

## IV-260 - POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS POR LEVEDURAS, BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E *SPHINGOSINICELLA MICROCYSTINIVORANS* – B9

### Francine Kuriama

Bióloga pelo Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL). Mestranda em Engenharia de Edificações e Saneamento pela Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### Karla Bigetti Guergoletto

Engenheira de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Professora do Departamento de Alimentos da UTFPR-Londrina

### Sandra Garcia

Engenheira de Alimentos e Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Doutora em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL). Professora do Departamento de Ciências Agrárias de UEL.

### 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<sup>(1)</sup>

Engenheira Civil pela Escola de Engenharia de São Carlos – EESC-USP. Mestre e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela mesma instituição. Pós-doutora pela Meijo University Japão. Professora do Depto de Construção Civil - CTU da UEL.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rodovia Celso Garcia Cid; Pr 445; Km 380; CEP: 86055-900, Londrina – Paraná - Brasil - Tel: (43) 3371-4815 - e-mail: [ekkuroda@uel.br](mailto:ekkuroda@uel.br)

## RESUMO

O uso da pré-cloração em estações de tratamento de água para inativação de cianobactérias pode gerar subprodutos organohalogenados potencialmente cancerígenos. Para minimizar este problema há necessidade de se estudar alternativas técnicas de tratamento com destaque os biofilmes com potencial de degradação de microcistinas - MCs. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de degradação de microcistinas por diferentes cepas de leveduras, bactérias probióticas e bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9. O teste foi efetuado com extrato de MCs obtido da cepa de *Microcystis* sp. tendo sido testados contra biomassa e cultivo dos microrganismos. Os tratamentos foram mantidos a 27°C com rotação de 100 rpm e as amostras para análise de MCs e contagem dos microrganismos foram retiradas nos tempos 0 e 96 h. Independente das condições testadas a bactéria B9 foi a que apresentou a maior degradação de MCs, com 95 e 98 % de degradação após 96 h.

**PALAVRAS-CHAVE:** cianobactérias, biodegradação, microcistinas, leveduras, bactérias probióticas.

## INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo em mananciais de água para abastecimento público, favorece a proliferação e em certos casos a predominância de cianobactérias produtoras de toxinas, que podem acarretar graves consequências para a saúde humana e de animais, devido ao seu potencial cancerígeno. Além disso, podem aumentar o custo do tratamento de águas, devido à necessidade da remoção de metabólitos extracelulares, gostos e odores indesejáveis.

As cianobactérias são microrganismos procariotos, geralmente aquáticos, que realizam fotossíntese com liberação de oxigênio. São 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. Algumas cianobactérias são potencialmente toxigênicas, tais como os gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Planktothrix* (Bittencourt e Molica, 2003).

As toxinas (cianotoxinas) no meio líquido podem afetar a saúde humana, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Podem ter ação neurotóxica, hepatotóxica ou serem irritantes, mesmo por contato (FUNASA, 2003).

No Brasil, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (2004) obriga o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas estabelecendo o valor máximo permitido de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistinas para água de consumo humano. 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 de cianobactérias, pode ocorrer a redução da duração das carreiras de filtração e ou comprometimento da qualidade da água produzida. A pré-cloração é uma prática realizada em muitos sistemas de tratamento de águas visando à inativação de microalgas e cianobactérias. Entretanto, alguns problemas são gerados na utilização desse pré-tratamento em mananciais com elevadas concentrações de fitoplâncton, com destaque, a promoção de lise celular com conseqüente liberação de metabólitos secundários e a formação de subprodutos organohalogenados.

Na tentativa de minimizar esses problemas, existem estudos voltados para o uso de microrganismos que possuem a capacidade de degradar as microcistinas em biofilmes, como é o caso da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 (Maruyama, 2006), que aderida a um suporte degradou até 100 % das microcistinas em 16 h de exposição (Tsuji, 2006), ou ainda, que apresentam atividade anti-cianobactéria com potencial aplicação como biocontrole.

Na agricultura, o biocontrole de patógenos tem sido prioritariamente feito com a introdução de organismos antagonistas no alvo a ser protegido. Entre os utilizados, alguns pesquisadores têm preferido as leveduras, especialmente quando o objetivo dos trabalhos é a proteção de frutos destinados ao consumo in natura. Estas têm se mostrado promissoras para o uso no controle das doenças que ocorrem na pós-colheita (Kraemer, 2007).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* e espécies filogeneticamente próximas são as mais empregadas pelo homem que as utilizam nas indústrias de fermentação alimentícia e de bebidas. As principais características que tornam as leveduras interessantes para usos industriais são sua facilidade de obtenção e multiplicação, utilização de nutrientes na forma mais simples, possibilidade de cultivo independente do ambiente, pequena exigência de água e área, formação de produtos de valor nutritivo, além de serem consideradas seguras para uso de maneira geral (Del Rio, 2004).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado a capacidade desta espécie em remover metais pesados da água, tornando uma alternativa promissora para descontaminação ambiental (Wang & Chen, 2006). Outro microrganismo que pode promover a degradação das microcistinas são os microrganismos probióticos, que quando consumidos através de uma dieta conferem benefícios à saúde de humanos e animais. Estudos feitos com *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* mostraram que esses microrganismos são eficientes para remoção de microcistinas, porém é preciso adaptá-los para serem utilizados em escala real (Sonja, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de degradação de microcistinas por diferentes cepas de leveduras, bactérias probióticas e da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* B9.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do teste de atividade de degradação de microcistinas – MCs foi utilizada a cepa toxigênica de *Microcystis* sp. cedida pelo Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya - Aichi - Japão. A cepa caracteriza-se pela produção predominante de MC-LR em elevadas concentrações.

### Preparação do extrato de *Microcystis* sp.

A cepa toxigênica de *Microcystis* sp. foi cultivada em meio ASM-1 estéril por 20-30 dias em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , intensidade luminosa de  $35 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de  $12 \text{ h.d}^{-1}$  e aeração contínua. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos para obtenção de biomassa. Estas foram congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ , liofilizadas (Liotop L101 / Liobras) e ressuspensas em água ultrapura. Para liberação da toxina, repetição de 3 séries de congelamento / descongelamento foram realizadas na biomassa, seguida de armazenamento  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de uso.

### Isolamento e cultivo dos microrganismos

A cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 cedida pelo Laboratory of Environmental Sciences, Faculty of Pharmacy, Meijo University Nagoya - Aichi – Japão foi isolada do Lago Tsukui, Kanagawa, mantida em meio sólido (Sakurai) a 25°C, incubando-se por 48-72 h e cultivada em meio líquido (peptona de caseína 0,2 %, extrato de levedura 0,1 % e glicose 0,05 %) a 25° C por 72 h.

As leveduras utilizadas mostradas na tabela 1 foram cultivadas em meio YPD (extrato de levedura 1%, glicose 2% e peptona 2%) a 25°C por 24 h.

**Tabela 1: Cepas de leveduras utilizadas no experimento**

Código da cepa	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
L1	PA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	YPD
L2	C2	<i>Pichia fermentans</i>	-	
L3	Calda	Cepa não identificada	Isolada de cana de açúcar	
L4	A2	Cepa não identificada	Isolada de carambola	
L5	Vale do Ivaí	Cepa não identificada	Isolada de cana de açúcar	
L6	CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isolada de cana de açúcar	

As culturas probióticas mostradas na tabela 2 foram ativadas 3 vezes em Caldo MRS à 37°C por 18 h.

Os grãos de kefir de água (mistura de bactérias láctica, acética e levedura) foram cultivados previamente 3 vezes em solução de açúcar mascavo à temperatura ambiente, por 24 h.

**Tabela 2: Cepas de bactérias probióticas utilizadas no experimento**

Código da cepa	Cepa	Classificação	Origem	Meio de cultura
P1	LPR	<i>Lactobacillus plantarum e rhamnosus</i>	Sacco	MRS
P2	Bb12	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Christian Hansen	MRS
P3	LC-1	<i>Lactobacillus casei</i>	Christian Hansen	MRS
P4	Kefir	de água	Laboratório de Ciência de Alimentos CCA-UEL	Açúcar mascavo
P5	La-5	<i>Lactobacillus acidófilos</i>	Christian Hansen	MRS

### Preparação do teste de varredura

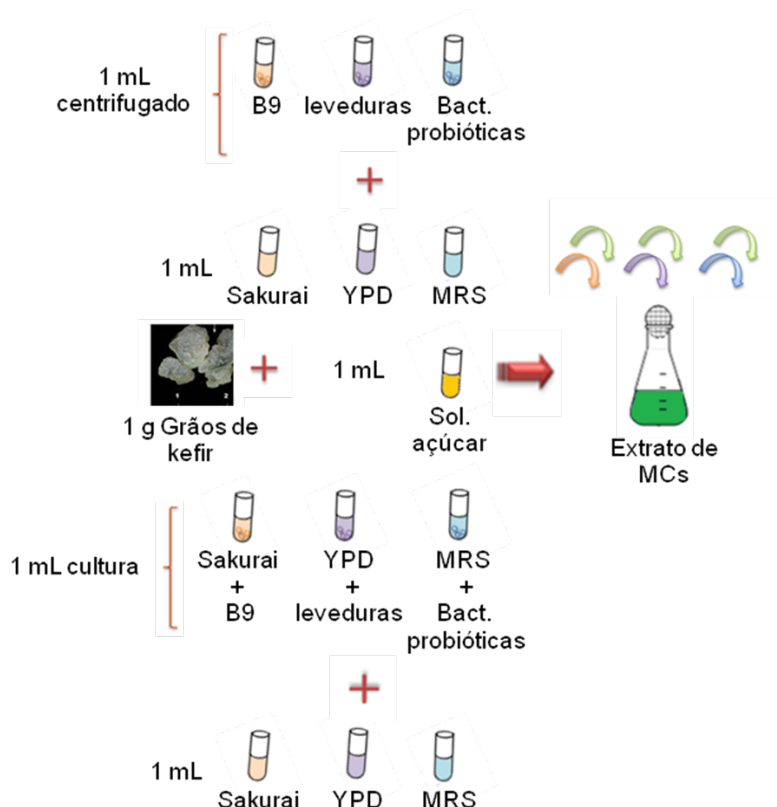
Primeiramente adicionou-se 8 mL do extrato de *Microcystis* sp. (com concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de microcistinas) em frascos de vidro com capacidade máxima de 50 mL. Os diferentes tratamentos foram realizados adicionando-se 1 mL de biomassa ou inóculo (microrganismo adaptado no meio de cultura) de levedura ou bactérias probióticas ou bactéria B9 + 1 mL de meio específico de cada microrganismo. No teste com os grãos de kefir, foi adicionado apenas 1 g do grão + 1 mL da solução de açúcar mascavo 5 % (Tabela 3). Os tratamentos foram mantidos à 27°C com rotação de 100 rpm por 96 h (Figura 1). Nos tempos 0 e 96 h foram retirados 1 mL para análise de MCs através do método de imunoensaio Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA (kits de Beacon Analytical Systems Inc.) e 1 mL para contagem dos microrganismos.

**Tabela 3: Condições experimentais testadas**

Código da condição	Condições experimentais
A	Extrato de MCs + 1 mL da cultura <sup>(**)</sup> + 1 mL de meio <sup>(*)</sup>
B	Extrato de MCs + 1 mL de biomassa <sup>(**)</sup> + 1 mL de meio <sup>(*)</sup>

(\*) meio específico dos microrganismos: B9 – Sakurai ou leveduras – YPD ou bactérias probióticas – MRS ou kefir - açúcar mascavo

(\*\*) específica dos microrganismos B9 ou leveduras ou bactérias probióticas



**Figura 1: Esquema do teste de varredura para degradação de microcistinas por diferentes cepas de bactéria B9, leveduras, bactérias probióticas, e grãos de kefir**

### Contagem de microrganismos

A contagem de bactérias probióticas, foi efetuada através de diluições decimais e seriadas de 1 mL da amostra em solução salina 0,85 % estéril, inoculação em Agar MRS e incubação a 37°C por 48 h.

Para a bactéria B9 foi realizada a retirada de 1 mL da amostra seguida de diluições decimais e seriadas com solução salina 0,85 % estéril, inoculação em Agar Sakurai com incubação a 25°C por 72 h.

Na contagem de leveduras, 1 mL da amostra foi retirada e fixada com formol 4 %. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer / microscópio Motic BA 21.

O teste de viabilidade e contagem dos microrganismos testados foram realizados nos tempos 0 e 96 h.

### RESULTADOS

As figuras 2 e 3 mostram os resultados do teste de degradação de microcistinas - MCs nos tempos 0 e 96 h e os percentuais de degradação pela bactéria B9 leveduras e bactérias probióticas e kefir respectivamente.

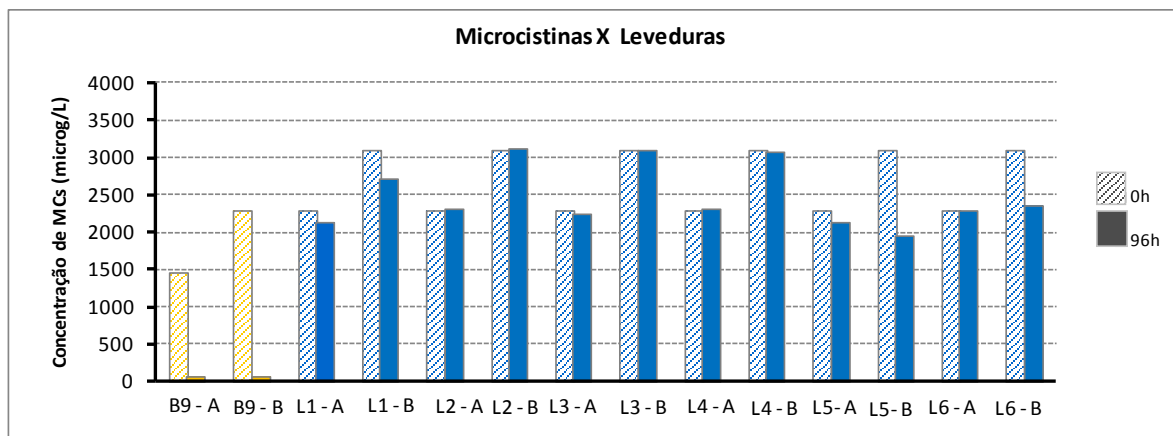
Independentemente da condição testada, a bactéria B9 apresentou a maior degradação de MCs com 95 e 98 % quando adicionada na forma de inoculo e biomassa centrifugada respectivamente. Essas eficiências comprovam os resultados obtidos por Tsuji et al. (2006), em que a imobilização da cepa de *Sphingosinicella microcystinivorans* B9 em biorreatores constituídos de resinas de poliéster mostrou eliminação completa de MC-LR após 24 h.

Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, um peptídeo tóxico liberado no meio de cultivo capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos sendo detectado em diversos gêneros como *Saccharomyces spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Torulopsis spp.* (Philliskirk & Young, 1975).

No entanto, a maior eficiência foi obtida com biomassa da cepa Vale do Ivaí (L5) a qual apresentou 37 % de degradação após 96 h de incubação, seguida da biomassa de CAT-1 (L6), com 24 %. As outras cepas

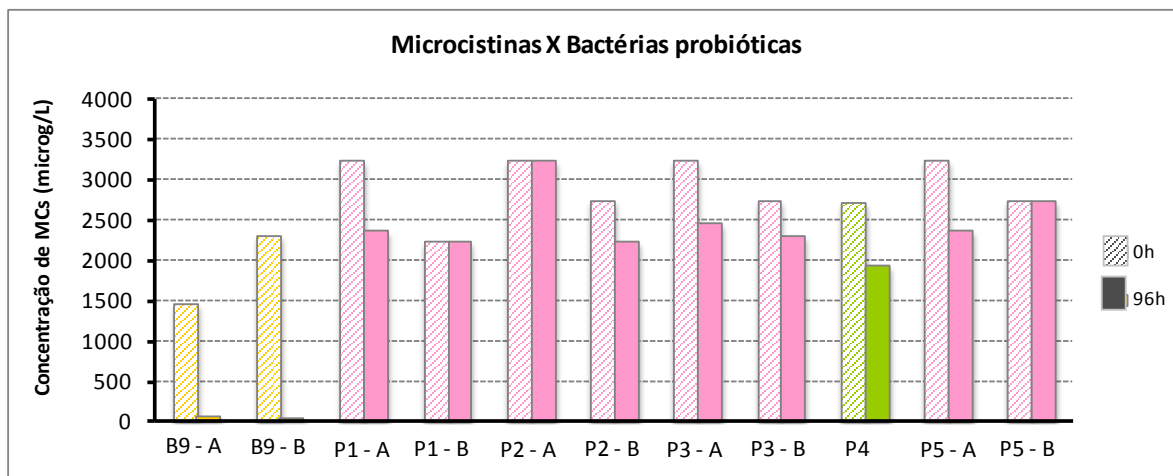
apresentaram resultados abaixo de 13 % de degradação, sendo assim consideradas insatisfatórias para uso como potencial de biodegradação e biocontrole.

Por outro lado, as condições de manutenção das leveduras são bastante simples quando comparadas às da bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 e às das bactérias probióticas, podendo-se constituir como alternativa promissora para estudos futuros, desde que sua capacidade de degradação seja potencializada.



**Figura 2: Degradação de MCs pela bactéria B9 e seis cepas de leveduras e bactéria B9 utilizando extrato de *Microcystis* sp. contendo MCs**

Entre as bactérias probióticas o maior percentual de degradação foi de 27 %, obtido pela cepa La-5 (P5) adicionada na forma de inoculo. O percentual de degradação de MCs dos grãos de kefir (P4), foi de 29 % após 96 h de incubação. Estudos feitos com *Lactbacillus* e *Bifidobacteria* mostraram que esses microrganismos são eficientes para remoção de MCs, porém é preciso adaptá-los para serem utilizados em processos de tratamento em escala real (Sonja, 2007).



**Figura 3: Degradação de MCs pela bactéria B9 e por cinco cepas de bactérias probióticas utilizando extrato de *Microcystis* sp. contendo MCs**

## CONCLUSÕES

A bactéria *Sphingosinicella microcystinivorans* - B9 mostrou ser eficiente, sendo capaz de degradar entre 95 e 98 % das MCs presentes nos meios com concentração da ordem de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  em 96 h de incubação;

De uma maneira geral, as capacidades de degradação de MCs pelas leveduras e bactérias probióticas foram limitadas. Entre as leveduras testadas, a isolada do Vale do Ivaí (L5) apresentou o maior percentual de degradação, 37 %, após 96 h de incubação. Em relação às bactérias probióticas as maiores eficiências foram

obtidas pela cepa La-5 (P5) e pelos grãos de kefir (P4) e apresentaram 27 e 29 % de degradação de MCs respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BITTENCOURT, M. C. O. MOLICA, R. Cianobactéria Invasora, Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – Edição nº 30, 2003.
2. DEL RIO, D. T.; Biossorção de Cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertação de mestrado, Piracicaba SP – Brasil 2004
3. KRAEMER, B. PETRINI, L. J. KREIN, T. GREGOLIN, C. NEUNFELT, T. H. LOHMANN, T. R. STANGARLIN, J. R. Utilização de leveduras para controle biológico de podridão em morango. XVI EAIC 2007
4. 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, 2006.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE Portaria nº 518 publicada em 25 de março de 2004 no Diário Oficial da União - Seção 1 pg 269 ISSN 1677-7042.
6. PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.41, n.2, p.147-151 (1975).
7. SONJA, M. K. NYBOM, S. J. SALMINEM & JUSSI, A. O. MERILOUTO Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2007.
8. TSUJI, K. ASAKAWA, M. ANZAI, Y. SUMINO, T. HARADA, K. Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in a eutrophic lake. *Chemosphere*. Japan, 2006.
9. Vigilância Ambiental em Saúde. Fundação Nacional de Saúde, Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano, Brasília 2003.
10. WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, *Biotechnology Advances*, 2006.