

I-374 – PROSPECÇÃO DE LEVEDURAS SELVAGENS COM POTENCIAL ANTICIANOBACTÉRIA VISANDO DESENVOLVIMENTO DE CEPA ENGENHEIRADA COM GENE DE DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA PARA TRATAMENTO DE ÁGUA

Tatiana de Ávila Miguel⁽¹⁾

Bióloga e Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Londrina. Doutoranda em Ciência de Alimentos – DCTA/UEL.

Daiane Dias Lopes

Bióloga e Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Londrina.

Gisele Maria de Andrade de Nóbrega

Bióloga e Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina. Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade de São Paulo. Docente da Universidade Estadual de Londrina.

Emília Kiyomi Kuroda

Engenheira Civil, Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Pos-Doc em Meijo University, Japão e Universidade Estadual de Londrina. Docente da Universidade Estadual de Londrina.

Fernando Carlos Pagnocca

Historia Natural pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais. Doutor em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pos-Doc pela Universidade Nova de Lisboa. Docente da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Elisabete Hiromi Hashimoto

Farmacêutica, Mestre e Doutora em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina. Docente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão.

Elisa Yoko Hirooka

Farmacêutica Bioquímica e Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina. Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Pos-Doc em Science University of Tokyo e Meijo University, Japão. Docente da Universidade Estadual de Londrina. Bolsista produtividade em pesquisa do CNPq.

Endereço⁽¹⁾: Rodovia Celso Garcia Cid / PR 445 Km 380. Londrina - PR - CEP: 86051-980 - Brasil - Tel: (43) 3371-4575 - e-mail: tavilamiguel@yahoo.com.br

RESUMO

A atividade agro-industrial, sem consciência logística e sustentável, causa impacto negativo ao recurso hídrico, favorecendo florações de cianofíceas toxigênicas a exemplo de *Microcystis aeruginosa*, produtora de hepatotoxinas denominadas microcistinas. A ineficácia do tratamento de água convencional perante remoção de microcistinas, aliada ao impacto ambiental negativo de agentes químicos, enfatiza o desenvolvimento de alternativas para prevenir/reduzir o perigo de contaminação, com destaque a microrganismos antagonistas. No trabalho avaliou-se o potencial anticianobactéria e biodegradação de microcistina de leveduras isoladas de usinas de açúcar/álcool e formigueiro, visando selecionar cepas destinadas ao futuro desenvolvimento de levedura recombinante, contendo genes de degradação de microcistinas da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9. Analisando a degradação de microcistina em onze isolados de leveduras, sete degradaram a toxina em t_{96h}. As cepas selvagens, denominadas de *Saccharomyces cerevisiae* VI08R e *Candida metapsilosis* PBM63 apresentaram os melhores resultados, atingindo degradação de 70 e 58%, respectivamente. Além destas, também avaliou-se *S. boulardii* comercial (taxa de 53%). *S. cerevisiae* VI08R foi selecionada para testar o antagonismo frente às cianobactérias *Phormidium tenue*, *Synechocystis* spp., *Anabaena* spp. e *M. aeruginosa*. O efeito antagônico ocorreu contra *Synechocystis* spp. e *Anabaena* spp. após 96h (determinação de clorofila-a). Os resultados indicaram que levedura VI08R e *S. boulardii* comercial são candidatos em potencial para inserir genes de degradação de microcistina de *S. microcystinivorans* B9.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras, Microcistina, Cianobactéria, Biodegradação, Antagonismo.

INTRODUÇÃO

Cianobactérias (Cyanophyceae) são procariotas uni ou pluricelulares, sendo a maioria fotoautotrófica e aeróbia, cuja fotossíntese se relaciona à presença de clorofila a, fotossistema I e II, com liberação de oxigênio (CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989). As espécies toxigênicas distribuem-se dentro de 40 gêneros pertencentes à Cyanophyceae (SKULBERG *et al.*, 1993); destaca-se *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *Aphanizomenon flos aquae*, *Anabaena* spp. e *Oscillatoria* spp., *Cylindrospermopsis* spp. entre outros (CARMICHAEL *et al.*, 2001; BOUVY *et al.*, 2000).

Floração de cianobactérias ocorre em ambiente eutrofizado, seja água de reservatório de abastecimento, recreacional ou piscicultura, afetando a qualidade e, conseqüente impacto econômico e na saúde humana e animal, pela produção de compostos orgânicos voláteis (JÜTTNER, 1987) e/ou cianotoxinas (GORHAM e CARMICHAEL, 1988). Os principais produtores de microcistina (MC) são *Microcystis* spp., *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., *Nostoc* spp. e *Anabaenopsis* spp. (BOTES, KRUGER e VILJOEN, 1982; NAMIKOSHI *et al.*, 1992; NAMIKOSHI *et al.*, 1990; CARMICHAEL *et al.*, 1988). Apesar de 80 análogos de MC terem sido caracterizados, a MC-LR é a mais tóxica e de maior ocorrência natural (ERIKSSON *et al.*, 2005).

As cianotoxinas são classificadas em hepato, neuro e citotoxinas baseadas no efeito toxicológico; ou estruturalmente em peptídeo cíclico (hepatotoxinas - microcistina e nodularina), alcalóide (neurotoxinas - anatoxina e saxitoxina) e lipopolissacarídeo. A MC 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). A MC constitui a família de peptídeo cíclico de maior ocorrência e, representa o principal desafio perante água potável segura para consumo (HITZFELD, HOGER e DIETRICH, 2000).

Casos relevantes de envenenamento humano por água contaminada ocorreram no Brasil. Na represa de Itaparica, a floração de *Anabaena* spp. e *Microcystis* spp. desencadeou 2000 casos de gastroenterite com 88 casos fatais (TEIXEIRA *et al.*, 1993). A contaminação de água com cianotoxinas em Caruaru no ano de 1996 afetou centro de hemodiálise, sendo que 85% dos pacientes desenvolveram uma doença com ampla gama de sintomas neurológicos, bem como lesão hepática aguda, causando em torno de 60 mortes (JOCHIMSEN *et al.*, 1998). A exposição crônica também representa perigo adicional, com estudo epidemiológico indicando correlação entre alta incidência de câncer hepático primário com MC em água de abastecimento na China (YU, 1989; UENO *et al.*, 1996). A Organização Mundial de Saúde estabeleceu o limite máximo de 1 µg/L de MC-LR em água destinada ao consumo humano e, a ingestão diária tolerável de 0,04 µg/Kg de peso corpóreo (WHO, 1998).

O tratamento de água convencional remove cianobactéria intacta, não ocorrendo o mesmo com as toxinas dissolvidas (DRIKAS *et al.*, 2001). Algicidas, a exemplo de sulfato de cobre, lisam a célula e liberam cianotoxinas, portanto, o biocontrole vem sendo uma alternativa no tratamento de água, pela menor agressividade ao meio ambiente. Estudos demonstraram o potencial de bactéria *Sphingomonas* spp. na biodegradação de MC (JONES *et al.*, 1994; PARK *et al.*, 2001; HO *et al.*, 2007). A linhagem B9, com 99% de similaridade com *Sphingosinicella microcystinivorans* pela análise DNA ribossomal 16S (MARUYAMA *et al.*, 2006), foi aplicada em escala piloto; a imobilização de $7,9 \times 10^6$ células/mL em resinas de poliéster de biorreatores promoveu eliminação completa de MC-LR após 1 dia; procedendo adição contínua de 600 µg de MC-RR houve eliminação de 80% da toxina, cuja eficiência persistiu por dois meses (TSUJI *et al.*, 2006).

Sphingomonas spp. apresentam um conjunto de quatro genes denominados *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* e *mlrD*, que codificam enzimas responsáveis pela biodegradação de MC. O gene *mlrA* codifica metalopeptidase MlrA, capaz de promover hidrólise da ligação peptídica entre Adda e Arg, linearizando MC-LR. A seguir, as peptidases MlrB (serinapeptidase) e MlrC (metalopeptidase), codificadas pelos genes *mlrB* e *mlrC*, respectivamente, promovem hidrólises subseqüentes, degradando a toxina. O produto do gene *mlrD* carrega a MC para o interior da célula bacteriana (BOURNE *et al.*, 1996; 2001).

Visando a biorremediação de ambientes eutrofizados e tratamento de água, a utilização de levedura na degradação de MC apresenta uma série de vantagens em relação à bactéria, que pode representar perigo à saúde humana e animal, considerando que genes de resistência a antibióticos são freqüentes em águas superficiais (YANG e CARLSON, 2003). Os genes de resistência podem ser adquiridos pela bactéria empregada na biorremediação e, transmitidos para seres humanos e animais (IVERSEN *et al.*, 2004; KIM *et al.*,

2005). Sob ponto de vista aplicado, a levedura anaeróbia facultativa (COOK, 1958) apresenta vantagens sobre *Sphingomonas* spp. aeróbia estrita (YABUUCHI e KOSAKO, 2005). Portanto, as leveduras adaptariam melhor em ambiente eutrofizado, onde existe escassez de oxigênio.

Outrossim, a capacidade de biodegradação varia imensamente conforme gênero, espécie e cepa de microrganismo, além de sofrer influência de fatores abióticos, como clima, pH, temperatura, entre outros. Portanto, o *design* de microrganismo com capacidade melhorada de biocatálise/biodegradação de substância de interesse é uma alternativa para solucionar os referidos impasses (TIMMIS e PIEPER, 1999).

Ciente do perigo de cianobactéria e MC na água, aliado à limitação e perigo de transferência dos genes de resistência entre bactérias no tratamento de água, a seleção / desenvolvimento de microrganismo inócuo com atividade anticianobactéria e anti-MC seria uma alternativa para o controle, minimização e remediação. No trabalho avaliou-se o potencial anticianobactéria e biodegradação de MC em isolados de levedura obtidas de usinas de açúcar/álcool e formigueiro, visando selecionar uma cepa-base para desenvolver levedura recombinante com genes de degradação de MC provenientes da bactéria B9.

MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem toxigênica *M. aeruginosa* TAC95 e *S. microcystinivorans* B9 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.

As cepas NIES 611 de *Phormidium tenue* foi fornecida 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, e Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Rio Claro.

A Tabela 1 apresenta a codificação, nome científico e local de isolamento dos microrganismos utilizados.

Tabela 1: Microrganismo-teste.

Microrganismo	Linhagem	Nome científico	Origem
Levedura	VI08R	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina de açúcar e álcool
Levedura	VI07L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina de açúcar e álcool
Levedura	PI07R1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina de açúcar e álcool
Levedura	PI07R2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina de açúcar e álcool
Levedura	PI06R1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Usina de açúcar e álcool
Levedura	PBM63	<i>Candida metapsilosis</i>	Formigueiro
Levedura	TO018	Não identificada	Não determinado
Levedura	S7	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Não determinado
Levedura	LJ3	<i>Candida tropicalis</i>	Não determinado
Levedura	PBM52	<i>Pichia guilliermondii</i>	Formigueiro
Levedura	SB	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Comercial
Bactéria	B9	<i>Sphingosinella microcystinivorans</i>	Lago (ambiente eutrofizado), Japão
Cianobactéria	NIES611	<i>Phormidium tenue</i>	Lago Biwa / Shiga, Japão, 1987
Cianobactéria	PCC6803	<i>Synechocystis</i> spp.	Califórnia, U.S.A., 1968
Cianobactéria	AU02G	<i>Anabaena</i> spp.	Lago Sagami / Kanagawa, Japão, 2002
Cianobactéria	TAC95	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Lago (ambiente eutrofizado), Japão

CULTIVO DE MICRORGANISMO

As cianobactérias foram cultivadas em meio ASM-1 (Erlenmeyer de 125ml) a 27°C sob iluminação (20 µE.m⁻².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).

PRIMEIRA ETAPA: TESTES DE BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA

Um mililitro contendo 10^7 células de levedura, ou 1 mL de bactéria B9, bem como 1 mL de meio específico (YPD e Sakurai, respectivamente) foi adicionado em Erlenmeyer contendo 8 mL de extrato celular de *M. aeruginosa* TAC 95 liofilizado (reconstituído em água, 1mg/L de MC). Após incubação a 30°C (150 rpm) por 96 h, amostras foram coletadas para a determinação de MC pelo método *Enzyme-linked immunosorbent assay* – ic-ELISA (Beacon Analytical Systems Inc, USA).

SEGUNDA ETAPA: TESTE DE ATIVIDADE ANTICIANOBACTÉRIA

Após analisar o potencial de biodegradação de MC, a cepa apresentando melhor perfil (VI08R) foi selecionada para prosseguir com o teste de antagonismo contra cianobactérias. As quatro espécies de cianobactérias utilizadas foram *Phormidium tenue* NIES611, *Synechocystis* spp. PCC6803, *Anabaena* spp. AU02G e *M. aeruginosa* TAC 95. Para avaliar a atividade anticianobactéria foram adicionadas 10^6 células de levedura, ou 1 mL de bactéria B9, bem como 1 mL de meio específico (YPD e Sakurai, respectivamente) às culturas pré-condicionadas de cianobactérias em meio ASM-1. Após 96 h de incubação (27°C; iluminação 20 μ E.m-2.s-1; 100 rpm), foram coletadas amostras para determinação da concentração de clorofila-a pelo método espectrofotométrico segundo APHA, AWWA, WEF (2005) e para determinação de células de microrganismos em câmara de Neubauer.

RESULTADOS

PRIMEIRA ETAPA: BIODEGRADAÇÃO DE MC

A degradação de MC foi avaliada em duas fases. Primeiramente, analisou-se as leveduras isoladas de usinas de açúcar / álcool, previamente identificadas como pertencentes à espécie *S. cerevisiae*. Na segunda fase, analisou-se isolados de levedura ainda não identificados, mas que foram identificados no decorrer de experimentos, conforme apresentado na Tabela 1.

O controle positivo de biodegradação consistiu de bactéria B9, caracterizada com taxa de degradação próxima a 100%, indicando adequância de parâmetros utilizados nos ensaios (figuras 1 e 2).

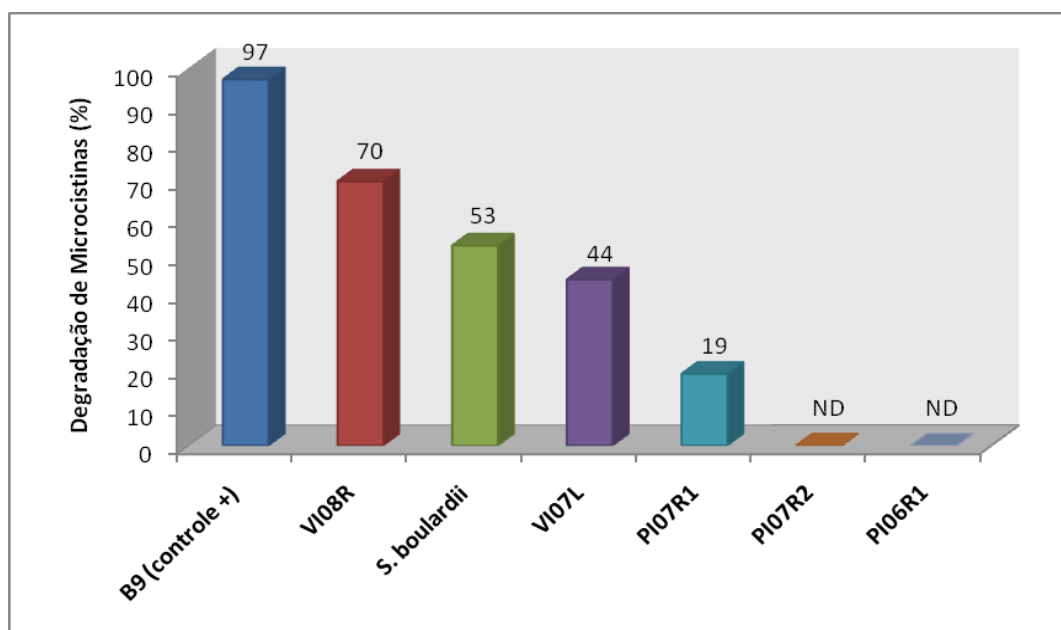


Figura 1: Biodegradação de microcistina por leveduras selvagens e linhagem comercial.

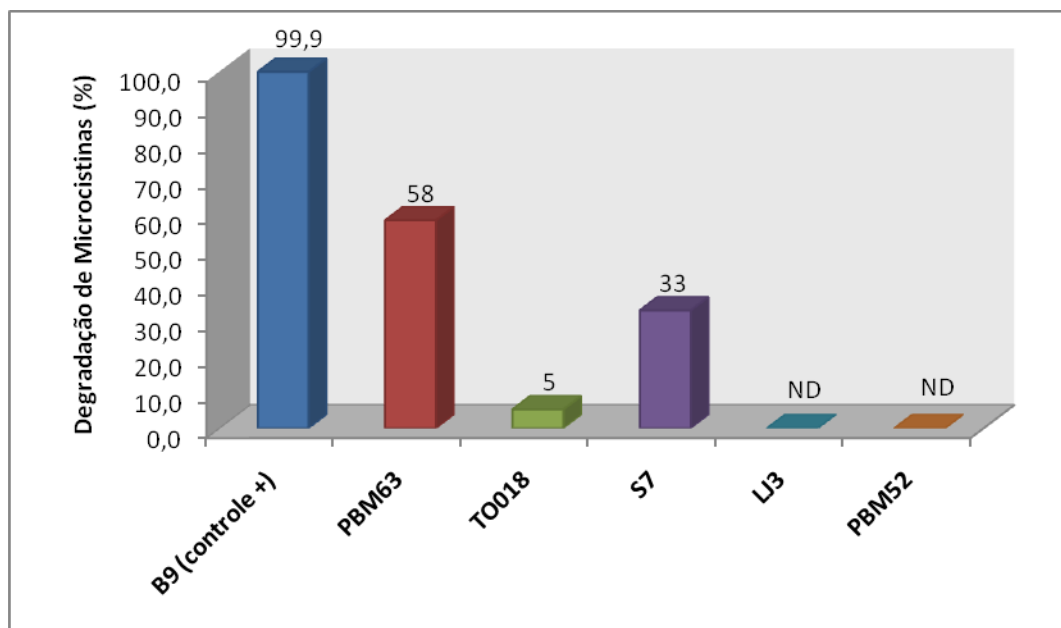


Figura 2: Biodegradação de microcistina por leveduras isoladas de meio ambiente.

Conforme mostram as figuras 1 e 2, onze isolados de levedura foram avaliados, sendo que apenas quatro não apresentaram atividade de biodegradação (PI07R2, PI06R1, LJ3 e PBM52). *S. cerevisiae* VI08R apresentou a maior taxa de degradação de MC (70%), seguida pela cepa PBM63 identificada como *Candida metapsilosis* (58%). *S. boulardii*, reconhecida como probiótica, foi capaz de degradar 53% da concentração inicial de MCs. As linhagens VI07L, PI07R1, TO018 e S7 apresentaram taxas de degradação de MCs variando entre 5 e 44%. Salienta-se que *S. cerevisiae* e *S. boulardii* são enquadrados como microrganismo grau GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA), contrastando com o gênero *Candida*, reconhecido normalmente como patogênico a humano.

A cepa PBM63 foi identificada como *C. metapsilosis*, anteriormente denominada *C. parapsilosis* grupo III, que tem sido comumente isolada de amostras de sangue da população latino-americana e asiática (TAVANTI *et al.*, 2005). A espécie tem sido relacionada à infecção sanguínea em neonatos, bem como a candidemia associada ao uso de cateter e hiperalimentação intravenosa (KRCMERY e BARNES, 2002). Conseqüentemente, a utilização de *C. metapsilosis* para o tratamento de água não seria adequada perante saúde humana. Portanto, os testes anticianobactérias foram realizados utilizando apenas *S. cerevisiae* VI08R.

SEGUNDA ETAPA: ATIVIDADE ANTICIANOBACTÉRIA

O antagonismo de *S. cerevisiae* VI08R frente à cianobactérias foi avaliado, determinando nível de clorofila-a e contagem celular em ensaio após 96 h de incubação. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos.

A contagem celular de levedura manteve-se constante na ordem de 10^6 células/mL no decorrer de ensaio (t_{0h} a t_{96h}), i.e., não ocorreu crescimento deste antagonista-teste.

S. cerevisiae VI08R não inibiu o crescimento de *P. tenue*, já que o nível de clorofila-a em t_{96h} aumentou em 6,7 µg/L em relação à t_0 . Embora uma redução de 50% na concentração de clorofila-a tenha sido observada para o controle negativo de *P. tenue* em t_{96h} , não foi detectada redução na contagem celular. Portanto, é provável que durante a análise a amostra tenha sofrido interferências que resultaram em leitura equivocada da concentração de clorofila-a.

A levedura também não apresentou atividade anti-*M. aeruginosa*, já que no controle negativo e na amostra contendo VI08R houve incremento de 13,4 µg/L de clorofila-a em t_{96h} .

Tabela 2: Efeito anticianobactéria de *S. cerevisiae* VI08R no nível de clorofila-a e contagem celular.

Cianobactéria	Levedura*	Cianobactéria				
		Clorofila-a (µg/L)			Contagem celular (célis/mL)	
		t _{0 h}	t _{96 h}	T (96 h – 0 h)	t _{0 h}	t _{96 h}
<i>Phormidium tenue</i>	-	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.	-	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.	-	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>M. aeruginosa</i>	-	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

* Culturas pré-condicionadas de cianobactérias (meio ASM-1) foram inoculadas com 10⁶ células de levedura VI08R e incubadas por 96 h (27°C; iluminação 20 µE.m-2.s-1; 100 rpm). VI08R indica amostras inoculadas com a levedura. O sinal (-) indica controle negativo.

** A subtração foi realizada entre as amostras VI08R 96 h e (-) 0 h.

Em relação à *Synechocystis* spp., a concentração de clorofila-a no controle negativo aumentou em t_{96h}, enquanto que na amostra inoculada com levedura, foi detectada redução (- 6,7 µg/L), indicando antagonismo de *S. cerevisiae* VI08R.

Antagonismo contra *Anabaena* spp. também foi observado, já que em t_{96 h} o nível de clorofila-a aumentou em 60,1 µg/L no controle negativo, enquanto que na amostra inoculada com levedura houve redução de 267,6 µg/L. Ressalta-se que em t_{0 h} o nível de clorofila-a na amostra VI08R foi de 447,7 µg/L, e diverge bastante do valor obtido para o controle negativo (240,6 µg/L), provavelmente devido à ocorrência de interferências durante a análise. Entretanto, a atividade anti- *Anabaena* spp. ainda é notável, já que mesmo quando comparados os valores de clorofila-a de VI08R t_{96 h} e controle negativo t_{0 h} houve redução de 60,2 µg/L.

A contagem celular de cianobactérias foi constante (10⁶ célula/mL) entre t_{0 h} e t_{96 h}, sendo realizada sem a utilização de corantes vitais e, portanto sem a possibilidade de distinguir células viáveis. Isto implica no fato de que, embora a contagem celular tenha permanecido constante, a concentração de células vivas pode ter sofrido alterações, já que os valores de clorofila-a indicaram redução de crescimento em algumas cianobactérias.

Para confirmar o antagonismo de VI08R frente à *Synechocystis* spp. e *Anabaena* spp. os autores sugerem que os ensaios anticianobactéria sejam repetidos e que amostras sejam coletadas também em outros períodos de incubação.

CONCLUSÕES

Os resultados dos testes de degradação de MCs foram satisfatórios, e a metodologia aplicada foi adequada para a avaliação de tal parâmetro, uma vez que o controle positivo (*S. microcystinivorans* B9) gerou os resultados esperados.

A levedura *S. cerevisiae* VI08R apresentou os melhores resultados frente à degradação de MC, além de efeito antagônico contra *Synechocystis* spp. e *Anabaena* spp, e foi selecionada para ser utilizada nos experimentos de recombinação gênica, inserindo os genes de degradação de MC de *S. microcystinivorans* B9.

C. metapsilosis PBM63 também apresentou expressiva taxa de degradação de MCs, porém 10% inferior ao detectado para *S. cerevisiae* VI08R. Soma-se a este fator, a garantia perante inocuidade da levedura VI08R para aplicação em tratamento de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF). 21ª ed., 2005.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. COOK, A. H. The chemistry and biology of yeasts. New York: Academic Press, 1958.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. IVERSEN, A.; KÜHN, I.; RAHMAN, M.; FRANKLIN, A.; BURMAN, L.G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; TORREL, E.; MÖLLBY, R. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ Microbiol*, v. 6, p.55-59, 2004.
17. 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.
18. 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.
19. JÜTTNER, F. Volatile organic substances. In: FAY, I. R.; VAN BAALEN, C. *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam, p. 453-469, 1987.
20. KIM, S.H.; WEI, C.I.; TZOU, Y.M.; AN, H.J. Multidrug-resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environment and retail products in Oklahoma. *J Food Prot*, v. 68, p. 2022-2029, 2005.
21. 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.

22. 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.
23. 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 A1 and 202 A2. *Toxicon*, v. 30, p.1457-1464, 1992.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. TIMMIS, K.N.; PIEPER, D.H. Bacteria designed for bioremediation. *TIBTECH*, v.17, p. 201 – 204, 1999.
29. TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. Degradation of microcystin using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake. *Chemosphere*, v. 65, n. 11, p. 117-124, 2006.
30. 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.
31. WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. 2a ed. Addendum to Volume 2. Geneva, 1998.
32. 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.
33. 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*. 2a ed., v. 2, parte C, p. 234–258. New York: Springer, 2005.
34. 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
35. 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.