



I-059 – USO DE MICRORGANISMOS PARA BIOCONTROLE DE CIANOBACTÉRIAS TOXIGÊNICAS E BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS

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 do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina.

Agnes Izumi Nagashima

Biotecnóloga (Universidade Estadual Paulista – UNESP- Assis, 2007), mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina.

Francine Kuriama

Bióloga (Centro Universitário Filadelfia de Londrina, 2008), colaboradora em projetos de pesquisa do Programa de Mestrado em Edificações e Saneamento do Centro de Tecnologia e Urbanismo da Universidade Estadual de Londrina.

Kiyomi Tsuji

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

Sandra Garcia

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

Gisele Maria de Andrade Nóbrega

Professora do Depto. de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Ken-ichi Harada

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

Elisa Yoko Hirooka

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

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: ekkuroda@yahoo.com.br

RESUMO

Florações de cianobactérias afetam a qualidade da água alterando as características físico-químicas e, principalmente, liberando cianotoxinas, tais como as microcistinas. O controle de floração (*bloom*) de cianobactérias envolve métodos mecânicos, químicos e biológicos, embora no momento, nenhum dos utilizados sejam recomendados. A exemplo, o uso de algicida sulfato de cobre pode lisar a célula e liberar as cianotoxinas na água. Por outro lado, a ineficácia do tratamento de água por ciclo completo perante remoção de microcistinas (MCs) extracelulares, aliado ao impacto ambiental negativo de agentes químicos, enfatiza a necessidade de desenvolver alternativas para prevenir/diminuir o perigo de contaminação via consumo de água. Nesse sentido, o biocontrole apresenta-se como opção promissora por ser um método sustentável e menos agressivo. Assim, este trabalho teve como objetivo, primeiramente, analisar atividade anti-cianobactéria de leveduras, visando a possibilidade de utilização para biocontrole e degradação de microcistinas (MCs). Nesse estudo preliminar, foi constatada a atividade anti-cianobactéria das leveduras *Pichia fermentans* (PF) e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (SC) devido à redução da concentração de clorofila-a da ordem de 54,9% e de 51,4% nas alíquotas da mistura retiradas após 96 hs de atividade (M+PF) 96 hs e (M+SC) 96 hs, respectivamente. Em relação à densidade celular, observou-se que nas alíquotas retiradas após 96 hs de atividade, houve redução da ordem de 65,4 a 82,1% no número total de células de *Microcystis* sp. M(M+PF) 96 hs quando exposta à cultura de *Pichia fermentans* (PF) e redução da ordem de 55,3 a 59,6% de células de *Microcystis* sp. M(M+SC) 96 hs quando exposta à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (SC).

PALAVRAS-CHAVE: cianobactéria, biocontrole, atividade anti-cianobactéria, microcistinas, leveduras.

INTRODUÇÃO

Florações de cianobactérias afetam a qualidade da água alterando as características físico-químicas e, principalmente, liberando cianotoxinas, tais como as microcistinas (Figura 1). O controle de floração (*bloom*) de cianobactérias envolve métodos mecânicos, químicos e biológicos, embora no momento, nenhum dos utilizados sejam recomendados. A exemplo, o uso de algicida sulfato de cobre pode lisar a célula e liberar as cianotoxinas na água. Por outro lado, a ineficácia do tratamento de água por ciclo completo perante remoção de microcistinas (MCs) extracelulares, aliado ao impacto ambiental negativo de agentes químicos, enfatiza a necessidade de desenvolver alternativas para prevenir/diminuir o perigo de contaminação via consumo de água. Nesse sentido, o biocontrole apresenta-se como opção promissora por ser um método sustentável e menos agressivo. Pesquisas comprovaram o uso de *Pseudomonas* spp., *Sphingosinicella microcystinivorans*, entre outros, no biocontrole de cianobactérias e/ou degradação de MCs (HASHIMOTO, 2007; MARUYAMA, et al., 2006).

Grupos microbianos emergentes promissores, incluídos recentemente devido ao potencial biodegradadora de microcistina compreendem as bactérias lácticas, de reconhecida característica benéfica probiótica, e leveduras. Assim, investigações visando procura de microrganismos antagonistas são essenciais para o tratamento de água sustentável, minimizando a aplicação de agentes químicos. Assim, este trabalho teve como objetivo, primeiramente, analisar atividade anti-cianobactéria de cepas de leveduras, visando a possibilidade de utilização para biocontrole e degradação de microcistinas (MCs).

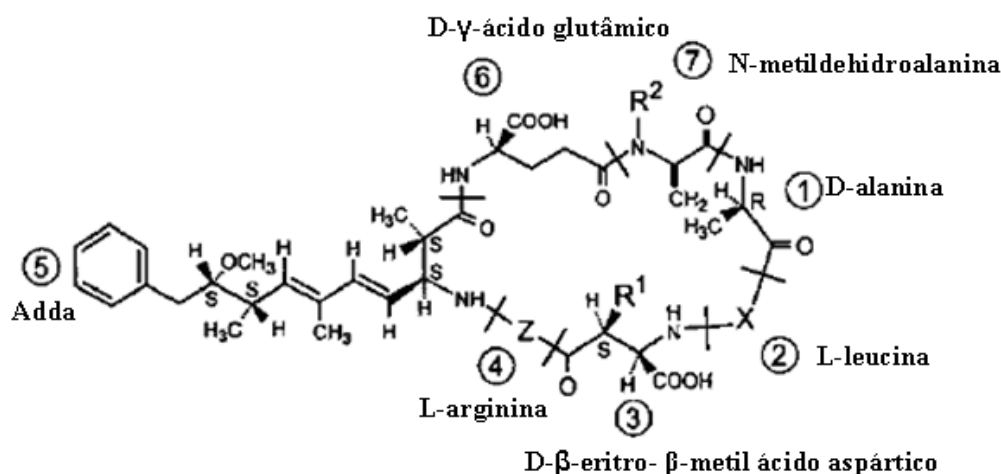


Figura 1: Estrutura química da microcistina, onde Z e X são os dois L-aminoácidos variáveis e R1 e R2 são hidrogênio (demetilmicrocistinas) (adaptado de CHORUS E BARTRAM, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

MICROCISTINAS

Em função de informações obtidas do Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Meijo, Nagoya – Aichi, Japão, a cepa toxigênica de *Microcystis* sp TAC95 produz predominantemente microcistina-LR (MC-LR) e em elevadas concentrações, sendo portanto, selecionada para a produção dos extratos de MCs utilizados nos experimentos.

Para obtenção das microcistinas, foram desenvolvidas culturas em mesocosmos de *Microcystis aeruginosa* TAC 95. A cultura foi centrifugada a 3000xg por 10 min e, o *pellet* obtido, congelado a -20° C e liofilizado (Liotop L101 da Liobras, São Carlos, SP, Brasil). O material liofilizado foi mantido a -20° até a preparação do extrato de *M. aeruginosa* TAC95.

O procedimento para extração e purificação de MCs foi baseado em KRISHNAMURTHY et. al (1986), ENVIRONMENT AGENCY (1998), LAWTON et. al (1994a), TSUJI et. al (1994) e HARADA et. al in CHORUS & BARTRAM (1999). As análises de MCs por cromatografia líquida de alta eficiência com



detector de diodo - HPLC-PDA foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD com detector de diodo UV/VIS modelo SPD-M10A. Para calibração do método foram utilizados padrões certificados de MC-LR, MC-YR, MC-RR, [D-Leu1]MC-LR.

A análise da concentração residual de MCs totais foi realizada por imunoenensaio ELISA (kit de placas da Beacon Analytical Systems Inc.). A placa de reação contém 96 poços, o volume requerido de amostra é de 50 µL por poço e o tempo médio gasto no processo para análise após preparação das amostras é da ordem de 90 min. As amostras foram previamente filtradas em filtro tipo GF/C ou similar e em seguida, diluídas com água deionizada em proporções variadas, de forma a possibilitar a quantificação pela curva de calibração construída para a faixa entre 0 e 2,0 µg/L de MCs totais. O limite de detecção do método é de 0,16 µg/L.

DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA-A

Em função das variadas propostas metodológicas para determinação da concentração de clorofila-a, optou-se pela adoção do método espectrofotométrico com extração em acetona 90% segundo APHA, AWWA, WEF (2005) com adaptações segundo KURODA *et. al.* (2005).

CULTURAS DE *MICROCYSTIS* SPP. TAC 95

As culturas de *Microcystis* spp. TAC 95 passaram a ser mantidas em meio ASM-1 autoclavado em tubos de ensaios de 20 mL em tréplica e elenmeyers de 125 mL em réplica, conforme condições apresentadas na Tabela 1 sob controle de contaminação.

Tabela 1 - Condições físicas para manutenção das culturas de *Microcystis* spp. TAC 95

Temperatura (°C)	25 ± 1° C
Luz (µE. m ⁻² .s ⁻¹)	35
Fotoperiodicidade	12 h
Agitação (d ⁻¹)	1

LEVEDURAS

Cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia fermentans* NCYC 738, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Gisele Maria de Andrade Nóbrega do Laboratório de Genética de Fungos do Depto. de Biologia Geral – UEL estão sendo mantidas e cultivadas em meio YPD (Yeast, Peptone, Dextrose).

CEPA B9

Como controle positivo para biodegradação de microcistinas será utilizada a cepa B9 (99 % geneticamente similar a *Sphingosinicella microcystivorans*) isolada do Lago Tsukui, Kanagawa – Japão, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ken-ichi Harada do Laboratório de Ciências Ambientais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Meijo, Nagoya – Aichi, Japão. A cepa B9 foi mantida em meio sólido (ágar nutriente) a 25°C, incubando-se por 48-72 h e em meio líquido (peptona de caseína 0,2%, extrato de levedura 0,1% e glicose 0,05%) sob agitação a 200 rpm a 27° C / 48 h.

CARACTERIZAÇÃO DA CEPA *MICROCYSTIS* SP TAC95

Devido ao uso da cepa toxigênica *Microcystis* sp TAC95 para produção dos extratos de MCs utilizados nos experimentos, foi necessária a realização da caracterização da cepa, a fim de obtermos subsídios para possibilitar o controle do crescimento e produção de MCs.

Para caracterização da cepa de *Microcystis* sp TAC-95, foi preparada uma cultura de 3000 mL e mantida em incubadora de BOD sob condições apresentadas na Tabela 1, aeração contínua e inoculação inicial de 15 %.

Inoculações e retiradas de alíquotas para amostragem da cultura foram realizadas sob bico de Bunsen.

Para a construção da curva de crescimento celular, alíquotas (1 mL) foram retiradas diariamente da cultura e preservadas com formol a 4% para contagem celular em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer.

Adicionalmente, foram retiradas alíquotas de 10 mL para determinação de clorofila-a (item 4.3.4) e de 2,0 mL para determinação de MCs intra e extracelulares (após filtração em GF/C) pelo método de imunoenensaio ELISA.

Atividade anti-cianobactéria - Testes preliminares

A atividade anti-cianobactéria de leveduras foi testada por meio da utilização de culturas (70 mL em réplica) de cepa toxigênica de *Microcystis sp* TAC95 sob condições apresentadas na Tabela 4.4.1 em meio ASM-1, 3 d após inoculação a 10%, inoculadas com culturas (1 mL) de leveduras - *Pichia fermentans* (PF) e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (SC) em meio YPD e adição de meio de nutrientes YPD (1 mL) e ASM-1 (30 mL). A mistura foi mantida sob condições apresentadas na Tabela 1 e após 0 e 96 h, foram coletados dessa mistura, 10 mL para determinação da concentração de clorofila *a*, 2 mL para análise de MCs (intra e extracelulares) e 1 mL para determinação da densidade celular em câmara de Neubauer. Cultura de *Microcystis* TAC95 adicionada do meio YPD foi utilizada como controle negativo do experimento.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *MICROCYSTIS SP* TAC95

Na Figura 2 estão representados os valores de densidade celular e de clorofil-a da curva de crescimento da cepa toxigênica *Microcystis sp* TAC95 monitorada até o 15º dia. Os valores de densidade celular foram acompanhados de acréscimos proporcionais da concentração de clorofila-a em função do tempo e variaram entre $1,1 \times 10^6$ cel/mL (1º dia) e $6,4 \times 10^6$ cel/mL (14º dia). Os valores das concentrações de clorofila-a resultaram entre 0,762 mg/L (1º dia) e 3,729 mg/L (14º dia). Observa-se na Figura 3, que inicialmente a cultura apresentou coloração levemente esverdeada que se escureceu gradualmente até o 14º dia atingindo um tom verde mais intenso, correspondente aos valores máximos de densidade celular e de clorofil-a.

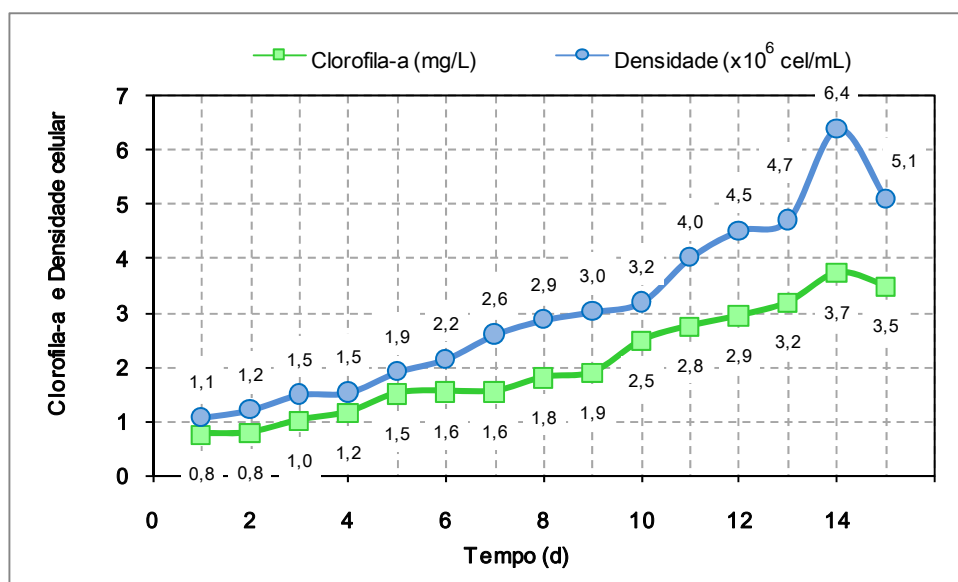


Figura 2 - Curva de crescimento da cepa toxigênica *Microcystis sp* TAC95 / Valores de densidade celular e de clorofil-a

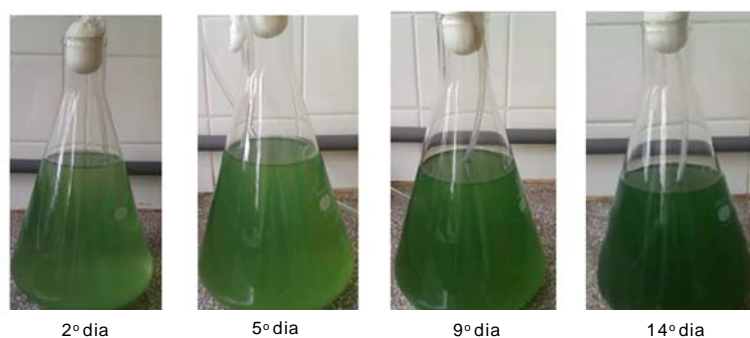


Figura 3 - Fotos da cultura de *Microcystis sp* TAC-95 utilizada para caracterização da cepa

ATIVIDADE ANTI-CIANOACTÉRIA - TESTES PRELIMINARES

No experimento preliminar realizado, foi constatada a atividade anti-cianobactéria das leveduras *Pichia fermentans* (PF) e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (SC) devido à redução substancial da concentração de clorofila-a da ordem de 54,9% e de 51,4% nas alíquotas da mistura retiradas após 96 hs de atividade (M+PF) 96 hs e (M+SC) 96 hs, respectivamente. O experimento foi validado em função das concentrações de clorofila-a do controle que se mantiveram praticamente constante mesmo após 96 hs. Os resultados das concentrações de clorofila-a são apresentados na Figura 4.

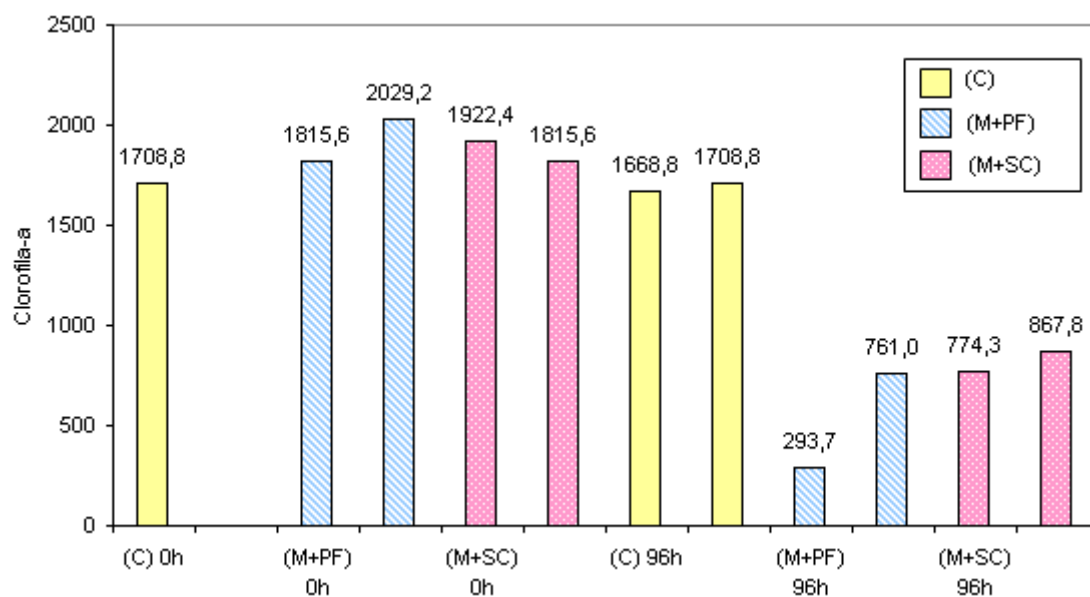


Figura 4 - Atividade anti-cianobactéria de leveduras × *Microcystis sp* TAC95 / concentrações de clorofila-a

Em relação à densidade celular, observou-se que nas alíquotas retiradas após 96 hs de atividade, houve redução da ordem de 65,4 a 82,1% no número total de células de *Microcystis sp*. M(M+PF) 96 hs quando exposta à cultura de *Pichia fermentans* (PF) e redução da ordem de 55,3 a 59,6% de células de *Microcystis sp*. M(M+SC) 96 hs quando exposta à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (SC).

Em ambos tratamentos, observou-se expressivo aumento da densidade celular de leveduras PF(M+PF) 96 hs e SC(M+SC) 96 hs.

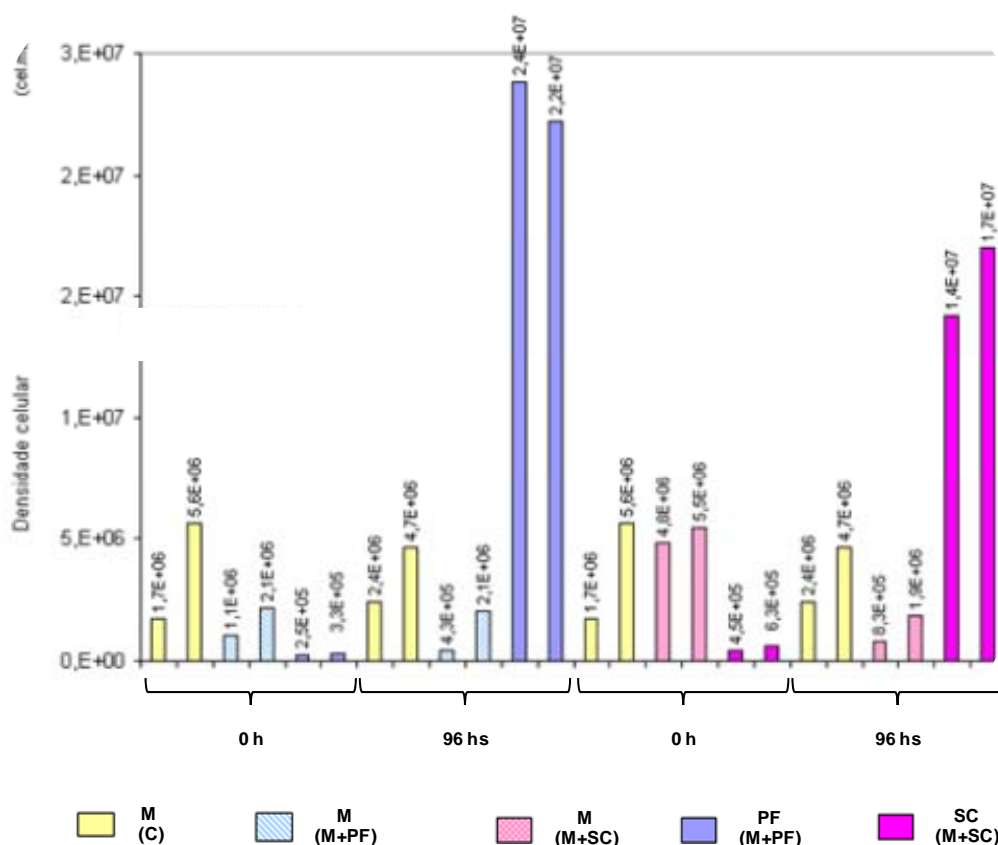


Figura 5 - Atividade anti-cianobactéria de leveduras \times *Microcystis sp* TAC95 / densidade celular

CONCLUSÕES

Com este estudo, foi possível verificar que:

- Os valores de densidade celular da curva de crescimento da cepa toxigênica *Microcystis sp* TAC95 monitorada até o 15º dia foram acompanhados de acréscimos proporcionais da concentração de clorofila-a em função do tempo e variaram entre $1,1 \times 10^6$ cel/mL (1º dia) e $6,4 \times 10^6$ cel/mL (14º dia). Os valores das concentrações de clorofila-a resultaram entre 0,762 mg/L (1º dia) e 3,729 mg/L (14º dia);
- Foi constatada a atividade anti-cianobactéria das leveduras *Pichia fermentans* (PF) e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 738 (SC) devido à redução da concentração de clorofila-a da ordem de 54,9% e de 51,4% nas alíquotas da mistura retiradas após 96 hs de atividade (M+PF) 96 hs e (M+SC) 96 hs, respectivamente;
- Em relação à densidade celular, observou-se que nas alíquotas retiradas após 96 hs de atividade, houve redução da ordem de 65,4 a 82,1% no número total de células de *Microcystis sp*. M(M+PF) 96 hs quando exposta à cultura de *Pichia fermentans* (PF) e redução da ordem de 55,3 a 59,6% de células de *Microcystis sp*. M(M+SC) 96 hs quando exposta à cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (SC);
- Em ambos tratamentos, observou-se expressivo aumento da densidade celular de leveduras PF(M+PF) 96 hs e SC(M+SC) 96 hs.



AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya, Aichi, Japão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, AWWA, WEF . Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF) / 20ª edição (1999).
2. HASHIMOTO, E. H. Avanço metodológico no biocontrole de cianobactérias toxigênicas com ênfase a degradação de microcistina-LR e bioensaio na qualidade de água e piscicultura. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina, 118p. , 2007.
3. MARUYAMA, T., PARK, H.D., OZAWA, K., TANAKA, Y., SUMINO, T., HAMANA, K., HIRAISHI, A., KATO, K., *Sphingosinicella microcystinivorans* gen. nov., sp. nov., a Microcystin-Degrading Bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 56, (1), 85–89, 2006.
4. CHORUS, I.; BARTRAM, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. 416p.
5. BRASIL (2004). Ministério da Saúde – Portaria nº. 518 – 03/2004 – DO nº 59 de 26/04/2004, Seção 1, pg 266 – 270.