

I-158 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CIANOBACTÉRIAS PELA BACTÉRIA *SPHINGOSINICELLA MICROCYSTINIVORANS* – B9

Francine Kuriama

Bióloga pelo Centro Universitário Filadélfia. Mestre em Engenharia de edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina (CTU/UEL).

Viviane Midori Yoshihara

Engenheira Civil pela Universidade Estadual de Londrina.

Josemarque Lima da Rosa

Graduando em Engenharia Ambiental da UTFPR – campus Francisco Beltrão. Em mobilidade acadêmica na UTFPR – campus Londrina e Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Elisabete Hiromi Hashimoto

Farmacêutica e Bioquímica formada pela Universidade Estadual de Londrina. Mestre e Doutora em Ciências de Alimentos pela mesma instituição. Professora do Curso de Tecnologia em Alimentos da UTFPR – campus Francisco Beltrão.

Ken-ichi Harada

Professor of Meijo University, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Environmental Sciences Faculty of Pharmacy, Tempakuku Yagotoyama 150 banchi, 468-8503 Nagoya, Aichi, Japan.

Elisa Yoko Hirooka

Farmacêutica e Bioquímica formada pela Universidade Estadual de Londrina. Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Professora associado C da UEL e bolsista produtividade em pesquisa 1B (CNPq).

Emília Kiyomi Kuroda⁽¹⁾

Engenheira Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos Universidade de São Paulo – EESC-USP. Mestre e doutora em Hidráulica e Saneamento pela mesma instituição. Pós-doutora pela Meijo University, Japão. Professora do Departamento de Construção Civil do Centro de Tecnologia e Urbanismo da UEL.

Endereço⁽¹⁾: Universidade Estadual de Londrina – UEL. Centro de Tecnologia e Urbanismo – CTU. Departamento de Construção Civil – DCCi. Rod. Celso Garcia Cid PR 445 Km 380 Campus Universitário. Cx Postal 10011 CEP 86057-970. Fone: +55 (43) 3371 4455 e +55 (43) 3371 5826 (lab), Email: ekkuroda@uel.br

RESUMO

A ocorrência de cianobactérias e seus metabólitos é um grave problema enfrentado pelas Estações de Tratamento de água. Para minimizar este problema há necessidade de se realizar estudos de alternativas técnicas de tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, que mostrou ser bastante promissora pois além da capacidade de degradar microcistinas, observada em experimentos anteriores, a bactéria B9 mostrou ser eficiente também na inibição do crescimento de cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Phormidium* e *Synechocystis*.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade anti-cianobactéria, clorofila-a, *Microcystis*, *Anabaena*, *Phormidium*, *Synechocystis*.

INTRODUÇÃO

Cianobactérias são microrganismos procariotos, geralmente aquáticos, que realizam fotossíntese com liberação de oxigênio. Podem ser predominantes no fitoplâncton de águas continentais, alcançando uma ampla diversidade de formas, devido às adaptações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas adquiridas durante seu longo processo evolutivo. Podem produzir metabólitos secundários como as cianotoxinas, potencialmente tóxicos aos humanos e animais (BITTENCOURT & MOLICA, 2003).

Atualmente são conhecidos aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias, sendo que 46 espécies já foram identificadas como potencialmente tóxicas aos vertebrados (MONDARDO, 2006).

As cianobactérias são os principais microrganismos produtores de compostos como geosmina e 2-metilisoborneol (2-MIB), que conferem odor e sabor à água, além da possível produção de potentes toxinas que causam intoxicações agudas ou crônicas, as quais podem ter ação hepática, neurológica ou dermatotóxica (FREITAS, 2008). Algumas cianobactérias, tais como os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* formam florações onde há a liberação de toxina através da lise celular (OLIVEIRA, 2003).

As florações de cianobactérias podem ocorrer de forma natural (processo lento, porém contínuo) ou artificial (provocada pelo homem). Segundo Mur *et al.*, (1999) as florações são ocasionadas por aumento da concentração de nutrientes nos ecossistemas aquáticos principalmente o nitrogênio e fósforo, sob condições ambientais favoráveis – temperatura em torno de 25°C, valores de pH na faixa de 6 a 9. Ocorrem principalmente em corpos d'água com pouca ou nenhuma turbulência, podendo liberar metabólitos secundários tóxicos para o meio, conhecidos como cianotoxinas (AZEVEDO, 2011).

Os gêneros de cianobactérias que se destacam pela sua ampla distribuição, e potencial capacidade de produzir toxinas são: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Nodularia*. A liberação das toxinas para o ambiente ocorre na forma de toxina dissolvida, através da morte, lise ou senescência das células (MULLER, 2009).

A presença de microalgas e cianobactérias em mananciais é um grave problema enfrentado pelas Estações de Tratamento de Águas - ETAs que utilizam as Tecnologias de Tratamento por Ciclo Completo, ou mesmo de Filtração Direta. Dependendo da espécie e do número de indivíduos, pode ocorrer a redução da duração das carreiras de filtração e / ou comprometimento da qualidade da água produzida, uma vez que os metabólitos dissolvidos não são eficientemente removidos por aqueles tratamentos. Nesse contexto a pré-cloração é uma prática realizada no Brasil, em muitos sistemas de tratamento de água, visando o controle e inativação de microalgas e cianobactérias. Entretanto, alguns problemas são gerados pela utilização deste pré-tratamento em mananciais com elevadas concentrações de fitoplâncton, com destaque à promoção de lise celular, com consequente liberação de metabólitos secundários, especialmente as cianotoxinas ou ainda, à formação de subprodutos organohalogenados potencialmente cancerígenos. Na tentativa de minimizar esses problemas, existem estudos visando o uso de microrganismos com a capacidade de degradar as microcistinas - MCs, a exemplo de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de inibição do crescimento de cianobactérias (atividade anti-cianobactéria) pela bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9, com capacidade já comprovada para degradar microcistinas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de cianobactérias

As cepas de cianobactérias utilizadas foram: *Microcystis* sp. TAC 95, *Microcystis* spp. NPLJ-4, *Anabaena ucrainica* AU 02g, *Phormidium tenue* NIES 611 e *Synechocystis* PCC 6803, codificadas de C1 a C5 (Tabela 1).

Tabela 1 Dados das cepas de cianobactérias mantidas no Laboratório de Hidráulica e Saneamento

Código	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
C1	TAC 95	<i>Microcystis</i> sp.	Japão	ASM-1
C2	NPLJ 4	<i>Microcystis</i> spp.	Lagoa de Jacarepaguá / RJ, Brasil	
C3	AU 02g	<i>Anabaena ucrainica</i>	Floração Lago Sagami / Kanagawa, C7Japão, 2002	
C4	NIES 611	<i>Phormidium tenue</i>	Lago Biwa C8 / Shiga, Japão, 1987	
C5	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.

Cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 e condições de cultivo

A cepa de bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* – B9 foi isolada do Lago Tsukui Kanagawa e cedida pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do *Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University Nagoya – Aichi – Japão*. A cepa foi mantida em meio sólido Sakurai (TSUJI *et al.*, 2006) a 4°C. Para utilização no experimento, a cepa foi previamente ativada por 2 vezes incubando-se em meio sólido Sakurai a 30°C por 48-72 h e posteriormente, cultivada em meio líquido (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%) a 30°C por 72 h.

Delineamento do experimento

Primeiramente foram preparadas culturas das diferentes cepas de cianobactérias adicionando-se um inóculo de 80 mL em 400 mL de meio ASM-1 que foram mantidos a 25°C sob iluminação ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12h.d⁻¹ e aeração contínua por 7 dias. Após este período 20 mL das culturas foram adicionadas a 140 mL de meio ASM-1 e pré-condicionadas por 3 dias a 27°C sob iluminação ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 12 h.d⁻¹ e agitação de 100 opm.

O experimento foi efetuado em triplicata inoculando-se nas culturas pré-condicionadas (160 mL) de cianobactérias, 20 mL de cultura de bactéria B9 e 20 mL de meio Sakurai ajustando-se o pH para 8,0 (Figura 1).

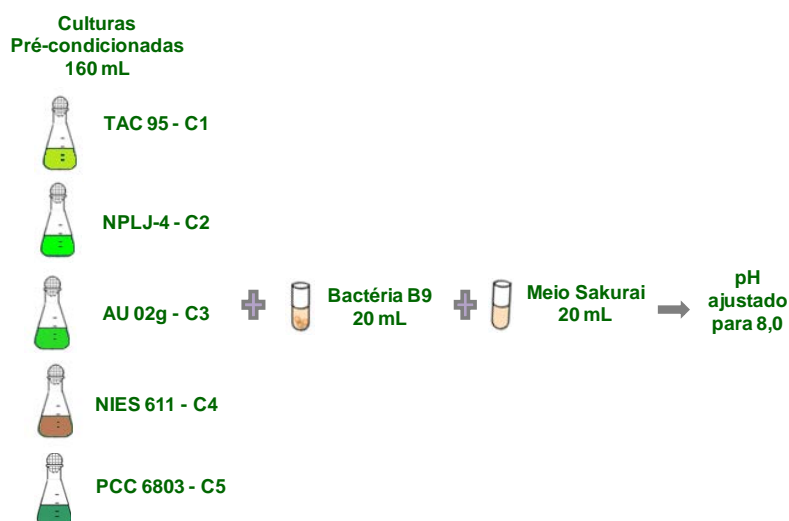


Figura 1 - Esquema ilustrativo do Experimento

A avaliação da atividade anti-cianobactéria, foi efetuada através de amostras retiradas nos tempos 0, 96, 168 e 336 h para contagem celular e análise de clorofila-a das culturas / misturas. Para verificar o crescimento da bactéria B9 foi efetuada a contagem nos tempos 0 e 96 h através de diluições decimais e seriadas nos controles negativos e misturas.

RESULTADOS

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores absolutos das triplicatas, suas médias e a porcentagem de inibição do crescimento através da contagem celular de cianobactérias e análise de clorofila-a, respectivamente, efetuadas nos tempos 0, 96, 168 e 336 h dos controles negativos e misturas.

Foi possível constatar que a bactéria B9 possui além de potencial de degradação de microcistinas – MCs, atividade de inibição do crescimento de cianobactérias ou atividade anti-cianobactéria em relação às cepas de *Microcystis* sp. e spp., *Anabaena ucrainica*, *Phormidium tenue* e *Synechocystis*.

Considerando os resultados de contagem celular das culturas / misturas de cianobactérias, pode-se observar que:

- Após 96 h, as porcentagens de inibição variaram de 41,4 a 79,3 %;
- Após 168 h, com exceção da cepa *M. SP. TAC 95 – C1* todas as outras cepas apresentaram um aumento na porcentagem de inibição variando de 42,2 a 90,6 %;
- Nas contagens de 336 h não foi observado um aumento significativo na porcentagem de inibição variando de 46,9 a 97,2 %.

Considerando os resultados das análises de clorofila-a das culturas / misturas de cianobactérias, pode-se observar que:

- Após 96 h as porcentagens de inibição variaram de 34,4 a 68,9 %;
- Após 168 h as porcentagens aumentaram variando de 51,0 a 76,4 %;
- Após 336 h a porcentagem de inibição diminuiu variando de 52,5 a 70,2 %.

Tabela 2 – Valores absolutos, média e porcentagem de inibição em relação à contagem celular para diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento

Classificação - cepa	Amostras	Contagem 0h	Contagem Média 0h	Contagem 96h	Contagem Média 96h	% de Inibição 96h	Contagem 168h	Contagem Média 168h	% de Inibição 168h	Contagem 336h	Contagem Média 336h	% de Inibição 336h
Microcystis sp. TAC 95	C1 (controle)	5,4E+06	6,0E+06	1,5E+07	1,6E+07		8,3E+06	1,2E+07		2,58E+07	3,69E+07	
	C1(controle)	6,8E+06		1,8E+07			1,6E+07			1,17E+07		
	C1(controle)	5,9E+06		1,4E+07			1,2E+07			7,32E+07		
	C1+B9	7,8E+06	7,0E+06	3,6E+06	3,3E+06	79,3 ^a	5,0E+06	7,1E+06	42,2 ^a	1,48E+06	1,96E+07	46,9 ^a
	C1+B9	8,2E+06		2,5E+06			1,2E+07			3,27E+07		
	C1+B9	5,0E+06		3,8E+06			3,9E+06			2,46E+07		
Microcystis spp. NAPLJ-4	C2 (controle)	5,7E+05	9,9E+05	5,6E+06	7,3E+06		8,6E+06	6,8E+06		1,23E+07	1,73E+07	
	C2 (controle)	1,4E+06		7,6E+06			8,5E+06			2,02E+07		
	C2 (controle)	1,0E+06		8,6E+06			3,3E+06			1,93E+07		
	C2+B9	1,8E+06	1,5E+06	2,6E+06	2,2E+06	70,3 ^a	1,5E+06	1,1E+06	83,3 ^a	8,30E+05	4,75E+05	97,2 ^a
	C2+B9	1,5E+06		2,4E+06			1,3E+06			4,53E+05		
	C2+B9	1,3E+06		1,5E+06			5,5E+05			1,43E+05		
Anabaena ucrainica AU02g	C3 (controle)	2,2E+06	2,1E+06	4,3E+06	4,2E+06		2,7E+06	4,7E+06		1,46E+07	1,39E+07	
	C3 (controle)	1,9E+06		6,8E+06			7,1E+06			1,31E+07		
	C3 (controle)	2,3E+06		1,7E+06			4,5E+06			1,40E+07		
	C3+B9	1,9E+06	2,0E+06	2,5E+06	1,9E+06	55,4 ^a	8,6E+05	1,3E+06	71,8 ^a	2,55E+06	2,50E+06	82,0 ^a
	C3+B9	2,0E+06		2,1E+06			2,1E+06			3,11E+06		
	C3+B9	2,0E+06		1,1E+06			1,1E+06			1,84E+06		
Phormidium tenue NIES 611	C4 (controle)	8,6E+06	6,0E+06	1,4E+07	1,6E+07		1,7E+07	3,0E+07		5,90E+07	2,64E+07	
	C4 (controle)	6,1E+06		1,9E+07			2,5E+07			2,58E+06		
	C4 (controle)	3,4E+06		1,4E+07			4,8E+07			1,76E+07		
	C4+B9	7,5E+06	7,1E+06	6,7E+06	9,3E+06	41,4 ^a	3,8E+06	2,8E+06	90,6 ^a	1,55E+06	1,81E+06	93,1 ^a
	C4+B9	7,4E+06		1,1E+07			3,5E+06			4,53E+05		
	C4+B9	6,4E+06		1,0E+07			1,2E+06			3,43E+06		
Synechocystis PCC - 6803	C5 (controle)	8,3E+06	7,5E+06	2,3E+07	1,9E+07		1,5E+07	2,5E+07		7,24E+07	6,88E+07	
	C5 (controle)	8,0E+06		2,2E+07			1,2E+07			7,65E+07		
	C5 (controle)	6,3E+06		1,1E+07			4,7E+07			5,76E+07		
	C5+B9	4,7E+06	7,2E+06	6,5E+06	6,8E+06	63,5 ^a	5,0E+06	6,2E+06	75,2 ^a	1,65E+07	1,01E+07	85,3 ^a
	C5+B9	7,9E+06		7,5E+06			8,9E+06			9,39E+06		
	C5+B9	9,1E+06		6,5E+06			4,6E+06			4,37E+06		

Tabela 3 – Valores absolutos, média e porcentagem de inibição de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento

Classificação - cepa	Amostras	Clorofila-a 0h	Clorofila-a Média 0h	Clorofila-a 96h	Clorofila-a Média 96h	% de Inibição 96 h	Clorofila-a 168h	Clorofila-a Média 168h	% de Inibição 168h	Clorofila-a 336h	Clorofila-a Média 336h	% de Inibição 336h
Microcystis sp. TAC 95	C1 (controle)	521,2		1042,5			1456,8			1777,5		
	C1(controle)	401,0		1002,4			1416,7			2485,9		
	C1(controle)	548,0	490,1	1336,5	1127,1		1750,8	1541,4		2472,5	2245,3	
	C1+B9	467,8		614,8			721,7			1136,0		
	C1+B9	467,8		588,1			828,6			1242,9		
	C1+B9	267,3	401,0	414,3	539,1	52,2 ^a	347,5	632,6	59,0 ^a	761,8	1046,9	53,4 ^a
Microcystis spp. NAPLJ-4	C2 (controle)	401,0		1162,8			1202,9			908,8		
	C2 (controle)	374,2		1363,2			1363,2			1189,5		
	C2 (controle)	401,0	392,0	1162,8	1229,6		1349,9	1305,3		1256,3	1118,2	
	C2+B9	401,0		801,9			454,4			414,3		
	C2+B9	454,4		695,0			401,0			307,4		
	C2+B9	401,0	418,8	534,6	677,2	44,9 ^a	334,1	396,5	69,6 ^a	280,7	334,1	70,1 ^a
Anabaena ucrainica AU02g	C3 (controle)	681,6		1390,0			1470,2			2579,4		
	C3 (controle)	641,5		1416,7			1951,3			1817,6		
	C3 (controle)	534,6	619,2	1269,7	1358,8		1376,6	1599,3		1376,6	1924,6	
	C3+B9	708,3		895,5			815,3			855,4		
	C3+B9	681,6		895,5			828,6			1470,2		
	C3+B9	641,5	677,2	882,1	891,0	34,4 ^a	708,3	784,1	51,0 ^a	414,3	913,3	52,5 ^a
Phormidium tenue NIES 611	C4 (controle)	401,0		948,9			1283,0			1710,7		
	C4 (controle)	467,8		1002,4			1015,7			2044,8		
	C4 (controle)	521,2	463,3	1055,8	1002,4		1323,1	1207,3		1790,9	1848,8	
	C4+B9	441,0		307,4			253,9			507,9		
	C4+B9	360,9		294,0			347,5			748,4		
	C4+B9	360,9	387,6	334,1	311,9	68,9 ^a	253,9	285,1	76,4 ^a	481,1	579,2	68,7 ^a
Synechocystis PCC - 6803	C5 (controle)	454,4		788,5			1202,9			588,1		
	C5 (controle)	320,8		855,4			775,2			561,3		
	C5 (controle)	294,0	356,4	614,8	752,9		748,4	908,8		601,4	583,6	
	C5+B9	481,1		414,3			334,1			721,7		
	C5+B9	494,5		374,2			467,8			735,1		
	C5+B9	320,8	432,1	401,0	396,5	47,3 ^a	307,4	369,8	59,3 ^a	334,1	597,0	-2,3 ^a

(a): porcentagem de inibição calculada em relação aos valores de clorofila-a no controle negativo para o tempo de 96 h.

Na Figuras 1 e 2 estão representados, respectivamente, os valores médios da contagem celular e de clorofila-a nos tempos 0, 96, 168 e 336 h.

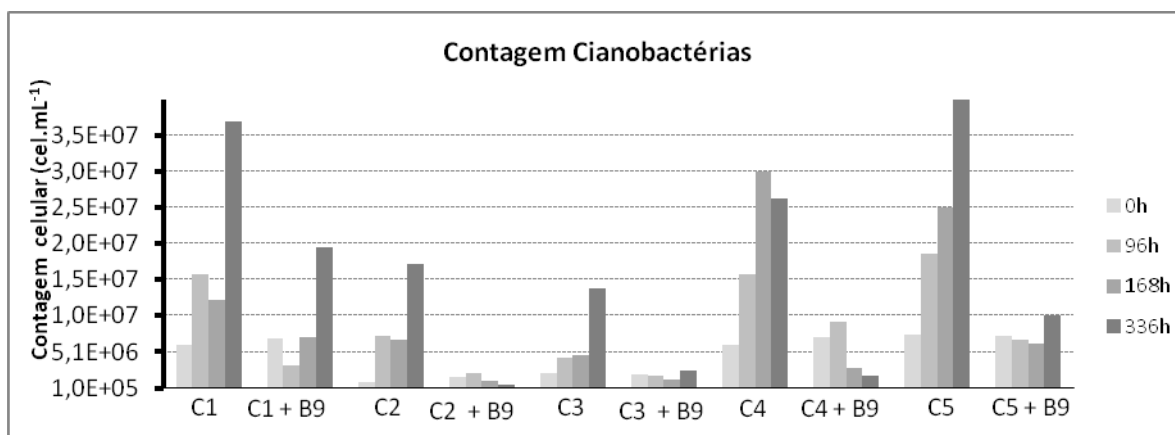


Figura 1 – Valores médios da contagem das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento

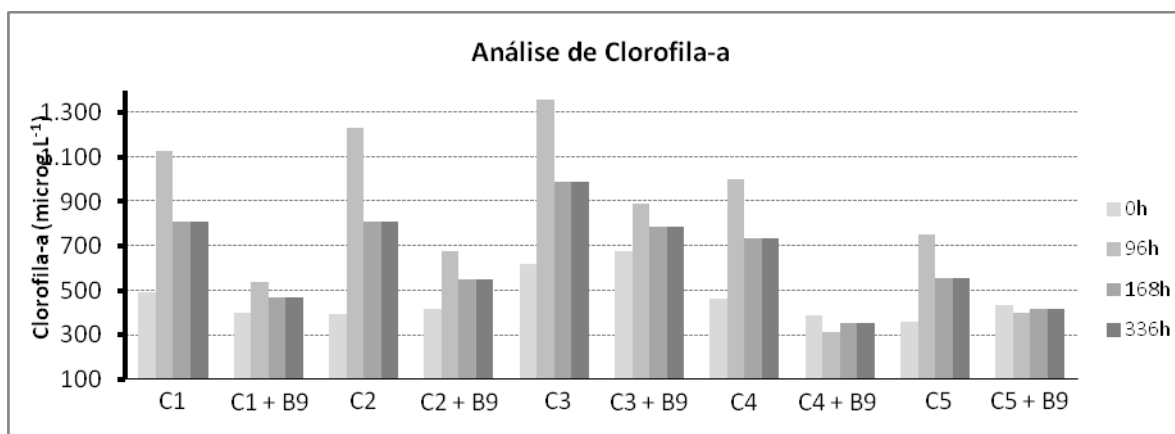


Figura 2 – Valores médios de clorofila-a das diferentes cepas de cianobactérias utilizadas no Experimento

A contagem da bactéria B9 no tempo 0 h variou de $3,2 \times 10^6$ a $1,22 \times 10^7$. Após 96 h ocorreu o pico de crescimento aumentando em valores mínimos de $3,1 \times 10^7$ e máximos de $2,6 \times 10^8$ e após este período não foi observado crescimento significativo da bactéria B9.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 apresentou atividade anti-cianobactéria para as diferentes cepas testadas no experimento.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BITTENCOURT, M. C. O. MOLICA, R. Cianobactéria Invasora. Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/cianobacteria.pdf>> Acesso em: 15 fev 2011.
2. FREITAS, A. M. SIRTORI, C. ZAMORA, P. G. P. Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com geosmina e 2-MIB. Quim. Nova, v. 31 n 1, p. 75-78, 2008.
3. MONDARDO, R. I. SENS, M. L. FILHO, L. C. M. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, v. 11, n 4 out/dez 2006.
4. OLIVEIRA, M. C. B. Cianobactéria invasora, Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil, Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 30, Janeiro/Junho 2003.
5. MUR, L. R. SKULBERG, O. M. UTKILEN, H. *Cyanobacteria in the environment, in Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, editado por Ingrid Chorus e Jamie Bartram, London, E & FN SPON, 1999.
6. AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm> Acesso em: 15 fev 2011.
7. MÜLLER, C. C. RODRIGUEZ, M. T. R. CYBIS, L. F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. Engenharia Sanitária e Ambiental, v.14, n.1, jan/mar 2009.
8. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Japão, v. 56, p. 85 – 89, 2006.
9. TSUJI, K. ASAKAWA, M. ANZAI, Y. SUMINO, T. HARADA, K. *Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake*. Chemosphere, Japan, n. 65, p. 117 - 124, Março 2006.
10. OZAKI, K. OHTA, A. IWATA, C. HORIKAWA, A. TSUJI, K. ITO, E. IKAI, Y. HARADA, K. *Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds*. Chemosphere, p. 8, Dezembro, 2007.