



I-055 – ANÁLISE DA REMOÇÃO DE MICROCISTINA NA ÁGUA POR MEIO DE FILTROS DE CARVÃO GRANULAR COM ATIVIDADE BIOLÓGICA EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

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

Michel Viana da Silva

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 Carlo (EESC/USP) – Professor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP.

Endereço ⁽¹⁾: Alameda Bahia, 550, Centro – Ilha Solteira - SP - CEP: 15385-000 - Brasil - Tel: (18) 3743 1137 / 1261 - e-mail: alminillo@yahoo.com.br

RESUMO

A crescente incidência de florações de cianobactérias nos mananciais de abastecimento pode provocar conseqüências à saúde humana e comprometimento no tratamento da água convencional. Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de tratamento de água que contemplem tanto a remoção das células viáveis de cianobactérias e suas toxinas dissolvidas na água. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de remoção da cianotoxina (D-Leu¹)-microcistina-LR utilizando filtros de carvão ativado biologicamente (CAB) em condições de laboratório. Juntamente a remoção desta cianotoxina, foi monitorada a eficiência na retenção do carbono orgânico dissolvido. Os resultados demonstraram que os filtros CAB apresentaram remoção da microcistina e excelente retenção do carbono orgânico dissolvido, evidenciando o potencial dos microrganismos presentes nesses filtros biológicos a capacidade de metabolização desta cianotoxina. Desta forma, pode-se inferir que os filtros biológicos de carvão podem representar um método alternativo e/ou complementar na remoção da microcistinas durante o tratamento de água.

PALAVRAS-CHAVE: Cianobactérias, microcistinas, biofilme, biofiltração.

INTRODUÇÃO

A eutrofização artificial produz mudanças na qualidade da água incluindo a redução de oxigênio dissolvido, da biodiversidade aquática, a perda das qualidades cênicas, a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias. Essas florações podem provocar o aumento no custo do tratamento da água de abastecimento e conseqüências relacionadas à saúde pública.

Uma conseqüência direta da eutrofização é o surgimento e a proliferação de florescimentos de cianobactérias produtoras de potentes toxinas. A ocorrência deste grupo de microrganismos em corpos de água usados para abastecimento urbano pode apresentar um sério risco à população humana caso houver uma exposição direta a estas biotoxinas produzidas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Dentre as toxinas de cianobactérias (cianotoxinas) conhecidas, microcistinas estão entre as mais descritas na literatura, em razão dos inúmeros casos associados de intoxicações. Sua estrutura química apresenta altamente estável na água e tolerante a variações de temperatura, o que dificulta a sua remoção durante o processo convencional de tratamento de água.



Atualmente tem sido desenvolvida muita pesquisa sugerindo novas técnicas de remoção e tratamento de água, visando melhorar a qualidade dos corpos hídricos atingidos por florações de cianobactérias, como também à otimização dos processos envolvidos na remoção das cianobactérias e suas toxinas durante o tratamento de água em estações de tratamento de água (ETA). O uso de filtros de carvão ativado granular (CAG) tem mostrado ser muito eficiente na remoção e atenuação das microcistinas.

Entretanto, durante o funcionamento dos filtros CAG, estes são naturalmente colonizados por microorganismos com capacidade de degradar uma diversidade de compostos orgânicos presentes na água, entre estes as cianotoxinas. Estes filtros de carvão com atividade biológica (CAB) representam uma alternativa do controle e remoção destes compostos nocivos ao homem durante o tratamento de água, além de reduzir ou eliminar a necessidade de regeneração periódica destes filtros CAG (NEWCOMBE e NICHOLSON, 2004; MESQUITA et al. 2006).

Um benefício adicional no uso dos filtros CAB é também a possibilidade de reduzir expressivamente a formação de trihalometanos e demanda de cloro na água tratada devido o maior consumo da matéria orgânica na água bruta (SIMPSON, 2008). Durante o funcionamento de um filtro CAB os processos de adsorção e a de biodegradação ocorrem simultaneamente. A biodegradação dos compostos orgânicos pelos microrganismos presentes no biofilme permitem aumentar a capacidade de adsorção do carvão ativado, conseqüentemente, a remoção de inúmeros compostos na água torna-se ampliada (SOBECKA et al. 2006). Alguns autores sugerem que a biosorção pode ser outro mecanismo adicional de remoção da matéria orgânica natural (MON) pelos microrganismos aderidos no biofilme dos filtros CAB (SIMPSON, 2008).

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivos avaliar a remoção da (D-Leu¹) - microcistina - LR utilizando filtros biológicos de carvão (CAB) em condições de laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação dos filtros de carvão granular com atividade biológica

Foram utilizados 4 filtros de carvão com atividade biológica (CAB), colonizados em condições de laboratório. Esses filtros constituem-se de colunas de vidro (borossilicato) de 10 cm, com diâmetro interno de 1,2 cm, preenchidos por 3 cm de uma camada de carvão, com aproximadamente 3,5 gramas (peso úmido). Foi utilizado o carvão de origem vegetal obtido da casca de coco, com grânulos de tamanho de 0,35 a 0,50 mm. Para a colonização efetiva, estes filtros receberam água bruta de um reservatório próximo da cidade. Como controle foram utilizados 4 filtros semelhantes, mas não colonizados (CAG), os quais foram alimentados com a água utilizada nos filtros CAB suplementada com azida de sódio (6 mM) para evitar o crescimento de microrganismos.

Delineamento dos ensaios com microcistinas em filtros CAB

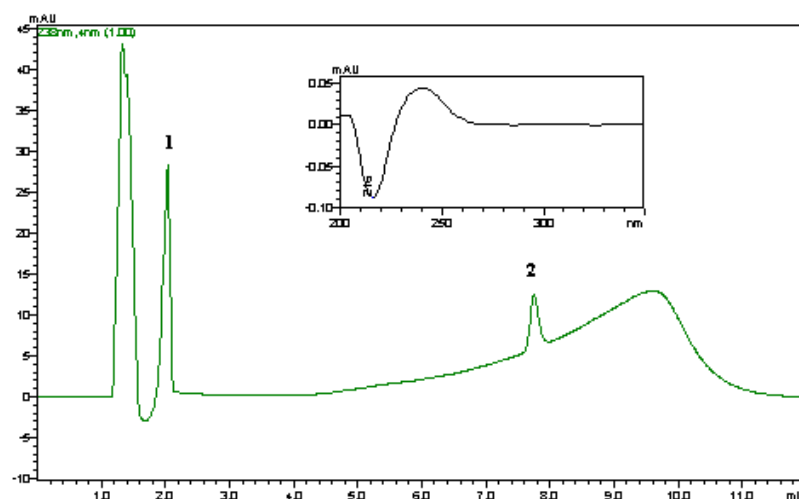
Para o ensaio, os 4 filtros colonizados (CAB) e os 4 não colonizados por microrganismos (CAG), foram expostos a mesma água de estudo coletada em um reservatório próximo, filtrada (1,0 µm), esterilizada (120 °C - 15 minutos), e suplementada com um extrato celular de *Microcystis spp*, contendo uma concentração final de 20 µg eq. (D-Leu¹)-microcistina-LR, durante um período de 30 dias. Para prevenir a colonização por microrganismos nos filtros CAG, foi adicionada à água de alimentação uma solução de azida de sódio (6 mM). O pH da água dos ensaios foi corrigido para 7,5 ± 0,1 (NaOH - 0,1 M) antes de ser aplicada nos filtros BAC e CAG. Os ensaios foram realizados a 25 ± 2 °C, sendo a água de estudo bombeada para os filtros em fluxo contínuo por uma bomba peristáltica, com vazão 0,3mL/ml, e o tempo de detenção hidráulica nos filtros de 8 minutos. Foram recolhidas amostras (200 mL) afluentes e efluentes destes filtros semanalmente para quantificação de microcistina.

A determinação da microcistina presente nas amostras (afluente e efluentes dos filtros) foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão), 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 4,6mm x 250 mm e diâmetro de partícula de 5 µm, segundo metodologia descrita por Meriluoto e



Spoof (2005). A fase móvel foi constituída por duas componentes, uma com água Milli-Q com 0,05% (v/v) de TFA e a outra por acetonitrila com 0,05% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA). Foi utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, com tempo de corrida cromatográfica de 12 minutos para cada amostra, sendo estas analisadas 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 de (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).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Valores de pH

O pH das amostras dos galões CAB e CAG apresentaram valores próximos entre si, ambos expressando valores próximos na neutralidade, com valor médio de 7,1 para o galão CAB e 7,3 para o galão CAG. As amostras recolhidas dos efluentes dos filtros apresentaram comportamento diferenciado, com valores levemente ácidos (6,9) para os filtros colonizados por microrganismos, enquanto os filtros CAG os valores apresentam valor média de 7,40. Este padrão de redução do pH no efluente dos filtros CAB apresentou concordância o um estudo realizado por Sobecka et al. (2006) em ensaios de laboratório com filtros biológicos de carvão. Esta redução dos valores de pH pode estar ocorrendo devido à libertação para o meio de substâncias acidificadas produzidas pelos microrganismos que se desenvolvem envolta do carvão (CALDWELL et al., 1992). Os valores de pH levemente básico encontrados nos filtros CAG decorreram da presença da azida sódica, esta utilizada com intuito de inibir o crescimento e formação de biofilme nos filtros CAG.

Valores de Oxigênio dissolvido

Com base nos resultados obtidos de oxigênio dissolvido (Tabela 1), constata-se que os valores em médio dos filtros CAB (5,01 mg/L) foram menores quando comparados com os filtros CAG (5,49 mg/L). Esta diferença na concentração do oxigênio dissolvido pode ser explicada pela atividade biológica dos microrganismos associados ao carvão durante a metabolização e biodegradação dos componentes orgânicos presentes na água, especialmente as microcistinas.



Tabela 1. Média mensal dos valores de oxigênio dissolvido entre os filtros CAB e CAG.

Data	Filtro CAB (mg/L)	Filtro CAG (mg/L)
Julho/2008	5,63	5,85
Agosto/2008	5,00	5,4
Setembro/2008	4,77	5,24
Outubro/2008	4,10	7,00
Novembro/2008	4,68	4,00

Remoção de microcistina nos filtros testados

Os resultados obtidos demonstram que ambos os filtros testados apresentaram a remoção de microcistinas. De modo geral, observa-se que houve remoção de microcistinas nos filtros CAB em relação à amostra presente no galão (Figura 2), sendo o mesmo padrão constatado para os filtros CAG na remoção desta cianotoxina em relação à água contida no galão (Figura 3).

Figura 2. Concentrações do microcistinas nas amostras afluentes dos galões (CAB) e efluentes dos filtros (CAB).

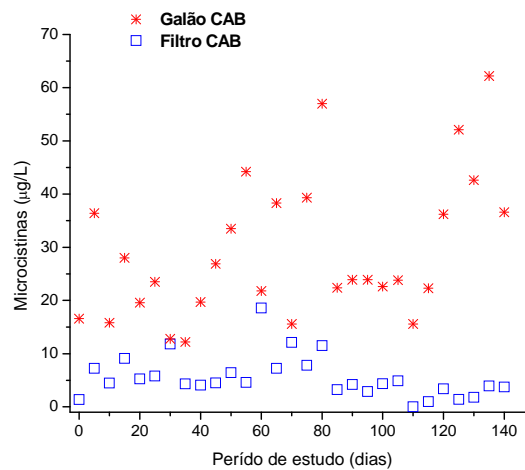
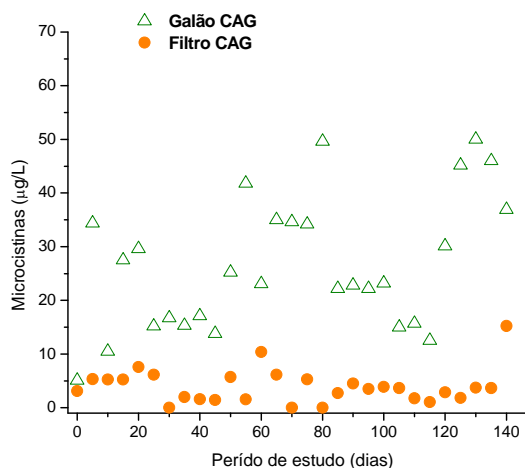


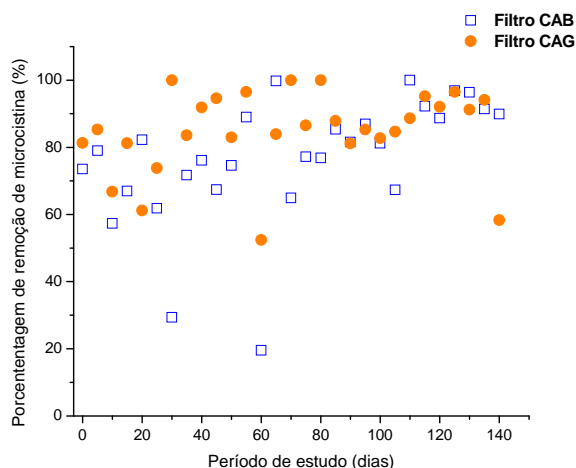
Figura 3. Concentrações do microcistinas nas amostras afluentes dos galões (CAG) e efluentes dos filtros CAG.





Os resultados encontrados demonstraram que os filtros CAG apresentaram uma porcentagem de remoção (em média) superior quando comparados aos filtros CAB (Figura 4).

Figura 4. Porcentagem de remoção de microcistinas nas amostras filtradas nos filtros CAB e CAG.



Carbono orgânico dissolvido

Os resultados obtidos para os valores de carbono orgânico dissolvido demonstraram que ambos os filtros apresentaram remoção (Tabela 2). De modo geral, os filtros colonizados por microrganismos (CAB) apresentaram uma maior remoção de carbono (em média) quando comparado com os filtros não colonizados (CAG). Estes padrão observado demonstra a capacidade do biofilme formado nos filtros CAB em reter os compostos orgânicos presentes na água. Desta forma, fica evidenciado a potencialidade dos microrganismos presentes no biofilme dos filtros CAB em metabolizarem os componentes orgânicos presentes na água de estudo utilizada, especialmente as microcistinas.

Tabela 2. Valores de carbono orgânico dissolvido nas amostras afluentes dos galões e efluentes dos filtros testados.

Dias	Galão CAB	Filtro CAB	Galão CAG	Filtro GAC
05	9,05	6,29	12,40	12,37
10	9,16	5,07	9,58	8,6
15	8,04	5,52	8,70	7,42
20	15,79	9,26	15,77	10,53
25	22,93	19,07	19,01	17,59
30	9,54	6,35	10,14	9,24
35	11,38	9,67	13,6	11,06
40	9,79	6,26	11	9,32
45	9,89	8,49	8,0	7,61
50	11,44	4,04	9,40	6,99
55	7,45	3,18	8,05	7,80

Foi evidenciado que entre ambos os filtros testados, os filtros CAG foram aqueles que apresentaram a maior remoção de microcistinas. Esta menor porcentagem de remoção da cianotoxina testada pelo filtro CAB pode estar associada pela presença de outras fontes de carbono na água de estudo, o qual podem estarem sendo mais rapidamente assimiladas e metabolizadas pelos microrganismos formadores do biofilme nesses filtros. Segundo Wang et al. (2007), a fase em que ocorre adsorção e biodegradação é usada para descrever um sistema de tratamento utilizando filtros CAG. A remoção principal de microcistina nesta fase poderia estar sendo biodegradada por microrganismos situados na superfície do carvão, em que utilizam esta cianotoxina



como um substrato secundário. A simples presença da matéria orgânica natural (MON) representa uma fonte primária de substrato de energia e carbono, devido sua alta concentração, esta em níveis de miligramas por litros quando comparada com concentrações de microcistinas que estão na ordem de microgramas por litro (WANG et al., 2007).

Experimentos realizados por Jones et al. (1994), demonstraram que a degradação de microcistinas ocorrem em duas fases, estas promovidas por uma indução seqüencial de duas populações distintas de bactérias. Em uma etapa inicial a quebra da microcistina-LR estaria sendo utilizada inicialmente como fonte de carbono e energia, enquanto que para uma segunda fase, as baixas concentrações residuais desta toxina estariam sendo co-metabolizadas por estas bactérias (JONES e ORR, 1994).

Outro aspecto a ser considerado foi a perda de carga hidráulica dos filtros CAB ao longo do tempo em decorrência do elevado crescimento de microrganismos formadores do biofilme. Como medida de restauração da vazão estabelecida, foi procedida a lavagem destes filtros CAB de modo reduzir a saturação por microrganismos colonizadores. Isto provavelmente influenciou a redução na remoção de microcistinas, devido a necessário de um tempo maior para a recolonização dos filtros por microrganismos.

De acordo com Wang et al., (2007) apesar da adsorção do carvão em filtros CAG responder por grande parte da remoção da microcistinas dissolvidas na água, a formação natural do biofilme nestes filtros possibilitam um aumento no tempo de remoção desta cianotoxina e outros compostos orgânicos como a MON (matéria orgânica natural) como resultado de sua biodegradação

Com base nos resultados encontrados nesta primeira etapa deste estudo, pode-se verificar que os filtros CAB podem atuar como uma pré-barreira na remoção de microcistina e outros compostos orgânicos indesejáveis dissolvidos na água, visto que o potencial destes em remover a matéria orgânica dissolvida. Considerando estes aspectos, o uso deste sistema de biofiltração pode representar uma importante ferramenta no tratamento de água, assim como uma medida de redução nos custos operacionais do tratamento de água, a exemplo a capacidade de prolongar o tempo de uso do carvão, por meio dos processos de bioregeneração (AKTAS e ÇEÇEN, 2006), devido à presença do biofilme.

Um importante fator a ser destacado é que os resultados obtidos destacam a possibilidade de prolongar o tempo de uso destes filtros CAB, sem a necessidade de regeneração periódica do seu leito filtrante, mantendo uma remoção de cianotoxinas próxima à observada sobre os filtros CAG.

CONCLUSÕES

Os filtros CAB e CAG apresentaram comportamento semelhante para a remoção de microcistinas;

Os filtros CAB apresentaram um melhor desempenho na remoção do carbono orgânico dissolvido;

As amostras coletas dos filtros CAB apresentaram os menores valores de oxigênio dissolvido, o que evidenciado a ação dos microrganismos no consumo de componentes orgânicos na água de estudo utilizada;

A remoção de microcistinas nos filtros colonizados por microrganismos revelam a importância do biofilme na biodegradação e adsorção desses compostos orgânicos;

O uso dos filtros colonizados por microrganismos podem representar um método alternativo e/ou complementar na remoção da microcistinas durante o tratamento de água;

Novos estudos são necessários nesta proposta, principalmente na caracterização das bactérias associadas aos filtros de carvão com atividade biológica, de modo a selecionar quais os consórcios de bactérias que promovam uma melhor performance na biodegradação da microcistina.



AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo n^o: 06/53502-0) pela bolsa concedida e o financiamento do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AKTAS, O.; ÇEÇEN, F., Bioregeneration of activated carbon: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 257-272, 2007.
- 2- CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAWRENCE, J. R., Imaging of Bacterial Cells by Fluorescence Exclusion Using Confocal Laser Microscopy. *J. Microbiol. Methods*, 15: 249, 1992.
- 3- CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds)., **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. E & FN Spon, New York, 416p., 1999.
- 4- 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. *Wat. Res.* 28 (4): 871–876, 1994.
- 5- JONES, G.J.; BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R.L.; DOELLE, H., Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2: 228–235, 1994.
- 6- 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.
- 7- MESQUITA, E.; MENAIA J.; ROSA M. J.; COSTA V., Microcystin-LR removal by bench scale biologically-activated-carbon filters. Proc. 4th Intern. Slow Sand and Alternative Biological Filtration Conf., 3-5 May 2006, Mülheim.
- 8- NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B., Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *J. of Wat. Suppl.: Res. and Technol. - AQUA*, (53/4), 227-239, 2004.
- 9- SIMPSON, D.R., Biofilm processes in biologically active carbon water purification. *Water Research*, 42: 2839– 2848, 2008.
- 10- SOBECKA, S. B.; TOMASZEWSKA, M.; JANUS, M.; MORAWSKI, A. W., Biological activation of carbon filters. *Water Res.*, 40 (2): 355-363, 2006.
- 11- 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.