



I-058 – COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE CIANOBACTÉRIAS

Emília Kiyomi Kuroda⁽¹⁾

Engenheira civil (Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1999), mestre (2002) e doutora (2006) em Hidráulica e Saneamento (Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo). Docente do Depto. de Construção Civil da Universidade Estadual de Londrina.

Daiki Fujise

Biólogo pesquisador doutor do Kawasaki Waterworks Bureau, Kanagawa, Japão.

Kiyomi Tsuji

Química, pesquisadora doutora da Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Chigasaki, Kanagawa, Japão.

Elisa Yoko Hirooka

Docente do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina.

Elisabete Yurie Sataque Ono

Docente do Depto. Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

Ken-ichi Harada

Professor da Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya, Aichi, Japão.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Construção Civil – Centro de Tecnologia e Urbanismo - Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid PR445 Km 380, Campus Universitário, Cx Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina – Paraná – Brasil, Tel: +55 (43) 3371- 4455, Email: ekuroda@yahoo.com.br

RESUMO

Muitos eventos de gosto e odor (taste and odour - T&O) têm sido associados aos compostos orgânicos voláteis (volatile organic compounds – VOCs) produzidos por cianobactérias, algas ou microrganismos heterotróficos (Jüttner, 1995, Watson, 2003) no ambiente aquático. A ocorrência desses compostos tem causado sérios problemas aos sistemas de abastecimento relacionados à vulnerabilidade da confiança do consumidor em relação à qualidade da água distribuída e aos sistemas de tratamento, por requerer processos específicos para remoção e implicar em custos adicionais. Este estudo preliminar foi realizado utilizando-se culturas de *Microcystis*, *Anabaena*, *Synechocystis* e *Phormidium* sob condições favoráveis ao crescimento, amostradas durante 45 dias para caracterização biológica e monitoramento da produção de alguns VOCs tais como geosmina e 2-metil iso-borneol associados ao gosto e odor de terra e mofo, e β -ciclocitral, β -ionona, 2(3)-metil-1-butanol. Foi possível avaliar qualitativa e quantitativamente a produção de VOCs em função do tempo e obter associações que podem contribuir para prevenção e controle de possíveis eventos de T&O em mananciais de abastecimento.

PALAVRAS-CHAVE: cianobactéria, compostos orgânicos voláteis, gosto e odor, pigmentos.

INTRODUÇÃO

O enriquecimento artificial dos mananciais superficiais com nitrogênio, fósforo e outros nutrientes sob determinadas condições ambientais pode conduzir à quebra do equilíbrio biológico dos corpos aquáticos e contribuir para a ocorrência de florações de algas e cianobactérias. A presença de metabólitos e subprodutos de cianobactérias em mananciais destinados ao abastecimento pode interferir diretamente na qualidade de água e introduzir efeitos negativos de ordens organolépticas pela atribuição de gosto e odor T&O às águas.

Muitos eventos de gosto e odor (taste and odour - T&O) têm sido associados aos compostos orgânicos voláteis (volatile organic compounds – VOCs) produzidos por cianobactérias, algas ou microrganismos heterotróficos (Jüttner, 1995, Watson, 2003) no ambiente aquático. A ocorrência desses compostos tem causado sérios problemas aos sistemas de abastecimento relacionados à vulnerabilidade da confiança do consumidor em relação à qualidade da água distribuída e aos sistemas de tratamento, por requerer processos específicos para remoção e implicar em custos adicionais.

Por outro lado, no cenário mundial, a indústria pesqueira sofreu enormes prejuízos devido à qualidade inaceitável do peixe pelos consumidores. Assim, este tema requer a realização de investigações adicionais

para tornar possível o entendimento e mitigação dos processos que controlam os eventos de T&O e produção de VOCs em ambientes aquáticos.

Este estudo preliminar foi desenvolvido com o objetivo de fornecer subsídios para avaliação dos processos que controlam a produção de compostos orgânicos voláteis - VOCs produzidos por cianobactérias. Para isso, foram utilizadas culturas de *Microcystis*, *Anabaena*, *Synechocystis* e *Phormidium* sob condições favoráveis ao crescimento, amostradas durante 45 dias para caracterização biológica e monitoramento da produção de alguns VOCs tais como geosmina e 2-metil iso-borneol associados ao gosto e odor de terra e mofo, e β -ciclocitral, β -ionona, 2(3)-metil-1-butanol de acordo com a Figura 1. Foi possível avaliar qualitativa e quantitativamente a produção de VOCs em função do tempo e obter associações que podem contribuir para prevenção e controle de possíveis eventos de T&O em mananciais de abastecimento.

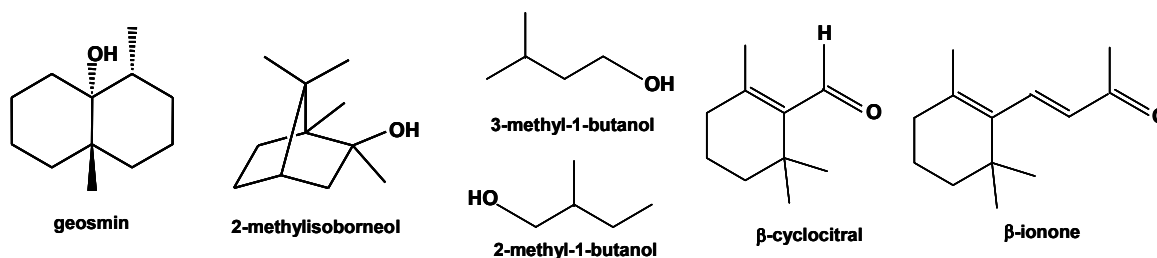


Figura 1 - Alguns compostos orgânicos voláteis - VOCs produzidos por cianobactérias

MATERIAL E MÉTODOS

CULTURAS DE CIANOBACTÉRIAS

Nesse estudo foram utilizadas cepas de *Microcystis* (NIES-87, NIES-102, NIES-112 e NIES-298), *Anabaena* (NIES-808, NIES-825 e AU02g), *Phormidium* (NIES-611) e *Synechocystis* (PCC-6803), adquiridas do National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japão – NIES, do Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, Paris, França – PCC e isolada do Lago Sagami, Kanagawa, Japan (AU02g) (Tabela 1). Essas cepas foram cultivadas em erlenmeyers contendo 500 mL de meio MA, autoclavados, mantidos sob condições contínuas e controladas de temperatura (25°C), iluminação (2000 lx), e agitação (100 rpm) por 45 dias.

O meio MA consistiu na mistura de bicina (500 mg); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50 mg); KNO_3 (100 mg); NaNO_3 (50 mg); Na_2SO_4 (40 mg); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 mg); β -sodioglicerofosfato (100 mg); 1 mL de solução mista composta por Na_2EDTA (1 mg); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mg); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 mg); ZnCl_2 (0,1 mg); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mg); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,16 mg) e H_3BO_3 (4 mg) em 200 mL de água ultrapura, pH ajustado para 8.6.

Tabela 1 – Características das cepas de cianobactérias

Cepa	Classificação	Origem
NIES-87	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Floração Lago Kasumigaura / Ibaraki, Japão
NIES-102	<i>Microcystis viridis</i>	Floração Lago Kasumigaura / Ibaraki, Japão
NIES-112	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Floração Lago Suwa / Nagano, Japão
NIES-298	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Floração Lago Kasumigaura / Ibaraki, Japão
NIES-808	<i>Anabaena mendotae</i>	Floração Lago Akan / Hokkaido, Japão
NIES-825	<i>Anabaena ucrainica</i>	Floração Lago Sagami / Kanagawa, Japão
AU02g	<i>Anabaena ucrainica</i>	Floração Lago Sagami / Kanagawa, Japão
NIES-611	<i>Phormidium tenue</i>	Lago Biwa / Shiga, Japão
PCC-6803	<i>Synechocystis</i>	California, U.S.A., 1968

NIES: National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japão;

PCC: Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, Paris, França.



DENSIDADE DE CÉLULAS, CONCENTRAÇÕES DE CLOROFILA-a E DE β -CAROTENO

A determinação da densidade de células de cianobactérias nas culturas foi realizada por microscopia óptica (Nikon / Eclipse E800, Hamamatsu color chilled 3CCD Camera) em câmara de Thoma. Para determinação da concentração dos pigmentos clorofila-a e β -caroteno, alíquotas de 5 mL foram filtradas em filtros de fibra de vidro tipo GF/C, extraídas em acetona 100% e metanol 100%, respectivamente, por 12 h à 4°C sob ausência de luz. A análise de clorofila-a foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico descrito em SCOR/UNESCO (1975). A leitura da absorbância dos extratos centrifugados a 3000 g por 15 min foi realizada a 750, 663, 645 e 630 nm, em espectrofotômetro UV 2450, Shimadzu, Kyoto, Japan e cubeta com comprimento óptico de 10 mm..

A análise de β -caroteno foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas LC/MS, equipado com bomba Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA), detector de diodo PDA (Waters 2996) (447 nm), coluna TSK gel Super-ODS (100 \times 2 mm ID, TOSOH) e espectrometria de massas ZQ 2000 (Waters), ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo, potencial de 4.5 kV no capilar, monitoramento de íon selecionado (SIM) a m/z 537. Acetonitrila / etanol (95:5, v.v⁻¹) foram utilizados como fase móvel com fluxo de 200 μ L.min⁻¹, o volume de injeção foi de 10 μ L e a temperatura da coluna foi de 35°C.

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS – VOCs

Alíquotas das culturas de cianobactérias filtradas, para análise de VOCs extracelulares e não filtradas para análise de VOCs totais, foram diluídas em diversas proporções e sujeitas à extração salina seguida de microextração em fase sólida com headspace (HS-SPME) por meio de um sistema automático de amostragem (Combi PAL system autosampler CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas GC/MS, injetor (Agilent 6890, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), coluna J&W Scientific (Folsom, CA, USA) DB-624 (30 m \times 0.25 mm ID \times 1.4 μ m film), detector seletivo de massa (Agilent 5973), monitoramento de íon selecionado (SIM) a m/z 152 e 137 para β -ciclocitral, m/z 177, 135 para β -ionona, m/z , 70, 57, 41 para 2-etil-1-butanol, m/z , 70, 55, 41 para 3-metil-1-butanol, m/z , 112, 111 para geosmina, m/z , 95, 107 para 2-metil iso-borneol e 115, 114 para geosmina d3 (usado como padrão interno).

RESULTADOS

Em geral, o crescimento celular de cianobactérias atingiu o final da fase exponencial aos 21 dias, com densidades entre $2,3 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^7$ cel.mL⁻¹. As concentrações máximas de clorofila-a e β -caroteno variaram entre 2302,6 a 4988,9 g.L⁻¹ (2,6 a 5,6 M) e de 302,1 a 2777,4 g.L⁻¹ (0,6 a 5,2 M), respectivamente.

Entre as cepas de cianobactérias estudadas, a produção de β -ciclocitral, 2(3)-metil-1-butanol só foi expressiva para o gênero *Microcystis* (Figura 2). No entanto, para valores de densidade celular similares (entre $1,2 \times 10^6$ e $3,4 \times 10^6$ cel.mL⁻¹), os valores de máxima produção de β -ciclocitral e 2(3)-metil-1-butanol (soma das formas isômeras) variaram significativamente, entre 74,0 e 706,8 μ g.L⁻¹ (0,5 e 4,6 μ M) e entre 100,3 e 2340,0 μ g.L⁻¹ (1,1 e 26,5 μ M), respectivamente.

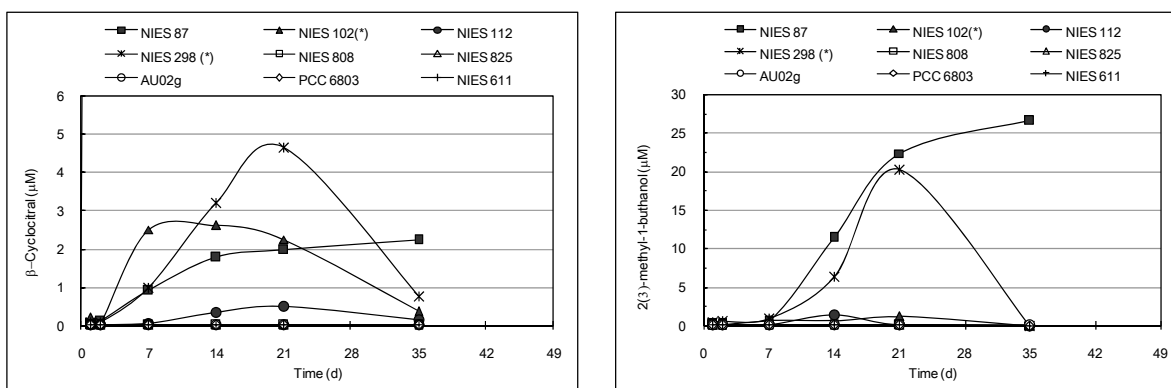


Figura 2 – Produção de β -ciclocitral e 2(3)-metil-1-butanol para culturas de cianobactérias em função do tempo

Dentre as 3 cepas de *Anabaena* estudadas, apenas a cepa AU02g produziu geosmina, tendo resultado em produção máxima de $35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($0.19 \mu\text{M}$).

Em relação aos resultados obtidos da análise de VOCs intra e extracelulares produzidos ao longo do tempo em condições de cultura, verificou-se que β -ciclocitral, β -ionona e geosmina tenderam a ser armazenados preferencialmente dentro das células; por outro lado, as frações extracelulares foram predominantes para 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol (Figura 3 e Tabela 2).

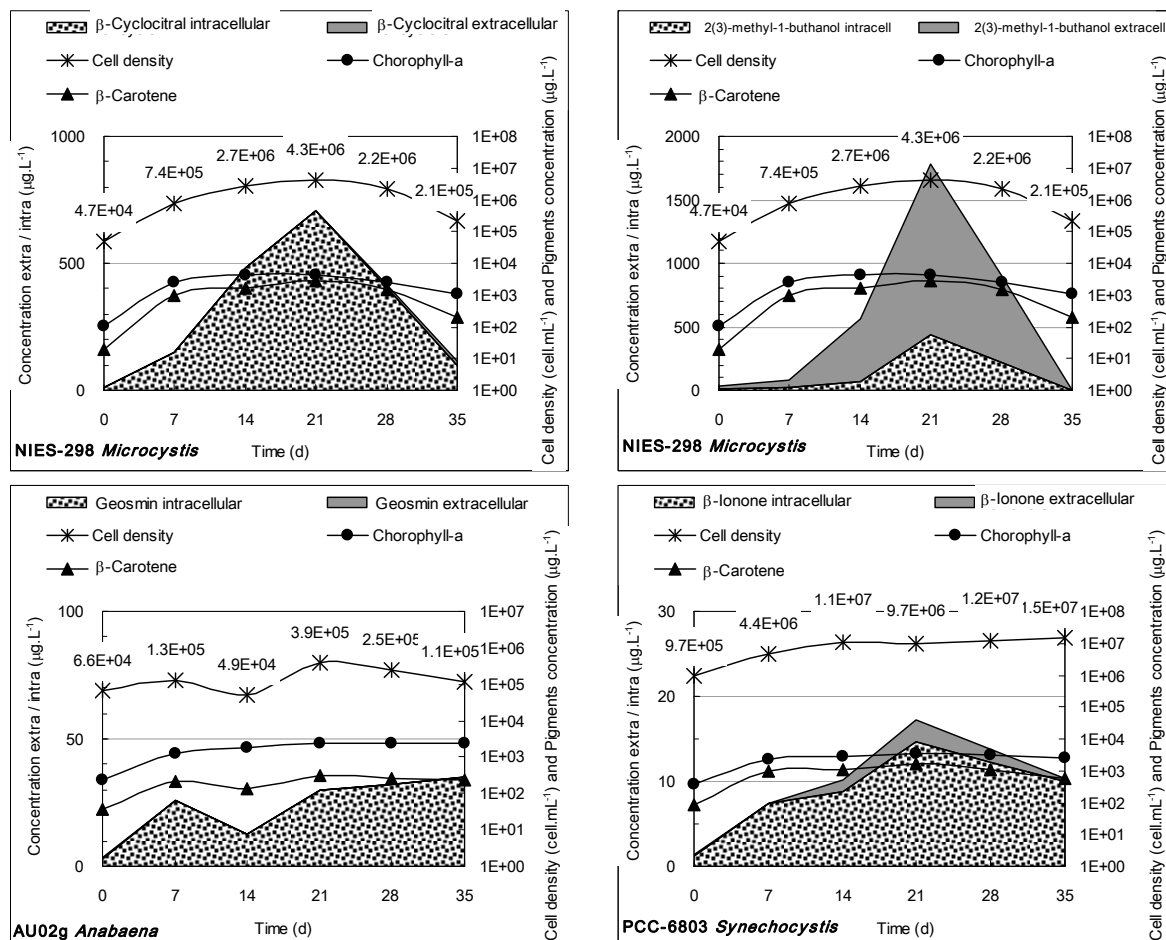


Figura 3 – Frações (intra e extracelular) de VOCs para culturas de cianobactérias

Tabela 2 – Valores de máxima produção de VOCs intracelulares e porcentagem da fração intracelular em relação à produção total (intra + extracelulares) para culturas de *Microcystis*

Cepa	β -ciclocitral $\mu\text{g.L}^{-1}$ (μM) [% do total]	2(3)-metil-1-butanol $\mu\text{g.L}^{-1}$ (μM) [% do total]
NIES-87	337.1 (2.2) [99.1]	169.7 (1.9) [7.3]
NIES-102	395.5 (2.6) [99.8]	34.8 (0.4) [34.7]
NIES-112	73.4 (0.5) [99.2]	14.8 (0.2) [12.3]
NIES-298	705.9 (4.6) [99.9]	431.7 (4.9) [24.2]



CONCLUSÕES

Com este estudo, foi possível verificar que:

- Para cada cepa, a produção temporária de clorofila-a e de β -caroteno em condições de cultura seguiram padrões similares e os valores médios das relações entre as concentrações de clorofila-a e de β -caroteno, variaram entre 1,8 e 5,4;
- Em geral, os picos de produção de VOCs ocorreram na fase estacionária de crescimento, porém, a produção de VOCs variou significativamente para um determinado gênero, espécie, e até para uma mesma cepa, por fatores ainda não esclarecidos;
- Das 9 cepas incluídas em 4 gêneros diferentes, a produção de β -ciclocitral ocorreu predominantemente para *Microcystis*; além disso, a produção de β -ciclocitral sempre foi acompanhado da ocorrência de 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol com relações estequiométricas muito variadas;
- Em relação à análise fracionada (intra e extracelular) de VOCs, β -ciclocitral, β -ionona e geosmina tenderam a ser armazenados preferencialmente dentro das células; por outro lado, as frações extracelulares foram predominantes para 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar seus agradecimentos à Agência de Cooperação Internacional - JICA, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, à Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya, Aichi, Japão, à Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Chigasaki, Kanagawa, Japão e à Kawasaki Waterworks Bureau, Kanagawa, Japão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jüttner, F.; Hoflacher, B. (1985). Evidence of β -carotene 7,8 (7',8') oxygenase (β -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. Arch Microbiol, 141, 337- 343.
2. Ozaki, K., Ohta, A., Iwata, C., Tsuji, K., Ito, E., Ikai, Y., Harada, K.-I. Lysis of Cyanobacteria with Volatile Organic Compounds, Chemosphere 2008 71, 1531-1538.
3. Satchwill, T.; Watson, S. B.; Dixon, E. (2007), Odourous algal-derived alkenes: differences in stability and treatment responses in drinking water. Water Science & Technology Vol 55 No 5 pp 95–102.
4. Scor/Unesco (1975). Determination of photosynthetic pigments in seawater., Monographs on Oceanographic Methodology, Unesco, Paris, vol. 1, pp.1 – 69.
5. Watson, S.B. (2003). Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity. Phycologia 42, 332–350.