



I-114 - BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAPOR BACTÉRIAS PRESENTES EM FILTROS DE CARVÃO BIOLÓGICO EM SISTEMA “BATCH”.

Alessandro Minillo ⁽¹⁾

Oceanólogo e Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) - Jovem Pesquisador FAPESP vinculado ao Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Sarah Caetano de Freitas

Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP de Ilha Solteira

William Deodato Isique

Biólogo pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP de São Jose do Rio Preto. Mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara. Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos – USP de São Carlos.

Edson Pereira Tangerino

Engenheiro Civil pela Escola de Engenharia de Lins (EEL), SP - Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS – Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Professor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Endereço ⁽¹⁾: Alameda Bahia, 550 – DEC – FEIS – UNESP - Centro – Ilha Solteira - SP - CEP: 15385-000 - Brasil - Tel: (18) 3743 1137 - e-mail: alminillo@yahoo.com.br

RESUMO

Microcistinas (MCs) são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias com comprovado efeito nocivo e carcinogênico em seres humanos. A persistência das MCs em ambientes aquáticos e sua difícil remoção no tratamento convencional de água representam um desafio às companhias de saneamento. Contudo, as MCs são susceptíveis a degradação por bactérias presentes na água, sedimento e efluentes de esgoto. O objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradação de MCs por bactérias presentes em filtros de carvão com atividade biológica (CAB) em sistema “batch”. Foi utilizada uma água de estudo contendo microcistinas (20 µg/L) com adição de suplementos específicos de um meio de cultivo, acrescido de um inóculo do efluente dos filtros CAB. Os ensaios foram realizados em duplicata, no escuro, com agitação, durante 84 dias, com análises de MCs semanalmente. Os resultados demonstraram que as MCs foram biodegradadas por bactérias predominantemente cocóides e com ausência de esporos. Este estudo infere sobre a capacidade de biodegradação de MCs por bactérias presentes em filtros CAB, e o possível uso destes microorganismos como alternativo de controle e remoção de MCs no tratamento de água potável.

PALAVRAS-CHAVE: Cianobactérias, microcistinas, biofilme, biodegradação, água potável.

INTRODUÇÃO

O acelerado processo de eutrofização dos ambientes aquáticos decorrente do enriquecimento nutricional nos corpos d'água por ação de fertilizantes utilizados na agricultura e pela geração de esgotos e efluentes industriais, tem resultado em sérios problemas de qualidade de água. Um dos problemas causado pela eutrofização é o surgimento de florações de cianobactérias produtoras de potentes toxinas, prejudiciais à saúde de humanos e animais. Dentre as toxinas produzidas por cianobactérias, as microcistinas são as que apresentam o maior número de casos de intoxicação em seres humanos e animais domésticos e selvagens (Chorus e Bartram, 1999).

As microcistinas tem como características uma elevada persistência na água, tolerância a temperaturas elevadas, resistência à hidrólise química e oxidação e uma lenta degradação natural (Saito et al., 2003a), o que dificulta a sua remoção durante o tratamento convencional de água (Newcombe e Nicholson, 2004).



Um dos tratamentos utilizados para sua remoção é o uso de filtros de carvão ativado em pó (CAP) ou granulado (CAG). Contudo, existem limitações sobre a capacidade de adsorção dos CAG é limitada e, por esta razão, estes necessitam ser regenerados periodicamente (Newcombe e Nicholson, 2004). Entretanto, durante o funcionamento dos filtros CAG, estes são colonizados por microorganismos com capacidade de degradar compostos orgânicos da água.

Embora diversos tratamentos químicos sejam propostos no tratamento de água, é possível em alguns momentos que esses procedimentos produzam substâncias com potencial carcinogênico e multagênico (Richardson, 2007). A biodegradação representa uma das formas moderadas e seguras para o tratamento de água na remoção de cianotoxinas e de outros micropoluentes presentes. Recentemente, tem sido reportada a habilidade das bactérias em decompor várias substâncias químicas (Liu *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novas tecnologias que aumentem a eficiência do tratamento de água, como a seleção de bactérias integrantes do biofilme em filtros biológicos de areia e carvão tem demonstrado uma perspectiva promissora na remoção de microcistinas, além de promover reduções significativas dos custos envolvidos no tratamento e uma disposição segura de água para o consumo humano (Wang *et al.*, 2007). Para Newcombe e Nicholson (2004) a biodegradação de cianotoxinas em instalações de tratamento de água representa uma técnica promissora, que pode assegurar padrões de potabilidade das águas destinadas para o consumo humano.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a degradação de microcistinas por bactérias presentes em filtros de carvão em sistema “batch”.

MATERIAL E MÉTODO

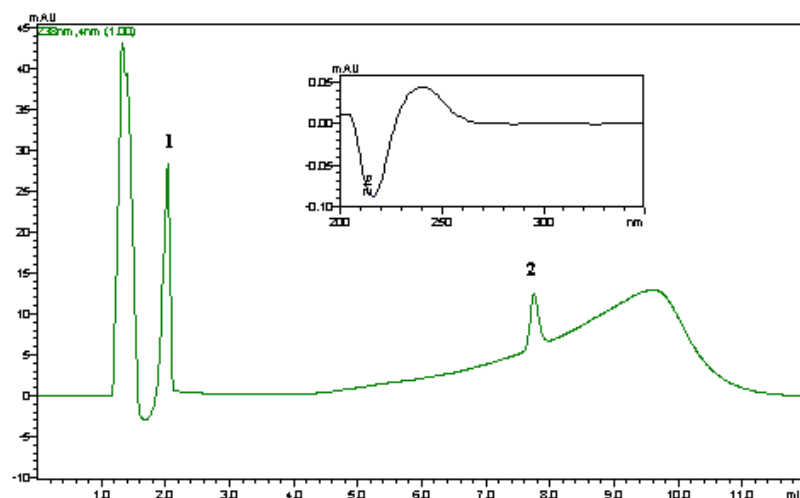
Para a realização deste trabalho foram utilizadas bactérias isoladas de um efluente de filtros de carvão biológico, utilizados em ensaios de remoção de microcistinas. Foi utilizada água destilada e esterilizada (120 °C – 15 min) e extrato celular de *Microcystis* spp com concentração final de 15 µg/L da cianotoxina (D-Leu1)-microcistina-LR. A água de estudo foi enriquecida com meio de cultivo específico contendo glicose (90mg/L), peptona (100mg/L), extrato de levedura (100mg/L) e acetado de sódio tri-hidratado (70mg/L).

Para o experimento foram utilizados dois galões de vidro (4L), sendo um preenchido com a água de estudo e 10% do volume do inóculo recolhido de um efluente de filtros biológicos de carvão. O segundo galão foi representado com as mesmas condições do primeiro, mas sem receber o inóculo, sendo este o tratamento controle da biodegradação natural da microcistina. O pH foi corrigido em $7,9 \pm 0,1$, sendo os ensaios realizados à 22 °C, no escuro, com agitação orbital (200 rpm), durante 5 semanas. Amostras (200 mL) foram retiradas semanalmente para análise do pH e determinação da concentração de microcistina.

Para a quantificação da microcistina nesse estudo foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com detector "Photodiode Array" (SPD-M20A), duas bombas de alta pressão (LC-20AT e LC 20AD), em coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack) com 4,6 x 150 mm e diâmetro de partícula de 5 µm segundo Meriluoto e Spoof (2005). A fase móvel foi constituída por duas componentes, uma com água Milli-Q com 0,05% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA), e a outra por acetonitrila com 0,05% (v/v) de TFA. Foi utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, com tempo de corrida cromatográfica de 12 minutos para cada amostra analisada em triplicatas. A microcistina foi identificada por seu tempo de retenção e características do espectro UV com um comprimento de onda de 238 nm (Figura 1), juntamente com auxílio de um padrão comercial externo de calibração da cianotoxina (D-Leu¹) - microcistina - LR, com 99 % de pureza.



Figura 1. Cromatograma e espectro de absorção da microcistina utilizada nos ensaios, com destaque para o pico do metanol (T.R:2,55 min.) (1) e de (D-Leu¹) – microcistina - LR (T.R: 7,82 min.) (2).



Isolamento e caracterização dos microrganismos nos filtros CAB

Os microrganismos presentes nos filtros CAB foram submetidos ao processo de isolamento e caracterização fenotípica. Para o isolamento foi retirado um volume total de 1 mL na superfície e interior dos filtros CAB, contendo os microrganismos, sendo o material homogeneizado e recolhido uma alíquota (200 µL), que foi transferido para placas de Petri contendo um meio nutriente, composto por extrato de carne (3 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹) e agar (15 g L⁻¹). O líquido foi distribuído com o auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 30 °C, no escuro. As colônias isoladas foram obtidas através de sucessivos plaqueamentos por esgotamento em estrias. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio, mantidos inclinados, contendo o agar nutriente. Essas colônias foram mantidas em refrigeração a 5 °C. Para cada colônia isolada foram observadas características morfológicas, coloração diferencial de Gram, e verificação da formação de esporos utilizando corante verde de malaquita, de modo obter informações dos possíveis grupos microbianos presentes nos filtros.

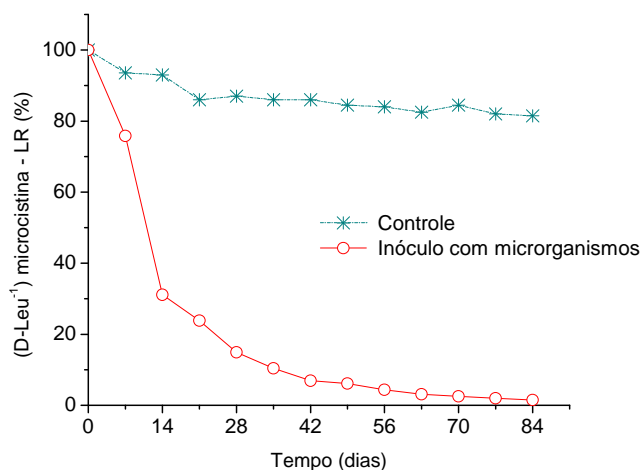
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que houve a biodegradação da microcistina no tratamento contendo microrganismos recolhidos dos filtros CAB (Figura 2). Pode-se verificar que o ensaio apresentou um comportamento semelhante na degradação da microcistina, com um rápido consumo da cianotoxina nas duas primeiras semanas, com uma redução de aproximadamente 70% do valor inicial, seguido por diminuição na taxa de consumo nas semanas seguintes. A partir do 84^o dia de experimento, os níveis de microcistina apresentaram suas concentrações abaixo do limite de detecção (<0,07 µg L⁻¹).

A diferença temporal encontrada na degradação de microcistina nos tratamentos avaliados possivelmente esteve associada a presença de outras fontes carbono na água de estudo utilizada, o que influenciou a biodegradação da toxina pelos microrganismos. O uso de um meio de cultivo no ensaio contendo suplementos orgânicos juntamente com o extrato de microcistina pode ter propiciado uma maior diversidade de fontes de alimento a serem consumidos pelos microrganismos, o que refletiu em uma menor taxa de biodegradação da toxina no meio. Desta forma, é possível estabelecer que a microcistina quando presente sob a forma exclusivamente purificada torne-se rapidamente consumida por microrganismos do que na forma de extratos semi-purificados quando extraídas de culturas de algas ou florações naturais, devido a presença de elementos orgânicos associados (não levando em conta as diferenças estruturais nas variantes de microcistinas testadas). Um estudo recente realizado por Lemes et al. (2008) constatou que uso de microcistinas quando purificadas em ensaios de biodegradação, foi um fator que condicionou seu rápido consumo por microrganismos. Estes autores atribuem que uma população bacteriana quando exposta apenas a presença de um composto

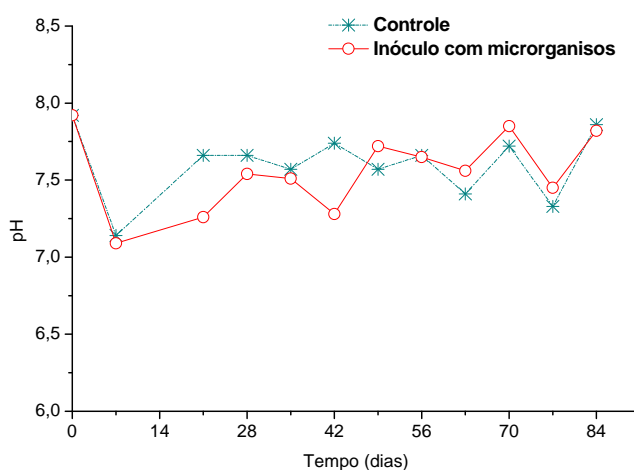
recalcitrante (microcistinas) irão administrar sua decomposição de forma rápida, o quanto possível, provavelmente em resposta a reduzida carência de outras fontes de alimento (Lemes et al., 2008).

Figura 2. Valores de (D-Leu1)-microcistina-LR biodegradadas durante o experimento.



O pH registrado nos ensaios realizados apresentaram valores ligeiramente acima da neutralidade, com valores médios entre 7,48 e 7,55 (Figura 3). De acordo com Saito et al. (2003a) a elevada estabilidade e persistência das toxinas de cianobactérias nos ambientes aquáticos assim como em água potável, podem estar relacionada com a alcalinidade do meio. O fato do pH no ensaio apresentou seus valores ligeiramente alcalinos pode ter potencializado uma redução na capacidade de degradação da microcistina pelos microrganismos nos tratamentos. Saito *et al.* (2003b) evidenciaram a redução no processo de biodegradação de microcistinas por bactérias (*Sphingomonas*) mediante um pH alcalino, o que segundo os autores poderia estar promovendo um efeito repressor enzimático no processo de degradação da cianotoxina.

Figura 3. Valores de pH determinados entre no tratamento durante o experimento.



A temperatura utilizada durante os ensaios pode também ter sido um fator importante na biodegradação da microcistina. Trabalhos realizados por Park *et al.* (2001) e Wang *et al.* (2007) demonstram que a taxa de degradação de microcistinas quando expostas à bactérias estão diretamente condicionadas a temperatura de incubação do meio, do que simplesmente às características inerentes das bactérias quando testadas isoladamente. Estes autores verificaram que valores elevados de temperatura (22 a 30 °C) do meio apresentaram uma maior degradação de microcistinas, quando comparadas a valores menores (5°C). Durante o estudo a temperatura utilizada nos tratamentos foi próxima (25 °C) aos valores considerados como ideais aos



reportados por Park *et al.* (2001) e Wang *et al.* (2007), o que corrobora à elevada degradação da cianotoxina no conjunto dos ensaios realizados. Contudo, deve ser ressaltada que valores extremos de temperaturas podem interferir no consumo de microcistinas por microrganismos, em decorrência de um efeito direto sobre redução metabólica ou inativação dos microrganismos responsáveis pela biodegradação da cianotoxina (Wang *et al.* 2007).

Microrganismos isolados dos ensaios de biodegradação

A partir do material recolhido de cada um dos ensaios de biodegradação com a microcistinas, foi possível verificar a presença de 13 formas colônias bacterianas. Estas formas coloniais apresentaram características variadas quanto a cor, tonalidade, e arranjo estrutural entre estas. Foi constatado o domínio para o grupo das gram-positivas, exceto para a amostra T8. Foi verificado que a maioria apresentou a ausência de esporos, com domínio das de formas cocóides (*cocos*), com alguns casos da presença de bactérias em forma de bastão (*bacilos*) curtos e de pequeno tamanho (Tabela 1).

Tabela 1- Características morfológicas das bactérias responsáveis pela biodegradação de microcistinas nos ensaios realizados.

Amostra	Características	Coloração Gram	Esporo	Forma
T1	Branca, opaca, borda rugosa, pequena	positivo	ausente	Bastonete curto e pequeno
T2	Branca, translúcida, formação de ponto central na colônia, borda lisa, pequena	positivo	ausente	Cocos
T3	Amarela, brilhante, borda lisa, pequena	positivo	ausente	Cocos
T4	Amarelada, espalha por todo meio, borda lisa	positivo	ausente	Cocos
T5	Esbranquiçada, opaca, espalha por todo meio, borda lisa,	positivo	ausente	Cocos
T6	Branca	positivo	ausente	Cocos
T7	Branca	positivo	ausente	Cocos
T8	Branca, opaca, borda lisa, pequena	negativa	presente	Bastonete curto
T9	Escura, brilhante, libera pigmento marrom para o meio, borda lisa	positivo	ausente	Bastonete curto
T10	Branca, translúcida, opaca, libera pigmento avermelhado para o meio, borda lisa, pequena	positivo	ausente	Cocos
T11	Branca, opaca, libera pigmento avermelhado para o meio, borda lisa	positivo	ausente	Cocos
T12	Alaranjada, opaca, borda lisa, puntiformes	positivo	ausente	Cocos
T13	Amarelas, opacas, borda lisa, pequenas	positivo	ausente	Bastonete curto e pequeno

Taxa de biodegradação de microcistinas

No presente estudo foram constadas uma taxa de biodegradação da microcistina, uma da ordem de $0,23 \mu\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Esta taxa obtida são relativamente reduzidas quando comparadas aos valores de consumo diários (de 5 a $13 \mu\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) registrados por Eleutério (2007) utilizando microrganismos presentes em filtros de areia.



Trabalhos anteriores realizados por Park *et al.* (2001) e Saitou *et al.* (2003a), reportaram taxas de biodegradação de microcistina extremamente superiores, com 13.000 e 9.000 $\mu\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$, respectivamente, tornando inviável uma comparação direta com os resultados do atual estudo devido a diferença extrema entre os valores.

A presença de microrganismos em elevadas concentrações no biofilme ativo de um filtro biológico de carvão ou areia não irá determinar efetivamente expressivas taxas de remoção da microcistina durante o tratamento de água (Ho *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Normalmente, microcistinas quando presentes em águas naturais são biodegradadas por microrganismos inerentes destes ambientes, embora o processo ocorra lentamente, podendo requerer um período de adaptação (Jones e Orr, 1994; Christoffersen *et al.*, 2002). Em ambientes em que a presença de microcistinas são frequentes a sua degradação pelos microrganismos ocorre sem a necessidade de um período “Lag” (Christoffersen *et al.*, 2002).

Deve ser ressaltada que a presença de fontes extras de carbono pode representar um fator de atenuação sobre as taxas de biodegradação de microcistinas, promovendo redução na velocidade de consumo por microrganismos, como observada no ensaio realizado. Contudo Ho *et al.* (2006) destaca que uma elevada biodegradação das cianotoxinas esta intrinsecamente dependente do tipo de microrganismos (bactérias) e de como esses são capazes de responder e/ou produzirem enzimas capazes de degradarem essas toxinas em condições ambientais.

O conhecimento a partir dos microrganismos responsáveis pela metabolização (biodegradação) de microcistinas e sua efetiva capacidade de consumir estas substâncias, representa um passo importante em estudos direcionados a identificação dos organismos e das condições ideais de eliminação desta cianotoxina em águas contaminadas destinadas ao abastecimento público.

Em continuidade a este estudo, estão sendo isolados e mantidos em meio de cultivo específico, os microrganismos responsáveis pela degradação de microcistinas. Nesta etapa sequencial da pesquisa, espera-se estabelecer a caracterização da diversidade genética das bactérias capazes de biodegradarem esta cianotoxina. Para tanto, serão utilizadas técnicas de biologia molecular, por meio da determinação na região do gene 16S rRNA do DNA metagenômico, este amplificado por meio da reação de PCR.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Houve a degradação da microcistina pelos microrganismos presentes no biofilme dos filtros de carvão com atividade biológica (CAB), demonstrando a capacidade desses microrganismos em metabolizarem esta toxina;

A degradação natural da cianotoxina ocorreu, embora de forma reduzida quando comparados no tratamento contendo as bactérias presentes no meio, o que comprova o potencial dos microrganismos no efeito de metabolização da cianotoxina;

Foi verificado um efeito de co-metabolismo da microcistina pelos microrganismos alimentados com a cianotoxina;

Foi observada a presença exclusiva de formas bacterianas nos isolados cultivados dos filtros CAB, sendo representado principalmente por bactérias, sem formação de esporos, com domínio de forma de cocos e gram-positivas;

Novos estudos são necessários, especialmente na caracterização das espécies e consórcios de bactérias associados aos filtros de carvão com atividade biológica, de modo a selecionar linhagens específicas capazes de metabolizarem eficientemente estas cianotoxinas.

A possibilidade de selecionar linhagens específicas de microrganismos (bactérias) capazes de degradarem microcistinas e seu uso como agentes colonizadores em filtros biológicos de carvão, pode representar um



aprimoramento tecnológico direcionado no tratamento de água, aumentando a eficiência na remoção de compostos recalcitrantes;

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº: 06/53502-0) pela bolsa concedida e o financiamento do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHORUS, I. ; BARTRAM, J., (Eds). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. E & FN Spon, Inc. New York, 416p., 1999.
2. CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A., Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* 27:125–136, 2002.
3. ELEUTERIO, L., Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by biofiltration: identification of toxin-degrading bacterial and effects of backwashing. Tese (Doutorado), Universidade de Nevada, Las Vegas, USA. 237p., 2007.
4. 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.* 40: 768–774, 2006.
5. JONES, G.J.; ORR, P.T., Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 28 (4): 871–876, 1994.
6. LEMES, G.A.F.; KERNSANACH, R.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A., Biodegradation of microcystin by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 358–365, 2008.
7. LIU, Y.J.; ZHANG, A.N.; WANG, X.C., Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 187–192, 2009.
8. MERILUOTO, J.; SPOOF, L., Solid phase extraction of microcystins in water samples. TOXIC European Project “**Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis**”, Abo Akademi University, Finland, 2005.
9. NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B., Water treatment options for dissolved Cyanotoxins. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, (53/4): 227–239, 2004.
10. PARK, H.D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K., Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.*, 16: 337–343, 2001.
11. RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINID, D.M., Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research*, 636: 178–242, 2007.
12. SAITO, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M., Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. *J. Water SRT - Aqua* 52, 13 – 18, 2003a.
13. SAITO, T.; OKANA, K.; PARK, H.D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B.A.; BURNS, B.P.; SUGIURA, N., Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* 229 (2): 271 – 276, 2003b.
14. WANG, H.; HOB. L.; LEWISA, D.M.; BROOKESB, J.D.; NEWCOMB, G., Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. *Water Res.*, 41: 4262 – 4270, 2007.