

Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu¹)-microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão

Biodegradation of hepatotoxin (D-Leu¹)-microcystin-LR by bacteria in carbon biological filters

Alessandro Minillo

Pesquisador Visitante da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo Programa de Formação de Recursos Humanos da Petrobras (PFRH – PB) – Dourados (MS), Brasil.

Sarah Caetano de Freitas

Mestranda do curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília (UNB) – Brasília (DF), Brasil.

William Deodato Isique

Bolsista FAPESP do Departamento de Engenharia Civil da FEIS, UNESP – Ilha Solteira (SP), Brasil.

Heloiza Ferreira Alves Do Prado

Professora assistente do Departamento de Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da FEIS, UNESP – Ilha Solteira (SP), Brasil.

Maurício Rocha Dimitrov

Mestre em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Douglas Antonio Alvaredo Paixão

Mestre em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Jaboticabal (SP), Brasil.

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Professora Titular do Departamento de Tecnologia da UNESP – Jaboticabal (SP), Brasil.

Edson Pereira Tangerino

Professor assistente do Departamento de Engenharia Civil da FEIS, UNESP – Ilha Solteira (SP), Brasil.

Resumo

A persistência das microcistinas (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 à degradação por bactérias presentes na água, sedimentos e efluentes de esgotos. Neste estudo, avaliou-se a biodegradação de MCs por microrganismos presentes em filtros de carvão com atividade biológica (CAB) e sua identificação filogenética pelo sequenciamento do gene 16S RNA. Foi utilizada uma água de estudo contendo MCs com diferentes composições, acrescida de efluente de filtros CAB. Os resultados demonstraram que as MCs foram biodegradadas por microrganismos presentes no biofilme. Este estudo infere sobre a capacidade de biodegradação de MCs por bactérias presentes em filtros CAB e o possível uso destes microrganismos como alternativa de remoção de MCs no tratamento de água potável.

Palavras-chave: microcistinas; biofilme; biodegradação; carvão ativado biológico.

Abstract

The persistence of MCs in aquatic environments and their difficult removal in the conventional water treatment is a challenge to companies of sanitation. However, the MCs are susceptible to degradation by bacteria present in water, sediment and sewage effluents. In this study, we investigated the biodegradation of MCs by microorganism present in carbon filters with biological activity (BAC) and their phylogenetic identification by sequencing gene 16S RNA. A study of water containing MCs was used, with different compositions, plus a filters BAC effluent. The results showed that of MCs were biodegraded by microorganism present in the biofilm. This study provides the ability to complete biodegradation of MCs by bacteria present in BAC filters and the possible use of these microorganisms as alternative of the removal of MCs in the treatment of drinking water.

Keywords: microcystins; biofilm; biodegradation; biological activated carbon.

Introdução

O frequente aumento dos florescimentos de cianobactérias tóxicas nos mananciais de abastecimento público representa um risco à saúde humana. Entre as toxinas produzidas por cianobactérias, microcistinas representam o grupo mundialmente associado a casos de intoxicações, tornando-se foco de atenção das empresas de saneamento em diversos países. Em razão da expressiva toxicidade das microcistinas, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu um valor guia de 1 µg.L⁻¹ como concentração máxima de microcistina-LR em água potável (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Microcistinas são heptapeptídeos cíclicos pertencentes ao grupo das hepatotoxinas produzidos por diferentes cianobactérias dos gêneros (*Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria/Planktothrix* e *Nostoc*). A estrutura química dessas cianotoxinas as tornam moléculas com elevada persistência na água, tolerância a temperaturas elevadas e resistência a oxidação (SAITO microcistina., 2002), o que dificulta a sua remoção no tratamento convencional de água (NEWCOMBE & NICHOLSON, 2004). Consequentemente, inúmeros estudos têm sido direcionados no tratamento e remoção eficiente das cianotoxinas em águas contaminadas, de modo a atender as normatizações sanitárias estabelecidas para seu consumo humano (NEWCOMBE & NICHOLSON, 2004).

Embora diversos tratamentos químicos sejam propostos para o tratamento de água em uma Estação de Tratamento de Água (ETA), é possível em alguns momentos que esses procedimentos produzam substâncias com potencial carcinogênico e multagênico (RICHARDSON *et al.*, 2007). Nesse contexto, o processo de biodegradação representa uma forma segura para remoção de elementos orgânicos responsáveis na formação de subprodutos da desinfecção (THMs, HAA), de cianotoxinas e de outros micropoluentes presentes na água durante seu tratamento (SIMPSON, 2008).

Apesar da conhecida susceptibilidade das microcistinas serem biodegradadas por populações naturais de microrganismos de diversos ecossistemas (JONES e ORR, 1994; CHRISTOFFERSEN; LYCK; WINDING, 2002), principalmente sob condições de alcalinidade elevada em meio líquido (SAITO *et al.*, 2003a), poucos são os estudos exploratórios que descrevem os microrganismos com capacidade de

remover efetivamente sua total presença (PARK *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 2003b; TSUJI *et al.* 2006; VALERIA *et al.*, 2006). O desenvolvimento de novas tecnologias que aumentem a eficiência do tratamento de água, como a seleção de microrganismos integrantes da camada biológica ou biofilme formado em filtros lento de areia e filtros de carvão, respectivamente, tem demonstrado ser uma perspectiva promissora na remoção de microcistinas na água durante seu tratamento em uma ETA (BOURNE *et al.*, 2006; TSUJI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007a), além de promover uma disposição segura dessa água para o consumo humano (SIMPSON, 2008).

Nos últimos anos, uma série de estudos tem apontado sobre o uso de bactérias com capacidade de degradação de microcistinas em biofilmes (MARUYAMA *et al.*, 2006; TSUJI *et al.*, 2006). Contudo, no Brasil ainda são escassos trabalhos direcionados ao uso de microrganismos como agentes de remoção de cianotoxinas e outros compostos indesejáveis produzidos por cianobactérias na água. Hashimoto (2007) e Hashimoto *et al.*, (2009) destacaram a utilização de bactérias específicas com efeitos antagônicos em cianobactérias, apresentando elevado efeito degradativo em microcistinas. Uma avaliação feita por Juliano (2008, 2010) apontou a oxidação biológica de compostos 2-MIB e geosmina via ação microbiana (bactérias) em complemento a adsorção dessas substâncias em carvão ativado granular como alternativa eficiente no tratamento de água contaminada por elevados níveis dessas substâncias.

Considerando a potencialidade de degradação das microcistinas via ação microbiana, o presente estudo avaliou a biodegradação da (D-Leu¹)-microcistina-LR utilizando microrganismos presentes no biofilme de filtros de carvão ativado biologicamente (CAB), e a caracterização filogenética desses microrganismos participantes no processo de metabolização da cianotoxina testada.

Materiais e métodos

O presente estudo foi inspirado em trabalhos realizados por Park *et al.* (2001) e Wang *et al.* (2007a) sobre a potencialidade no uso de microrganismos integrantes da camada biológica e do biofilme em filtros lentos de areia e de carvão, respectivamente, na remoção de microcistinas em água em seu tratamento em ETAs.

Inoculo com microrganismos consumidores de microcistina

Um inóculo (0,5 L) contendo microrganismos com potencial em consumir cianotoxinas foi utilizado nos ensaios de biodegradação. Este material proveio do efluente de filtros CAB utilizados em experimentos de biofiltração de (D-Leu¹)-microcistina-LR em condições de laboratório (MINILLO *et al.*, 2009).

Ensaio de biodegradação com microcistinas

Para os experimentos de biodegradação da hepatotoxina, foram realizados três ensaios (A, B e C), nos quais foi utilizada uma água de estudo com composição específica diferenciada. Em cada ensaio foi adicionado à água de estudo um extrato celular de *Microcystis* spp contendo a (D-Leu¹)-microcistina-LR de modo que essa água obtivesse uma concentração final de 20 µg.L⁻¹ dessa cianotoxina. O valor definido para essa ficotoxina na água de estudo esteve fundamentado em concordância com os valores relatados em estudos de biofiltração de águas com microcistinas por biofiltros de carvão (MESQUITA *et al.*, 2006; MINILLO *et al.*, 2009) e também próximos aos níveis médios registrados dessa cianotoxina em mananciais de abastecimento impactados por florações de cianobactérias tóxicas (CHORUS & BATRAM, 1999).

A composição da água de estudo utilizada para cada um dos ensaios foi padronizada mediante as seguintes padronizações:

Água de estudo do Ensaio A – Para esta água de estudo, foi utilizada como matriz uma água destilada, que foi esterilizada (120°C – 15 min), e acrescida de (D-Leu¹)-microcistina-LR (20 µg.L⁻¹). No fim, esta água recebeu a adição de um meio de cultura constituído por glicose (90 µg.L⁻¹), extrato de levedura (100 µg.L⁻¹) e peptona (100 µg.L⁻¹);

Água de estudo do Ensaio B – Esta água de estudo foi preparada a partir de uma água provinda de um lago artificial (Lago do Ipê – próximo do município de Ilha Solteira – SP) com características meso-oligotróficas, segundo análises realizadas utilizando o método descrito por Toledo *et al.* (1983). A água coletada foi filtrada em filtros GF/F (1,0 µm), sendo esterilizada (120°C – 15 min) e acrescida de (D-Leu¹)-microcistina-LR (20 µg.L⁻¹). De forma semelhante ao preparo da água de estudo do ensaio A, esta também recebeu no fim a adição do meio de cultura composto por glicose (90 µg.L⁻¹), extrato de levedura (100 µg.L⁻¹) e peptona (100 µg.L⁻¹).

Água de estudo do Ensaio C – A elaboração desta água de estudo requisiu a mesma água natural utilizada no ensaio B, sendo esta coletada e filtrada em filtros GF/F (1,0 µm), esterilizada (120°C – 15 min) e no fim acrescida com extrato de (D-Leu¹)-microcistina-LR (20 µg.L⁻¹). Esta água de estudo não recebeu a adição do meio de cultura utilizada para as águas de estudo dos ensaios A e B.

Delineamentos do experimento

Para cada ensaio, foi utilizado um galão de vidro âmbar, com volume útil de 4 L, em duplicata, representando um único tratamento, ao qual foi adicionado uma água de estudo contendo a hepatotoxina, juntamente com o inoculo do efluente dos filtros CAB a 10% (v.v). O tratamento controle foi representado por um galão de vidro âmbar, com volume útil de 4 L, em duplicata, ao qual foi adicionado uma água de estudo contendo a hepatotoxina sem a adição do inóculo com efluente dos filtros CAB. Todos os experimentos foram realizados em um ambiente escuro, com agitação orbital (100 rpm) e temperatura controlada (25 ± 2°C), durante 84 dias. Foi tomada uma amostra (200 mL) no início do ensaio, em cada um dos tratamentos (tempo zero), seguida por coletas consecutivas semanais para leitura do pH (DIGIMED DM 20) e determinação das concentrações de microcistina por método cromatográfico (CLAE – Shimadzu).

Isolamento e caracterização filogenética das bactérias nos filtros de carvão ativados biologicamente

Os microrganismos presentes nos filtros CAB foram submetidos ao processo de isolamento e caracterização filogenética, por meio da retirada de um volume (1 mL) de amostra na superfície e interior dos filtros CAB. O material recolhido foi homogeneizado, sendo retirada uma alíquota (200 µL) que foi transferida para placas de Petri contendo microcistina (c.a. 20 µg.L⁻¹) e 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 por meio de sucessivos plaqueamentos por esgotamento em estrias. Os microrganismos foram transferidos para tubos de ensaio mantidos inclinados, contendo o agar nutriente sob refrigeração (5°C) no escuro. Foram observadas características morfológicas, coloração diferencial de Gram e verificação da formação de esporos utilizando corante verde de malaquita, de modo a obter informações dos possíveis grupos microbianos presentes nos filtros (MINILLO *et al.*, 2009), sendo posteriormente realizadas produções massivas de cada um isolado, para extração do DNA e identificação filogenética.

Extração de DNA dos isolados e amplificação do gene 16S rRNA

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando o *kit* FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), segundo as instruções do fabricante. O material genético foi usado na amplificação, por reação em cadeia da polimerase, do gene 16S rRNA. Na reação, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores fd1 (WEISBURG *et al.*, 1991), com condições acrescidas de modificações. Para isso, foi utilizado um termociclador (MJ Research Inc., modelo PTC – 200)

ajustado com programação sugerido por Alvaredo Paixão *et al.* (2010). Os produtos de PCR do gene 16S rRNA foram sequenciados usando 0,5 µL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 5 pmols do oligonucleotídeo iniciador fD1; 150 ng de DNA em um volume final de 10 µL. As condições no termociclador foram: 2 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 15 seg, 60°C por 2 min. Os *amplicons* foram sequenciados em um sequenciador de capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análises das sequências

As sequências foram analisadas com o auxílio do pacote de programas Phred/Phrap (EWING *et al.*, 1998; EWING & GREEN, 1998) e comparadas com o banco de dados de genes ribossomais *Ribosomal Database Project II* (RDP II), por meio do programa *Classifier* (WANG *et al.*, 2007b). Em seguida, estas foram alinhadas usando o programa *ClustalX 1.83* (THOMPSON *et al.*, 1997). Todas as sequências do gene 16S rRNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (*GenBank*) e encontram-se disponíveis com os números de acesso FJ978048 à FJ978478.

Extração de (D-Leu¹)-microcistina-LR das culturas de laboratório

O extrato contendo (D-Leu¹)-microcistina-LR utilizados no estudo foi obtido a partir da concentração de culturas de *Microcystis* spp mantidas em laboratório. As culturas de algas foram liofilizadas e diluídas em solução de metanol 75% (v.v) por 18 horas, no escuro, a 4°C. A solução obtida foi centrifugada em seguida (10 min – 3500 rpm), e sobrenadante foi recolhido e submetido ao processo de separação do metanol em um evaporador rotativo (80 rpm – 42°C), sendo no fim obtido um concentrado contendo um semipurificado de (D-Leu¹)-microcistina-LR que foi utilizada nos ensaios.

Quantificação de (D-Leu¹)-microcistina-LR dos ensaios de biodegradação

A quantificação da (D-Leu¹)-microcistina-LR foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão), equipado com detector Photodiode Array (SPD-M20A), com 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 Spooft (2005). A fase móvel foi constituída por dois componentes, uma com água Milli-Q e a outra por acetonitrila, ambas acidificadas 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 analisada em triplicatas. A microcistina foi identificada por meio do seu tempo

de retenção e características de seu espectro UV (238 nm), juntamente com auxílio de um padrão comercial externo de calibração de (D-Leu¹)-microcistina-LR, com 99% de pureza.

Tratamento estatístico dos dados obtidos

Os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise estatística com o teste de Tukey (p<0,05), utilizando o *software Origin 7.5*.

Resultados e discussão

Biodegradação de microcistina

Os resultados demonstraram que houve a biodegradação da microcistina nos tratamentos contendo microrganismos recolhidos dos filtros CAB. Pode-se verificar que os ensaios A e B apresentaram 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 84º dia de experimento, os níveis de microcistinas apresentaram suas concentrações abaixo do limite de detecção (<0,07 µg.L⁻¹). O ensaio C apresentou uma reduzida taxa de degradação de microcistina durante o primeiro mês de experimento, com apenas 20% de consumo em relação ao valor inicial. Posteriormente, foi observada uma elevada degradação da cianotoxina nas semanas seguintes, atingindo valores não detectáveis com 49 dias de experimento (Figura 1). A degradação natural da microcistina durante os experimentos foi reduzida (<19%), o que corrobora o efeito de metabolização da cianotoxina pelos microrganismos presentes no meio.

A diferença temporal encontrada na degradação de microcistina entre os tratamentos avaliados possivelmente esteve associada à presença de outras fontes de carbono na água de estudo utilizada, o que influenciou a biodegradação da toxina pelos microrganismos. O uso de um meio experimental nos ensaios A e B, contendo suplementos orgânicos juntamente com o extrato de microcistina, pode ter propiciado uma maior diversidade de fontes de alimentos a ser consumidos pelos microrganismos, o que refletiu em uma menor taxa de biodegradação da toxina no meio. Diferentemente, no ensaio C houve uma menor disponibilidade de elementos nutrientes no meio experimental de estudo, o qual dispôs apenas dos elementos orgânicos naturalmente presentes na água coletada no reservatório de água, sem a presença de suplementos nutricionais adicionais. Com a ausência de fontes extras de carbono, é provável que os microrganismos presentes no meio optassem preferencialmente pelo consumo daqueles elementos orgânicos presentes na água, sendo essas fontes primárias de carbono assimiláveis, de fácil quebra de suas moléculas. Com o rápido declínio dos elementos

nutricionais no meio, os microrganismos passaram a utilizar as microcistinas como uma fonte secundária de carbono e energia, o que proporcionou sua degradação em um menor período de tempo. Uma situação semelhante foi observada por Park *et al.* (2001), quando verificaram um tempo de degradação de microcistina quatro vezes superior em um meio suporte contendo a cianotoxina e nutrientes inorgânicos, assim como comparado com um meio experimental contendo a toxina e nutrientes orgânicos.

Os resultados neste estudo evidenciam que as microcistinas, quando presentes sob as formas exclusivamente purificadas, poderiam ser mais rapidamente consumidas pelos microrganismos do que sob a forma de extratos semipurificados, extraídos de culturas ou de florações naturais de cianobactérias. Esse fato decorre da presença de elementos orgânicos associados, não levando em conta as diferenças estruturais nas variantes de microcistinas testadas, que representam uma fonte de carbono e energia para esses microrganismos. Em um estudo realizado por Lemes *et al.* (2008), foi constatado que o uso de microcistinas purificadas em ensaios de biodegradação representou um fator que condicionou seu rápido consumo por microrganismos isolados do ambiente natural. Esses autores inferem que uma

população bacteriana quando exposta apenas à presença de um composto recalcitrante (microcistinas) irão promover sua decomposição de forma rápida, provavelmente em resposta à reduzida carência de outras fontes de alimento (LEMES *et al.*, 2008).

Influência do pH e da temperatura sobre a degradação de microcistinas

Os valores de pH observados nos ensaios realizados ficaram ligeiramente acima da neutralidade, com valores médios entre 7,55 e 7,48 nos ensaios A e B, respectivamente, enquanto que no ensaio C a média foi menor que 7,18. De modo geral, não foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores registrados entre os tratamentos controle e com microrganismos, para cada um dos ensaios realizados. De acordo com Saito *et al.* (2003b), a elevada estabilidade e persistência das cianotoxinas nos ambientes aquáticos, assim como em água potável podem estar relacionadas com a alcalinidade do meio. O fato dos valores de pH nos ensaios A e B terem-se apresentados ligeiramente alcalinos poderia ter contribuído para uma redução na capacidade de degradação da microcistina pela comunidade de

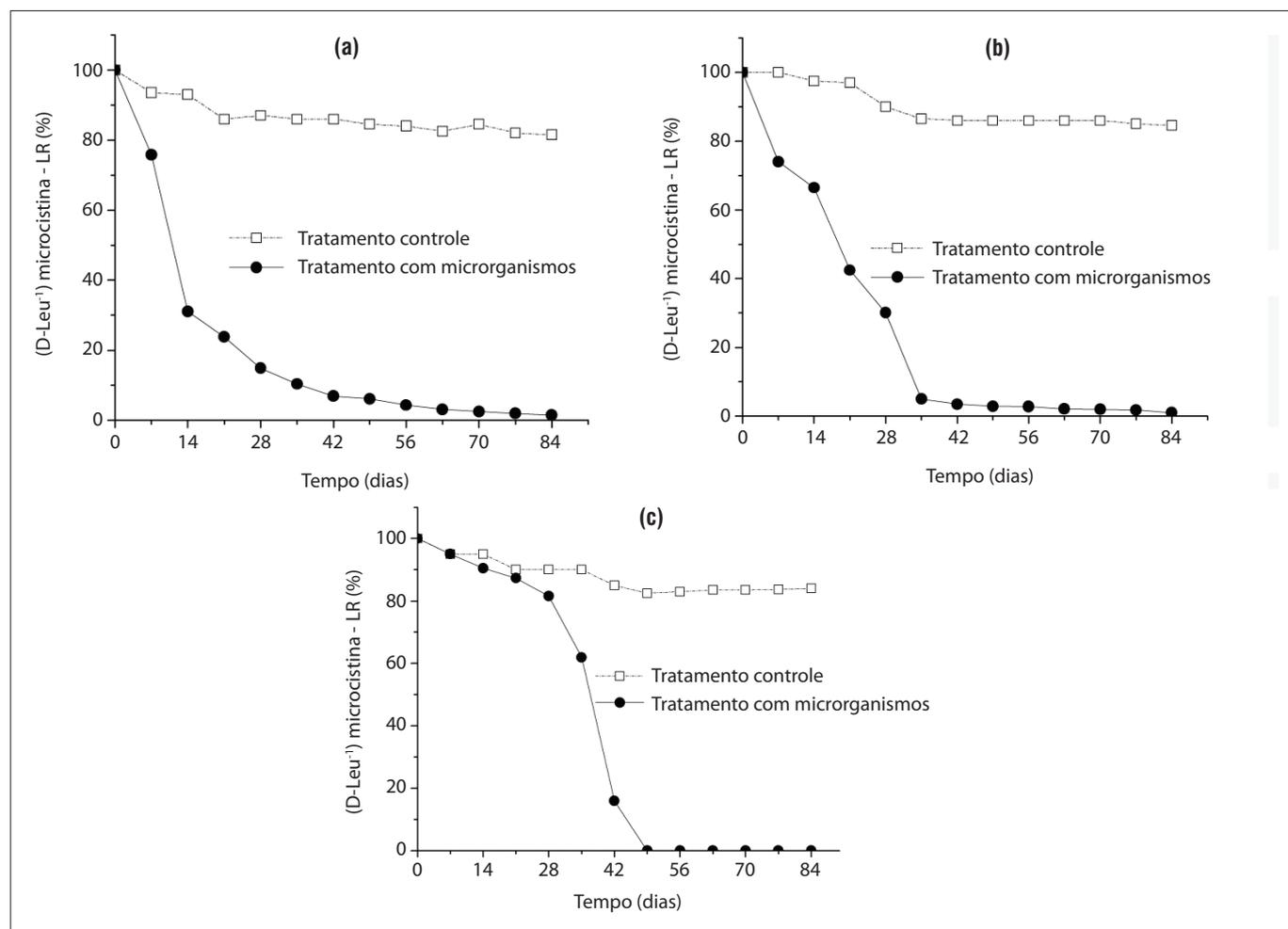


Figura 1 – Valores finais de degradação de (D-Leu¹)-microcistina-LR nos ensaios A (a), B (b) e C (c) realizados durante o estudo.

microrganismos presentes nos tratamentos. Saito *et al.* (2003a) evidenciaram que a redução no processo de degradação biológica de microcistinas por bactérias (*Sphingomonas*) pode ser influenciada em ambientes aquosos com valores alcalinos de pH. Nesse entendimento, torna-se importante considerar que a alcalinidade do meio constitui um possível fator que atua como efeito repressor enzimático no processo de degradação das cianotoxinas.

A temperatura testada durante os ensaios pode também representar um parâmetro sobre a biodegradação da microcistina. Trabalhos realizados por Park *et al.* (2001) e Wang *et al.* (2007a) demonstraram que a taxa de degradação de microcistinas expostas à bactérias está diretamente condicionada à temperatura de incubação do meio, e não apenas às características inerentes das bactérias quando testadas isoladamente. Esses autores verificaram que valores elevados de temperatura (22 a 30°C) do meio apresentaram uma maior degradação de microcistinas, quando comparadas a baixos valores de temperatura (5°C). Para valores extremos de temperaturas, a degradação de microcistinas por microrganismos pode apresentar declínio, em decorrência do efeito de redução da atividade metabólica ou mesmo da inativação dos microrganismos responsáveis pela biodegradação da cianotoxina (Wang *et al.*, 2007a). Durante o estudo, os tratamentos apresentaram valor de temperatura de 25±2°C, o que está próximo dos valores considerados ideais (PARK *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2007a), corroborando a expressiva degradação da cianotoxina no conjunto dos ensaios realizados.

Caracterização das bactérias que participam na biodegradação de microcistina

A partir do material coletado dos filtros CAB e cultivado segundo os métodos microbiológicos tradicionais, foram obtidos 10 isolados. Esse material biológico isolado foi representado em sua totalidade por colônias bacterianas integrantes do grupo das gram-positivas (80%), com ausência de esporos (80%), constituídos por formas cocóides (60%) e em bastonetes curtos (40%) (MINILLO *et al.*,

2009). Conforme descrito na Tabela 1, foram identificadas as sequências do gene 16S rRNA e foi amplificado a partir do DNA das amostras isoladas um total de 4 gêneros (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Stenotrophomonas*), sendo que em 2 amostras foi possível uma classificação somente em nível de família (Burkholderiaceae e Oxalobacteraceae).

A presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* e representantes da família Burkholderiaceae nos isolados cultivados dos filtros CAB evidencia o potencial desses microrganismos em biodegradarem microcistinas, tendo em vista trabalhos na literatura que reportam esta capacidade (TAKENAKA & WATANABE, 1997; LEMES *et al.*, 2008). Alguns estudos destacam os gêneros *Pseudomonas* e *Sphingomonas* como um dos poucos capazes de degradar microcistinas em águas naturais em condições aeróbicas (BOURNE *et al.*, 1996; TAKENAKA & WATANABE, 1997; SAITO *et al.*, 2003a). Contudo, trabalhos têm demonstrado uma eficiente remoção de microcistinas em filtros biológicos de carvão e areia, quando inoculados com linhagens específicas de *Sphingomonas* no sistema filtrante (BOURNE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007a). A ocorrência de representantes da família Burkholderiaceae nas amostras analisadas é um indicativo da capacidade desse grupo de participar diretamente no consumo de microcistinas. Essa potencialidade foi descrita em um estudo com linhagens desse gênero (*Burkholderia*) isoladas do ambiente natural que quando expostas às microcistinas apresentaram elevada capacidade de biodegradação da cianotoxina (LEMES *et al.*, 2008).

A capacidade de biodegradação de microcistinas por bactérias está normalmente associada ao fato dos microrganismos estarem condicionados à presença frequente das toxinas. Christofersen *et al.* (2002) demonstrou que bactérias heterotróficas de ocorrência natural podem degradar microcistinas quando a comunidade bacteriana está exposta à presença periódica da cianotoxina em seu hábitat. Bourne *et al.* (2006) relataram uma expressiva remoção (até 80%) da microcistina-LR após a inoculação de uma linhagem de *Sphingomonas* (ACM 3962), obtida em um lago eutrofizado e na água armazenada na superfície de filtros de areia. Um estudo recente realizado por Eleuterio e Baptista (2010) destacou a presença de bactérias (*Morganella morganii*) em filtros biológicos de areia como responsáveis pela degradação de microcistinas. A presença de bactérias aderidas ao leito filtrante desses filtros representa um campo de estudos promissor na bioprospecção e seleção dos microrganismos (bactérias) de ocorrência natural em mananciais de abastecimento superficial e em outros ambientes, com possível base às pesquisas sobre vias de remoção biológica de cianotoxinas no tratamento da água (ELEUTERIO, 2007; ELEUTERIO & BAPTISTA, 2010). Consequentemente, novos estudos têm sido direcionados na busca e seleção de linhagens específicas de microrganismos capazes de degradarem cianotoxinas em ETAs. Exemplos claros desse fato são os esforços realizados por Meriluoto *et al.* (2005) e Nybom, Salminen e Meriluoto (2008) na seleção e no uso de bactérias com propriedades benéficas à saúde

Tabela 1 – Caracterização dos isolados obtidos dos filtros biológicos de carvão com destaque aos gêneros (a) e famílias (b) encontrados e disponibilizados no *GeneBank*.

Isolado	Gêneros (a) e família (b) de bactérias identificadas	Número de acesso
T1	Oxalobacteraceae ^b	FJ848773
T2	<i>Acinetobacter</i> ^a	FJ848774
T3	<i>Pseudomonas</i> ^a	FJ848775
T4	<i>Cupriavidus</i> ^a	FJ848776
T5	Burkholderiaceae ^b	FJ848777
T6	Oxalobacteraceae ^b	FJ848778
T7	<i>Cupriavidus</i> ^a	FJ848779
T8	<i>Pseudomonas</i> ^a	FJ848780
T9	<i>Stenotrophomonas</i> ^a	FJ848781
T10	<i>Acinetobacter</i> ^a	FJ848782

(*Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium lactis*), com capacidade de remover microcistinas do meio por propriedades de adsorção, como uma possível base para tecnologia de tratamento de água.

Uso de microrganismos como agentes de remoção de cianotoxinas

Os resultados apontaram para duas taxas distintas de biodegradação das microcistinas nos ensaios realizados, uma com 0,23 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (ensaio A e B) e outra ligeiramente maior, com 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ (ensaio C). As diferenças observadas entre os resultados dos ensaios sustentam a premissa de que a presença de fontes extras de carbono disponíveis poderia ter representado o fator crucial que atenuou as taxas de biodegradação das microcistinas nos ensaios A e B. Contudo, alguns trabalhos destacam que a presença de microrganismos em elevadas concentrações no biofilme em um filtro biológico de carvão ou areia não irá determinar efetivamente expressivas taxas de remoção de microcistinas durante o tratamento de água (WANG *et al.*, 2007a; HO *et al.*, 2006). As microcistinas, quando presentes em águas naturais, são degradadas por microrganismos inerentes a esses ambientes, embora o processo possa ocorrer lentamente, o que requer um período de adaptação (*Lag*) dos microrganismos à cianotoxina (JONES & ORR, 1994; CHRISTOFFERSEN; LYCK; WINDING, 2002). Em ambientes em que microcistinas se mostram frequentes, a sua degradação por ação microbiana ocorre sem a necessidade de um período *Lag* para adaptação em seu consumo (CHRISTOFFERSEN; LYCK; WINDING, 2002). Esse aspecto reforça a premissa de que uma degradação elevada de microcistinas em meio natural está intrinsecamente dependente do tipo de microrganismos (bactérias) presentes e da capacidade destes em responder na produção de enzimas capazes de degradarem essas toxinas em condições ambientais (HO *et al.*, 2006).

Deve ser destacada a possível presença de outras linhagens de bactérias que eventualmente não se desenvolveram nas placas de cultivo, mas que poderiam atuar no consumo das microcistinas de forma direta ou em consórcios microbianos formados no microecossistema do biofilme no filtro biológico de carvão. Dessa forma, torna-se imprescindível a realização de uma varredura da diversidade microbiana presente no biofilme dos filtros biológicos de carvão por métodos complementares que permitam uma avaliação precisa, o que auxiliaria na verificação da presença de grupos bacterianos que estariam atuando conjuntamente na metabolização das cianotoxinas utilizadas no estudo.

O potencial de biodegradação das microcistinas por bactérias é atribuído à capacidade natural de síntese de enzimas específicas produzidas por esses microrganismos (BOURNE *et al.*, 1996, 2001; SAITO *et al.*, 2003a; HO *et al.*, 2007). Segundo Bourne *et al.* (2001), a quebra da ligação peptídica das microcistinas requer uma série de

proteases com estruturas específicas, pois essas cianotoxinas apresentam estabilidade contra várias proteases, tripsina, quimiotripsina, elastase, trombina, papaína, colagenase, carboxipeptidase e pepsina (SAITO *et al.*, 2002). Uma análise de forma sequenciada dos genes dos isolados bacterianos obtidos no presente estudo representa um passo seguinte desta pesquisa na confirmação da presença dos genes que expressam a síntese das enzimas degradadoras das microcistinas. Essa etapa torna-se imprescindível em razão de trabalhos apontarem em linhagens de *Sphingomonas* (ACM – 3962) a presença de cluster de genes A, B, C e D que codificam enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica em regiões da molécula de microcistina, principalmente nos aminoácidos Adda-Arginina (BOURNE *et al.*, 2001).

O gene *mlrA* (microcistinase), que é uma metaloprotease, é considerado a enzima mais importante do mecanismo de metabolização de microcistina, pois a estrutura cíclica promove estabilidade contra outras proteases e outros fatores químicos (BOURNE *et al.*, 1996; 2001). A identificação desse gene representa uma base tecnológica para trabalhos futuros direcionados ao uso de microrganismos para o tratamento biológico de águas contaminadas por cianotoxinas. A possibilidade de isolamento de linhagens específicas de microrganismos dotados da capacidade de degradarem cianotoxinas configura proposta futura para o tratamento de água (WANG *et al.*, 2007a), principalmente quando as condições adequadas para a biodegradação puderem ser identificadas e impostas sobre os filtros biológicos (NEWCOMBE & NICHOLSON, 2004).

Conclusões

Pode-se verificar a biodegradação das microcistinas via ação dos microrganismos presentes no biofilme dos filtros CAB, comprovando o potencial de metabolização da cianotoxina por componentes microbianos presentes nos biofiltros.

Foi constatada uma degradação natural da hepatotoxina, que apesar de reduzida em relação aos tratamentos contendo microrganismos do biofilme nos filtros CAB, deve ser considerada no balanço final de remoção da cianotoxina.

Foi verificado o efeito de cometabolismo das microcistinas pelos microrganismos mantidos sob a presença da hepatotoxina.

Houve domínio de formas bacterianas nos isolados cultivados dos filtros CAB, estando representados por quatro gêneros e duas famílias de bactérias.

A possibilidade de selecionar linhagens de microrganismos que degradam microcistinas para seu uso como agentes colonizadores em filtros de carvão biológico pode representar uma alternativa no aprimoramento das tecnologias de tratamento de água, aumentando a eficiência na remoção desses compostos recalcitrantes.

Referências

- ALVAREDO PAIXÃO, D.A.; DIMITROV, M.R.; PEREIRA, R.M.; ACCORSINI, F.R.; VIDOTTI, M.B. LEMOS, E.G.M. (2010) Molecular analysis of the bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 34, p. 773-781.
- BOURNE, D.G.; JONES, G.J.; BLAKELEY, R.L.; JONES, A.; NEGRI, A.P.; RIDDLES, P. (1996) Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 11, p. 4086-4094.
- BOURNE, D.G.; RIDDLES, P.; JONES, G.J.; SMITH, W.; BLAKELEY, R.L. (2001) Characterisation of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin LR. *Environmental Toxicology*, v. 16, p. 523-534.
- BOURNE, D.G.; BLAKELEY, R. L.; RIDDLES, P.; JONES, G.J. (2006) Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Research*, v. 40, p. 1294-1302.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Eds.) (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. New York: E & FN Spon, Inc. 416 p.
- CHRISTOFFERSEN, K.; LYCK, S.; WINDING, A. (2002) Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 27, p.125-136.
- ELEUTERIO, L. (2007) 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, 237 p.
- ELEUTERIO, L. & BATISTA, J.R. (2010) Biodegradation studies and sequencing of microcystin LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake. *Toxicon*, v. 55, p. 1434-1442.
- EWING, B. & GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, *Genome Research*, v. 8, p.186-194.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, *Genome Research*, v. 8, p. 175-185.
- HASHIMOTO, E.H. (2007) Avanço metodológico no biocontrole de cianobactérias toxigênicas com ênfase a degradação de microcistina-LR e bioensaio na qualidade de água e piscicultura. Tese (Doutorado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 118 p.
- HASHIMOTO, E.H.; KATO, H.; KAWASAKI, Y.; NOZAWA, Y.; TSUJI, K.; HIROOKA, E.Y.; HARADA, K.I. (2009) Further investigation of microbial degradation of microcystin using the advanced marfey method. *Chemical Resesearch in Toxicology*, v. 22, p. 391-398.
- HO, L.; MEYN, T.; KEEGAN, A.; HOEFEL, D.; BROOKES, J.; SAINT, C.P.; NEWCOMBE, G. (2006) Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Water Research*, v. 40, p. 768-774.
- HO, L.; GAUDIEUX, A.L.; FANOK, S.; NEWCOMBE, G.; HUMPAGE, A.R. (2007) Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. *Toxicon*, v. 50, p. 438-441.
- JONES, G.J. & ORR, P.T. (1994) 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 Research*, v. 28, n. 4, p. 871-876.
- JULIANO, V.B. (2008) Relatório final de atividades do subprojeto remoção de substâncias que causam gosto e odor (2-metilisoborneol e geosmina) em água através de carvão ativado e oxidação biológica. Porto Alegre: IPH/UFRGS.
- JULIANO, V.B. (2010) Remoção dos Compostos 2-Metilisoborneol e Geosmina de Água de Abastecimento por Carvão Ativado Granular e Ação Microbiana. Tese (Doutorado) em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 125 p.
- LEMES, G.A.F.; KERNSANACH, R.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; YUNES, J.S.; MATTHIENSEN, A. (2008) Biodegradation of Microcystin by Aquatic Burkholderia sp. From a South Brazilian Coastal Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 358-365.
- MARUYAMA, T.; PARK, H.; OZAWA, K.; TANAKA, Y.; SUMINO, T.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A.; KATO, K. (2006) *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. Nov., sp. Nov., a microcystin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 85-89.
- MERILUOTO, J. & SPOOF, L. (2005) Solid phase extraction of microcystins in water samples. *Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*. Meriluoto J. and Codd, G.A. (Eds), p. 73-76. ÅBO AKADEMI UNIVERSITY PRESS. Finland, v. 65, n. 1, 149 p.
- MERILUOTO, J.; GUEIMOND, M.; HASKARD, C.A.; SPOOF, L.; SJÖVALL, O.; SALMINEN, SEPPO. (2005) Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. *Toxicon*, v. 46, p. 111-114.
- MESQUITA, E.; MENAIA, J.; ROSA, M. J.; COSTA, V. (2006). Microcystin-LR removal by bench scale biological-activated-carbon filters. In: GIMBEL, R.; GRAHAM, J.D.; COLLINS, M.R. (Eds.) *Recent Progress in Slow sand and Alternative Biofiltration Processes*. London: IWA Publishing, ISBN 9781843391203, p. 373-383.
- MINILLO, A.; ISIQUE, W.D.; PRADO, H.F.A.; PAIXÃO, D.A.A.; DIMITROV, M.R.; LEMOS, E.G.M.; TANGERINO, E.P.T. (2009) Remoção da hepatotoxina (D-Leu1)-microcistina-LR por filtros de carvão com atividade biológica com atividade biológica em escala de bancada. *Revista DAE*, v. 180, p. 12-19.
- NEWCOMBE, G. & NICHOLSON, B. (2004) Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, v. 53, n. 4, p. 227-239.
- NYBOM, S.M.K.; SALMINEN, S.J.; MERILUOTO, J.A.O. (2008) Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. *Toxicon*, v. 52, p. 214-220.

- PARK, H.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K. (2001) Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by a New Bacterium Isolated from a Hypertrophic Lake. *Environ. Toxicol.*, v. 16, p. 337-343.
- RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; DEMARINID, D.M. (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research*, v. 636, p. 178-242.
- SAITO, T.; OKANA, K.; PARK, H.D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B.A.; BURNS, B.P.; SUGIURA, N. (2003a) Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, mlrA, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 229, n. 2, p. 271-276.
- SAITO, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M. (2003b) Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. *J. Water SRT – Aqua*, v. 52, p. 13-18.
- SAITO, T.; SUGIURA, N.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; MATSUMURA, M. (2002) Degradation of microcystin by biofilm in a practical treatment facility. *Wat. Sci. Technol.*, v. 46, p. 237-244.
- SIMPSON, D.R. (2008) Biofilm processes in biologically active carbon water purification. *Wat. Res.*, v. 42, p. 2839-2848.
- TAKENAKA, S. & WATANABE, M.F. (1997) Microcystin-LR Degradation by *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *Chemosphere*, v. 34, n. 4, p. 749-757.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. (1997) The CLUSTAL - X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, p. 4876-4882.
- TOLEDO J.A.P.; TALARICO, M.; CHINEZ, S.J.; AGUDO, E.G. (1983) A aplicação de modelos simplificados para a avaliação do processo da eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Balneário Camboriú, Santa Catarina. p. 1-34.
- TSUJI, K.; ASAKAWA, M.; ANZAI, Y.; SUMINO, T.; HARADA, K.I. (2006) Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in eutrophic lake. *Chemosphere*, v. 65, p. 117-124.
- VALERIA, A.M.; RICARDO, E.J.; STEPHAN, P.; ALBERTO, W.D. (2006) Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba – Argentina). *Biodegradation*, v. 17, p. 447-455.
- WANG, H.; HOB, L.; LEWISA, D.M.; BROOKESB, J.D.; NEWCOMB, G. (2007a) Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. *Wat. Res.*, v. 41, p. 4262-4270.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. (2007b) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 5261-5267.
- WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 697-703.

