eutróficos, sendo a maioria pertencente ao gênero *Sphingomonas*. Essas bactérias possuem um cluster com quatro genes (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*) os quais produzem as peptidases necessárias para degradação da molécula de MC. O conhecimento sobre esses genes ainda é escasso, sendo que seu estudo e caracterização fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle e/ou descontaminação de águas superficiais destinadas ao consumo humano.

Ainda, a aplicação direta de bactérias no tratamento de água pode ser de difícil manejo, além de poderem representar riscos à saúde, devido ao potencial patogênico de algumas *Sphingomonas* spp. e da presença frequente de genes de resistência a antibióticos em águas superficiais. Portanto, a investigação sobre o potencial de biodegradação de MC em outros microrganismos, em especial leveduras GRAS, é uma alternativa vantajosa para o monitoramento e para o controle natural de floração de cianobactérias tóxicas e seus metabólitos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cianobactérias Toxigênicas e Cianotoxinas

Cianobactérias, também denominadas algas azuis, são microrganismos procarióticos, uni ou pluricelulares, fotoautotróficos, aeróbios, sendo que possuem fotossistemas e clorofila a. Assim como nas bactérias gram-negativas, há uma camada de peptidoglicano recobrindo a membrana plasmática. Apresentam pigmentos organizados em estruturas denominadas tilacóides, a exemplo da clorofila, ficocianina, aloficocianina e beta-caroteno. Utilizam amido como polissacarídeo de reserva, na forma de pequenos grânulos de polifosfato (CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989; FAY, 1965; CARMICHAEL, 1992; MANTOVANI, MOSER e FAVERO, 2011).

Constituem um grupo antigo de organismos, com origem estimada há 3,5 bilhões de anos, cujos habitats variam de fontes termais até lagos temporariamente congelados na Antártica, podendo ocorrer tanto em água doce quanto em ambientes marinhos (WHITTON, 1992; CARMICHAEL, 1992).

Existem cerca de 150 gêneros e 2000 espécies descritas de cianobactérias, sendo que pelo menos 40 gêneros são constituídos por espécies toxigênicas (SKULBERG *et al.*, 1993), com destaque para *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, *Aphanizomenon flos aquae*, *Anabaena* spp. e *Oscillatoria* spp. (CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Os metabólitos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são denominados cianotoxinas, produtos do metabolismo secundário, as quais constituem um grupo de toxinas naturais bastante variado. As cianotoxinas são produzidas

durante as Florações (ou *blooms*) de cianobactérias, as quais são comuns em ambientes aquáticos eutrofizados, podendo ocorrer em reservatórios de água de abastecimento, águas recreacionais e pisciculturas, impactando diretamente em fatores econômicos, na saúde humana e animal (SKULBERG, 1996), uma vez que pode haver produção de substâncias indesejáveis (JÜTTNER, 1987) e/ou tóxicas (GORHAM e CARMICHAEL, 1988). Além da ocorrência global em ambientes aquáticos, recentemente foi relatada a presença de cianotoxinas em ambiente desértico (METCALF *et al.*, 2012) e em líquens simbiontes de ambiente terrestre (KAASALAINEN *et al.*, 2012), demonstrando que o perigo de contaminação pode não estar restrito à água.

Cianotoxinas são classificadas de acordo com seu efeito toxicológico em hepato, neuro e citotoxinas, ou pela estrutura química em peptídeos cíclicos (as hepatotoxinas - microcistinas e nodularinas), alcalóides (as neurotoxinas - anatoxina e saxitoxinas) e lipopolissacarídeos (SIVONEN e JONES, 1999; HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000).

2.2. Florações e Exposição à Cianotoxinas

Embora sejam majoritariamente originadas em ambientes aquáticos, as cianotoxinas exercem efeitos mais profundos em mamíferos terrestres do que na biota aquática (SIVONEN e JONES, 1999).

O primeiro relato de envenenamento animal data de 1878, e ocorreu no Lago Alexandrina, na Austrália, onde foi observada letalidade de bovinos, ovinos, cães, equinos e suínos após a ingestão de água contendo floração de *Nodularia spumigena* (FRANCIS, 1878). Desde então, muitos casos de envenenamento

animal foram relatados (Tabela 1), geralmente letais. É importante ressaltar que a contaminação animal, além dos prejuízos pessoais, afeta também a economia, pois a letalidade de animais de consumo pode ocorrer devido a intoxicação por cianotoxinas (ANDERSEN *et al.*, 1993; RODGER *et al.*, 1994; TORANZO, NIETO e BARJA, 1990; PENALOZA *et al.*, 1990).

As formas mais comuns de intoxicação ocorrem pelo contato através do nado e ingestão de água contaminada com cianotoxinas (YOO *et al.*, 1995). Porém, há estudos que sugerem bioacumulação e contaminação através da cadeia alimentar (CODD *et al.*, 1999; PAPADIMITRIOUS *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2010; IBELINGS e CHORUS, 2007) e por aerossol (CHENG *et al.*, 2007), representando um sério risco à saúde pública. Em seres humanos, há também a possibilidade de contaminação intravenosa através de diálise (TEIXEIRA *et al.*, 1993; JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998).

Casos de exposição aguda subcrônica em humanos foram primeiramente relatados nos Estados Unidos, em 1931, em cidades próximas ao rio Ohio, onde condições ambientais favoreceram uma intensa floração de cianobactérias, causando gastroenterite na população (TISDALE, 1931).

No entanto, os dois casos mais importantes de envenenamento humano por água contaminada com cianobactérias ocorreram no Brasil. Uma floração de *Anabaena* spp. e *Microcystis* spp. na represa de Itaparica (Bahia) foi responsável pela ocorrência de 2000 casos de gastroenterite, afetando principalmente crianças e resultando em 88 mortes (TEIXEIRA *et al.*, 1993)

Tabela 1 – Casos confirmados de intoxicação animal e humana por microcistina

	Ano	Local	Descrição	Referência
ANIMAIS	1990	Piscina natural (EUA, Califórnia)	Cão – Vômito, letargia, diarreia, falência hepática; bioensaio em camundongo positivo	DeVries <i>et al.</i> , 1993
	1997	EUA	Gado – fraqueza, hipersensibilidade, morte após 3 dias; MC detectada e algas encontradas no rúmen	
	2000	Noruega	Veado – letargia, fraqueza, lesão hepática; MC detectada no fígado	Handeland e Ostensvik, 2010
	2004	Lagoa Los Ansares (Espanha)	Peixes e aves – mortalidade em massa após <i>bloom</i> de <i>Microcystis aeruginosa</i> ; toxina detectada em órgãos	Lopez-Rodas <i>et al.</i> , 2008
	2007	Baía Monterey (EUA)	Lontra – lesões coerentes com falência hepática; MC detectada no fígado	Miller <i>et al.</i> , 2010
	2011	Lago Amstelmeer (Holanda)	Cão – Vômito, letargia, dificuldade respiratória, sangramento gastrointestinal, morte em 24 h; MC detectada na água e no vômito dos animais	Lurling e Faassen, 2013
	2011	Lago Milford (EUA)	Cão - Falência, necrose e coagulação hepática fulminantes, hemorragia; MC na água, vômito e fígado dos animais	Van der Merwe <i>et al.</i> , 2012
HUMANOS	1989	Inglaterra	Exposição aguda – 2 indivíduos com pneumonia após queda em <i>bloom</i> , 8 indivíduos com sintomas adicionais; MC detectada	Turner <i>et al.</i> , 1990
	1993-1994	China	Exposição crônica – correlação entre MC em água e câncer hepático	Yu <i>et al.</i> , 2001
	1996	Brasil	Exposição aguda – vômito, diarreia, falência hepática, centro de hemodiálise, 116 pacientes afetados, mais de 50 mortes; MC detectada na água e tecidos dos pacientes	Jochimsen <i>et al.</i> , 1998
	1980 – 1990 2000 – 2002	Sérvia	Exposição crônica – correlação entre MC em água e câncer hepático	Svircev <i>et al.</i> , 2009
	2007	Represa Salto Grande (Argentina)	Exposição aguda – esquiador em contato com <i>bloom</i> , em 4 horas apresentou náusea, dor abdominal e febre. Após 3 dias, apresentou pneumonia; MC detectada na água	Giannuzzi <i>et al.</i> , 2011
	Fonte: Adaptado de ROEGNER <i>et al.</i> , 2013			

Outro caso ocorreu em um centro de hemodiálise em Caruaru em 1996 (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998). Em Fevereiro do mesmo ano 85% dos pacientes de hemodiálise desenvolveram uma doença com severidade variável, apresentando uma ampla gama de sintomas neurológicos, bem como lesão aguda no fígado. Cerca de 23 pacientes morreram nas primeiras 2 semanas, em decorrência dos sintomas neurológicos ou de falência hepática. Nas cinco semanas seguintes, outros 37 pacientes faleceram diretamente devido aos efeitos hepatotóxicos ou por complicações desta patologia (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; POURIA *et al.*, 1998).

Além dos episódios agudos, a exposição crônica pode representar um grande perigo, uma vez que estudos epidemiológicos demonstram a correlação entre a alta incidência de câncer hepático primário e a ocorrência de MCs em água de abastecimento na China (YU, 1989; HARADA *et al.*, 1996; UENO *et al.*, 1996).

Embora exista uma grande variedade de cianotoxinas, a cilindrospermopsina e os peptídeos cíclicos das famílias da microcistina (MC) e nodularina são mais frequentes, com destaque para as MCs, e representam um grande desafio para a o tratamento de água de consumo (SIVONEN e JONES, 1999; HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000).

2.3. Microcistinas

As MCs foram primeiramente isoladas de culturas de *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL *et al.*, 1988), mas diversos gêneros e espécies são capazes de produzir a toxina, com destaque para *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*

e *Anabaenopsis* (BOTES, KRUGRER e VILJOEN, 1982; NAMIKOSHI *et al.*, 1992; NAMIKOSHI *et al.*, 1990; CARMICHAEL *et al.*, 1988).

Estruturalmente, MCs são heptapeptídeos monocíclicos compostos por três D-aminoácidos na porção invariável da molécula, dois aminoácidos raros e dois L-aminoácidos (Figura 1). Os três D-aminoácidos são alanina (D-Ala), β -eritro- β -metil ácido aspártico (D- β MeAsp) e γ -ácido glutâmico (D-Glu); os aminoácidos raros são N-metildehidroalanina (Mdha) e (2S,3S,8S,9S) 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dipnóico (Adda) (BOTES, KRUGRER e VILJOEN, 1982). Embora variações estruturais possam ocorrer em qualquer um dos sete aminoácidos que compõem a molécula, as alterações de maior frequência responsáveis pela existência de diferentes análogos são as substituições nos L-aminoácidos e a presença ou ausência de grupos metil nos aminoácidos D- β MeAsp e/ou Mdha (CARMICHAEL, 1992; SIVONEN e JONES, 1999). Mais de 80 análogos de MCs já foram caracterizados, mas a MC-LR é a mais tóxica e de maior ocorrência natural (HOEGER, HITZFELD e DIETRICH, 2005; FALCONER e HUMPAGE, 2005).

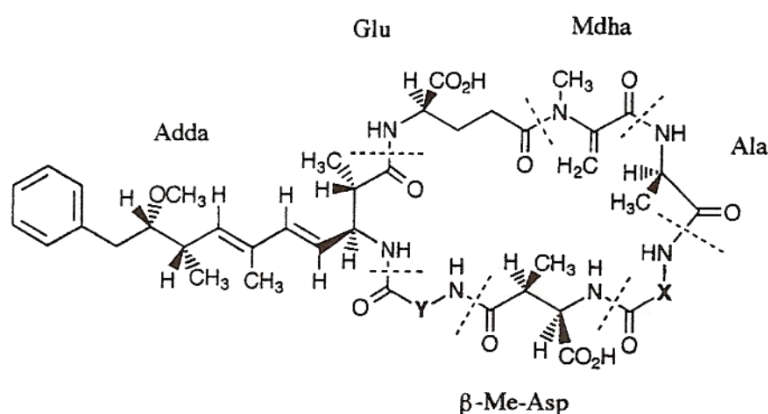


Figura 1 – Estrutura química de microcistinas – X e Y representam L-aminoácidos variáveis (Para MC-LR: X = Leucina e Y = Arginina). Fonte: HASHIMOTO (2007).

As MCs são bastante estáveis, e persistem no ambiente mesmo semanas após a ocorrência do *bloom* (PEARSON e NEILAN, 2008). A estrutura da toxina se mantém em faixa de pH entre 1 e 9 (HARADA *et al.*, 1996), além de resistir à temperatura de fervura, ao cozimento (ZHANG, XIE e CHEN, 2010) e à salinidade (MAZUR e PLINSKI, 2001). MCs também são estáveis a foto-oxidação natural, hidrólise química e oxidação em pH próximo a neutralidade (TSUJI *et al.*, 1995; HARADA e TSUJI, 1998).

2.4. Toxicidade e Mecanismo de Ação de Microcistinas

Os sintomas do envenenamento agudo por MCs incluem distúrbio gastrintestinal (náusea, vômito, febre, dor de cabeça, dor abdominal), fraqueza, dificuldade respiratória, inflamação e falência hepática. O fígado é o principal órgão afetado, sendo que as principais alterações observadas incluem necrose hepática centrilobular, destruição do endotélio sinusoidal, hemorragia intrahepática, necrose de hepatócitos, entre outras (RUNNEGAR e FALCONER, 1982; WICKSTROM *et al.*, 1996; ITO, KONDO e HARADA, 1997; YOSHIDA *et al.*, 1997).

As consequências da intoxicação por MCs dependem principalmente da dose, gênero, espécie, peso corpóreo e a via de contaminação. LD₅₀ (*Lethal Dose 50%* - dose necessária para mortalidade de 50% dos indivíduos de uma população) para MCs varia de 50 µg/Kg a 11mg/Kg de peso corpóreo. Em camundongos, por exemplo, a LD₅₀ para MC-LR é de 5 a 10 mg/Kg quando administrada via oral, e de 25 a 150 µg/Kg quando a contaminação é via intraperitoneal (FAWELL *et al.*, 1994; KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1999).

A toxicidade das MCs ocorre devido ao efeito inibitório que exercem sobre a subunidade catalítica das proteínas fosfatases 1 e 2A, também denominadas PP1 e PP2A, respectivamente. Alguns estudos sugeriram que a ligação covalente entre toxina e fosfatases ocorre nos resíduos de cisteína (cisteína-273 em PP1 e cisteína-266 em PP2A), impedindo a desfosforilação de proteínas fosfoseril e fosfotreonil, provocando uma hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto e resultando, portanto, na deformação de hepatócitos (RUNNEGAR *et al.*, 1995; MACKINTOSH *et al.*, 1995; RUNNEGAR e FALCONER, 1981; ERIKSSON *et al.*, 1989; ERIKSSON *et al.*, 1990; ERIKSSON *et al.*, 1993; RUNNEGAR e FALCONER, 1986; RUNNEGAR *et al.*, 1987). Além disso, alguns estudos também demonstraram que a cadeia lateral do aminoácido Adda, e possivelmente a porção planar do anel do peptídeo, são responsáveis tanto pelo reconhecimento quanto pela inibição das proteínas fosfatases (RUDOLPH-BÖHNER, MIERKE e MORODER, 1994; NAMIKOSHI *et al.*, 1989).

Também pode ocorrer formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequente aumento na peroxidação lipídica (PINHO *et al.*, 2005), danos a mitocôndrias (DING, SHEN e ONG, 2002), rompimento do sistema antioxidante (AMADO *et al.*, 2009) e danos ao DNA (ZENGURA *et al.*, 2003).

Devido aos danos que as MCs podem ocasionar, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu o limite máximo de 1µg/L de MCLR em água destinada ao consumo humano, e a ingestão diária tolerável de 0,04 µg/Kg de peso corpóreo (WHO, 1998). Os limites de MC permitidos pela legislação de alguns países são mostrados na Tabela 2.

Para prevenir a ocorrência de *blooms* e MCs é necessário compreender os fatores que contribuem para eutrofização da água. Em resumo, deve-se reduzir o despejo, direto e indireto, de material orgânico e/ou nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo (DOWNING *et al.*, 2005; PAERL *et al.*, 2011). Medidas como tratamento de esgoto e resíduos, redução da utilização de fertilizantes na agricultura, proteção da vegetação e mata ciliar podem contribuir, a médio/longo prazo para redução do problema (HEISLER *et al.*, 2008; CHORUS e MUR *et al.*, 1999; CETESB, 2013).

Tabela 2 – Legislação para a regulação de microcistina em água

	Água para consumo	Águas recreacionais
Brasil	1 µg/L	-
França	1 µg/L	25 µg/L
Alemanha	1 µg/L	10 µg/L
Espanha	1 µg/L	-
Holanda	1 µg/L	20 µg/L
Uruguai	1 µg/L	-
África do sul	1 µg/L	-
Turquia	1 µg/L	25 µg/L
Austrália	1,3 µg/L	10 µg/L
Canadá	1,5 µg/L	20 µg/L

Fonte: Adaptado de CHORUS, 2012.

2.5. Estratégias para o Controle e Opções de Tratamento para Água Contaminada com Cianobactérias e Microcistinas

O manejo de *blooms* de cianobactérias é complexo, pois engloba prevenir, monitorar e tratar / remediar água contaminada com cianotoxinas (MEREL *et al.*, 2013). Monitorar a presença de cianobactérias e MCs na água também é essencial, sendo que em diversos países, como Estados Unidos, Finlândia, Alemanha, França e Holanda procedimentos padrão foram adotados, embora exista diferenças entre as metodologias utilizadas por cada país (CHORUS, 2005; RAPALA *et al.*, 2005). Estratégias de monitoramento incluem principalmente diagnóstico de áreas de risco, contagem e identificação do fitoplâncton, determinação qualitativa e quantitativa de cianotoxinas (MEREL *et al.*, 2013).

O tratamento de água deve ter a capacidade de remover a biomassa planctônica sem que ocorra comprometimento da estrutura celular e consequente liberação de toxinas, bem como remover toxinas que possam estar dissolvidas (SCHMIDT *et al.*, 2002; MEREL *et al.*, 2013).

Técnicas convencionais (coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração) podem remover células intactas de cianobactérias, entretanto são ineficientes para a remoção de toxinas dissolvidas na água, sendo necessária a implantação de sistema de tratamento complementar (HIMBERG *et al.*, 1989; LAMBERT, HOLMES e HRUDEY, 1996; CHOW *et al.*, 1999; DRIKAS *et al.*, 2001).

Prática comum no tratamento de água, a pré-cloração objetiva a remoção de cianobactérias, além de ser eficaz para a degradação de toxina dissolvida.

Entretanto, o método requer a utilização de altas concentrações de cloro, e a performance varia muito de acordo com a qualidade da água e composto clorado utilizado (ROEGNER *et al.*, 2013). Ainda, há formação de subprodutos tóxicos, como os trihalometanos, e alteração no gosto e odor da água (DALY, HO e BROOKES, 2007; HITZFELD *et al.*, 2000; ACERO *et al.*, 2005; MEREL, CLÉMENT e THOMAS, 2010).

Outras alternativas incluem utilização de ozônio, permanganato de potássio e peróxido de hidrogênio. Contudo, não existem muitos estudos em relação à eficiência de degradação de MCs, formação de subprodutos tóxicos, gosto e odor na água. A tecnologia exigida e o custo para aplicação dessas metodologias também dificultam sua aplicação (ROEGNER *et al.*, 2013; WETZEL, 2001).

Ainda considerando tratamentos químicos, na piscicultura faz-se utilização de substâncias algicidas (como o sulfato de cobre, por exemplo) as quais promovem lise celular, acarretando na liberação de cianotoxinas para a água. Para solucionar este problema, alguns métodos químicos podem ser utilizados (WETZEL, 2001), mas há o inconveniente do alto custo e poluição secundária, o que dificulta a utilização de tais métodos (AHN *et al.*, 2003).

A literatura descreve diversos procedimentos para remoção de cianotoxinas da água: utilização de radiação UV (TSUJI *et al.*, 1995; KAYA e SANO, 1998), carvão ativado (WESTWICK *et al.*, 2010; MULLER *et al.*, 2009), filtração por membranas, i.e. micro, ultra e nanofiltração, e osmose reversa (CHOW *et al.*, 1997; LEE e WALKER, 2008; DIXON *et al.*, 2010), dentre outros. Entretanto a maioria exige combinação com outros procedimentos para remoção completa de cianotoxinas e/ou subprodutos tóxicos da água. Além disso, a maioria dos

estudos foi realizada em escala laboratorial, sendo a implementação em grande escala um desafio devido ao alto custo e a infraestrutura necessária (MEREEL *et al.*,2013; ROEGNER *et al.*,2014).

Neste sentido, a utilização de controle biológico para o tratamento de água é uma alternativa mais econômica e menos agressiva ao meio ambiente. A maioria das pesquisas é baseada em bactérias, capazes de degradar cianotoxinas, isoladas de locais com ocorrência de *blooms*. Tais bactérias apresentam capacidade única para degradação de MCs, a qual varia não somente com a espécie, mas inclusive de acordo com a cepa. O primeiro caso de bactéria degradadora de MCs foi relatado na Austrália por Jones *et al.* (1994). O isolado, caracterizado inicialmente como *Pseudomonas* spp., apresentou capacidade de degradação quase total de MC-LR e -RR em apenas três dias. Em 1996, Bourne *et al.* reclassificaram essa bactéria como *Sphingomonas* spp. ACM 3962, a qual foi utilizada nos primeiros estudos para elucidação do mecanismo de biodegradação de MCs.

Desde então, a utilização do biocontrole para tratamento de água contaminada por cianotoxinas vem se tornando cada vez mais uma realidade. Diversos estudos indicam a possibilidade de utilização de filtros contendo bactérias, os quais são eficazes para a remoção completa de pelo menos dois análogos de MCs, MC-LR e -LA (BOURNE *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2007; HO *et al.*, 2010).

Sumino, Ogasawara e Park (2008) patentearam um método (Patente No. US 7425267 B2) no qual, basicamente, a água contaminada é colocada em contato com *Sphingomonas* spp. MDB1 (comercialmente denominada FERM P-19480)

através de aplicação de suspensão bacteriana (10^8 células/m²) na forma de spray, com eficiência de redução de 18 µg/L para menos de 1 µg/L de MCs após 5 dias. Há ainda possibilidade de aplicação na forma *pellets* (3 mm de diâmetro) contendo a bactéria imobilizada, sendo observada redução de 10 µg/L para menos de 1 µg/L de MCs em apenas 30 minutos. Os autores descrevem ainda equipamentos para construção de uma estação de descontaminação da água, para onde a água seria bombeada e tratada com a bactéria FERM P-19480.

2.6. Biodegradação de Microcistinas

Há na literatura diversos relatos sobre a biodegradação de MCs por microrganismos, em especial bactérias do gênero *Sphingomonas* (BOURNE *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1994; ISHI *et al.*, 2004; HARADA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2003; HO *et al.*, 2007; ZHANG, PAN e YAN, 2010).

Sphingomonas spp. ACM-3962, microrganismo isolado por Jones *et al.* em 1994, é capaz de degradar tanto MC-LR quanto -RR *in vitro* (BOURNE *et al.*, 1996). Outra linhagem de *Sphingomonas* spp., denominada Y2, degradou MC-LR, -RR e -YR, com atividade máxima observada em temperatura de 30°C. As taxas de degradação observadas foram de 5,4 mg/L/dia e 13 mg/L/dia de MC-LR e -RR, respectivamente (PARK *et al.*, 2001). Saito *et al.* (2003) relataram a degradação de MC-RR e -YR pela cepa MD após a indução da atividade com MC-LR. A cepa 7CY foi capaz de degradar MC-LR, -RR, -LY, -LW e -LF, além de nodularina-Har na presença de MC-RR (ISHI *et al.*, 2004). Imanishi *et al.* (2005) observaram que a cepa B9 degradou diversos análogos de MC, incluindo MC-LR, MC-RR, 3-desmetil-MC-LR, di-hidro-MC-LR e MC-LR-cisteína conjugada, além de nodularina. A degradação de MC-LR e MC-LA foi observada por *Sphingopyxis*

spp. LH21 (HO *et al.*, 2007). Outra linhagem de *Sphingopyxis* spp., denominada USTB-05, degradou MC-RR em uma taxa equivalente a 16,7 mg/L/dia (ZHANG, PAN e YAN, 2010).

Apesar de haverem poucos relatos na literatura, existem outros microrganismos capazes de degradar MCs, como por exemplo, bactérias *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Rhodococcus* spp. (MANAGE, *et al.*, 2009), e bactérias probióticas, com destaque para *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* e *B. longum* (MERILUOTO *et al.*, 2005; NYBOM *et al.*, 2007; NYBOM *et al.*, 2008). Entretanto, as linhagens pertencentes à família Sphingomonadaceae se destacam pela capacidade de degradar diferentes análogos e altas concentrações da toxina.

Em relação à aplicação no tratamento de água, a linhagem B9, que apresenta 99% de similaridade, pela análise DNA ribossomal 16S, com *Sphingosinicella microcystinivorans* (MARUYAMA *et al.*, 2006) foi aplicada em escala piloto, sendo que a imobilização de $7,9 \times 10^6$ células/mL em resinas de poliéster de biorreatores promoveu a eliminação completa de MCLR após 1 dia de tratamento. Além disso, com a adição continuada de 600 µg de MCRR houve eliminação de 80% da toxina, sendo que a eficiência do tratamento persistiu por dois meses (TSUJI *et al.*, 2006).

2.7. Via de Degradação de Microcistinas por *Sphingomonas* spp.

As MCs apresentam estabilidade frente a uma série de proteases, como pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastase, trombina, papaína, colágenase e carboxipeptidase. Por este motivo, a quebra das ligações peptídicas das requere

peptidases específicas. Um conjunto de quatro genes (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*) foi identificado por Bourne *et al.* (1996; 2001) como o *cluster* envolvido na biodegradação de MCs (Figura 2).

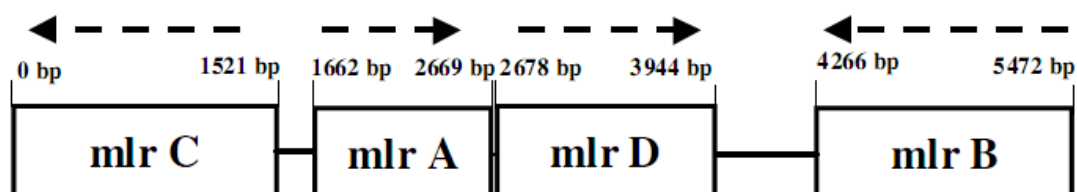


Figura 2 – Genes envolvidos na degradação de microcistinas. Fonte: BOURNE *et al.* (2001)

O gene *mlrA* codifica para a enzima MlrA, uma metalopeptidase que promove a quebra hidrolítica da ligação peptídica entre Adda e Arg, abrindo a estrutura cíclica da MC-LR. Após a linearização, as peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC* (MlrB – serinapeptidase e MlrC – metalopeptidase, respectivamente) promovem hidrólises subsequentes. O produto do gene *mlrD* não é uma enzima de degradação, mas sim uma proteína transportadora que carrega MCs para o interior da célula bacteriana, onde ocorre a via de degradação (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

A metalopeptidase codificada pelo gene *mlrA* é a enzima mais importante no processo de biodegradação de MCs, uma vez que a estrutura cíclica da toxina é o principal fator envolvido na estabilidade frente às outras proteases, sendo que a linearização da molécula provavelmente a torna mais susceptível à hidrólise enzimática (BOURNE *et al.*, 1996; 2001). O gene *mlrA* possui uma sequência nucleotídica rara, e está na maioria das espécies com capacidade de degradar MC. Este gene apresentou-se conservado em pelo menos três espécies de

bactérias, sugerindo que a capacidade de degradação de MCs foi adquirida através da transferência de genes no curso da evolução do gênero *Sphingomonas* (SAITO *et al.*, 2003).

Durante a biodegradação de MC-LR, Bourne *et al.* (1996) identificaram alguns dos intermediários produzidos pela metabolização da toxina pela cepa ACM-3962, como a forma linearizada da MC-LR e tetrapeptídeo (H-Adda-Glu-Mdha-Ala-OH). Adda intacto também foi isolado após biodegradação pela cepa B9 por Harada *et al.* (2004). A toxina linear, o tetrapeptídeo e Adda apresentam menor atividade tóxica em camundongos, além de menor capacidade de inibir proteínas fosfatases em relação à MC-LR, demonstrando a eficiência de detoxificação das proteases produzidas por *Sphingomonas* spp. (BOURNE *et al.*, 1996; 2001; HARADA *et al.*, 2004; HO *et al.*, 2007).

A via de degradação de MCs também foi investigada por HASHIMOTO *et al.* (2009). Com a utilização do método avançado de Marfey para derivatização, os autores identificaram intermediários / subprodutos de degradação da MC-LR por *S. microcystinivorans* B9, e propuseram um esquema (Figura 3) que indica a presença do *cluster* gênico descrito anteriormente, embora o mesmo não tenha sido ainda detectado na referida bactéria. Embora pareça claro que MC possa ser degradada pelos mecanismos acima descritos, Manage *et al.* (2009) indicaram a possível existência de outras vias e genes, uma vez que os autores não detectaram a presença dos genes *mlr* em seus isolados (*Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp. e *Rhodococcus* spp).

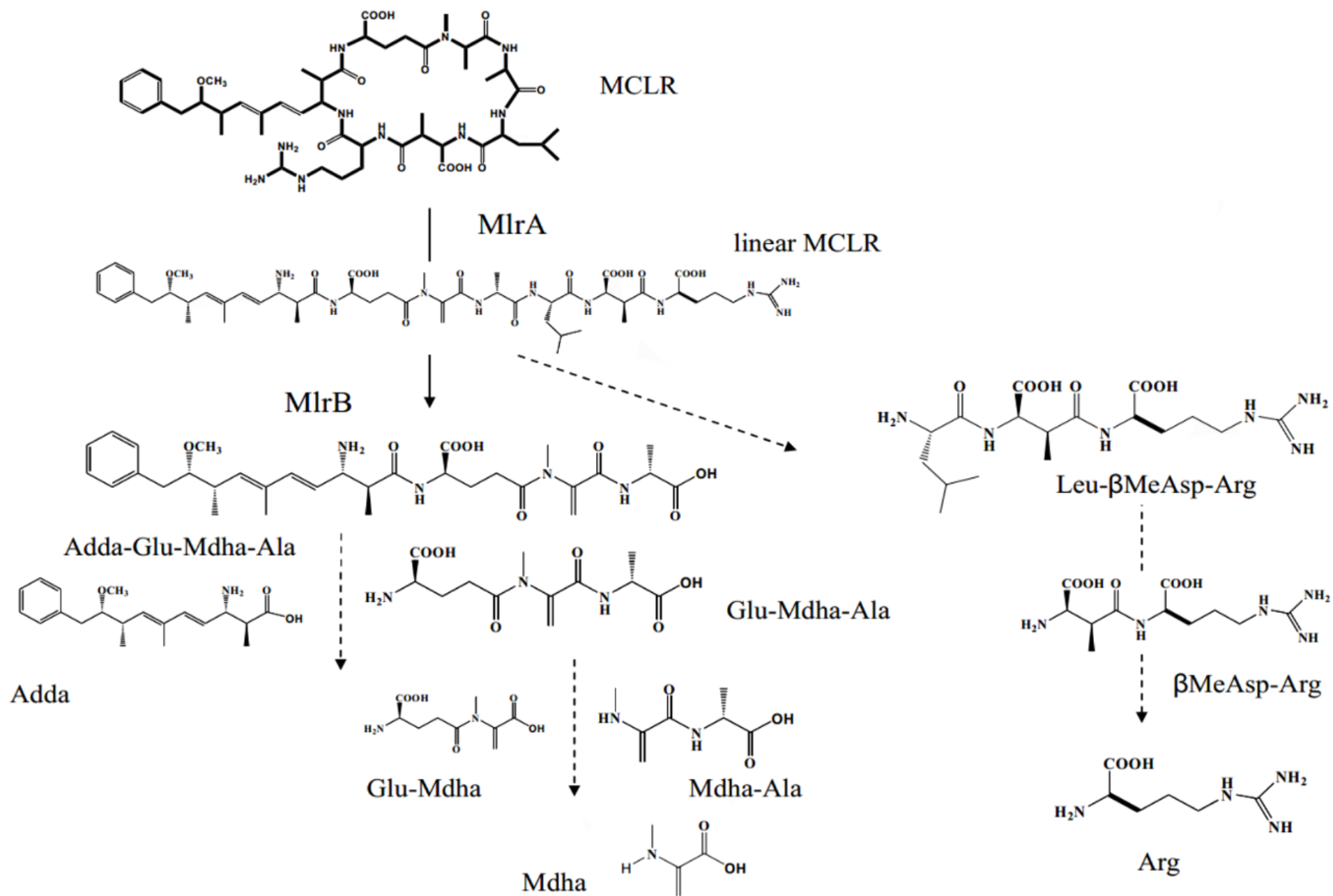


Figura 3 – Biodegradação de microcistina LR por *Sphingosinicella microcystinivorans* B9. Fonte: HASHIMOTO, 2007

3. JUSTIFICATIVA

Como consequência do crescimento urbano e agroindustrial a eutrofização da água torna-se um problema cada vez mais frequente, acarretando em maior ocorrência de *blooms* de cianobactérias e MCs na água. Devido à escassez de informação sobre a contaminação de água por cianotoxinas, em especial no Brasil, e de alternativas menos onerosas e poluentes para prevenção e/ou remediação, há a necessidade de pesquisas que objetivem o monitoramento e tratamento de água para consumo.

Neste sentido, foi realizado monitoramento da contaminação de água por MCs no Paraná, bem como avaliação do potencial para biodegradação da toxina por leveduras, dado este inexistente na literatura científica. Ainda, a presença dos genes para degradação de MCs foi investigada em *S. microcystinivorans* B9, com o intuito de fornecer informações para elucidação dos mecanismos de biodegradação e para o desenvolvimento de estratégias de controle e minimização dos riscos associados à presença de cianobactérias e MCs na água.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Determinar a contaminação de água por MCs no estado do Paraná. Avaliar o potencial de biodegradação da toxina por leveduras selvagens, a fim de selecionar linhagem capaz de controlar o crescimento de cianobactérias e de degradar MCs em ambientes eutrofizados ou altamente competitivos. Paralelamente, isolar, sequenciar e clonar os genes para degradação de MCs de *S. microcystinivorans* B9.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar MCs na água na região de Londrina e Foz do Iguaçu;
- Comparar a contaminação de água por MCs no Paraná em dois períodos distintos e relacionar os dados com a qualidade da água, degradação do meio ambiente, desenvolvimento urbano e agroindustrial;
- Avaliar o potencial anticianobactéria e de degradação de MCs por leveduras selvagens isoladas de usina de açúcar e álcool e de formigueiro;
- Comparar o potencial anticianobactéria e de biodegradação de MCs por leveduras com *S. microcystinivorans* B9 e outras *Sphingomonas* spp.;
- Padronizar metodologias para extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes *mlr* em *S. microcystinivorans* B9;
- Amplificar, isolar, purificar e sequenciar cada um dos genes de degradação de MCs (*mlrA*, *mlrB* e *mlrC*) de *S. microcystinivorans* B9;
- Clonar e analisar a expressão dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *S. microcystinivorans* B9 em *Escherichia coli* JM109;

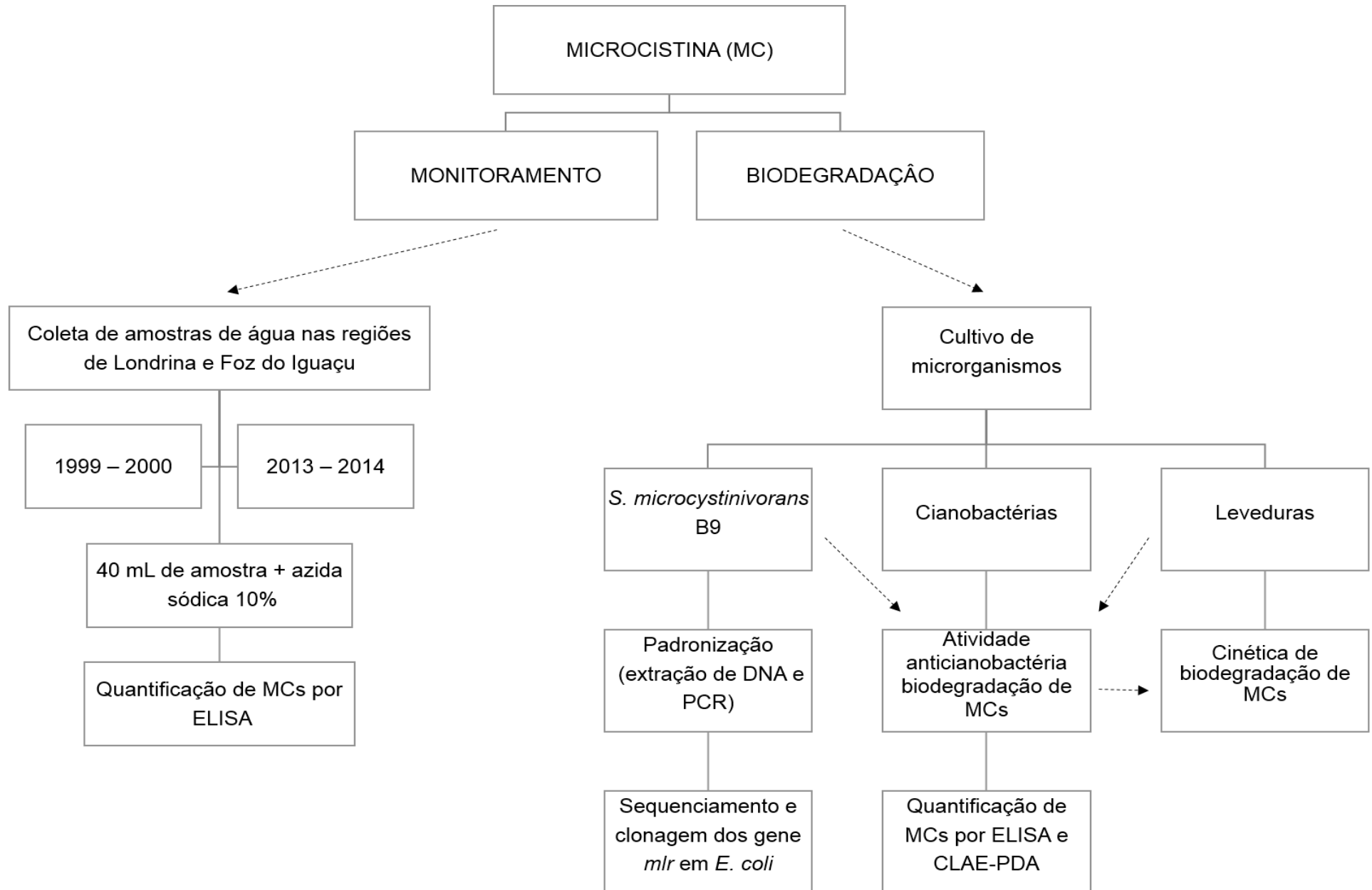
5. MATERIAL E MÉTODOS

O detalhamento das metodologias e materiais utilizados em cada experimento será abordado em cada capítulo descrito no item 'RESULTADOS E DISCUSSÃO'. O delineamento experimental geral é mostrado no fluxograma 1.

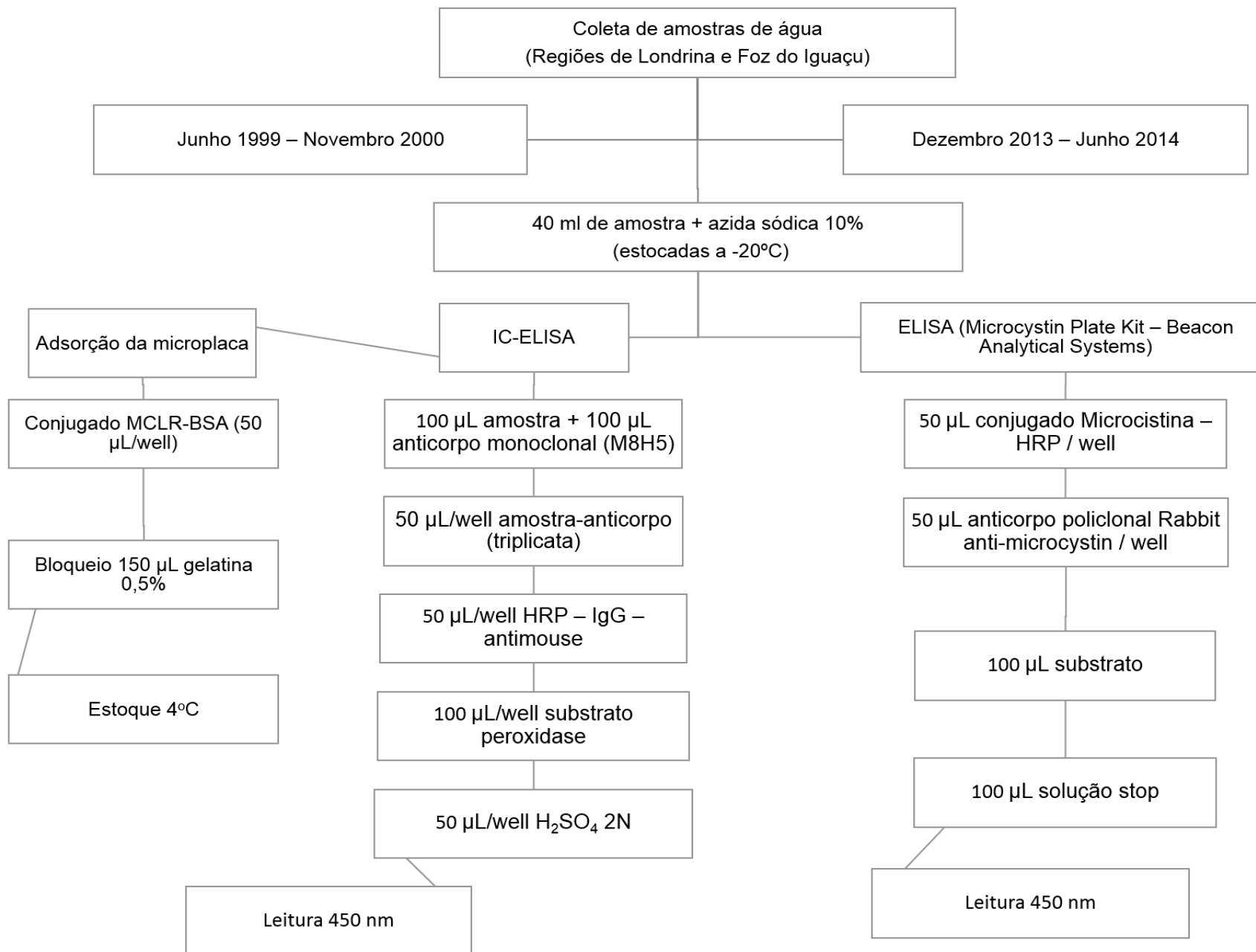
Três experimentos foram executados conforme o objetivo da pesquisa:

1. Prospecção da contaminação por MCs no Paraná (fluxograma 2);
2. Avaliação do potencial anticianobactéria e de biodegradação de MCs por leveduras selvagens (fluxograma 3);
3. Isolamento, sequenciamento e clonagem em *E. coli* dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *S. microcystinivorans* B9 (fluxograma 4)

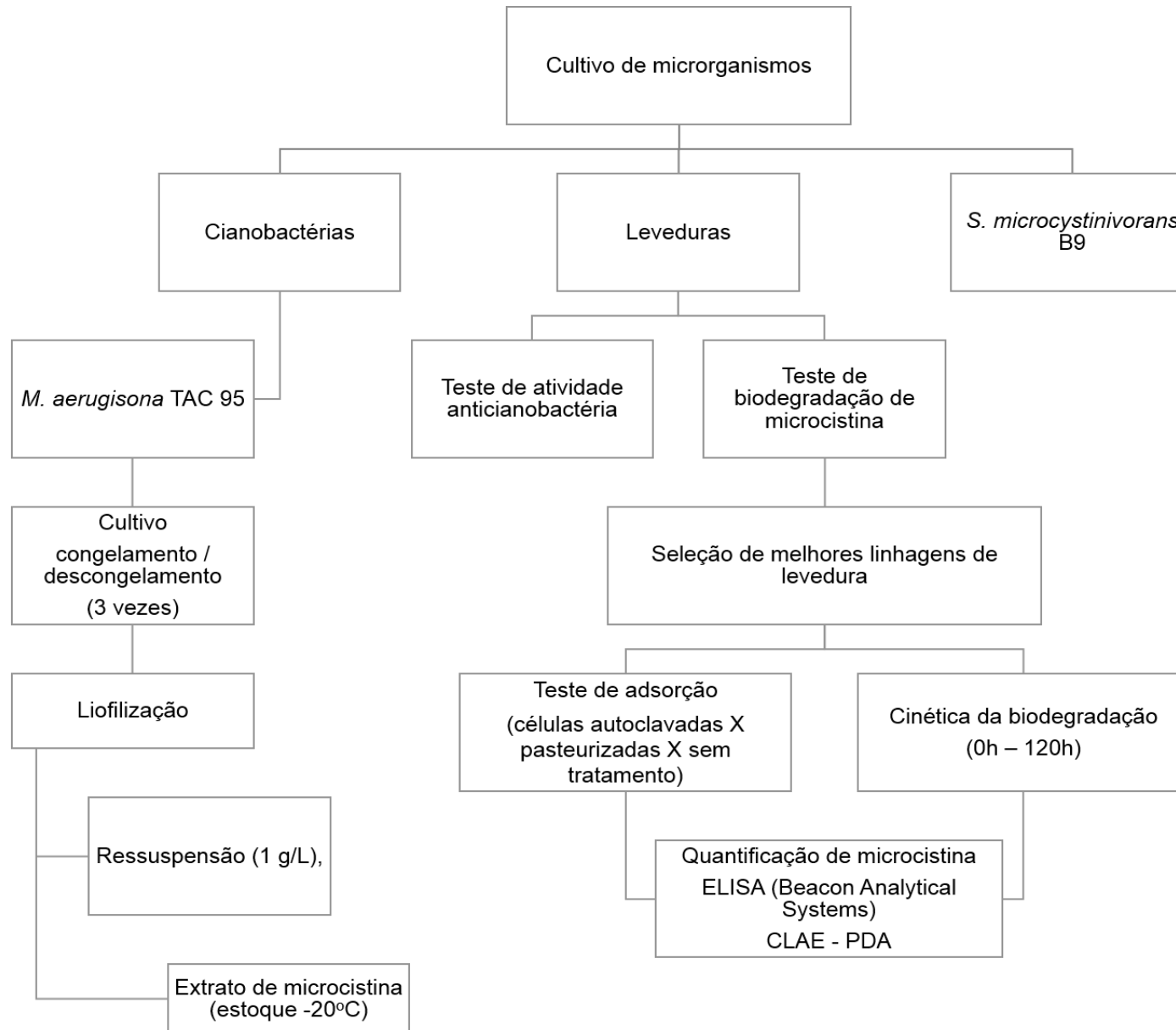
Para determinação dos níveis de MCs foram utilizadas duas metodologias diferentes de ELISA (fluxograma 2). Algumas amostras (experimento 2) também foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotodiodo (CLAE-PDA).



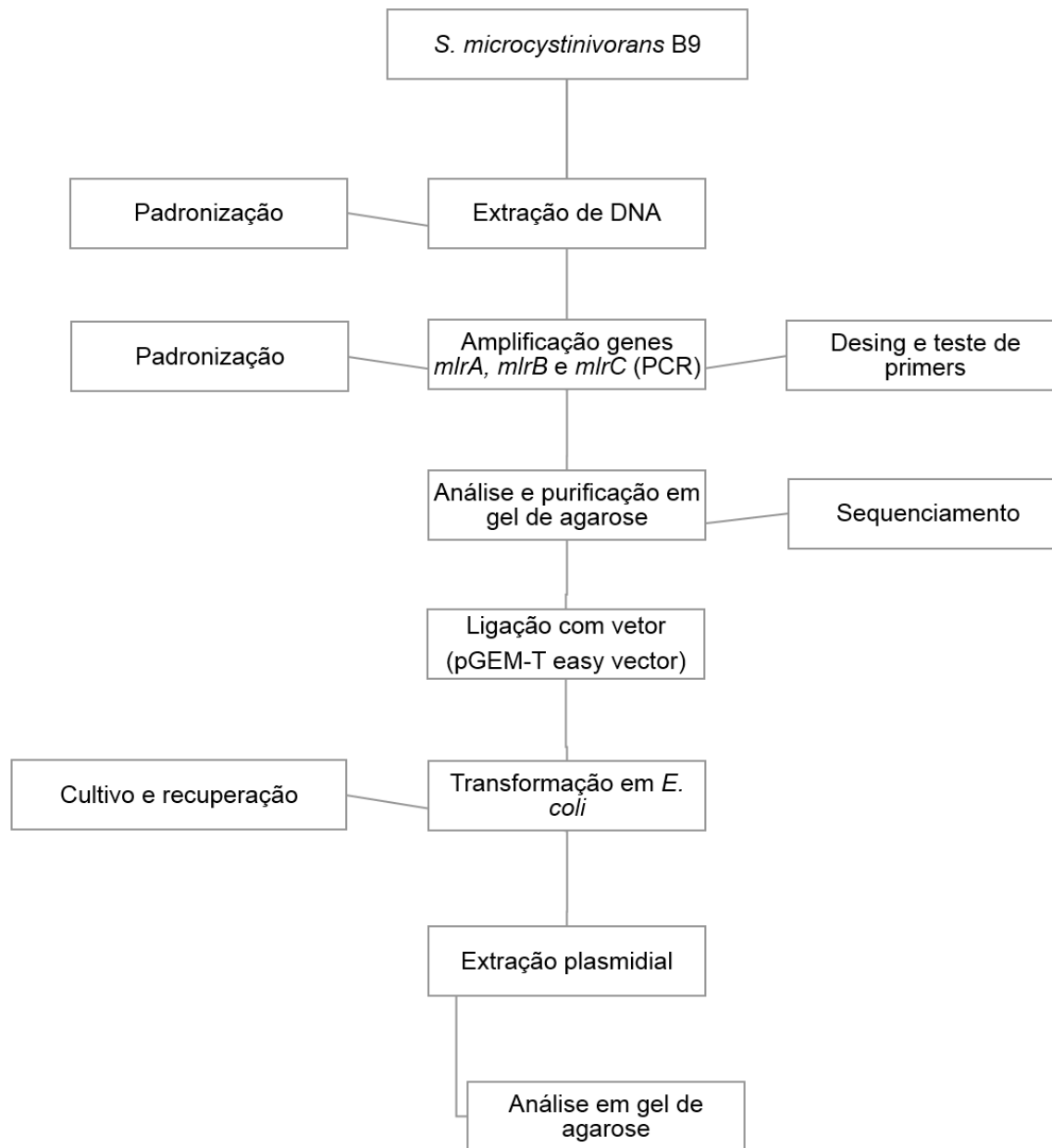
Fluxograma 1 – Delineamento experimental geral



Fluxograma 2 – Delineamento experimental para monitoramento de amostras no Paraná.



Fluxograma 3 – Etapas experimentais para avaliação de bioatividade de leveduras contra microcistina



Fluxograma 4 – Delineamento experimental para isolamento e clonagem dos genes de degradação de microcistina de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na forma de capítulos para publicação:

Capítulo 1

PROSPEÇÃO DE MICROCISTINA NO PARANÁ – CONTAMINAÇÃO, QUALIDADE DA ÁGUA E DEGRADAÇÃO DO MEIO AMBIENTE

Capítulo 2

ATIVIDADE ANTICIANOBACTÉRIA E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR LEVEDURAS SELVAGENS

Capítulo 3

DETECÇÃO E CLONAGEM DOS GENES PARA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA DE *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

CAPÍTULO 1

PROSPECÇÃO DE MICROCISTINA NO PARANÁ – CONTAMINAÇÃO, QUALIDADE DA ÁGUA E DEGRADAÇÃO DO MEIO AMBIENTE

Resumo

O aumento da frequência e intensidade da proliferação de cianobactérias, acarretando em produção de microcistinas, é um problema global, sendo o monitoramento da qualidade da água de fundamental importância. No presente trabalho a concentração de microcistinas no Estado do Paraná (bacias hidrográficas do Tibagi e Paraná III; regiões de Londrina e Foz do Iguaçu, respectivamente) foi monitorada em dois períodos diferentes. Em geral, os níveis variaram de 0,02 a 240,00 µg/L, com média geral 13,62 µg/L para a bacia hidrográfica do Paraná III, e 0,15 µg/L para a bacia do Tibagi. Dos 60 pontos de amostragem, foi detectada microcistina em 39, sendo que 21 não apresentaram contaminação. A região de Foz do Iguaçu na bacia do Paraná III apresentou maior contaminação por microcistina (83,3% de positividade) em relação a região de Londrina, na bacia do Tibagi (53,3% de positividade). Os recursos hídricos sofrem alto impacto pelo escoamento de matéria orgânica e pela construção de Usinas Hidrelétricas, salientando a necessidade de programas de monitoramento e tratamento de água, coleta adequada de esgoto e tratamento de resíduos, aprimoramento de práticas agropecuárias e conscientização da população sobre o perigo da ocorrência de cianobactérias e microcistinas, a fim de minimizar os impactos socioeconômicos resultantes.

Introdução

As mudanças climáticas, o crescimento urbano desordenado e a intensa atividade agroindustrial sem a consciência logística e sustentável causam impacto negativo ao recurso hídrico devido à eutrofização e deterioração da água, favorecendo florações de cianofíceas toxigênicas. A qualidade da água é prejudicada pela produção de metabólitos que conferem gosto e odor, além de toxinas, com destaque para microcistinas (MC), hepatotoxinas que causam danos à saúde humana e animal (JÜTTNER, 1987; FLEMING e STEPHAN, 2001; GORHAN e CARMICHAEL, 1988).

As microcistinas são um grupo de cianotoxinas composto por cerca de 80 análogos, entretanto a MC-LR é considerada a mais tóxica e de maior ocorrência natural (HOEGER, HITZFELD e DIETRICH, 2005; FALCONER e HUMPAGE, 2005). O envenenamento por MCs pode ocorrer via dérmica, por inalação, intravenosa (diálise) e, principalmente, pela ingestão de água contaminada (TISDALE, 1931; CHORUS e BARTRAM, 1999).

Em 1996 (Caruaru, Brasil), água contaminada com microcistina atingiu um centro de hemodiálise, afetando 166 pacientes, com 52 fatalidades (AZEVEDO *et al.*, 2002). No reservatório de Itaparica (Bahia, Brasil) o consumo de água contaminada com microcistina afetou cerca de 2000 pessoas, causando 88 mortes (TEIXEIRA *et al.*, 1993). Além da intoxicação aguda, há o perigo da exposição crônica, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem correlação entre a incidência de câncer hepático primário e a ocorrência de microcistina na água em algumas localidades da China (YU, 1989; UENO *et al.*, 1996). Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde (1998) estabeleceu o limite máximo

de 1 µg/L de MC-LR em água destinada ao consumo, e ingestão diária tolerável de 0,04 µg/Kg de peso corpóreo, sendo estes os valores adotados pela legislação brasileira.

O aumento da frequência e intensidade da proliferação de cianobactérias, acarretando em produção de microcistinas, é um problema global (CHORUS e BARTRAM, 1999; SVREK e SMITH, 2004; MEREL, CLÉMENT e THOMAS, 2010). No Brasil, surtos de florações de cianobactérias foram documentados em 11 Estados (DÖRR *et al.*, 2010), com predominância dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*, indicando perigo à saúde humana e animal (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000; HUSZAR *et al.*, 1998; BOUVY *et al.*, 2000). Para o manejo do problema, são necessárias estratégias que objetivem a prevenção e remediação da contaminação por microcistina, sendo o monitoramento da qualidade da água de fundamental importância (MEREL *et al.*, 2013).

Portanto, o presente trabalho objetivou determinar a concentração de microcistinas no Estado do Paraná (bacias hidrográficas do Tibagi e Paraná III; regiões de Londrina e Foz do Iguaçu, respectivamente) em dois períodos diferentes, com o intuito de correlacionar dados de contaminação com a qualidade da água e degradação do meio ambiente.

Material e Métodos

Pontos de Coleta e Amostragem

As amostras foram coletadas nas bacias do rio Tibagi (Londrina, Sertanópolis, Primeiro de Maio) e Paraná 3 (Santa Helena, São Miguel do Iguaçu e Santa Terezinha de Itaipu), ao norte e oeste do Estado do Paraná, respectivamente (Figura 1).

Os pontos de coleta para a região de Londrina foram fixados nas represas de Capivara (municípios de Primeiro de Maio e Sertanópolis) e Três Bocas (município de Londrina), sendo coletadas 32 amostras entre Junho de 1999 e Outubro de 2000, e 13 amostras entre Fevereiro e Maio de 2014.

No segundo período, também foram coletadas 18 amostras de pesqueiros, piscicultura e lagos do município de Londrina os quais utilizam águas de afluentes do Rio Tibagi (Ribeirões Cambé, Três Bocas e Cafezal).

Para a região de Foz do Iguaçu, os pontos de coleta foram realizados no lago de Itaipu nos municípios de Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu e Santa Helena. Foram coletadas 24 entre Junho de 1999 e Outubro de 2000; e 10 amostras entre Abril e Junho de 2014. Para determinação de microcistinas, as amostras coletadas foram imediatamente adicionadas de azida sódica 0,1% e estocadas a -20°C.

Determinação de Microcistinas

Para as amostras coletadas entre 1999 – 2000, foi utilizada metodologia de IC-ELISA (*Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) descrita abaixo. As amostras coletadas em 2014 foram analisadas com kit comercial (Beacon Analytical Systems) conforme instruções do fabricante.

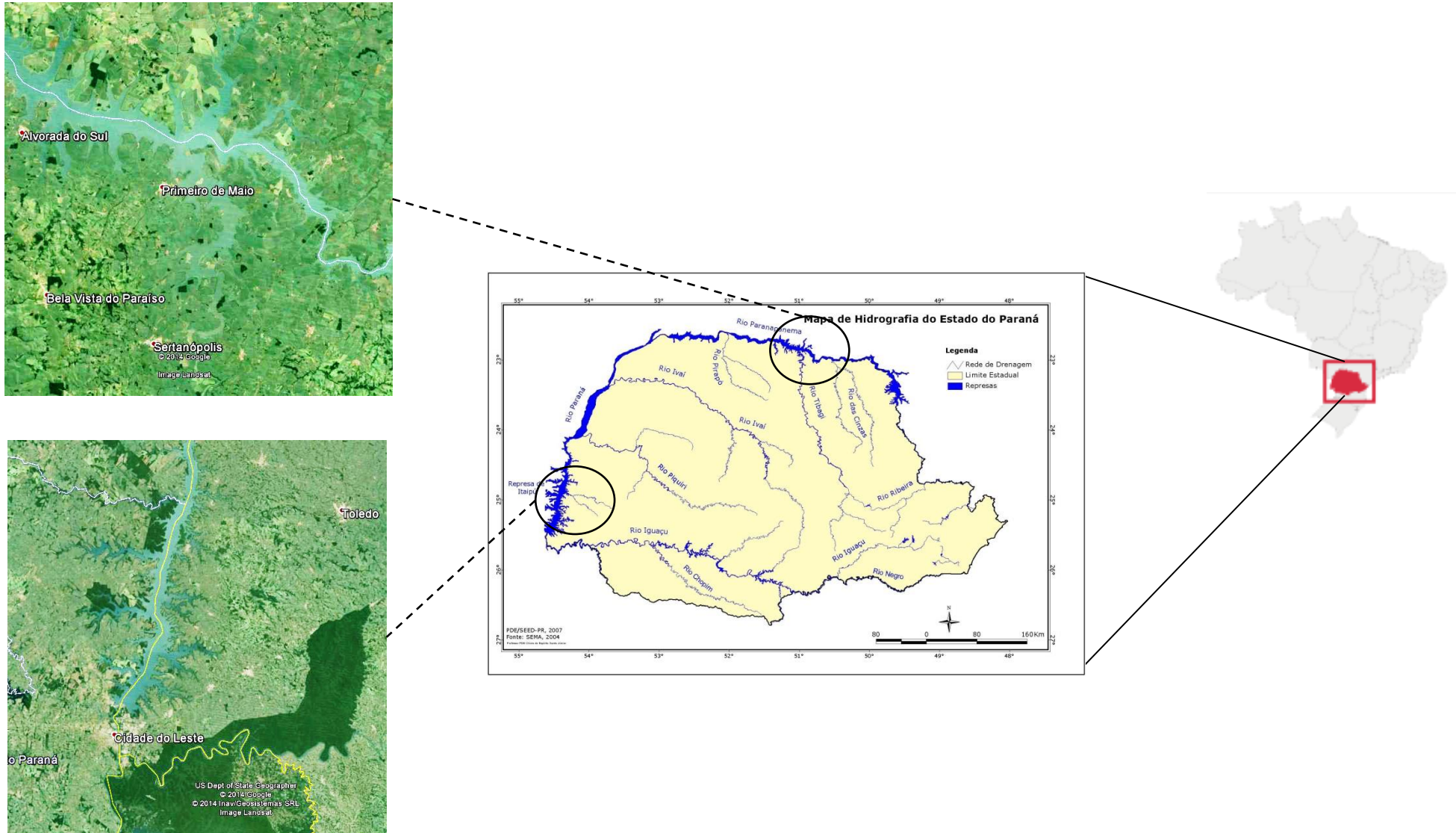


Figura 1 - Área de estudo e regiões de coleta de amostra nas bacias hidrográficas do Tibagi e Paraná III.

IC – ELISA

As microcistinas totais foram determinadas por método de ELISA competitivo indireto (NAGATA *et al.*, 1997), utilizando anticorpo IgG monoclonal M8H5 contra microcistinas totais e sistema de substrato peroxidase. O limite de detecção foi 50 pg/mL. O padrão consistiu de microcistina MC-LR com 95% de pureza, obtida de floração de cianobactéria toxigênica ocorrida no Lago Suwa, Japão e purificado na Science University of Tokyo, Japão. O conjugado MCLR–BSA (microcistina–LR conjugada a soroalbumina bovina) e anticorpo monoclonal anti-MC (M8H5) também foram preparados na mesma Instituição (NAGATA *et al.*, 1997).

A microplaca (Costard, Japão) foi sensibilizada com 50 µL de conjugado MCLR-BSA (1:20000 em PBS 0,015M pH 7,3), seguida de incubação a 4°C “overnight”. Após 3 lavagens com PBS 0,015M/Tween 20 (0,05%), a placa foi bloqueada com solução de gelatina (0,5%) em PBS contendo 0,1% de azida sódica (150µL/poço), mantida a temperatura ambiente por 30 min e estocadas a 4°C. Para o ensaio, 100 µL de água foram misturados com 100 µL de anticorpo monoclonal M8H5 (1:20000 em PBS 0,03 M pH 7,4 adicionado de 1% de gelatina) em microtubo, procedendo incubação por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se a mistura em microplaca sensibilizada com MCLR-BSA e incubadas a 4°C (“overnight”). Após 4 lavagens com PBS/Tween 20 (0,05%), adicionou-se 100µL de imunoglobulina G anti-camundongo produzido em cabra e conjugado a peroxidase (1:5000 em PBS/Tween 20 com 0,5% de gelatina) e incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. Após 5 lavagens com PBS/Tween 20 adicionou-se o substrato (0.1 mg/mL de 3,3'-5, 5'-

tetrametil benzidina-TMBZ em 0,005% de H₂O₂ em tampão acetato 0,1M a pH 5,0). A absorbância no branco foi medida a 650 nm nos intervalos de 5 min (leitora de ELISA, Bio-Tek Instruments), interrompendo-se a reação com H₂SO₄ 0,1M ao atingir absorbância entre 0,2 a 0,3 e a reação lida a 450 nm. Para a determinação de MCs confeccionou-se curva padrão com MC-LR (20 a 2000 pg/mL). Os controles consistiram de amostras previamente coletadas no lago Itaipu, pertencentes a localidade de Porto Mendes (controle negativo) e Passocôe (controle positivo) e testados pela Tokiwa Chemical Industries. O limite de detecção foi de 50 pg/mL. A curva padrão foi confeccionada com MC-LR, empregando-se concentração na faixa de 20 a 2000 pg/mL.

Resultados e Discussão

As concentrações médias de microcistina nos pontos de monitoramento estão mostradas na Tabela 1. Em geral, os níveis variaram de ND a 240,0 µg/L, com média geral 13,62 µg/L para a bacia hidrográfica do Paraná III, e 0,15 µg/L para a bacia do Tibagi. Dos 60 pontos de amostragem, foi detectada microcistina em 39, sendo que 21 não apresentaram contaminação. A região de Foz do Iguaçu na bacia do Paraná III apresentou maior contaminação por microcistina (86,67% de positividade) em relação a região de Londrina, na bacia do Tibagi (46,67% de positividade).

A alta positividade de microcistina na Bacia do Paraná 3 pode ser devido ao fato de que a região é ocupada em grande parte com agricultura intensiva (milho, soja, trigo), e que o uso de fertilizantes tem aumentado no Brasil (IBGE, 2012). De acordo com relatório elaborado pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SEMA, 2013) a bacia apresenta alto potencial de

contaminação por *run-off* agrícola, sendo caracterizada como um núcleo com alto consumo de agrotóxicos e fertilizantes; ainda, o índice de atendimento de coleta de efluentes domésticos fica em torno de 32%. Portanto, a região é suscetível ao incremento de matéria orgânica e a possibilidade de eutrofização da água, acarretando na proliferação de cianobactérias e contaminação por microcistinas.

Na região de Foz do Iguaçu, os maiores níveis médios foram detectados em Agosto de 1999 (28,85 µg/L), Maio de 2000 (21,14 µg/L) e Julho de 2000 (81,40 µg/L), indicando maior tendência de contaminação entre maio e agosto, período de menor precipitação média na região, caracterizada pelo clima subtropical úmido (SEMA, 2013). Embora poucas amostras tenham sido coletadas no 2º período (2014), há indícios de que houve melhora / diminuição na incidência de microcistinas, uma vez que os níveis detectados foram menores, inclusive no mês de Maio.

Considerando os municípios de coleta (Tabela 1), a maior ocorrência de microcistina foi em São Miguel do Iguaçu, com positividade de 100% das amostras analisadas. Os níveis de microcistina foram superiores ao limite máximo permitido (1 µg/L) em 50% das amostras. Santa Helena e Santa Terezinha do Itaipu apresentaram alta positividade (80% e 70%, respectivamente), porém os níveis de microcistina permaneceram abaixo de 1 µg/L na maioria das amostras.

Tabela 1 – Monitoramento de microcistina em municípios das bacias hidrográficas do Paraná III e Tibagi.

Microcistina (µg/L)								
Bacia do Paraná III				Bacia do Tibagi				
	Santa Helena	São Miguel do Iguçu	Santa Terezinha de Itaipu	MÉDIA	Sertanópolis	Primeiro de Maio	Londrina	MÉDIA
Jun/99	0,40	0,95	1,02	0,79	0,38	ND	0,13	0,17
Ago/99	0,51	86,00	0,05	28,85	ND	ND	ND	0,00
Out/99	ND	3,25	0,17	1,14	ND	ND	ND	0,00
Dez/99	0,15	0,08	0,08	0,10	0,15	0,08	0,06	0,10
Mar/00	1,90	0,06	ND	0,65	ND	0,13	ND	0,04
Mai/00	21,00	42,00	0,41	21,14	ND	0,05	ND	0,02
Jul/00	0,56	3,65	240,00	81,40	0,13	1,15	0,08	0,45
Out/00	0,39	0,91	0,16	0,49	0,14	0,82	0,42	0,46
Fev/14	----	----	----	----	0,67	ND	ND	0,22
Abr/14	0,01	0,77	ND	0,26	----	----	----	----
Mai/14	0,08	1,10	ND	0,39	ND	ND	ND	0,00
MÉDIA	2,50	13,88	24,19	13,52	0,15	0,25	0,07	0,15
POSITIVIDADE *	90%	100%	70%	86,67%	50%	50%	40%	46,67%

ND – Não Detectado. A determinação de microcistina foi realizada por ELISA.

* Positividade – porcentagem de amostras com microcistina por município.

Embora a concentração média de microcistina em Santa Helena e Santa Terezinha do Itaipu tenham sido de 2,5 µg/L e 24,19 µg/L, respectivamente, ressalta-se que estes valores somente foram obtidos devido aos altos níveis detectados nas amostras de Maio e Julho de 2000, indicando situação atípica, contrastante com os dados nas demais datas. Neste sentido, desconsiderando as análises de Maio e Julho de 2000, a concentração média de microcistina seria 0,44 µg/L para Santa Helena e 0,21 µg/L para Santa Terezinha do Itaipu, ambas abaixo do limite máximo permitido.

Os dados de monitoramento para a bacia do Paraná III estão em conformidade com dados do Instituto Ambiental do Paraná (IAP, 2004), onde a análise de amostras de água do lago Itaipu, de 1999 a 2004, mostrou que a maioria das amostras foi classificada como classe III, i.e., moderadamente degradado.

Apenas 1 amostra coletada na bacia do Tibagi apresentou nível de microcistina superior ao permitido por legislação (Jul/00, Primeiro de Maio – 1,15 µg/L). Entretanto, cerca de metade das amostras apresentou contaminação por microcistina, variando de ND a 1,15 µg/L. Assim como a bacia do Paraná 3, a região do Tibagi é ocupada principalmente pela agricultura intensiva, com poucas áreas de floresta, e atendimento de coleta de efluentes domésticos de 59% (SEMA, 2013). Monitoramento da bacia do Tibagi entre Abril de 2010 e Dezembro de 2011 indicou que na região de Londrina a qualidade da água é considerada de pouco poluída a boa (IAP, 2012), corroborando os baixos níveis de microcistina detectados (Tabela 1).

A maior ocorrência de microcistina na região de Foz do Iguaçu ocorreu em todos os períodos analisados (Figura 2), sendo provável que a maior pressão ambiental seja de origem antrópica, com a variável climática em segundo plano.

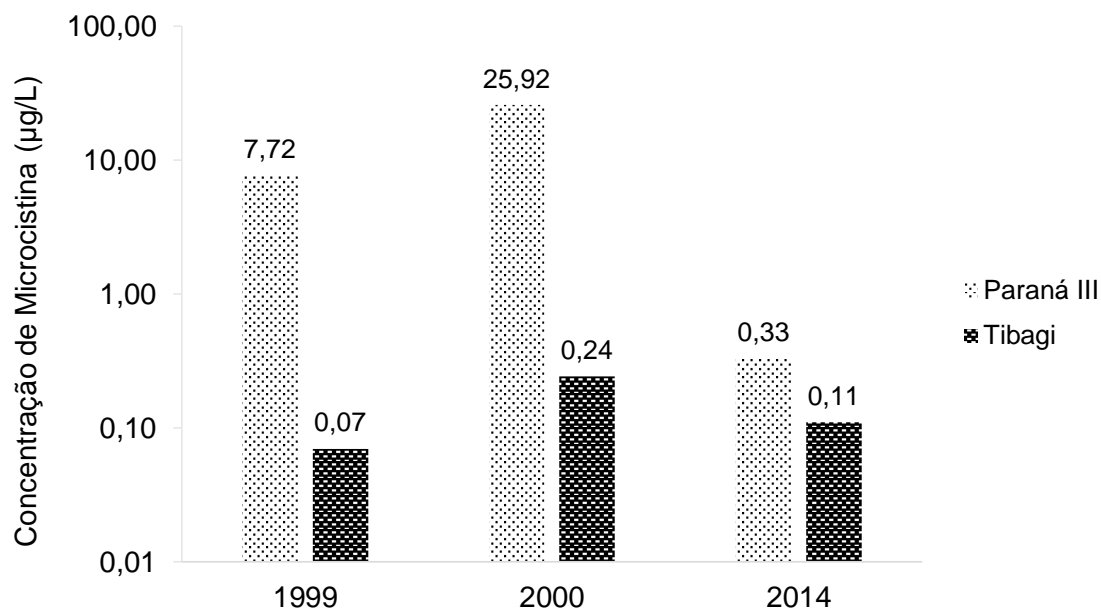


Figura 2 – Níveis médios da contaminação por microcistina nas bacias hidrográficas do Paraná III (Região de Foz do Iguaçu) e Tibagi (Região de Londrina).

Um dos maiores impactos ambientais na bacia do Paraná III ocorreu com o represamento do rio Paraná para a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu (UHI). As obras de construção causaram impactos profundos em toda região do extremo oeste do Estado do Paraná, principalmente em Foz do Iguaçu e municípios próximos. As consequências do impacto da UHI decorrem do volume de mão de obra e serviços associados necessários para a construção, bem como da extensão de terras férteis e infraestruturas submersas pelo lago da usina, implicando em uma série de transformações na paisagem (Enokida e Souza, 2010). Dentre os fatores que caracterizaram a transformação da paisagem, destaca-se as alterações ocorridas na dinâmica hidrológica, no clima

(microclima), na vegetação e na ocupação do solo, acarretando em processos erosivos, assoreamento e contaminação da água (Enokida e Souza, 2010).

Embora a contaminação por microcistina na região de Londrina seja menor, é importante levar em consideração a construção de Usina Hidrelétrica de Mauá (UHM), inaugurada em 2012. A UHM é a primeira de um complexo de seis hidrelétricas projetadas para construção no Tibagi, cujo grande reservatório abasteceria as demais usinas. O licenciamento ambiental para a construção da usina foi tema polêmico na região, principalmente em Londrina, onde inúmeras ações foram propostas por ambientalistas, população ribeirinha, indígena e pesquisadores.

Além das consequências sociais, a construção da usina compromete a qualidade da água do rio Tibagi, manancial de abastecimentos de diversas cidades, incluindo as regiões metropolitanas de Londrina e Apucarana (MENECHINO, 2008). Cerca de 83,3 Km de terra e 5.000 hectares de floresta foram submersos, prejudicando toda a dinâmica ecológica do rio (MOIMAS, ALECRIM e PINHEIRO, 2009). Previamente a construção da usina, a SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná) declarou em carta (CAMPANA, 2008):

“Em caso de floração de cianobactérias no reservatório da UHE Mauá, dependendo do tipo de organismo, da intensidade de floração, das condições do clima, da hidrodinâmica do reservatório e corpos hídricos a montante (até a barragem do reservatório) e a jusante (após o reservatório), as captações de água para abastecimento público da Sanepar em Tibagi, Telêmaco Borba e Londrina, que são influenciadas diretamente por este ecossistema, poderão ser afetadas quanto à presença de biomassa algal. Cita-se o exemplo do fato ocorrido em 2006, em Londrina onde, em condições de estiagem severa, ocorreu uma grande proliferação de algas no manancial. Ressalta-se que a bacia hidrográfica do rio Tibagi apresenta um potencial de aporte difuso de nutrientes bastante significativo, em função do desenvolvimento de atividades agropecuárias intensas”.

O aumento da utilização de fertilizantes na agricultura (IBGE, 2012), aliado ao serviço deficiente de coleta de efluentes domésticos (SEMA, 2013) e aos impactos ambientais provocados pela construção da UHM são fatores contribuintes para eutrofização e comprometimento intenso da bacia do Tibagi na região de Londrina. Neste sentido, o monitoramento é essencial para manutenção da baixa contaminação por microcistina na região de Londrina.

O município de Londrina é permeado por importantes afluentes do Tibagi, os quais fornecem água para consumo, pesqueiros, piscicultura, irrigação e atividades recreacionais. Neste sentido, foram coletadas amostras em diferentes pontos de utilização dos ribeirões Cambé, Cafezal e Três Bocas. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Monitoramento de microcistina no município de Londrina – Paraná.

Local	Ribeirão	Microcistina ($\mu\text{g/L}$)**	
		Fev/14	Mai/14
Piscicultura	-----	ND	ND
Pesqueiro A	Três Bocas	ND	ND
Pesqueiro B	Cafezal	ND	ND
Praça pública	Cambé	ND	ND
CA – SANEPAR *	Cafezal	ND	ND
Águas Termais	Cambé	0,73	----
Lago Igapó	Cambé	0,76	0,92

ND – Não Detectado.

* Captação de Água – SANEPAR.

** A determinação de microcistina foi realizada por ELISA.

A ocorrência de microcistina foi detectada apenas no ribeirão Cambé, e embora os níveis não ultrapassem o limite permitido por legislação, a detecção ocorreu em 100% das amostras. De acordo com o IAP (2011), entre Julho de 2007 e Novembro de 2009 foram coletadas amostras em 14 pontos de monitoramento do ribeirão Cambé, sendo que a qualidade da água foi classificada de muito poluída a medianamente poluída na maioria das amostras. A qualidade da água foi considerada boa em apenas 2 pontos de monitoramento. A microbacia do ribeirão Cambé é alvo de loteamento desde 1940/1950, porém os maiores impactos são resultado do represamento para formação do Lago Igapó (FERREIRA, 2002). A poluição encontrada nos rios de Londrina é predominantemente de origem orgânica. Além disso, os lixos domésticos e a ausência de vegetação ciliar também contribuem para reduzir a qualidade da água (IAP, 2011).

Considerações finais

O comprometimento do recurso hídrico, com consequente contaminação por microcistinas, foi evidenciado nas bacias hidrográficas do Paraná III e Tibagi. Os recursos hídricos sofrem alto impacto pelo escoamento de matéria orgânica e pela construção de Usinas Hidrelétricas. Os resultados apresentados salientam a necessidade de programas de monitoramento e tratamento de água, coleta adequada de esgoto e tratamento de resíduos, aprimoramento de práticas agropecuárias e conscientização da população sobre o perigo da ocorrência de cianobactérias e microcistinas, a fim de minimizar os impactos socioeconômicos resultantes.

Referências

- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K.; Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru. **Brazil. Toxicol.** 181 – 182, p. 441-446, 2002.
- BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquat Microb Ecol**, v. 23, p. 13-27, 2000.
- CAMPANA, F. **Sanepar confirma: Usina de Mauá prejudicará Londrina, Cambé, Tibagi e Telêmaco Borba.** 2008. Disponível em: <http://www.fabiocampana.com.br/2008/10/sanepar-confirma-usina-de-maua-prejudicara-londrina-cambe-tibagi-e-telemaco-borba/>. Acesso em: 12/08/2014.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.** World Health Organization (WHO): 1999.
- DÖRR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S.M. Microcystins in South American aquatic eco- systems: occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.56, p.1247–1256, 2010.
- ENOKIDA, C.H.; SOUZA, E.B.C. A questão ambiental na região de fronteira Brasil e Paraguai: estudo do Lago de Itaipu. **Anais XVI Encontro Nacional dos Geógrafos: “Crise, práxis e autonomia: espaços de resistências e de esperanças”.** Porto Alegre/RS – 2010.
- FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.2, n.1, p.43-50, 2005.
- FERREIRA, Y.N. **Uso do Solo Urbano de Londrina.** Relatório de pesquisa: Londrina, laboratório de pesquisas urbanas e regionais, departamento de geociências, Universidade Estadual de Londrina. 2002.
- FLEMING, L.E.; STEPHAN, W. **Blue green algae, their toxins and public health issues. Report to the Florida Harmful Algal Bloom Taskforce.** NIEHS Marine and Freshwater Biomedical Sciences Center, University of Miami, 2001.
- GORHAM, P.R.; CARMICHAEL, W.W. Hazards of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In: LEMBI, C.A; WAALAND, J.R. **Algae and Human Affairs.** Cambridge University Press, Cambridge, p. 403-432, 1988.
- HOEGER, S.J.; HITZFELD, B.C.; DIETRICH, D.R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 203, p. 231-242, 2005.

HUSZAR, V.I.M.; SILVA, L.H.S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; SANT'ANNA, C.I. **Cyanoprokariote Assemblages in Eight Productive Tropical Brazilian Waters** In: Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology. Shrewsbury, England, p. 67-77, 1998.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004**. Curitiba: Imprensa oficial, 2004.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade das água de microbacias urbanas na região metropolitana de Londrina, norte do Estado do Paraná, no período de 2007 a 2009**. IAP, 2011.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade da água do rio tibagi e barra grande, na área de influência do futuro reservatório de mauá e município de londrina de mauá e município de londrina e município de Londrina– pr, no período de abril de 2010 a dezembro de 2011**. IAP, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – IDS, 2012**.

JÜTTNER, F. Volatile organic substances. In: FAY, I. R.; VAN BAALEN, C. **The Cyanobacteria**. Elsevier, Amsterdam, p. 453-469, 1987.

MENECHINO, L. **UHE Mauá transformará em um imenso lago morto o primeiro rio em diversidade de vida do Paraná**. Ecodebate. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br>. Acesso em: 17 agosto 2008

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environ Int**, v.59, p.303-327, 2013.

MEREL, S.; CLÉMENT, M.; THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. **Toxicon**, v.55, n.4, p.677-691, 2010.

MOIMAS, D.; ALECRIM, A.S.; PINHEIRO, A.C.D. A usina hidrelétrica Máua: interesse do estado antagônico a proteção dos direitos difusos e fatores sociais. **Revista de direito público**, v.4, n.2, p.43-58, 2009.

NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; UENO, Y.; WATANABE, M.F. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. **J AOAC Int**, v.80, n.2, p.408-417, 1997.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.D. Contribution to the Knowledge of Potentially Toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v.71, p.359-385, 2000.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (SEMA). **Bacias Hidrográficas do Paraná – Série Histórica**. 2ª ed., 2013.

SVREK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria Toxins and the Current State of Knowledge on Water Treatment Options: A Review. **Environ Eng Sci**, v.3, n.3, p.155- 185, 2004.

TEIXERA, M.; COSTA, M.; CARVALHO, V.; PEREIRA, M.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull Pan Am Health Org**, v. 27, p. 244-253, 1993.

TISDALE, E.S. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. VA., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. **Am J Public Health**, v. 21, p.198-200, 1931.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.D.; CHEN, G.C.; CHEN, G.; YU, S.Z. Detection of microcystins, a bluegreen algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis** v. 17, p. 1317-1321, 1996.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking water quality**. 2^a ed. Addendum to Volume 2. Geneva, 1998.

YU, S.Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z.Y.; WU, M.C.; XIA, S.S. **Primary Liver Cancer**. p. 30-37. China Academic Publishers/Springer, 1989.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTICIANOBACTÉRIA E REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR LEVEDURAS SELVAGENS

Resumo

O aumento de florações de cianobactérias em todo o mundo é uma preocupação cada vez mais frequente. O tratamento de água convencional não é suficiente para remoção de toxinas dissolvidas, sendo o controle biológico uma alternativa econômica e menos agressiva ao meio ambiente. Neste sentido, o trabalho avaliou o potencial para remoção de microcistinas dissolvidas, bem como para controle de crescimento de cianobactérias, de leveduras selvagens isoladas de usina de açúcar e álcool e formigueiro. A maioria das cepas apresentou bioatividade contra microcistina após 96h, porém apenas 3 removeram mais de 50% da concentração inicial. *Saccharomyces cerevisiae* VI08R removeu 70,3% da concentração inicial de microcistina, com maior atividade nas primeiras 24h de cultivo. A levedura também apresentou potencial para biocontrole de *Synechocystis* spp. e *Anabaena* spp. Investigação sobre os mecanismos de biocontrole de microcistina por levedura sugerem participação metabólica e biossorção. Os resultados apresentados inserem nova perspectiva para o tratamento de água contaminada, com utilização de biocontrole por levedura, além de indicar a possibilidade de outras vias de biodegradação e métodos para remoção de microcistina.

Introdução

A ação antrópica no meio ambiente, com impacto direto aos recursos hídricos, favorece o aumento de florações (*blooms*) de cianobactérias em todo o mundo. A ocorrência dessas florações pode acarretar sérios prejuízos a qualidade da água e à saúde pública, uma vez que pode ocorrer a produção de toxinas (JÜTTNER, 1987; GORHAM e CARMICHAEL, 1988).

As microcistinas são as cianotoxinas mais abundantes naturalmente, e representam o principal desafio perante água potável segura para consumo (HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000). *Microcystis* spp., *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., *Nostoc* spp. e *Anabaenopsis* spp. são os principais produtores de microcistina (BOTES, KRUGRER e VILJOEN, 1982; NAMIKOSHI *et al.*, 1992; NAMIKOSHI *et al.*, 1990; CARMICHAEL *et al.*, 1988). Apesar de 80 análogos terem sido caracterizados, microcistina -LR (MC-LR) é o mais tóxico e de maior ocorrência natural (ERIKSSON *et al.*, 2005). A intoxicação pela toxina afeta o fígado e causa necrose centrilobular, destruição do endotélio sinusoidal, hemorragia intrahepática e choque hipovolêmico (RUNNEGAR e FALCONER, 1982; WICKSTROM *et al.*, 1996; ITO, KONDO e HARADA, 1997).

O tratamento de água convencional remove células de cianobactéria intactas, não ocorrendo o mesmo com as toxinas dissolvidas (DRIKAS *et al.*, 2001). Diversos procedimentos físico-químicos são eficazes para remoção de microcistinas da água (TSUJI *et al.*, 1995; KAYA e SANO, 1998; WESTWICK *et al.*, 2010; MULLER *et al.*, 2009; CHOW *et al.*, 1997; LEE e WALKER, 2008; DIXON *et al.*, 2010), porém a maioria exige combinação com outros procedimentos para remoção completa de cianotoxinas e/ou subprodutos tóxicos da água (MEREL

et al.,2013; ROEGNER *et al.*,2014). Neste sentido, a utilização de controle biológico para o tratamento de água é uma alternativa mais econômica e menos agressiva ao meio ambiente.

A maioria das pesquisas é baseada em bactérias *Sphingomonas* spp., capazes de degradar cianotoxinas, isoladas de locais com ocorrência de *blooms* (JONES *et al.*, 1994; PARK *et al.*, 2001; HO *et al.*, 2007; MARUYAMA *et al.*, 2006; TSUJI *et al.*, 2006), e há poucos relatos de estudos com outros microrganismos. Visando a biorremediação de ambientes eutrofizados e tratamento de água, a utilização de levedura para biocontrole de microcistina, em especial espécies GRAS (*Generally Recognized As Safe*), apresenta uma série de vantagens em relação à bactéria, uma vez que são anaeróbias facultativas e não conferem prejuízos à saúde humana e animal (COOK, 1958). Neste sentido, o trabalho objetivou avaliar o potencial para biodegradação de microcistinas, bem como para controle de crescimento de cianobactérias, de leveduras selvagens isoladas de usina de açúcar e álcool e formigueiro.

Material e Métodos

Microrganismos

A linhagem toxigênica *M. aeruginosa* TAC95 e *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 (utilizada como controle positivo) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Meijo, Nagoya - Aichi – Japão. *Phormidium tenue* NIES 611 foi fornecido pelo *National Institute for Environmental Studies*, Tsukuba, Japão; a cepa PCC6803 de *Synechocystis*

spp. pelo *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria*, Paris, França; e a cepa AU02G de *Anabaena* spp. foi isolada do Lago Sagami, Kanagawa, Japão por Ms. Daiki Fujise. As leveduras analisadas foram isoladas de usinas de açúcar/álcool e formigueiro, pertencentes ao Laboratório de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina – Dra Gisele Maria Andrade de Nóbrega, e Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Rio Claro – Dr. Fernando Pagnocca. A Tabela 1 apresenta a codificação, nome científico e local de isolamento dos microrganismos utilizados.

Cultivo de Microrganismos

As cianobactérias foram cultivadas em meio ASM-1 (Erlenmeyer de 125m) a 27°C sob iluminação ($20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) por 24 h e agitação de 100 rpm. *S. microcystinivorans* B9 foi mantida em meio sólido (Sakurai) a 25°C, incubando-se por 48-72 h e cultivada em meio líquido (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%) a 27° C por 72 h para a realização dos experimentos. As leveduras foram armazenadas em meio YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) + Agar. Para ensaio, procedeu-se cultivo apenas em meio YPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose).

Tabela 1 – Microrganismos – cepas, nome científico e local de isolamento

Tipo	Cepa	Nome Científico	Local de Isolamento
	VI08 R [▪]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina A/A
	VI07 L [▪]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	VI07 R1 [▪]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	VI07 R2 [▪]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	PI06 R1 [*]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	PI06 R2 [*]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	SB	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Comercial
Levedura	AIM A12	<i>Pichia caribbica</i>	Formigueiro
	PBM52	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	S7	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
	DC4M	<i>Candida chickasaworum</i>	
	LJ3	<i>Candida tropicalis</i>	
	PBM 63	<i>Candida metapsilosis</i>	
	PT1-1Basp		
	PI II 64		
	N8a		
	Sia 24.1		
	N12 a2		
	FB8		
	BR6 2AI	Yeast ^{NI}	
	TO 018		
	TO 011		
BR3 3BY			
BR6 2AY			
CG8 8BY			
N4 ap2			
Bacteria	B9	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i>	LE – Japão
	TAC 95	<i>Microcystis</i> sp.	
Cianobactéria	AU 02G	<i>Anabaena</i> sp.	LE – EUA
	NIES 611	<i>Phormidium tenue</i>	
	PCC 6803	<i>Synechocystis</i> sp.	

[▪] Leveduras isoladas da usina de açúcar e álcool Vale do Ivaí, Paraná, Brasil.

^{*} Leveduras isoladas da usina de açúcar e álcool Pioneiros, São Paulo, Brasil.

^{NI} Não Identificada.

^{LE} Lago Eutrófico.

Usina A/A Usina de açúcar e álcool.

Extrato de Microcistinas

O extrato de microcistinas (MCE) foi obtido de culturas de *Microcystis* spp. TAC95. Após obtenção de biomassa, os cultivos foram congelados e descongelados três vezes, procedendo-se liofilização e ressuspensão de 1g em 1 L de água ultrapura. Foi realizada filtragem sequencial a vácuo utilizando membranas com porosidade de 0,8, 0,45 e 0,2 μm . A quantificação de microcistinas foi realizada por ELISA (*Enzyme-Linked immunosorbent Assay*) – kit comercial Beacon Analytical Systems Inc, USA; o extrato foi estocado a -20°C em garrafas de vidro.

Potencial para Remoção de Microcistina

Oito mililitros do MCE foram adicionados em frascos de Erlenmeyer, juntamente com 1 mL de cultivo de levedura (10^7 células), 1 mL de meio YPD e 0,5 % de cloranfenicol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os controles positivos foram executados utilizando 1 mL de cultivo de *S. microcystinivorans* B9 e 1 mL de meio Sakurai, sem adição de cloranfenicol. Para os controles negativos, 1 mL de água ultrapura foi utilizada para substituir os microrganismos. Amostras foram coletadas para contagem celular (câmara de Neubauer) em $t_{24\text{h}}$ e $t_{96\text{h}}$, sendo adicionadas de formaldeído e estocadas a 4°C . Após incubação a 30°C (150 rpm) por 96 h, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g; 15 min), sendo o sobrenadante coletado para determinação de microcistinas por ELISA (Beacon Analytical Systems Inc, USA e Envirologix TM, USA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram estocadas em frascos de vidro a -20°C .

Avaliação da Atividade Anticianobactéria

Após analisar o potencial de remoção de microcistina, a cepa apresentando melhor perfil (VI08R) foi selecionada para prosseguir com o teste de antagonismo contra cianobactérias. As quatro espécies de cianobactérias utilizadas foram *P. tenue* NIES611, *Synechocystis* spp. PCC6803, *Anabaena* spp. AU02G e *M. aeruginosa* TAC 95. Para avaliar a atividade anticianobactéria foram adicionadas 10^7 células de levedura, ou 1 mL de bactéria B9, bem como 1 mL de meio específico (YPD e Sakurai, respectivamente) às culturas pré-cultivadas de cianobactérias em meio ASM-1. Após 96h de incubação (27°C; iluminação 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 100 rpm), foram coletadas amostras para determinação da concentração de clorofila-a pelo método espectrofotométrico segundo APHA, AWWA, WEF (2005) e para contagem celular em câmara de Neubauer.

Cinética da Remoção de Microcistina

Para avaliar o perfil/curva de remoção de microcistinas, culturas de *S. cerevisiae* VI08R foram submetidas a atividade contra microcistina conforme descrito anteriormente. A incubação foi a 30°C, 150 rpm, por 120h, sendo coletadas amostras a cada 24h. As concentrações de microcistina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Bioatividade de S. cerevisiae VI08R Contra Microcistinas

Para avaliar se a redução dos níveis de microcistina por leveduras provém de atividade metabólica ou biossorção, células de *S. cerevisiae* VI08R foram

autoclavadas ou pasteurizadas, sendo co-culturas com microcistina, conforme descrito anteriormente, com incubação a 30°C, 150 rpm, por 96h. A determinação de microcistina foi realizada por ELISA.

Determinação da Atividade Killer

O teste *killer* foi realizado a fim de averiguar se há relação com a bioatividade de leveduras contra microcistina e/ou cianobactérias. A metodologia foi realizada conforme descrito por Polonelli *et al.* (1983). Foram utilizadas 8 cepas de leveduras (VI08R, PBM63, SB, VI07L, S7, TO018, PI07R1, N12a2). A linhagem de levedura sensível utilizada foi *S. cerevisiae* NCYC 1006, e o controle positivo foi executado com *S. cerevisiae* NCYC 738.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As amostras foram preparadas utilizando coluna C18 Sep-Pak® (Waters) pré-condicionada com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura. Um mililitro de amostra foi passado pela coluna, seguido de 5 mL de água ultrapura, 5 mL de metanol 20% e 5 mL de metanol 90%. As microcistinas foram eluídas em 5 mL de metanol 100%, secas em N₂ e estocadas a -20°C. Para determinação da concentração de microcistina as amostras secas foram ressuspensas em 100 µL de metanol e agitadas em vórtex por 1 minuto. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, constituído de um sistema de bombeamento de solvente LC-10AD, gerenciado por uma interface CBM-20A, válvula injetora Rheodyne® com alça de amostragem de 20 µL e forno de coluna CTO-20AC. O sistema é acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, onde a aquisição de dados e o controle do instrumento foram

realizados por um microcomputador pelo software LC Solutions®. A separação cromatográfica foi isocrática, fase móvel metanol : acetonitrila : acetato de amônio 20 mM (10: 28: 62, v/v), com vazão de 1 mL por minuto, em coluna de guarda C₁₈ (4 x 3.0 mm - Phenomenex®) e coluna Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm - Phenomenex®) em 11 min de corrida. A coluna foi mantida a 30 °C e o comprimento de onda monitorado 238 nm. A quantificação de microcistina LR consistiu na comparação das áreas obtidas nos cromatogramas das amostras com as áreas dos padrões externos, além da verificação do tempo de retenção e espectro obtido.

Resultados e Discussão

Remoção de microcistina por leveduras

A remoção de microcistina por leveduras variou de 0,6 a 70,3 %; 9 cepas não apresentaram bioatividade, e apenas 3 cepas (VI08R, PBM63 e SB) removeram microcistina acima de 50% (Tabela 2). A taxa de biodegradação do controle positivo foi acima de 90 % indicando adequação dos parâmetros experimentais.

Saccharomyces cerevisiae VI08R apresentou a maior bioatividade (70,3%), seguida por *C. metapslosis* PBM63 (57,4%) e *S. boulardii* (52,9%), a qual é probiótica. É importante ressaltar que entre essas 3 linhagens, os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey (Tabela 2), indicando que as leveduras apresentam atividades similares contra microcistina.

Embora tenha potencial para remoção de microcistina, *C. metapsilosis* PBM 63, previamente denominada *C. paraparsilosis* grupo III (TAVANTI *et al.*, 2005), é frequentemente isolada de amostras de sangue das populações América Latinas e Asiáticas, sendo associada com infecção sanguínea em recém-nascidos e candidemia como resultado de uso de cateteres ou hiperalimentação intravenosa (KRCMERY e BARNES, 2002). Portanto, a aplicação no tratamento de água poderia acarretar danos à saúde humana e animal.

Por outro lado, *S. cerevisiae* VI08R e *S. boulardii*, as quais apresentaram taxas de biodegradação de 70,3 e 52,9 %, respectivamente, são consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), uma característica vantajosa para aplicação no tratamento de água.

As pesquisas realizadas com *Sphingomonadaceae* constantemente apresentam resultados com taxas de degradação diversas dependendo da espécie e cepa de bactéria, bem como dos análogos de microcistina. Ame *et al.* (2006) isolaram *Sphingomonas* spp. CBA4 do reservatório de San Roque (Cordoba, Argentina), obtendo degradação completa de 200 µg/L de MC-RR em 36h. *Sphingomonas* spp. ACM 3926 degradou 80 % da concentração inicial de MC-LR (100 µg/L) após 6 dias (ELEUTERIO e BATISTA, 2010). *Sphingopyxis* spp. LH21 degradou 99 % de MC-LA e MC-LR após 3 dias. *S. microcystinivorans* B9 removeu completamente MC-LR após 1 dia, e 80 % de MC-RR continuamente adicionada (600 µg), por 2 meses (TSUJI *et al.*, 2006). Nota-se, que assim como observado para as bactérias, as taxas de biodegradação/remoção de microcistina por leveduras (Tabela 2) variam de acordo com a espécie e cepa.

Tabela 2 – Remoção de microcistina por leveduras.

Microrganismo	Cepa	Células/mL		Degradação de Microcistina (%)
		t _{24h}	t _{96h}	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VI08R	8,00 E+07	2,08 E+07	70,3 ^a
<i>Candida metapsilosis</i>	PBM63	7,38 E+07	5,80 E+07	57,4 ^{ab}
<i>Saccharomyces boulardii</i>	SB	2,70 E+08	3,75 E+07	52,9 ^{ab}
Levedura NI	N12a2	2,10 E+08	2,80 E+07	45,2 ^{bc}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VI07L	3,03 E+07	1,52 E+06	43,9 ^{bcd}
<i>Issatchenkia orientalis</i>	S7	4,70 E+07	3,10 E+07	36,2 ^{bcde}
<i>Pichia caribbica</i>	AIMA12	8,00 E+07	1,36 E+07	36,1 ^{bcde}
Levedura NI	PT1-1BASP	1,55 E+08	1,33 E+08	32,4 ^{bcdef}
<i>Candida chickasaworum</i>	DC4M	6,48 E+08	3,70 E+08	31,4 ^{bcdef}
Levedura NI	PI264	4,70 E+07	2,75 E+07	28,6 ^{cdef}
Levedura NI	N8A	1,58 E+06	1,25 E+06	25,6 ^{defg}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PI07R1	8,43 E+08	4,35 E+08	19,1 ^{efgh}
Levedura NI	Sia24.1	1,13 E+07	2,65 E+06	15,7 ^{efgh}
Levedura NI	FB8	4,81 E+07	7,70 E+07	14,1 ^{fgh}
Levedura NI	BR62AI	9,10 E+07	1,40 E+06	8,5 ^{gh}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PI07R2	7,73 E+08	2,93 E+08	6,3 ^{gh}
<i>Pichia guilliermondii</i>	PBM52	9,15 E+07	2,50 E+06	2,9 ^h
Levedura NI	CG88BY	8,50 E+07	2,10 E+07	1,3 ^h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PI06R1	1,87 E+08	4,30 E+07	0,6 ^h
<i>Candida tropicalis</i>	LJ3	1,01E+08	2,75 E+07	0,6 ^h
Levedura NI	AIMA7	2,76 E+07	1,96 E+07	0,6 ^h
Levedura NI	VI07R1	5,14 E+07	3,85 E+07	0 ^h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PI06R2	1,03 E+07	7,42 E+06	0 ^h
Levedura NI	BR33BY	2,28 E+08	1,98 E+08	0 ^h
Levedura NI	VI07R2	2,76 E+08	2,10 E+08	0 ^h
Levedura NI	TO018	1,83 E+08	8,05 E+06	0 ^h
Levedura NI	TO011	2,55 E+07	9,90 E+05	0 ^h
Levedura NI	BR62AY	1,83 E+08	8,05 E+06	0 ^h
Levedura NI	TO217	1,16 E+08	4,05 E+07	0 ^h
Levedura NI	N4ap2	5,35 E+07	7,15 E+07	0 ^h

* Média de três repetições. Valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Leveduras foram co-cultivadas com microcistina por 96h (30°C, 150rpm). A determinação de microcistina foi realizada por ELISA.

^{NI} Não identificado.

Embora a biodegradação bacteriana de microcistinas seja notável, a aplicação de leveduras no tratamento de água pode ser mais vantajosa, pois apresentam facilidade de crescimento e adaptação, além do metabolismo anaeróbio facultativo (COOK, 1958), o qual favorece a colonização de ambiente eutrofizado. Além disso, bactérias são mais propensas a sofrer mutação e/ou adquirir resistência a antibióticos, o que poderia acarretar danos à saúde pública. Este dado deve ser levado em consideração, uma vez que a presença de genes de resistência a antibióticos é frequente em águas superficiais (YANG e CARLSON, 2003). Além disso, diversos estudos apontam que a resistência clínica a antibióticos é relacionada a presença de genes de resistência e bactérias no meio ambiente (TATAVARTHY *et al.*, 2006; PRABHU *et al.*, 2007; ABRIOUEL *et al.*, 2008).

Atividade anticianobactéria

Com base nos dados descritos anteriormente, *S. cerevisiae* VI08R foi selecionada para os testes de antagonismo contra 4 espécies de cianobactérias (Tabela 3). Co-culturas com VI08R e *P. tenue* NIES 611 apresentaram aumento de 6,7 µg/L nos níveis de clorofila-a após 96h. O controle negativo para *P. tenue* NIES 611 apresentou decréscimo de 50 % de clorofila-a em t_{96h} ; entretanto, a contagem celular permaneceu inalterada. Aumento de 13,4 µg/L de clorofila-a em t_{96h} também foi observado nas culturas *Microcystis* spp. TAC95, tanto para o controle negativo quanto para cultivo com *S. cerevisiae* VI08R.

Embora a contagem celular de cianobactérias tenha permanecido inalterada após o período de incubação em todas as amostras (10^6 células/mL), ressalta-se que não foram utilizados corantes vitais, ou seja, não houve distinção entre

células viáveis e não viáveis. Ainda que não tenha sido observado decréscimo na contagem celular, co-culturas de *Synechocystis* spp. PCC 6803 e *S. cerevisiae* VI08R apresentaram redução de 6,7 µg/L nos valores de clorofila-a após 96h, enquanto no controle negativo foi detectado acréscimo de 6,7 µg/L, indicando atividade antagônica.

Tabela 3 – Atividade anticianobactéria de *Saccharomyces cerevisiae* VI08R

Cianobactéria	Levedura *	Cianobactéria **				
		Clorofila-a (µg/L)			Contagem celular (celúlas/mL)	
		t _{0 h}	t _{96 h}	T (96 h – 0 h)	t _{0 h}	t _{96 h}
<i>Phormidium tenue</i> NIES 611	-	66,8	33,4	- 33,4	2,43 x 10 ⁶	1,65 x 10 ⁶
	VI08R	66,8	73,5	6,7	1,68 x 10 ⁶	2,98 x 10 ⁶
<i>Synechocystis</i> spp. PCC 6803	-	113,6	120,3	6,7	1,70 x 10 ⁶	2,93 x 10 ⁶
	VI08R	73,5	66,8	- 6,7	2,45 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶
<i>Anabaena</i> spp. AU 02G	-	240,6	300,7	60,1	1,48 x 10 ⁶	1,60 x 10 ⁶
	VI08R	447,7	180,4	- 267,6 / 60,2***	1,43 x 10 ⁶	1,58 x 10 ⁶
<i>Microcystis</i> spp. TAC 95	-	120,3	133,7	13,4	1,35 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁶
	VI08R	93,5	106,9	13,4	1,15 x 10 ⁶	1,83 x 10 ⁶

* VI08R indica amostras inoculadas com *S. cerevisiae* VI08R. O sinal (-) indica controle negativo.

** Média de duas repetições. Cultura pré-condicionadas de cianobactérias foram inoculadas com 10⁶ células de *S. cerevisiae* VI08R e incubadas por 96h (27°C; iluminação 20 µE.m^{-2.s}⁻¹; 100 rpm).

*** A subtração de valores foi realizada entre VI08R 96h e (-) 0h.

Efeito similar foi observado nas co-culturas de *S. cerevisiae* VI08R e *Anabaena* spp. AU 02G. Após 96 h, os níveis de clorofila-a aumentaram 60,1 µg/L no controle negativo, enquanto que nas amostras inoculadas com a levedura houve decréscimo de 267,6 µg/L. É importante destacar que os níveis de clorofila-a em t_{0h} foram bastante divergentes no controle negativo e co-culturas com levedura (240,6 e 447,7 µg/L, respectivamente). Ainda assim, há indícios de atividade

antagônica de *S. cerevisiae* VI08R contra *Anabaena* spp. AU02G, uma vez que também houve redução de 60,2 µg/L de clorofila-a em comparação com o controle negativo t_{0h}.

M. aeruginosa é uma das cianobactérias tóxicas de maior ocorrência no Brasil, sendo encontrada em diferentes locais tanto de regiões tropicais quanto de subtropicais (SANT'ANNA *et al.*, 2008). *S. cerevisiae* VI08R não mostrou antagonismo contra *Microcystis* spp. TAC 95, porém foi capaz de controlar o crescimento de *Anabaena* spp., a qual, juntamente com *Microcystis* spp., é um dos gêneros com maior número de espécies tóxicas em águas brasileiras (SANT'ANNA *et al.*, 2008).

Mecanismos Envolvidos na Bioatividade de Levedura Contra Microcistina

Não há relatos na literatura sobre a utilização de leveduras para biocontrole de microcistina. Portanto, a fim de elucidar os possíveis mecanismo associados à bioatividade de leveduras, o caráter *killer*, a cinética de remoção de microcistina e a relação com a viabilidade celular.

O processo de controle biológico é complexo, e pode envolver uma série de mecanismos, embora o papel funcional de alguns deles não tenha sido ainda elucidado (WISNIESWSKI *et al.*, 1991; SHARMA, SINGH e SINGH, 2009; JAMALIZADEH *et al.*, 2011). O caráter *killer* de leveduras é aproveitado em diversos setores para antagonismo/biocontrole de microrganismo indesejado (BORTOL *et al.*, 1986; BOONE *et al.*, 1990; MORACE *et al.*, 1989; BOEKHOUT E SCORZETTI, 1997; BUZZINI E MARTINI, 2001, SCHMITT e BREINIG, 2002).

Neste sentido, para avaliar se a atividade *killer* poderia estar relacionada à bioatividade contra microcistinas e/ou cianobactérias, 8 cepas de leveduras foram avaliadas. Apenas 2 cepas (S7 e N12a2) apresentaram discreta descoloração ao redor do inóculo, não sendo observada formação de zona de inibição (Figura 1). Ressalta-se que a formação de zona de inibição no controle positivo (NCYC 738) ocorreu somente após 7 dias de incubação. Leveduras com maior potencial para remoção de microcistina (Tabela 2) não apresentaram atividade *killer* contra NCYC 1006.



Figura 1 – Caráter *killer* de leveduras selvagens – Zona de inibição ao redor do controle positivo (NCYC 738). Leve descoloração ao redor de colônias das leveduras S7 e N12A2.

Embora não tenha sido observada correlação entre caráter *killer* e bioatividade de leveduras, é importante notar que apenas uma cepa sensível foi utilizada (NCYC 1006), e que os parâmetros de pH foram mantidos conforme descrito por Pononelli *et al.* (1983). Portanto, análises adicionais em faixas de pH diferentes, bem como utilização de outras cepas sensíveis, devem ser realizadas para confirmação do resultado.

Para avaliar se a capacidade de remoção de microcistina por leveduras é associada ao metabolismo enzimático e/ou biossorção, células autoclavadas e

pasteurizadas de *S. cerevisiae* VI08R foram utilizadas e os resultados foram comparados aos obtidos com células viáveis. Dois experimentos foram executados da mesma forma, porém resultados distintos foram obtidos (Figura 2). No experimento 1, a determinação de microcistinas foi realizada por ELISA e confirmada por CLAE-PDA, sendo que não foi detectada redução dos níveis de toxina em nenhuma das amostras (Figura 2), contrastando com os resultados obtidos anteriormente para VI08R, onde células viáveis mostraram redução de 70,3% da microcistina inicial. Os resultados obtidos podem ser consequência da inviabilidade celular da levedura utilizada, da fase de crescimento celular ou de condições experimentais inapropriadas. Portanto, um segundo experimento foi realizado, utilizando os mesmos parâmetros utilizados anteriormente. Os resultados obtidos (Figura 2) indicam que há atividade metabólica, com degradação de toxinas, bem como adsorção, sendo que células vivas de *S. cerevisiae* VI08R promovem remoção mais eficiente de microcistina.

Leveduras, em especial *S. cerevisiae*, são amplamente utilizadas e pesquisadas como agentes de bioissorção e biodegradação. Embora os mecanismos para bioatividade contra toxinas não tenham sido esclarecidos (FOMINA e GADD, 2014), pesquisas também indicam que tanto o metabolismo quanto a adsorção são importantes na remoção de toxinas. Resultados semelhantes aos apresentados foram obtidos por PETRUZZI *et al.* (2014), que demonstraram remoção de 3,69 a 81,87% de ocratoxina A (OTA) por leveduras vivas; a aplicação isolada de parede celular, no entanto, promoveu redução entre 2,47 a 50% de OTA. A atividade metabólica parece desempenhar papel essencial para bioatividade de leveduras contra microcistina, embora mecanismos de bioissorção também sejam importantes. Portanto, a viabilidade celular e fase de

crescimento da levedura provavelmente influenciam no potencial de remoção de microcistina. Neste sentido, a taxa de redução diária de microcistina por *S. cerevisiae* VI08R foi investigada.

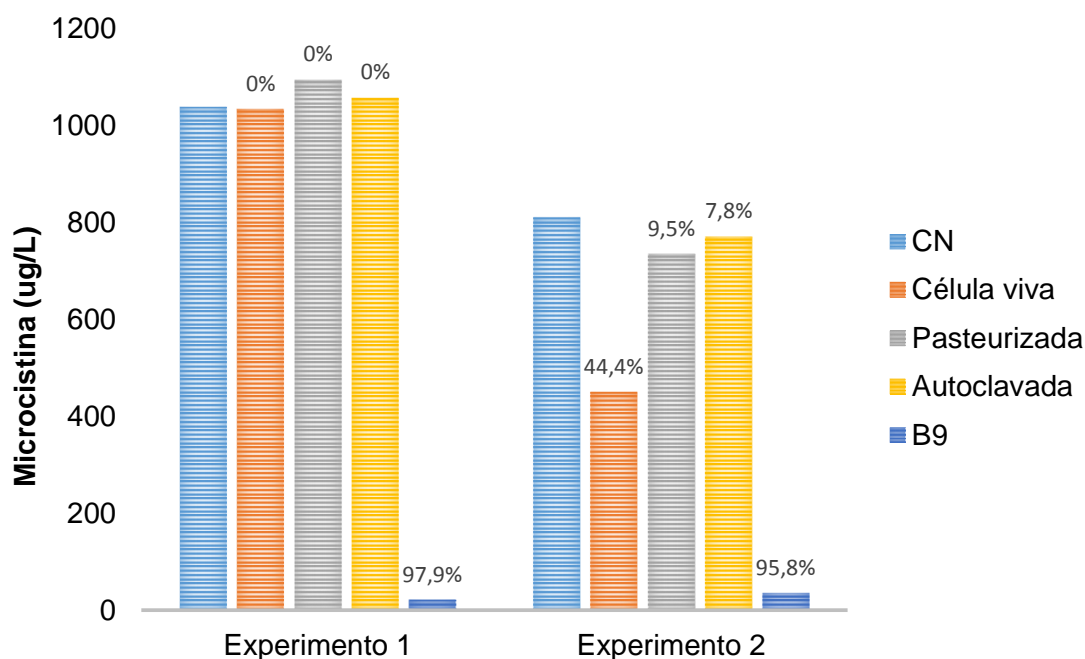


Figura 2 – Remoção de microcistina por células vivas, pasteurizadas e autoclavadas de *Saccharomyces cerevisiae* VI08R em dois experimentos. O eixo y mostra a concentração de microcistina; os valores sobre as barras indicam a porcentagem de remoção em relação ao controle negativo (CN). B9 indica o controle positivo (*Sphingosinicella microcystinivorans* B9).

A curva obtida (Figura 3) mostra que a maior atividade contra microcistina ocorreu nas primeiras 24h de cultivo, coincidindo com as fases de adaptação e exponencial de crescimento da levedura. Após esse período, não foi obtida redução significativa da concentração inicial de microcistina. Da mesma forma, diversos autores relatam que, embora muitas vezes não haja remoção completa de microcistina por biodegradação bacteriana, as quedas mais significativas nos níveis da toxina ocorrem entre as primeiras 3h e 24h (SAITO *et al.*, 2003;

IMANISHI *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2007; OKANO *et al.*, 2009, HU *et al.*, 2009; HO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

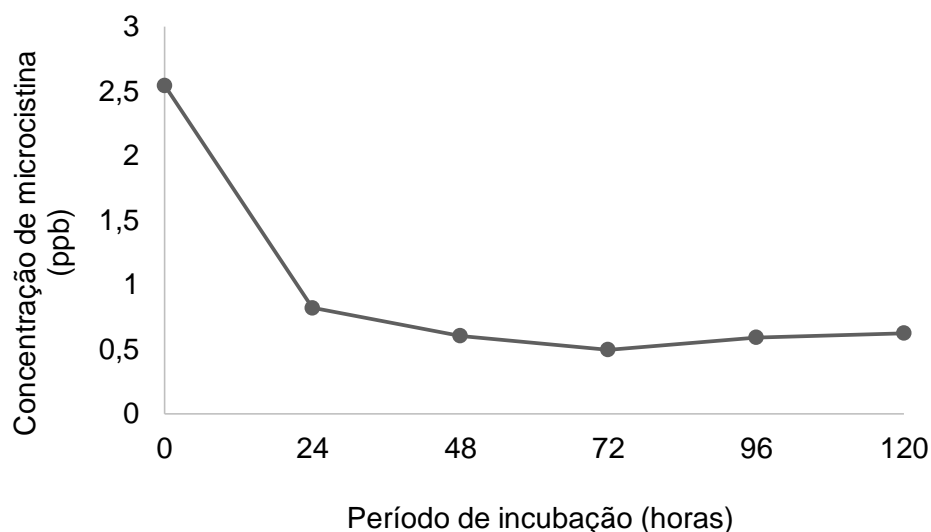


Figura 3 – Cinética de remoção de microcistina por *Saccharomyces cerevisiae* VI08R. A levedura foi co-cultivada com microcistina; amostras foram coletadas a cada 24h e a determinação de toxina foi realizada por CLAE-PDA

Considerações Finais

O presente trabalho demonstrou o potencial de remoção de microcistina e controle de crescimento de cianobactérias por leveduras, com enfoque na utilização de *S. cerevisiae* VI08R. A utilização de biocontrole para degradação de microcistina geralmente tem enfoque na utilização de *Sphingomonas*, sendo que poucos estudos demonstram que esse fenômeno em outros microrganismos (MANAGE *et al.*, 2009; MERILUOTO *et al.*, 2005; NYBOM *et al.*, 2008; SURONO *et al.*, 2008; JIA *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2012). Os resultados apresentados inserem nova perspectiva para o tratamento de água contaminada com microcistina, com utilização de biocontrole por levedura, além de indicar a

possibilidade de outras vias de biodegradação e formas de remoção de microcistina.

Referências

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R.L.; GRANDE, M.J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Int J Food Microbiol**, v. 123, p. 38-49, 2008.

AME, M.V.; ECHENIQUE, J.R.; PFLUGMAGER, S.; WUNDERLIN, D.A. Degradation of microcystin –RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba – Argentina). **Biodegrad**, v.17, p.447-455, 2006.

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

BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 35, n. 2, p. 147-149, 1997.

BOONE, C.; SOMMER, S.S.; HENSEL, A.; BUSSEY, H. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. **The Rockefeller University Press**, v. 110, n. 5, p.1833-1843, 1990.

BORTOL, A.; NUDEL, C.; FRAILE, E.; TORRES, R.; GIULIETTI, A.; SPENCAR, J.F.T.; SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. **Applies Microbiol Biotechnol**, v.24, n.5, p. 414-416, 1986.

BOTES, D.P.; KRUGER, H.; VILJOEN, C.C. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 20, p. 945-954, 1982.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Medical Mycology**, v.39, n.6, p. 479-482, 2001.

CARMICHAEL, W.W.; ESCHEDOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L 575 from New Zealand. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, p.2257-2263, 1988.

CHOW, C. W. K.; PANGLISCH, S.; HOUSE, J.; DRIKAS, M.; BURCH, M. D.; GIMBEL, R. A study of membrane filtration for the removal of cyanobacterial cells. **Journal of Water SRT. Aqua**, v.46, n.6, p.324-334, 1997.

COOK, A. H. **The chemistry and biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958.

DIXON, M.B.; FALCONET, C.; HO, L.; CHOW, C.W.K.; O'Neill, B.K.; Newcombe, G. Nanofiltration for the removal of algal metabolites and the effects of fouling. **Water Sci Technol**, v.61, n.5, p.1189–1199, 2010.

DRIKAS, M.; CHOW, C.W.K.; HOUSE, J.; BURCH, M.D. Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. **J AWWA**, v. 93, n. 2, p. 100-111, 2001.

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

ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J.A.O.; KARAKI, H.; HAN, Y.G.; FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-Green algal) toxins in drinking water. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2005.

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Biores Technol**, v.160, p.3-14, 2014.

GORHAM, P.R.; CARMICHAEL, W.W. Hazards of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In: LEMBI, C.A; WAALAND, J.R. **Algae and Human Affairs**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 403-432, 1988.

HITZFELD, B.C.; HOGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. **Environ Health Persp**, v.1, n.08, Supplement 1, 2000.

HO, L.; GAUDIEUXB, A.L.; FANOKA, S.; NEWCOMBEA, G.; HUMPAGE, A.R. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, v. 50, p. 438–441, 2007.

HO, L.; HOEFEL, D.; PALAZOT, S.; SAWADE, E.; NEWCOMBE, G.; SAINT, C.P.; BROOKES, J.D. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters. **J Hazard Mater**, v.180, p.628–633, 2010.

HU, L.; ZHANG, F.; LIU, C.; WANG, M. Biodegradation of microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. **Energy Procedia**, v.16, p.2054–2059, 2012.

HU, L.B.; YANG, J.D.; ZHOU, W.; YIN, Y.F.; CHEN, J.; SHI, Z.Q. Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. **New Biotechnol**, v.26, p.205–211, 2009.

IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; TSUJI, K.; HARADA, K.I. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. **Chem Res Toxicol**, v. 18, n. 3, p. 591-598, 2005.

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K.I.; Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. **Toxicon** v. 35, p. 231-239, 1997.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H.R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, v.41, n.1, p.65-71, 2011.

JIA, Y.; JINGJING, D.; FUQIANG, S.; GUIYING, Z.; XINGJUN, T. A Fungus Capable of Degrading Microcystin-LR in the Algal Culture of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Applied Biochem Biotechnol**, v.166, n.4, p.987-996, 2012.

JONES, G.J.; BOURNE, D.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. **Nat Toxins**, v. 2, p. 228-235, 1994.

JÜTTNER, F. Volatile organic substances. In: FAY, I. R.; VAN BAALEN, C. **The Cyanobacteria**. Elsevier, Amsterdam, p. 453-469, 1987

KAYA, K.; SANO, T. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. **Chem Res Toxicol**, v.11, p.159–163, 1998.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infection**. v.50, p.243-260, 2002.

LEE, J.; WALKER, H.W. Mechanisms and Factors Influencing the Removal of Microcystin-LR by Ultrafiltration Membranes. **J Memb Sci**, v.320, n.1-2, p.240-247, 2008.

MANAGE, P.M.; EDWARDS, C.; SINGH, B.K.; LAWTON, L.A. Isolation and identification of novel microcystin degrading bacteria **Appl Environ Microbiol**, doi:10.1128/AEM.01928-09, 2009.

MARUYAMA, T. PARK, H. OZAWA, K. TANAKA, Y. SUMINO, T. HAMANA, K. HIRAIISHI, A. KATO, K. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. Nov., sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. **Int J of S and Evolutionary Microbiol**, 2006.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environ Int**, v.59, p.303-327, 2013.

MERILUOTO, J.; GUEIMONDE, M.; HASKARD, C.A.; SPOOF, L.; SJOVALL, O.; SALMINEN, S. Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. **Toxicon**, v.46, p.111e114, 2005.

MORACE, G.; MANZARA, S.; DETTORI, G.; FANTI, F.; CONTI, S.; CAMPANI, L.; POLONELLI, L.; CHEZZI, C. Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. **Eur J Epidemiol**, v.5, n.3, p.303–310, 1989.

MULLER, C.C.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T.; CYBIS, L.F. Powdered Activated Carbon Adsorption for Microcystin Removal from Public Water Supply. **Eng Sanit Ambiental**, v.14, p.29-38, 2009.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. **J Org Chem**, v. 55, p.6135-6139, 1990.

NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Two new L-serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* sp. Strains 202 AI and 202 A2. **Toxicol**, v. 30, p.1457-1464, 1992.

NYBOM, S.M.K.; SALMINEN, S.J.; MERILUOTO, J.A.O. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. **Toxicol**, v.52, p.214-220, 2008.

OKANO, K.; SHIMIZU, K.; KAWAUCHI, Y.; MASEDA, H.; UTSUMI, M.; ZHANG, Z.; NEILAN, B.A.; SUGIURA, N. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. **J Toxicol**, p.1-8, 2009.

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**, v. 16, n. 4, p. 337-343, 2001.

PETRUZZI, L.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A. Decontamination of ochratoxin A by yeasts: possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.98, n.15, p.6555-6567, 2014.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J. Clin. Microb**, v.17, p.774-780, 1983

PRABHU, D.I.G.; PANDIAN, R.S.; VASAN, P.T. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. **Indian J Exp Biol**, v. 45, p.817-823, 2007.

ROEGNER, A.F.; BRENA, B.; GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; PUSCHNER, B. Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies. **J Appl Toxicol**, v.34, n.5, p.441-457, 2014.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R.; The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **S Afr J Sci** v. 78, p. 363-366, 1982.

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-degradation gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiol Letters**, v. 229, p. 271-276, 2003.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; DE CARVALHO, L.R. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algolog Stud**, v.126, p.251-265, 2008.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiol Rev**, v.26, n.3, p.257-276, 2002.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v.50, n.3, p.205-221, 2009.

SURONO, I.S.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; MERILUOTO, J. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. **Food Chem Toxicol**, v.46, p.502-507, 2008.

TATAVARTHY, A.; PEAK, K.; VEGUILLA, W.; REEVES, F.; CANNONS, A.; AMUSO, P.; CATTANI, J. Comparison of antibiotic susceptibility profiles and molecular typing patterns of clinical and environmental *Salmonella enterica* serotype Newport. **J Food Prot**, v. 69, p. 749-756, 2006.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**, v.43, p.284-292, 2005.

TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. degradation of microcystin using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 117-124, 2006.

TSUJI, K.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABE, M.F.; NAKAZAWA, H.; 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**, v.33, p.1619-1631, 1995.

WANG, J.; WU, P.; CHEN, J.; YAN, H. Biodegradation of Microcystin-RR by a New Isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **Chin.J.Chem.Eng.**, v.18, n1, p. 108-112, 2010.

WESTWICK, J.A.; SZLAG, D.C.; SOUTHWELL, B.J.; SINCLAIR, J. A Review of Cyanobacteria and Cyanotoxins Removal/Inactivation in Drinking Water Treatment. **Anal Bioanal Chem**, v.397, n.5, p.1705-1514, 2010.

WICKSTROM, M.; HASCHEK, W.; HENNINGSEN, G.; MILLER, L.A.; WYMAN, J.; BEASLEY, V. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. **Nat Toxins** v. 4, p. 195-205, 1996.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S. **The use of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*.** 1991. In: WILSON, C.; CHALUTZ, E. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-92, p.167-183.

YANG, S.; CARLSON, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water res**, v. 37, p. 4645-4656, 2003.

CAPÍTULO 3

DETECÇÃO E CLONAGEM DOS GENES PARA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA DE *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

Resumo

A utilização do biocontrole para tratamento de água contaminada por microcistina vem ganhando destaque pela eficiência de remoção, baixo custo e impacto ao meio ambiente. *Sphingomonas* spp. apresenta alta capacidade para degradação de microcistina, sendo que a atividade contra a toxina ocorre devido à presença de um *cluster* gênico o qual codifica para enzimas específicas para degradação da microcistina. No presente trabalho foi realizada detecção, isolamento e caracterização dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9, bem como clonagem em *Escherichia coli*. As análises de similaridade confirmaram identidade dos genes com aqueles de outras bactérias. Os resultados obtidos permitem compreensão mais detalhada da via de biodegradação de microcistina de *S. microcystinivorans* B9, além de fornecerem informações importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de água contaminada com cianotoxinas.

Introdução

A contaminação de água por microcistinas é um problema global cujo tratamento representa um desafio, uma vez que as metodologias convencionais não promovem remoção das toxinas dissolvidas. A utilização do biocontrole para tratamento de água contaminada por cianotoxinas vem ganhando destaque pela eficiência de remoção, baixo custo e impacto ao meio ambiente. Há na literatura diversos relatos sobre a biodegradação de microcistinas por microrganismos, em especial bactérias do gênero *Sphingomonas* (BOURNE *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1994; ISHI *et al.*, 2004; HARADA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2003; HO *et al.*, 2007; ZHANG, PAN e YAN, 2010).

Um esquema da via de biodegradação de microcistinas foi proposta por Bourne *et al.* (1996; 2001), sendo identificado um conjunto de quatro genes (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*) como o *cluster* envolvido na produção de enzimas para a biodegradação. O gene *mlrA* codifica para a enzima MlrA, uma metalopeptidase que promove a quebra hidrolítica da ligação peptídica entre Adda e Arg, abrindo a estrutura cíclica da MC-LR. Após a linearização, as peptidases codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC* (MlrB – serinapeptidase e MlrC – metalopeptidase, respectivamente) promovem hidrólises subsequentes. O produto do gene *mlrD* não é uma enzima de degradação, mas sim uma proteína transportadora que carrega MCs para o interior da célula bacteriana, onde ocorre a via de degradação (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

Embora pareça claro que microcistina possa ser degradada pelos mecanismos acima descritos, há relatos de pelo menos 20 espécies nas quais não houve

detecção simultânea dos genes *mlr*, indicando a existência de outras vias e genes para biodegradação (HOEFEL *et al.*, 2009; MANAGE *et al.*, 2009).

Sphingosinicella microcystinivorans B9, que apresenta 99% de similaridade, pela análise DNA ribossomal 16S, com (MARUYAMA *et al.*, 2006) apresenta alta capacidade para degradação de microcistina. B9 imobilizada aplicada em escala piloto ($7,9 \times 10^6$ células/mL) em promoveu a eliminação completa de MC-LR após 1 dia de tratamento. Além disso, com a adição continuada de 600 μ g de MC-RR houve eliminação de 80% da toxina, sendo que a eficiência do tratamento persistiu por dois meses (TSUJI *et al.*, 2006).

O mecanismo de biodegradação de microcistina por *S. microcystinivorans* B9 foi proposto HASHIMOTO *et al.* (2009), sendo identificados intermediários / subprodutos de degradação de MC-LR que indicam a presença do *cluster* gênico descrito anteriormente, embora o mesmo não tenha sido ainda detectado.

O sequenciamento, clonagem e expressão heteróloga dos genes *mlr* é essencial para o estudo dos mecanismos de biodegradação, além de fornecer ferramentas para o desenvolvimento de metodologias para o tratamento de água contaminada com microcistina (DZIGA *et al.*, 2012). Portanto, o presente trabalho buscou desenvolver metodologias para amplificação e caracterização dos genes *mlr* de *S. microcystinivorans* B9, bem como clonagem visando expressão heteróloga de proteases para biodegradação de microcistina em *Escherichia coli*.

Material e Métodos

Microrganismos e Meios de Cultivo

Sphingosinicella microcystinivorans B9 foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Meijo, Nagoya - Aichi – Japão. O meio de cultivo Sakurai (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%) foi utilizado para manutenção e cultivo da bactéria. *Escherichia coli* JM109 (Promega, EUA) foi recuperada e cultivada em meio LB (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, pH ajustado para 7,0 com NaOH).

Extração de DNA Genômico

S. microcystinivorans B9 foi cultivada em 5 mL de meio Sakurai líquido *overnight* (30°C, 100 rpm). Para comparar a eficiência do método, três protocolos para extração de DNA de bactérias foram utilizados.

O primeiro método consistiu de simples fervura (100°C, 10 min.) de células bacterianas pré-lavadas (3 vezes em água ultrapura), seguida de centrifugação (10.000 x g, 15 min.), coleta do sobrenadante e precipitação com etanol absoluto. O segundo protocolo foi realizado da mesma forma que o primeiro, porém 300 µL de proteinase K foram adicionados às células após a fervura, sendo a mistura incubada a 45°C por 60 min.

A terceira metodologia consistiu de uma combinação entre o segundo método e o protocolo tradicional de extração de DNA com fenol: clorofórmio, seguido de precipitação com etanol absoluto.

A concentração de DNA foi determinada em fluorímetro (DyNA Quant 200 Hoefer, EUA), com adição de 2mL de corante Hoescht a 2µL de DNA. A calibração foi realizada com DNA padrão a 100ng.

Primers

A Tabela 1 resume todos os primers utilizados para amplificação dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* genes a partir do DNA genômico da bactéria B9. Os primers foram obtidos da literatura ou desenhados através do software *Gene Runner* 3.01, utilizando as sequências disponíveis no GenBank para *Sphingomonas* spp. ACM 3962 (BOURNE *et al.*, 1996).

Padronização de PCR e Amplificação dos Genes mlr

As condições iniciais para padronização da metodologia de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram obtidas de Ho *et al.* (2007). A padronização consistiu na avaliação da influência da concentração dos reagentes de PCR: primer (1, 5 ou 10pmol), MgCl₂ (25 ou 50mM), dNTP (2,5, 5 ou 10mM), DNA genômico (1, 5, 10 ou 20ng) e PCR buffer (1, 5 ou 10 X). A eficiência da reação também foi avaliada frente às diferentes polimerases, AmpliTaq® DNA polymerase 1,25U e Platinum® Taq 5U (Invitrogen, EUA). O objetivo da padronização foi obter amplificação com a menor concentração possível para cada reagente. A reação de PCR foi realizada em termociclador Amplitherm thermal cycler TX96 plus sob as seguintes condições: ciclo inicial de 95°C por 10 min.; 35 ciclos de 95°C por 20 s, T_m (Tabela 1) por 10 s, 72°C por 30 s; ciclo final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando como os marcadores DNA 1Kb, *HindIII* fragments ou DNA Low Mass

(Invitrogen, EUA). O sequenciamento foi realizado pela empresa Ludwig-Biotec (Alvorada do Sul – RS).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos para amplificação dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

Nome	Sequência (5´ - 3´)	Tm (°C)	Referência
mlrA F	GACCCGATGTTCAAGATGCT		
mlrA F2	TCGCCATTTATGTGATGGCTG	60	Saito <i>et al.</i> (2003)
mlrA R	CTCCTCCCACAAATCAGGAC		
mlrA164F	CTAGGGATCCATGCGGGAGTTTGTCCG	64	Dziga <i>et al.</i> (2012)
mlrA164R	TCGACTCGAGTTAGCCGTTTCGCGCCGGACT		
mlrA cl1 F	ATTCTTGTTGACCATCCTGGG	62	Desenhado *
mlrA cl1 R	AGCAATACCGCTGGGTGAT		
mlrA cl2 F	ATGCGGGAGTTTGTCCGA	63	Desenhado *
mlrA cl2 R	GACAAGTCCGGCGCGAAC		
mlrA cl3 F	GTTCCATATGCGGGAGTTTGTCCGAC	62	Dziga <i>et al.</i> (2012)
mlrA cl3 R	GAAAGCGGCCGCGTTTCGCGCCGGACTTG		
mlrA cl4 F	CCATAACGCGCTGGGAGTAAACGTC	63	Dziga <i>et al.</i> (2012)
mlrA cl4 R	CTCCCAGCGCGTTATGGATGGCGTG		
mlrB F	CGACGATGAGATACTGTCC	60	Ho <i>et al.</i> (2007)
mlrB R	CGTGCGGACTACTGTTGG		
mlrC F	TCCCCGAAACCGATTCTCCA	60	Ho <i>et al.</i> (2007)
mlrC R	CCGGCTCACTGATCCAAGGCT		

* Primers foram desenhados através do software Gene Runner 3.01

* Tm – Temperatura de Melting

Clonagem dos Genes mlr em Escherichia coli

Para ligação dos fragmentos amplificados foi utilizado vetor p-GEM® – T Easy Vector (Promega, EUA). A Figura 1 ilustra a sequência e pontos de referência do vetor. Células competentes de *E. coli* JM109 (Promega, EUA) foram utilizadas

para transformação. As reações de ligação e transformação foram executadas conforme instruções do fabricante.

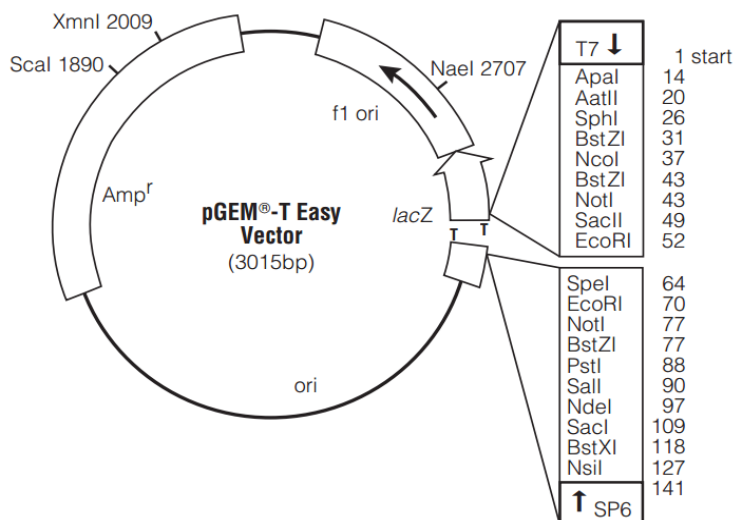


Figura 1 – Mapa e pontos de referência do vetor pGEM® – T Easy. (Fonte: Promega, EUA)

As células de *E. coli* transformadas foram plaqueadas em LB sólido suplementado com 100µg/mL de ampicilina. Previamente ao plaqueamento, 100µL de IPTG (100mM) e 20µL de X-Gal (50mg/mL) foram espalhados sobre a superfície das placas, a fim de possibilitar a seleção de transformantes. Os cultivos foram incubados *overnight* a 37°C.

Extração de DNA Plasmidial

Para isolamento e purificação de DNA plasmidial, foi utilizado o kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NotI* e *Spel* para isolamento dos genes *mlr*. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Análise da Expressão

Oito mililitros de extrato de microcistina (obtido de cultura liofilizada de *Microcystis* spp.) foram adicionados em frascos de Erlenmeyer, juntamente com 1mL de cultivo em meio LB líquido de clones de *E. coli* (contendo fragmentos dos genes *mlrA*, *mlrB* ou *mlrC*), 1mL de meio LB e ampicilina (100 µg/mL). Os controles positivos foram executados utilizando 1mL de cultivo de *S. microcystinivorans* B9 e 1mL de meio Sakurai Para os controles negativos, 1mL de água ultrapura foi utilizada para substituir os microrganismos. Após incubação a 37°C (150 rpm) por 96 h, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g; 15 min), sendo o sobrenadante coletado para determinação de microcistinas por ELISA (Beacon Analytical Systems Inc, USA), conforme instruções do fabricante.

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as concentrações de DNA obtidas com três diferentes protocolos. Todas as metodologias avaliadas foram eficientes para isolamento de DNA genômico de *S. microcystinivorans* B9, porém maiores concentrações (49,5ng) foram obtidas com a utilização de apenas fervura e precipitação (protocolo 1). Os protocolos 2 (fervura e utilização de proteinase K) e 3 (fenol:clorofórmio e proteinase K) possibilitaram isolamento de 28,5 e 25,0ng de DNA genômico, respectivamente. Não foi observada diferença qualitativa (i.e. contaminação de DNA por proteínas) entre os métodos. Portanto, a utilização do protocolo 1 possibilita isolamento de DNA genômico de forma rápida e com menor custo.

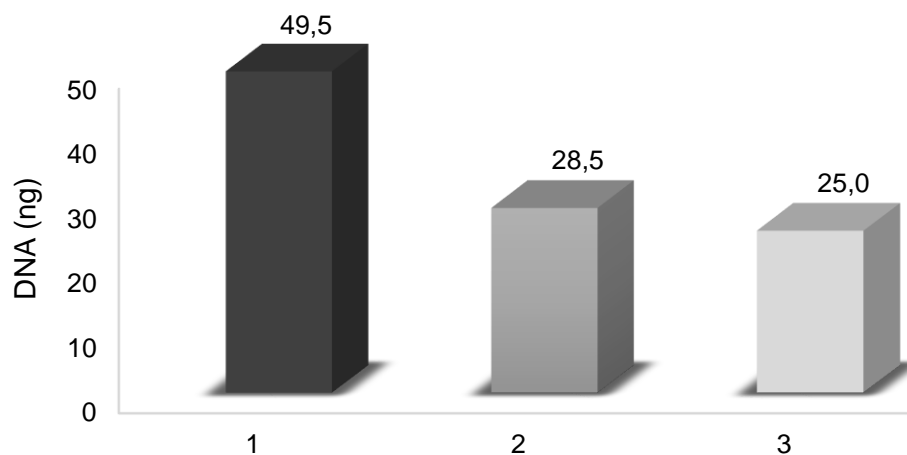


Figura 2 – Isolamento de DNA genômico de bactéria utilizando três metodologias. Protocolo 1 consistiu de fervura de células por 10 minutos e precipitação com etanol absoluto. Protocolo 2 foi adicionada proteinase K após fervura. Protocolo 3 foi realizado com fenol:clorofórmio e adição de proteinase K.

Em relação a padronização de PCR, ambas as concentrações de primer e DNA não influenciaram na reação, sendo mantidas, portanto, nos valores mínimos (1 pmol de primer e 1ng de DNA). Amplificação somente foi obtida com utilização de 50mM MgCl₂, 10mM dNTP e 10X PCR buffer. Apenas a Platinum® Taq 5U foi eficiente para amplificação de todos os fragmentos; AmpliTaq® DNA polymerase 1,25U foi eficiente somente para amplificação de fragmentos dos genes *mlrB* e *mlrC*.

Dentre os primers utilizados, a amplificação de fragmentos, utilizando as condições de PCR acima descritas, foi obtida com os pares *mlrA* cl 1, *mlrA* 164, *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* (Figuras 3 e 4). Nenhum dos primers desenhados gerou produtos de amplificação (Figura 3). Embora o par *mlrA* cl 1 tenha gerado bandas inespecíficas, a qualidade da amostra não foi suficiente para análise por

sequenciamento, uma vez que a análise em gel (Figura 3 B) mostra que não é possível distinção de banda para isolamento e purificação. Os fragmentos obtidos foram sequenciados e alinhados ao banco de dados do GenBank.

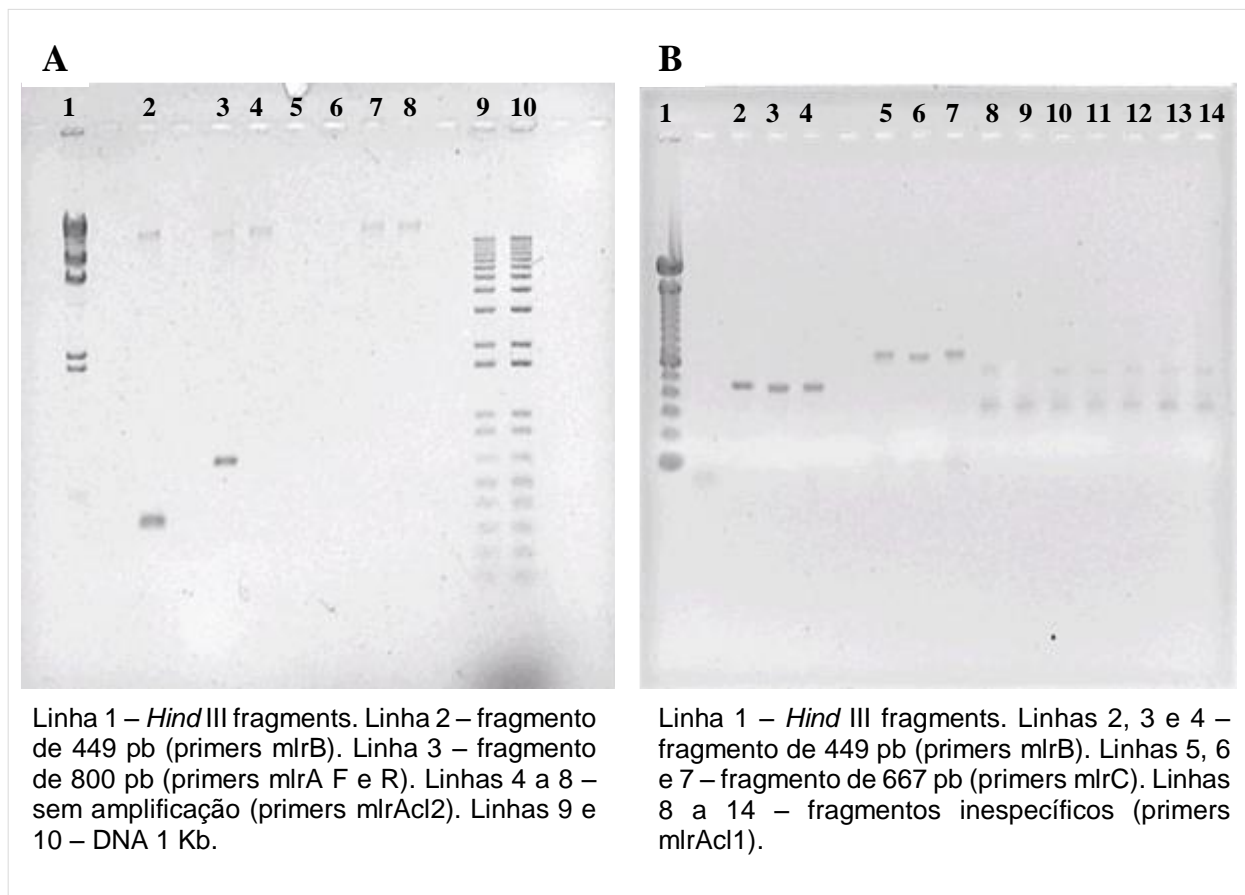


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% para visualização de fragmentos obtidos por PCR.

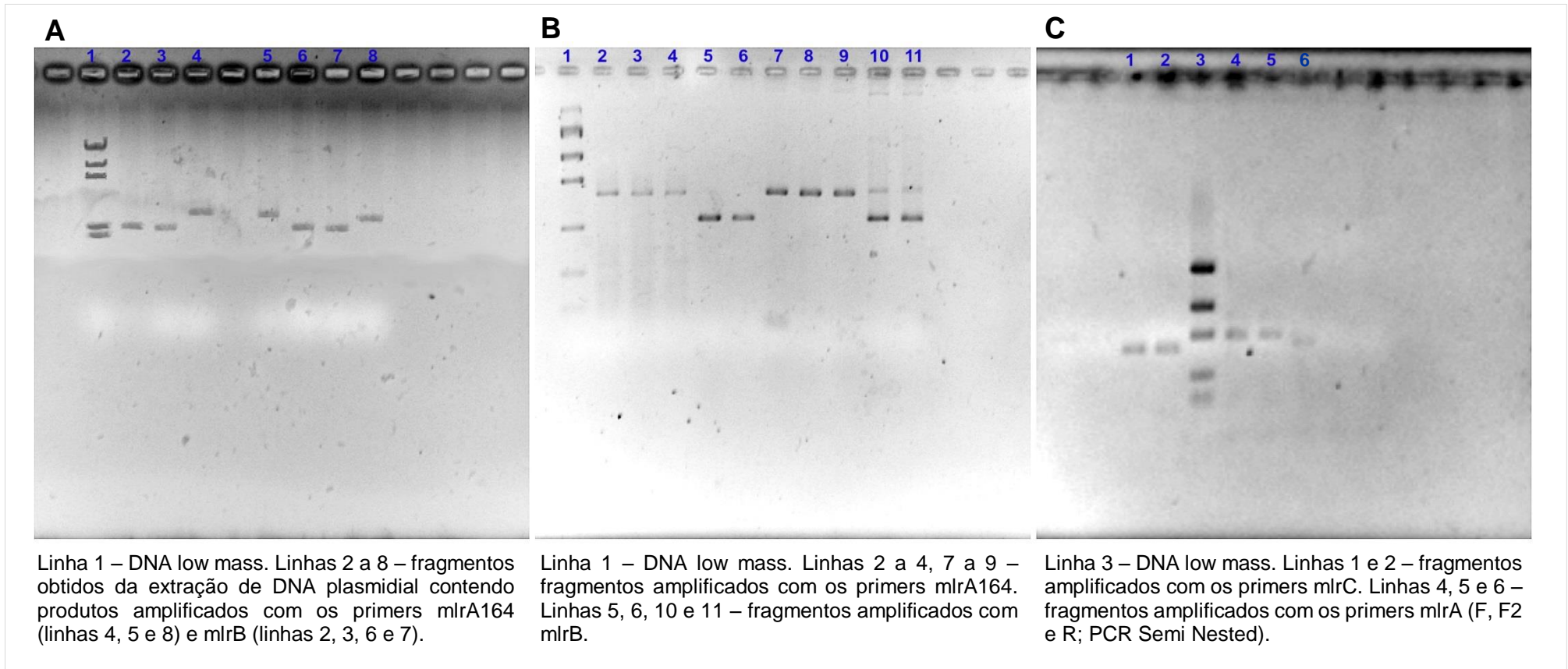


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% para visualização de fragmentos obtidos por PCR.

Os resultados mostram que a utilização dos primers *mlrA* e *mlrA164* em apenas uma reação de PCR não foi suficiente para amplificação do gene *mlrA*, uma vez que as análises dos fragmentos indicaram similaridade de 70 a 76% com DNA topoisomerase IV subunidade de 10 bactérias (Anexos 1 e 2).

Para amplificação do gene *mlrA* foi necessária a realização de Semi-Nested PCR com os primers *mlrA* F, F2 e R. Os fragmentos amplificados são mostrados na Figura 4 C. A análise dos dados gerou uma sequência (Anexo 3) de 857pb (120 A, 140 T, 246 C, 246 G e 15 ambiguidades), com identidade de 99% ao gene *mlrA* de *Sphingomonas* spp. Y2 (SAITO *et al.*, 2003). Similaridade com gene *mlrA* entre 82% e 85% também foi observada para *Sphingomonas* spp. USTB-05 (YAN *et al.*, 2012), *Sphingopyxis* spp. C-1 (OKANO *et al.*, 2009), *Sphingomonas* spp.ACM-3962 (BOURNE *et al.*, 2001), *Novosphingobium* spp. THN1 (JIANG *et al.*, 2011) e *Sphingomonas* spp. MD-1 (SAITO *et al.*, 2003).

Os fragmentos correspondentes aos genes *mlrB* e *mlrC* foram obtidos com reação única de PCR (Figuras 3 e 4), sendo facilmente isolados em relação ao gene *mlrA*. A sequência obtida para o gene *mlrB* (Anexo 4) possui 1049pb (206 A, 229 T, 299 C, 314 G e 1 ambiguidade), com identidade de 88 a 90% aos genes *mlrB* de *Sphingomonas* spp. USTB-05 (YAN *et al.*, 2012), *Novosphingobium* spp. THN1 (JIANG *et al.*, 2011), *Sphingopyxis* spp. LH21 (HO *et al.*, 2007), *Sphingopyxis* spp. C-1 (OKANO *et al.*, 2009), *Sphingomonas* spp.ACM-3962 (BOURNE *et al.*, 2001) e *Sphingomonas* spp. NV3 (SOMDEE *et al.*, 2013).

A sequência obtida para gene *mlrC* (Anexo 5) possui 694pb (131 A, 151 T, 193 C, 204 G e 15 ambiguidades), com similaridade de 85 a 87% aos genes *mlrC* de *Novosphingobium* spp. THN1 (JIANG *et al.*, 2011), *Sphingomonas* spp.ACM-

3962 (BOURNE *et al.*, 2001), *Sphingomonas* spp. USTB-05 (YAN *et al.*, 2012), *Sphingopyxis* spp. C-1 (OKANO *et al.*, 2009), *Sphingopyxis* spp. LH21 (HO *et al.*, 2007) e *Sphingomonas* spp. NV3 (SOMDEE *et al.*, 2013). Um resumo dos todos fragmentos amplificados no trabalho é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Amplificação e identidade dos genes para degradação de microcistina de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

Par de primer	Alvo	Sequência Amplificada*	
		Tamanho	Identidade
mlrA F mlrA R	<i>mlrA</i>	663 pb (Anexo 1)	DNA topoisomerase IV subunidade A
mlrA 164 F mlrA 164 R	<i>mlrA</i>	659 pb (Anexo 2)	DNA topoisomerase IV subunidade A
mlrA F e mlrA F2 mlrA R **	<i>mlrA</i>	857 pb (Anexo 3)	Gene <i>mlrA</i>
mlrB F mlrB R	<i>mlrB</i>	1049 pb (Anexo 4)	Gene <i>mlrB</i>
mlrC F mlrC R	<i>mlrC</i>	694 pb (Anexo 5)	Gene <i>mlrC</i>

* pb – pares de base.

* Detalhes das sequências e análises de alinhamento são mostradas nos anexos. A identidade dos fragmento foi obtida pela análise de BLAST.

** Foi realizada Semi-Nested PCR, o mesmo primer R foi utilizado para as duas reações.

A primeira via de biodegradação de microcistinas por bactérias foi proposta por Bourne *et al.* (1996; 2001), onde há participação de três peptidases (MlrA, MlrB e MlrC) codificadas por um grupo de genes (*mlrA*, *mlrB* e *mlrC*) arranjados em *cluster*. Estudo prévio da biodegradação de microcistina por *S. microcystinivorans* B9 (HASHIMOTO *et al.*, 2009) demonstrou que a reação é iniciada pela quebra da ligação Arginina-Adda, com conseqüente linearização da

molécula. Em seguida, ocorre hidrólise da ligação Alanina-Leucina, formando tetrapeptídeo e tripeptídeo, os quais são clivados, gerando Adda e peptídeos menores. Esta via é similar àquela apresentada por Bourne *et al.* (1996; 2001), sugerindo a ocorrência dos genes para degradação de microcistina em *S. microcystinivorans* B9. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a presença dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* em *S. microcystinivorans* B9.

Embora muitos estudos têm enfoque na biodegradação bacteriana de microcistina (TAKENAKA E WATANABE, 1997; LEMES *et al.*, 2008; MANAGE *et al.*, 2009), a eficiência do processo, no que se refere à aplicação prática no tratamento de água, pode ser melhorada pela utilização de enzimas e/ou de organismos geneticamente modificados, com capacidade melhorada para biodegradação. Neste sentido, foi realizada clonagem dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* em *E. coli*. Os parâmetros e condições utilizadas foram suficientes para obtenção de transformantes (Figura 5).

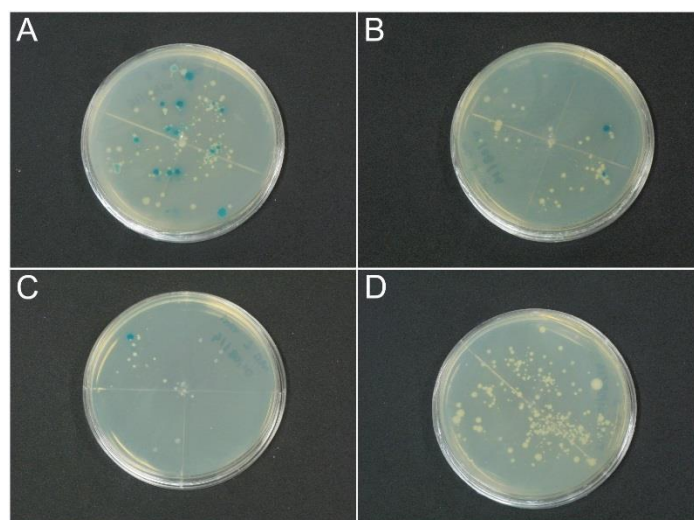


Figura 5 – Clones de *Escherichia coli* contendo genes para biodegradação de microcistina.

Os clones foram plaqueados separadamente e a confirmação foi realizada por extração de DNA plasmidial e visualização em gel de agarose. Embora o procedimento de clonagem e transformação tenha sido bem sucedido, não foi detectada expressão heteróloga (Tabela 3). Entretanto, as sequências gênicas obtidas foram similares aos estudos onde houve expressão heteróloga das enzimas de biodegradação de microcistina (BOURNE *et al.*, 1996; 2006; SAITO *et al.*, 2003; DZIGA *et al.*, 2012), é provável que o vetor utilizado não tenha permitido a tradução das proteínas.

Tabela 3 – Biodegradação de microcistina por clones de *Escherichia coli*

Amostra*	Gene clonado	Microcistina (mg/L)		Degradação (%)
		t_{0h}	t_{96h}	
A	<i>mlrA</i>		5,04	0
B	<i>mlrB</i>		5,01	0
C	<i>mlrC</i>	5,49	5,34	0
ABC **	<i>mlrA, mlrB, mlrC</i>		5,29	0
JM109	-----		5,15	0

* Clones de *E. coli* contendo genes para biodegradação foram cultivados com microcistina (37°C, 150rpm, 96h).

** A amostra foi inoculada com 3 clones, um para cada gene de degradação (*mlrA*, *B* ou *C*) em proporções iguais.

De fato, o protocolo do fabricante (Promega, EUA) do vetor pGEM-T Easy suplementa que o mesmo não é um bom vetor de expressão, uma vez que não possui sítio para ligação ribossomal, sendo muitas vezes necessário inserir este elemento no vetor para obtenção de expressão significativa. Portanto, é necessária a investigação com utilização de outro vetor para determinar a viabilidade de expressão heteróloga dos genes de degradação de microcistina de *S. microcystinivorans* B9

Considerações finais

A remoção de microcistina da água é um desafio global, sendo que não há ainda uma metodologia eficiente e de baixo custo para solucionar o problema. O controle biológico, com aplicação direta de microrganismos ou de enzimas isoladas, constitui uma alternativa promissora. Neste sentido, os genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *S. microcystinivorans* B9 foram detectados, isolados, sequenciados e clonados em *E. coli*. Os resultados obtidos permitem compreensão mais detalhada da via de biodegradação de microcistina de *S. microcystinivorans* B9, além de fornecerem informações importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de água.

Referências

- 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. **Environ Toxicol**, v. 16, p. 523-534, 2001.
- 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 Res**, v.40, n.6, p.1294-302, 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 Environ Microbiol**, v. 62, p. 4086-4094, 1996.
- DZIGA, D.; WLADYKA, B.; ZIELINSKA, G.; MERILUOTO, J.; WASYLEWSKI, M. Heterologous expression and characterization of microcystinase. **Toxicon**, v.59, p.578-586, 2012.
- HARADA, K.I.; IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; ITO, E.; TSUJI, K. Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation. **Toxicon**, v. 44, p. 107-109, 2004.
- HASHIMOTO, E.H.; KATO, H.; KAWASAKI, Y.; NOZAWA, Y.; TSUJI, K.; HIROOKA, E.Y. Further Investigation of Microbial Degradation of Microcystin Using the Advanced Marfey Method. **Chem. Res. Toxicol**, v.22, n.2, p.391-398, 2009.

HO, L.; GAUDIEUXB, A.L.; FANOKA, S.; NEWCOMBEA, G.; HUMPAGE, A.R. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, v. 50, p. 438–441, 2007.

HOEFEL, D.; ADRIANSEN, C.M.M.; BOUYSSOU, M.A.C.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G.; HO, L. Development of an *mlrA* gene- directed TaqMan PCR assay for quantitative assessment of microcystin-degrading bacteria within water treatment plant sand filter biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v.75, p.5167–5169, 2009.

ISHI, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacteria. **Water Res**, v. 38, n. 11, p. 2667-2676, 2004.

JIANG, Y.; SHAO, J.; WU, X.; XU, Y.; LI, R. Active and silent members in the *mlr* gene cluster of a microcystin degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. **FEMS Microbiol Lett**, v.322, p.108–114, 2011.

JONES, G.J.; BOURNE, D.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. **Nat Toxins**, v. 2, p. 228-235, 1994.

LEMES, G.A.F.; KERSANACH, R.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A. Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.69, p.358–365, 2008.

MANAGE, P.M.; EDWARDS, C.; SINGH, B.K.; LAWTON, L.A. Isolation and identification of novel microcystin degrading bacteria **Appl Environ Microbiol**, doi:10.1128/AEM.01928-09, 2009.

MARUYAMA, T. PARK, H. OZAWA, K. TANAKA, Y. SUMINO, T. HAMANA, K. HIRAISHI, A. KATO, K. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. Nov., sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. **Int J of S and Evolutionary Microbiol**, 2006.

OKANO, K.; SHIMIZU, K.; KAWAUCHI, Y.; MASEDA, H.; UTSUMI, M.; ZHANG, Z.; NEILAN, B.A.; SUGIURA, N. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. **J Toxicol**, p.1–8, 2009.

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**, v. 16, n. 4, p. 337-343, 2001.

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-degradem gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiol Letters**, v. 229, p. 271-276, 2003.

SOMDEE, T.; THUNDERS, M.; RUCK, J.; LYS, I.; ALLISON, M.; PAGE, R. Degradation of [Dha7]MC-LR by a Microcystin Degrading Bacterium Isolated from Lake Rotoiti, New Zealand. **ISRN Microbiol**, published online, 2013.

TAKENAKA, S.; WATANABE, M.F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **Chemosphere**, v.34, p.749–757, 1997.

TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. degradation of microcystin using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 117-124, 2006.

YAN, H.; WANG, J.; CHEN, J.; WEI, W.; WANG, H.; WANG, H. Characterization of the first step involved in enzymatic pathway for microcystin-RR biodegraded by *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **Chemosphere**, v.87, n.1, 2012.

ZHANG, M.; PAN, G.; YAN, H. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **J Environ Sci**, v. 22, n. 2, p. 168–75, 2010.

ANEXO 1 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrA F e mlrA R. A análise por BLAST indica similaridade com gene para DNA topoisomerase IV subunidade A

```
TTCTAGGGATCCATGCGGGAGTTYGTCSGCAGSSCACGGKSKMGAARCGGCYATWSTCG
GMGKCGATGAGGATCTTGTCTGGTCTGTTTGCCTTGGAACGCGAAGGCGGGGCCGTCGCC
CTCCTTGAACCTGAACGCGTCCGGGTCTGCTGAGGTCGAGATGGCCTTTCATCGCGCGCGC
CCAGCCCTTGCCCGAGACGACAACGGTGATCGGTTCTTTCTCGATCATCGCTTCAAGCGG
GATTTACGCGTTGCAGAGGCCTCCTCTATCCGCGTGCGGCGAGCGCCGAGCACGGTTTC
AAATCCGTAACGTTTCGCGAAGCACGGCGAGATCGCGCTTCAGGCGCGTGCGCTGGCGCG
CGGGGCTGTCGATGAGCGCGACGAGGCCTTCGCGCTCTTTGGCGAGACTGTCGCGCTCC
TTGCGGATTTCCATTTCTCAAGGCGGCGCAGGCTCCTCAGGCGCATGTTGAGAATGGCT
TCGGCCTGCCGGTCATTGAGCTCGAACTCAGCCATCATCACCGCCTTCGGTTCATCTTCG
GTACGGATGATTTGATGATGCGATCGAGATTGAGATAGGCGATCAGATAGCCGTCTSATR
SRGWTCCATGCGGGAGTYGTCCGCTAKSKTCRMC AKCCGGTGGCGCGACGGTTAAACTC
GAGTCGA
```

ANEXO 2 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers mlrA 164 F e mlrA 164 R. A análise por BLAST indica similaridade com gene para DNA topoisomerase IV subunidade A

```
TCTAGGGATCCATTGCGGGAGTTTGTCCGCAGCSSACGGTSTAGMMWCGAGYCRWKGTS
SGCGGSGMTGAGGATCTTGTCCGGTSGTTTGCCTTGGAAACRCGAAGGCGGGGCCGTCGC
CCTCCTTGAACCTTGAACGCGTCCGGGTCGCTGAGGTTCGAGATGGCCTTTCATCGCGCGCG
CCCAGCCCTTGGCCGAGACGACAACGGTGATCGGTTCTTTCTCGATCATCGCTTCAAGCG
GGATTTACGCGTTGCAGAGGCCTCCTCTATCCGCGTGCGGCGAGCGCCGAGCACGGTT
TCAAATCCGTAACGTTTCGCGAAGCACGGCGAGATCGCGCTTCAGGCGCGTGCGCTGGCG
CGCGGGGCTGTCGATGAGCGCGACGAGGCCTTCGCGCTCTTTGGCGAGACTGTCGCGCT
CCTTGCGGATTTCCATTTCCCTCAAGGCGGCGCAGGCTCCTCAGGCGCATGTTGAGAATGR
MTTCGGCCTGCCGGTCATTGAGCTCGAACTCAGCCATCMTACCGCMTTCGGTTCATCKT
CGGTACGGATGATTTSGAKGATGCKATCGAGATTGAGATAGGMGWTCRSMYRGCCGKCKA
GCAGYTCSAKKCGAGKCGTTCGAWCKKCGYMAGCTCGAGTGRCGMGAACGGCTTAACTCG
AGTCA
```

ANEXO 3 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers *mlrA* F, *mlrA* F2 e *mlrA* R (PCR Semi-Nested). A análise por BLAST indica similaridade com gene *mlrA*

```
TCTCCTTCTTACMAMTCAKGGKAGAGATMCAATAAGCGCGTKCAAATCGTACTGCGATGAA
TCCAAGGGGGCGCCACCCGAGTCCCTGCAGCCGCGGGCGACCATTGGCCATTACGTT
TTACGCCAGCTCGTTATGGATCGCGTGAGTAAGCAATCCGCCCCACAGCGATCCACCCA
GTTTGTTGCAAACAAGACAGCCGATGATCGTACTGGCGATCATTCCGGGCGCGATAACG
AACTGCTTGACGATAACCCCCAGAGGGCACCAGGCTCGCCGGAGAACATTGCCGGCAA
GTCGCGTGGCAAATGCCAGGCCACCACATGGTGCCGAGGATGACCGCCGCGCAGGG
GGTCAAACCTTCTTGAGCAGCTGGGGCAGTGCGAACCCGCGCCAGCCAAGCTCCTCGAGC
AGCGGGCCCGGGCTGATAAGAAGCGATGCTGCCAGCATCGCGTAAATGGAGAGCGGATC
TGACCCATAGCGCAGGAATGCGCGATCGAGCGTACCTGACGGAGCGTATAGGTAGGTCTG
AACCCACATCATCCCGGTGAGCGCGAAGAAGACAAGGAAGCACACCCGCAATGACAGTGAC
GCCCTGCCGCCACGAAACAGGATCTCGCCAAGGGGGCGCAGCGGCTTAGCAGCTCACGAA
ATCCTGCGCGACCGTAGCCTATTCCGGTCACAATCAGGGCCGCAAGCATTGGTGCAGCCG
GGAACAACAGGAACGTATAGGCTGTTGGATAATCGAACGTGGACCTGATGGCCGTCACAA
TGTTGAGGTGAGCGTGCGTCTCTTGCAAGTATCTGAAACMATCGGGGWYCTGAGCCATCW
CAWTAATKTGGRMVAAAAGGAGA
```

ANEXO 4 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers *mlrB F* e *mlrB R*. A análise BLAST indica similaridade com gene *mlrB*

CGGCAAGTGTAGCGTCCACAATGCGCGTAACCACCACACCCTCCGCGCTTAATGGGCGGC
AACAGGGGGGCCATTTGCCATCGTCGTGTGGACTACTGTTGGGAAGAGCGATCGGTGTGG
GCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGTCAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG
GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACG
ACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCTCGGCCGCCATGGCCGCGGG
ATTCGTGCGGACTACTGTTGGCGACGMMTGCTCTTTGGCATGGCGCTTCGCTCGCTGCTA
CAACCGGCGGCAAGGCACTCGAAGTGGCCCGCCTCGTGAACGGAAAAGTGCCTCTGGC
AGACCTGTCGATTATGCCGGTGGGTTGTTTCGTGGATAATCGGCAAGGCGAGCGTGTGTG
TCGCATTCGGGCTTGTTGTGGGCAACCGGGCCATGGACGTGCTCTATCCGGACAGCGG
GATGGGTATCAGCGTGATGTGCAATCGTGATGATATCGCGCCGGCTGAACGTGCGCGCAA
AATTGCTTTGCTCGTGAAGCCCGGGCACCTGATCCGGGGTTTGATCGCGCAATTGATCC
TGCCGAGATGAAGCGCCTGGGACAAATTGGTGACCTCCGCGCCGCGCCTGATGGCTACTA
TCGCGATCCCTGTGTACGGACAGAATCTCATCGTGAACCGCGGCCATGGCCGCGGGGA
GCATGCGACATCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGATTCACTGGCCGTC
GTTTTACAACGTCGTGACTGAAAAACGCTGTGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC
ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAGGACGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCACA
GTAGTCCGCACGTCACGGTAATGGACTCCCCCTACAGCCGCGTATTCAGCCGGGAAACCG
TGTGGTCACCTGCATTAATAATCTACCATGC

ANEXO 5 – Sequência consenso dos fragmentos obtidos com utilização dos primers *mlrC F* e *mlrC R*. A análise BLAST indica similaridade com gene *mlrC*

```
TTTCCCGMWMMCTRTCCAAGGCTTTCGKGC GAAGGACTAGTCGCTCGCAKGGGCTCA  
AAAGTGCTGATCTATACCGACAATGACCAGCCAGCTGCCGCTTCGATCGCGCAAGATTTTCG  
GTCGCCGCTATCAAGCCATGGCCGGGGTCATGAAAGGCAACGGGACAGGGCGAACCTTT  
GCGGATGACATCGAGCTTGCCAAGGCTGCGACCGCATTTCGTAATTTTGGTTCGATAGTT  
CCGACAACCCCGGCGGAGGGGCTTCCGGTGACAATATGGCATTGGCCCGTGCAATGCTG  
GACAATGGACTTACCCAGCATGCATTGGCCCGATATGGGATCCCTTGGCAGTACGCTTG  
GGCTTTGAAGCTGGTCTTGGTGCAGATTTTCCCTGCGCGTTGGCGGCAAGGTCGGCGAG  
GCATCCGGGCCGCCCTCGACGTTTCGCGGCAAATCACAGGGCTTGCCGAAAACGTAC  
GCAAACCTTCTAGGCTCTCGGCCGCCTCTGGGGCGCGTCGTTTGCATCAATGCTGCCGG  
ACTCGACATCATCGTTAGCGAAATTCGCGACCAAGTGCTACGGCCCCGAGATGTTCCGGGC  
GGTCGGTGTGCAACCTGCCGAAAAGCGCTATGTTGCCAGTAAMGTCGYCCGAGCAGTGKD  
RGATCGGKTTTTCGGGGAAAYTTTTTTTTTTCGCGGC
```

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no monitoramento da contaminação de água por microcistina no Paraná salientam a necessidade de programas de monitoramento e tratamento de água. A remoção de microcistina por leveduras, com ênfase em *S. cerevisiae* VI08R, a detecção e clonagem dos genes *mlrA*, *mlrB* e *mlrC* de *S. microcystinivorans* B9 constituem ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de água contaminada com cianotoxinas.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R.L.; GRANDE, M.J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Int J Food Microbiol**, v. 123, p. 38-49, 2008.
- ACERO, J.L.; RODRÍGUEZ, E.; MERILUOTO; J. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins **Water Res**, v 39, p. 1628–1638, 2005.
- 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. **Biotechnol Letters**, v. 25, p. 1137-1142, 2003.
- AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNESC, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **Sci Total Environ**, 407, p. 2115–2123, 2009.
- AME, M.V.; ECHENIQUE, J.R.; PFLUGMAGER, S.; WUNDERLIN, D.A. Degradation of microcystin –RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba – Argentina). **Biodegrad**, v.17, p.447-455, 2006.
- ANDERSEN, R.J.; LUU, H.A.; CHEN, D.Z.X.; HOLMES, C.F.B.; KENT, M.L.; LE BLANC, M.; TAYLOR, F.J.R.; WILLIAMS, D.E. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. **Toxicon**, v. 31, p. 1315-1323, 1993.
- ANDRADE-NÓBREGA, G.M. **Construção de um novo vetor para caracterização de promotores de leveduras industriais e de laboratório**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Microbiologia) – Universidade de São Paulo.
- APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF)**. 21^a ed., 2005.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K.; Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru. **Brazil. Toxicol**. 181 – 182, p. 441-446, 2002.
- BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G. Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 35, n. 2, p. 147-149, 1997.

BOONE, C.; SOMMER, S.S.; HENSEL, A.; BUSSEY, H. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. **The Rockefeller University Press**, v. 110, n. 5, p.1833-1843, 1990.

BORTOL, A.; NUDEL, C.; FRAILE, E.; TORRES, R.; GIULIETTI, A.; SPENCAR, J.F.T.; SPENCER, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applies Microbiol Biotechnol*, v.24, n.5, p. 414-416, 1986.

BOTES, D.P.; KRUGER, H.; VILJOEN, C.C. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 20, p. 945-954, 1982.

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. **Environ Toxicol**, v. 16, p. 523-534, 2001.

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 Res**, v.40, n.6, p.1294-302, 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 Environ Microbiol**, v. 62, p. 4086-4094, 1996.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquat Microb Ecol**, v. 23, p. 13-27, 2000.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Medical Mycology**, v.39, n.6, p. 479-482, 2001.

CAMPANA, F. **Sanepar confirma: Usina de Mauá prejudicará Londrina, Cambé, Tibagi e Telêmaco Borba**. 2008. Disponível em: <http://www.fabiocampana.com.br/2008/10/sanepar-confirma-usina-de-maua-prejudicara-londrina-cambe-tibagi-e-telemaco-borba/>. Acesso em: 12/08/2014.

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **J Applied Bacteriol**, v. 72, p.445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; ESCHEDOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L 575 from New Zealand. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, p.2257-2263, 1988.

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. **Environ Health Persp**, v. 109, p. 663-668, 2001.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 3, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1710-1727, 1989.

CEREGHINO, G.P.L.; CREGG, J.M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Curr Opin in Biotechnol**, v. 10, p. 422–427, 1999.

CETESB (São Paulo). **Manual de cianobactérias planctônicas : legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais** / CETESB. São Paulo: 2013.

CHENG, Y.S.; ZHOU, Y.; IRVIN, C.M.; KIRKPATRICK, B.; BACKER, L.C. Characterization of aerosols containing microcystin. **Mar Drugs**, v.5, p.136–150, 2007.

CHORUS I., MUR L. **Preventative measures**. In: CHORUS, I.; BERTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**, p. 232–266, 1999.

CHORUS, I. **Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries**. Federal Environmental Agency: 2012.

CHORUS, I. **Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries**. Federal Environmental Agency: 2005.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. World Health Organization (WHO): 1999.

CHOW, C. W. K.; PANGLISCH, S.; HOUSE, J.; DRIKAS, M.; BURCH, M. D.; GIMBEL, R. A study of membrane filtration for the removal of cyanobacterial cells. **Journal of Water SRT. Aqua**, v.46, n.6, p.324-334, 1997.

CHOW, C.W.K.; DRIKAS, M.; HOUSE, J.; BURCH, M.D.; VELZEBOER, R.M.A. The impact of conventional water treatment processes on cell of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Wat Res**, v. 33, n. 15, p. 3253-3262, 1999.

CODD, G.A.; BELL, S.G.; KAYA, K.; WARD, C.J.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **Eur J Phycol**, v.34, p. 405–415, 1999.

COOK, A. H. **The chemistry and biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958.

DALY, R.I.; HO, L.; BROOKES, J.D. Effect of Chlorination on *Microcystis aeruginosa* Cell Integrity and Subsequent Microcystin Release and Degradation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, n. 12, p. 4447–4453, 2007.

DING, W.X.; SHEN, H.M.; ONG, C.N. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin- induced cell death in rat hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.291, p.321–331, 2002.

DIXON, M.B.; FALCONET, C.; HO, L.; CHOW, C.W.K.; O'Neill, B.K.; Newcombe, G. Nanofiltration for the removal of algal metabolites and the effects of fouling. **Water Sci Technol**, v.61, n.5, p.1189–1199, 2010.

DÖRR, F.A.; PINTO, E.; SOARES, R.M.; FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S.M. Microcystins in South American aquatic eco- systems: occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.56, p.1247–1256, 2010.

DOWNING, T.G.; MEYER, C.; GEHRINGER, M.M.; VAN DE VENTER, M. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. **Environ Toxicol**, v.20, n.3, p.257–262, 2005.

DRIKAS, M.; CHOW, C.W.K.; HOUSE, J.; BURCH, M.D. Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. **J AWWA**, v. 93, n. 2, p. 100-111, 2001.

DZIGA, D.; WLADYKA, B.; ZIELINSKA, G.; MERILUOTO, J.; WASYLEWSKI, M. Heterologous expression and characterization of microcystinase. **Toxicon**, v.59, p.578-586, 2012.

ECKART, M.R.; BUSSINEAU, C.M. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. **Curr Opin Biotechnol**, v. 7, p. 525-530, 1996.

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

ENOKIDA, C.H.; SOUZA, E.B.C. A questão ambiental na região de fronteira Brasil e Paraguai: estudo do Lago de Itaipu. **Anais XVI Encontro Nacional dos Geógrafos**: “Crise, práxis e autonomia: espaços de resistências e de esperanças”. Porto Alegre/RS – 2010.

ERIKSSON, J.E.; GOLMAN, R.D. Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeletal structure and cellular morphology. **Adv Prot Phosphatases** v. 7, p. 335-357, 1993.

ERIKSSON, J.E.; GRÖNBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J.P.; MERILUOTO, J. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin- LR, a cyclic peptide toxin. **Biochim Biophys Acta**, n.1025, p.60–66, 1990.

ERIKSSON, J.E.; PAATERO, G.I.L.; MERILUOTO, J.A.O.; CODD, G.A.; KASS G.E.N.; NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Exp Cell Res** v. 185, p. 86-100, 1989.

ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J.A.O.; KARAKI, H.; HAN, Y.G.; FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health risk assessment of cyanobacterial

(blue-Green algal) toxins in drinking water. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2005.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.2, n.1, p.43-50, 2005.

FAWELL, J.K.; JAMES, C.P.; JAMES, H.A. **Toxins from Blue-Green Algae: Toxicological Assessment of Microcystin-LR and a Method for its Determination in Water**. Water Research Centre: Medmenham. United Kingdom. 1994.

FAY, P. Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. **J Gen Microbiol**, v. 39, p. 11-20, 1965.

FERREIRA, Y.N. **Uso do Solo Urbano de Londrina**. Relatório de pesquisa: Londrina, laboratório de pesquisas urbanas e regionais, departamento de geociências, Universidade Estadual de Londrina. 2002.

FLEMING, L.E.; STEPHAN, W. **Blue green algae, their toxins and public health issues. Report to the Florida Harmful Algal Bloom Taskforce**. NIEHS Marine and Freshwater Biomedical Sciences Center, University of Miami, 2001.

FOMINA, M.; GADD, G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Biores Technol**, v.160, p.3-14, 2014.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, v. 18, p.11-12, 1878.

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 peptide: combination of Marfey's method with mass spectrometry and its practical application. **Analytical Chem**, v. 69, n. 24, p. 5146-5151, 1997.

GORHAM, P.R.; CARMICHAEL, W.W. Hazards of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In: LEMBI, C.A; WAALAND, J.R. **Algae and Human Affairs**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 403-432, 1988.

HARADA, K.; OSHIKATA, M.; UCHIDA, H.; SUZUKI, M.; KONDO, F.; SATO, K.; UENO, Y.; YU, S. Z.; CHEN, G.; CHEN, G. C.; Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City, China. **Nat Toxins**, v. 4 p.277-283, 1996.

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

HARADA, K-I.; TSUJI, K. Persistence and Decomposition of Hepatotoxic Microcystins Produced by Cyanobacteria in Natural Environment. **Toxin Reviews**, v.17, n.3, p.385-403, 1998.

HARTSHORNE, D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. **Biochem Biophys Res Commun** v. 173, p. 1347-1353, 1990.

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. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina.

HASHIMOTO, E.H.; KATO, H.; KAWASAKI, Y.; NOZAWA, Y.; TSUJI, K.; HIROOKA, E.Y. Further Investigation of Microbial Degradation of Microcystin Using the Advanced Marfey Method. **Chem. Res. Toxicol**, v.22, n.2, p.391-398, 2009.

HEISLER, J.; GILBERT, P.M.; BURKHOLDER, J.M.; ANDERSON, D.M.; COCHLAN, W.; DENNISON, W.C.; DORTCH, Q.; GOBLER, C.J.; HEIL, C.A.; HUMPHRIES, E.; LEWITUS, A.; MAGNIEN, R.; MARSHALL, H.G.; SELLNER, K.; STOCKWELL, D.A.; STOECKER, D.K.; SUDDLESON, M. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. **Harmful Algae**, v.8, n.1, p.3-13, 2008.

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A.M.; HIISVIRTA, L.; PYYSAALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: a laboratory study. **Wat Res**, v. 23, p. 979-984, 1989.

HITZEMAN, R.A.; HAGIE, F.E.; LEVINE, H.L.; GOEDDEL, D. V.; AMMERER, G.; HALL, B. D. Expression of a human gene for interferon in yeast. **Nature**, v. 293, p. 717-722, 1981.

HITZFELD, B.C.; HOGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. **Environ Health Persp**, v.1, n.08, Supplement 1, 2000.

HITZFELD, B.C.; LAMPERT, C.S.; SPAETH, N.; MOUNTFORT, D.; KASPAR, H.; DIETRICH, D.R. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Toxicon**, v.38, p.1731-1748, 2000.

HO, L.; GAUDIEUXB, A.L.; FANOKA, S.; NEWCOMBEA, G.; HUMPAGE, A.R. Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. **Toxicon**, v. 50, p. 438-441, 2007.

HO, L.; HOEFEL, D.; PALAZOT, S.; SAWADE, E.; NEWCOMBE, G.; SAINT, C.P.; BROOKES, J.D. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters. **J Hazard Mater**, v.180, p.628-633, 2010.

HO, L.; MEYN, T.; KEEGAN, A.; HOEFEL, D.; BROOKES, J.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G. Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. **Water Res**, v. 40, p.768-774, 2006.

HOEFEL, D.; ADRIANSEN, C.M.M.; BOUYSSOU, M.A.C.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G.; HO, L. Development of an mlrA gene- directed TaqMan PCR

assay for quantitative assessment of microcystin-degrading bacteria within water treatment plant sand filter biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v.75, p.5167–5169, 2009.

HOEGER, S.J.; HITZFELD, B.C.; DIETRICH, D.R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 203, p. 231-242, 2005.

HU, L.; ZHANG, F.; LIU, C.; WANG, M. Biodegradation of microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. **Energy Procedia**, v.16, p.2054–2059, 2012.

HU, L.B.; YANG, J.D.; ZHOU, W.; YIN, Y.F.; CHEN, J.; SHI, Z.Q. Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. **New Biotechnol**, v.26, p.205–211, 2009.

HUSZAR, V.I.M.; SILVA, L.H.S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; SANT'ANNA, C.I. **Cyanoprokariote Assemblages in Eight Productive Tropical Brazilian Waters** In: Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology. Shrewsbury, England, p. 67-77, 1998.

IBELINGS, B.W.; CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. **Environ Pollut**, v.150, p.177–192, 2007.

IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; TSUJI, K.; HARADA, K.I. Bacterial degradation of microcystins and nodularin. **Chem Res Toxicol**, v. 18, n. 3, p. 591-598, 2005.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004**. Curitiba: Imprensa oficial, 2004.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade das águas de microbacias urbanas na região metropolitana de Londrina, norte do Estado do Paraná, no período de 2007 a 2009**. IAP, 2011.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Monitoramento da qualidade da água do rio Tibagi e Barra Grande, na área de influência do futuro reservatório de Mauá e município de Londrina de Mauá e município de Londrina – pr, no período de abril de 2010 a dezembro de 2011**. IAP, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável – IDS**, 2012.

ISHI, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacteria. **Water Res**, v. 38, n. 11, p. 2667-2676, 2004.

ITO, E.; KONDO, F.; HARADA, K.I.; Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. **Toxicol** v. 35, p. 231-239, 1997.

IVERSEN, A.; KÜHN, I.; RAHMAN, M.; FRANKLIN, A.; BURMAN, L.G.; OLSSON-LILIJEQUIST, B.; TORREL, E.; MÖLLBY, R. Evidence for transmittion between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. **Environ Microbiol**, v. 6, p.55-59, 2004.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H.R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, v.41, n.1, p.65-71, 2011.

JIA, Y.; JINGJING, D.; FUQIANG, S.; GUIYING, Z.; XINGJUN, T. A Fungus Capable of Degrading Microcystin-LR in the Algal Culture of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Applied Biochem Biotechnol**, v.166, n.4, p.987-996, 2012.

JIANG, Y.; SHAO, J.; WU, X.; XU, Y.; LI, R. Active and silent members in the mlr gene cluster of a microcystin degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. **FEMS Microbiol Lett**, v.322, p.108–114, 2011.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.; FILHO, D.A.M.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **N Engl J Med**, v. 338, p. 873-878, 1998.

JONES, G.J.; BOURNE, D.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. **Nat Toxins**, v. 2, p. 228-235, 1994.

JÜTTNER, F. Volatile organic substances. In: FAY, I. R.; VAN BAALEN, C. **The Cyanobacteria**. Elsevier, Amsterdam, p. 453-469, 1987.

KAASALAINEN, U.; FEWER, D.P.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proc Natl Acad Sci**, v.109 p.5886–5891, 2012.

KAYA, K.; SANO, T. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. **Chem Res Toxicol**, v.11, p.159–163, 1998.

KIM, S.H.; WEI, C.I.; TZOU, Y.M.; AN, H.J. Multidrug-resistam *Klebsiella pneumoniae* isola Ted from farm environment and retail products in Oklahoma. **J Food Prot**, v. 68, p. 2022-2029, 2005.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infection**. v.50, p.243-260, 2002.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. **Human Health Aspects** in: Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, p.113-153, 1999.

LAMBERT, T.W.; HOLMES, C.F. ; HRUDEY, S.E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon in full scale water treatment. **Wat Res**, v. 30, p. 1411-1422, 1996.

LEE, J.; WALKER, H.W. Mechanisms and Factors Influencing the Removal of Microcystin-LR by Ultrafiltration Membranes. **J Memb Sci**, v.320, n.1-2, p.240-247, 2008.

LEMES, G.A.F.; KERSANACH, R.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A. Biodegradation of microcystins by aquatic Burkholderia sp. from a South Brazilian coastal lagoon. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.69, p.358–365, 2008.

LOPES, D.D. **Estudo molecular e morfológico de leveduras de processos fermentativos de produção de etanol**. 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado Em Genética e Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Geral - Universidade Estadual de Londrina.

MACKINTOSH, R.W.; DALBY, K.N.; CAMPBELL, D.G.; COHEN, P.T.; COHEN, P.; MACKINTOSH, C. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. **FEBS Lett**, v. 371, p. 236-240, 1995.

MANAGE, P.M.; EDWARDS, C.; SINGH, B.K.; LAWTON, L.A. Isolation and identification of novel microcystin degrading bacteria **Appl Environ Microbiol**, doi:10.1128/AEM.01928-09, 2009.

MANTOVANI, D.; MOSER, A. S.; FAVERO, D. M. Cianobactérias em Reservatórios Brasileiros e seus Prejuízos a Saúde Pública. **Revista Agronegócios e Meio Ambiente**, v.4, n.1, p. 145-155, 2011.

MARUYAMA, T. PARK, H. OZAWA, K. TANAKA, Y. SUMINO, T. HAMANA, K. HIRAIISHI, A. KATO, K. *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. Nov., sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. **Int J of S and Evolutionary Microbiol**, 2006.

MAZUR, H.; PLINSKI, M. Stability of Cyanotoxins, Microcystin-LR, Microcystin-RR and Nodularin in Seawater and BG-11 Medium of Different Salinity. **Oceanologia**, v.43, n.3, p.329-339, 2001.

MENECHINO, L. **UHE Mauá transformará em um imenso lago morto o primeiro rio em diversidade de vida do Paraná**. Ecodebate. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br>. Acesso em: 17 agosto 2008

MEREL, S.; CLÉMENT, M.; THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. **Toxicon**, v.55, n.4, p.677-691, 2010.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environ Int**, v.59, p.303-327, 2013.

MERILUOTO, J.; GUEIMONDE, M.; HASKARD, C.A.; SPOOF, L.; SJOVALL, O.; SALMINEN, S. Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. **Toxicon**, v.46, p.111e114, 2005.

METCALF, J.S.; BEATTIE, K.A.; PURDIE, E.L.; BRYANT, J.A.; IRVINE, L.M.; CODD, G.A. Analysis of microcystins and microcystin genes in 60–170-year-old dried herbarium specimens of cyanobacteria. **Harmful Algae**, v.15, p.47–52, 2012.

MILLER, M.A.; KUDELA, R.M.; MEKEBRI, A.; CRANE, D.; OATES, S.C.; TINKER, M.T.; STAEDLER, M.; MILLER, W.A.; TOY-CHOUTKA, S.; DOMINIK, C.; HARDIN, D.; LANGLOIS, G.; MURRAY, M.; WARD, K.; JESSUP, D.A. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to Sea Otters. **Plos One**, v.5, n.9, 2010.

MOIMAS, D.; ALECRIM, A.S.; PINHEIRO, A.C.D. A usina hidrelétrica Máua: interesse do estado antagônico a proteção dos direitos difusos e fatores sociais. **Revista de direito público**, v.4, n.2, p.43-58, 2009.

MORACE, G.; MANZARA, S.; DETTORI, G.; FANTI, F.; CONTI, S.; CAMPANI, L.; POLONELLI, L.; CHEZZI, C. Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. **Eur J Epidemiol**, v.5, n.3, p.303–310, 1989.

MULLER, C.C.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T.; CYBIS, L.F. Powdered Activated Carbon Adsorption for Microcystin Removal from Public Water Supply. **Eng Sanit Ambiental**, v.14, p.29-38, 2009.

NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; YOSHIDA, F.; UENO, Y.; WATANABE, M.F. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. **J AOAC Int**, v.80, n.2, p.408-417, 1997.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. **J Org Chem**, v. 55, p.6135-6139, 1990.

NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Two new L-serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* sp. Strains 202 AI and 202 A2. **Toxicon**, v. 30, p.1457-1464, 1992.

NAMIKOSHI, N.; RINEHART, K.; DAHLEM, A.; BEASLEY, V.; CARMICHAEL, W. Total synthesis of Adda, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. **Tetrahedron Lett**, v. 30, p. 4349-4352, 1989.

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

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

OKANO, K.; SHIMIZU, K.; KAWAUCHI, Y.; MASEDA, H.; UTSUMI, M.; ZHANG, Z.; NEILAN, B.A.; SUGIURA, N. Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. **J Toxicol**, p.1–8, 2009.

OLSEN, R.H.; DEBUSSCHER, G.; McCOMBIE, W.R. Development of Broad-Host-Range Vectors and Gene Banks: Self-Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO Chromosome. **J Bacteriol**, v. 150, n. 1, p. 60-69, 1982.

PAERL, H.W.; HALL, N.S.; CALANDRINO, E.S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. **Sci Total Environ**, v.409, p.1739–1745, 2011.

PAPADIMITRIOU, T.; KAGALOU, I.; STALIKAS, C.; PILIDIS, G.; LEONARDOS, I.D. Assessment of microcystin distribution and bio-magnifications in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake. **Ecotoxicology**, v.21, p.1155–1166, 2012.

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**, v. 16, n. 4, p. 337-343, 2001.

PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. The Molecular Genetics of Cyanobacterial Toxicity as a Basis for Monitoring Water Quality and Public Health Risk. **Current Opin Biotechnol**, v.19, n.3, p.281-288, 2008.

PENALOZA, R.; ROJAS, M.; VILA, I.; ZAMBRANO, F. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish. **Freshwater Biol**, v. 24, p. 233-240, 1990.

PETRUZZI, L.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A. Decontamination of ochratoxin A by yeasts: possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.98, n.15, p.6555-6567, 2014.

PINHO, G.L.L.; DA ROSA, C.M.; MACIEL, F.E.; BIANCHINI, A.; YUNES, J.S.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.61, p.353–360, 2005.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSSI, C.; SESTITO, M.; MORACE, G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J. Clin. Microb**, v.17, p.774-780, 1983.

PORRO, D.; SAUER, M.; BRANDUARDI, P.; MATTANOVICH, D. Recombinant Protein Production in Yeasts. **Molecular Biotechnol**, v. 31, p. 245-259, 2005.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.; BARRETO, V.; WARD, C.; PREISER, W.; POON, G.; NEILD, G.; CODD, G. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, p. 21-26, 1998.

PRABHU, D.I.G.; PANDIAN, R.S.; VASAN, P.T. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. **Indian J Exp Biol**, v. 45, p.817-823, 2007.

RAPALA, J.; BERG, K.A.; LYRA, C.; NIEMI, R.M.; MANZ, W.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LAHTI, K. Paucibacter toxinivorans gen. nov., sp. Nov., a bacterium that degrades cyclic cyano- bacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.55, p.1563–1568, 2005.

RIPP, S.; NIVENS, D.E.; AHN, Y.; WERNER, C.; JARREL, J.; EASTER, J.P.; COX, C.D.; BURLAGE, R.S.; SAYLER, G.S. Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. **Environ Sci Technol**, v. 34, p. 846-853, 2000.

RODGER, H.D.; TURNBULL, T.; EDWARDS, C.; CODD, G.A. Cyanobacterial (blue-green-algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. **J Fish Dis**, v. 17, p.177-181, 1994.

RODRÍGUEZ, C.; LANG, L.; WANG, A.; ALTENDORF, K.; GARCIA, F.; LIPSKI, A. Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline-and-gentamicina-resistam bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 5870-5876, 2006.

ROEGNER, A.F.; BRENA, B.; GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; PUSCHNER, B. Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies. **J Appl Toxicol**, v.34, n.5, p.441-457, 2014.

ROEGNER, A.F.; SCHIRMER, M.P.; PUSCHNER, B.; BRENA, B.; GONZALEZ-SAPIENZA, G. Rapid quantitative analysis of microcystins in raw surface waters with MALDI MS utilizing easily synthesized internal standards. **Toxicon**, v.78, p.74-102, 2013.

ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, p. 423-488, 1992.

ROMANOS, R. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Curr Opin Biotechnol**, v. 6, p. 527-533, 1995.

RUDOLPH-BOHNER, S.; MIERKE, D.F.; MORODER, L. Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. **FEBS Lett**, v. 349, p.319-323, 1994.

RUNNEGAR, M.; BERNDT, N.; KONG, S.M.; LEE, E.Y.; ZHANG, L. In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A. **Biochem Biophys Res Commun** v. 216, p. 162-169, 1995.

RUNNEGAR, M.T.C.; ANDREWS, J.; GERDES, R.G.; FALCONER, I.R. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon** v. 25, p. 1235-1239, 1987.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. **Toxicon** v. 24, p.109-115, 1986.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 317, p. 268-272, 1981.

RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R.; The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **S Afr J Sci** v. 78, p. 363-366, 1982.

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-degradem gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbil Letters**, v. 229, p. 271-276, 2003.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.D. Contribution to the Knowledge of Potentially Toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v.71, p.359-385, 2000.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; DE CARVALHO, L.R. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algolog Stud**, v.126, p.251-265, 2008.

SAYLER, G.S.; COX, C.D.; BURLAGE, R.; RIPP, S.; NIVENS, D.E.; WERNER, C.; AHN, Y.; MATRUBUTHAM, U. Field application of a genetically engineered microorganism for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation process monitoring and control. In: FASS, R.; FLASHNER, Y.; REUVENY, S. **Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 241-254, 1999.

SAYLER, G.S.; RIPP, S. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. **Curr Opinion Biotechnol**, v. 11, p. 286-289, 2000.

SCHMIDT, 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. **Environ Toxicol**, v. 17, p. 357-385, 2002.

SCHMITT, M.J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiol Rev**, v.26, n.3, p.257-276, 2002.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (SEMA). **Bacias Hidrográficas do Paraná – Série Histórica**. 2ª ed., 2013.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, v.50, n.3, p.205-221, 2009.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London & New York: World Health Organization, 1999.

SKULBERG, O.M. Toxin produced by cyanophytes in Norwegian inland waters - health and environment. In: LAG, J. **Chemical Data as a Basis of Geomedical Investigations**. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, p.197-216, 1996.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; CODD, G.A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: FALCONER, I. R. **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**. Academic Press Ltd., London, p.145-164, 1993.

SOMDEE, T.; THUNDERS, M.; RUCK, J.; LYS, I.; ALLISON, M.; PAGE, R. Degradation of [Dha7]MC-LR by a Microcystin Degrading Bacterium Isolated from Lake Rotoiti, New Zealand. **ISRN Microbiol**, published online, 2013.

SUMINO, T.; OGASAWARA T.; PARK, H.D. Method and equipment for treating microcystin-containing water. **Patente No. US 7425267 B2**, 2008.

SURONO, I.S.; COLLADO, M.C.; SALMINEN, S.; MERILUOTO, J. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin- LR. **Food Chem Toxicol**, v.46, p.502-507, 2008.

SVREK, C.; SMITH, D.W. Cyanobacteria Toxins and the Current State of Knowledge on Water Treatment Options: A Review. **Environ Eng Sci**, v.3, n.3, p.155- 185, 2004.

TAKENAKA, S.; WATANABE, M.F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. **Chemosphere**, v.34, p.749-757, 1997.

TATAVARTHY, A.; PEAK, K.; VEGUILLA, W.; REEVES, F.; CANNONS, A.; AMUSO, P.; CATTANI, J. Comparison of antibiotic susceptibility profiles and molecular typing patterns of clinical and environmental *Salmonella enterica* serotype Newport. **J Food Prot**, v. 69, p. 749-756, 2006.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**, v.43, p.284-292, 2005.

TEIXERA, M.; COSTA, M.; CARVALHO, V.; PEREIRA, M.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull Pan Am Health Org**, v. 27, p. 244-253, 1993.

TIMMIS, K.N.; PIEPER, D.H. Bacteria designed for bioremediation. **TIBTECH**, v.17, p. 201 – 204, 1999.

TISDALE, E.S. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. VA., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. **Am J Public Health**, v. 21, p.198-200, 1931.

TORANZO, A.E.; NIETO, F.; BARJA, J.L. Mortality associated with cyanobacterial bloom in farmed rainbow trout in Galicia (Northwestern, Spain). **Bull Eur Assoc Fish Pathol**, v. 10, p.106-107, 1990.

TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. degradation of microcystin using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. **Chemosphere**, v. 65, n. 11, p. 117-124, 2006.

TSUJI, K.; WATANUKI, T.; KONDO, F.; WATANABE, M.F.; NAKAZAWA, H.; 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**, v.33, p.1619-1631, 1995.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.D.; CHEN, G.C.; CHEN, G.; YU, S.Z. Detection of microcystins, a bluegreen algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis** v. 17, p. 1317-1321, 1996.

WANG, J.; WU, P.; CHEN, J.; YAN, H. Biodegradation of Microcystin-RR by a New Isolated Sphingopyxis sp. USTB-05. **Chin.J.Chem.Eng.**, v.18, n1, p. 108-112, 2010.

WESTWICK, J.A.; SZLAG, D.C.; SOUTHWELL, B.J.; SINCLAIR, J. A Review of Cyanobacteria and Cyanotoxins Removal/Inactivation in Drinking Water Treatment. **Anal Bioanal Chem**, v.397, n.5, p.1705-1514, 2010.

WETZEL, R.G. **Limnology: lake and river eco systems**. 3^a ed. San Diego: Academic Press, 2001.

WHITTON, B.A. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: MANN, N.H.; CARR, N.G. **Photosynthetic Prokaryotes**. Plenum Press, New York, p. 1-51. 1992.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking water quality**. 2^a ed. Addendum to Volume 2. Geneva, 1998.

WICKSTROM, M.; HASCHEK, W.; HENNINGSEN, G.; MILLER, L.A.; WYMAN, J.; BEASLEY, V. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced by microcystin-LR in isolated perfused rat livers. **Nat Toxins** v. 4, p. 195-205, 1996.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S. **The use of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea***. 1991. In: WILSON, C.; CHALUTZ, E. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-92, p.167-183.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y. Genus I – *Sphingomonas*. In: BRENNER, D. J.; KREIG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2^a ed., v. 2, parte C, p. 234–258. New York: Springer, 2005.

YAN, H.; WANG, J.; CHEN, J.; WEI, W.; WANG, H.; WANG, H. Characterization of the first step involved in enzymatic pathway for microcystin-RR biodegraded by *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **Chemosphere**, v.87, n.1, 2012.

YANG, S.; CARLSON, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water res**, v. 37, p. 4645-4656, 2003.

YOO, S.R.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide: AWWA Research Foundation and American Water Works Association**, 1995.

YOSHIDA, T.; MAKITA, Y.; TSUTSUMI, T.; YOSHIDA, F.; SEKIJIMA, M.; TAMURA, S. I.; UENO, Y. Acute oral toxicity of microcystin-LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice. **Nat Toxins** v. 5, p. 91-95, 1997.

YU, S.Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z.Y.; WU, M.C.; XIA, S.S. **Primary Liver Cancer**. p. 30-37. China Academic Publishers/Springer, 1989.

ZHANG, D.; XIE, P.; CHEN, J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.84, p.202–207, 2010.

ZHANG, M.; PAN, G.; YAN, H. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **J Environ Sci**, v. 22, n. 2, p. 168–75, 2010.